(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2023년07월20일
(11) 등록번호 10-2557309
(24) 등록일자 2023년07월14일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 47/68 (2017.01) *A61P 31/00* (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01) *A61P 37/00* (2006.01)
(52) CPC특허분류
A61K 47/6889 (2017.08)
A61K 47/6803 (2017.08)
(21) 출원번호 10-2022-7042635(분할)
(22) 출원일자(국제) 2013년05월14일
심사청구일자 2023년01월04일
(85) 번역문제출일자 2022년12월05일
(65) 공개번호 10-2022-0166877
(43) 공개일자 2022년12월19일
(62) 원출원 특허 10-2021-7023061
원출원일자(국제) 2013년05월14일
심사청구일자 2021년08월19일
(86) 국제출원번호 PCT/US2013/040951
(87) 국제공개번호 WO 2013/173337
국제공개일자 2013년11월21일
(30) 우선권주장
61/647,373 2012년05월15일 미국(US)
(뒷면에 계속)
(56) 선행기술조사문헌
EP00446071 A2
US20100104589 A1

(73) 특허권자
씨젠 인크.
미국 98021 워싱턴주 보델 30번 드라이브 에스.이. 21823
(72) 발명자
라이온, 로버트
미국 98021 워싱턴주 보셀 써티쓰 드라이브 에스.이. - 21823
도로니나, 스베틀라나
미국 98021 워싱턴주 보셀 써티쓰 드라이브 에스.이. - 21823
보비, 티모씨
미국 98021 워싱턴주 보셀 써티쓰 드라이브 에스.이. - 21823
(74) 대리인
양영준, 김영

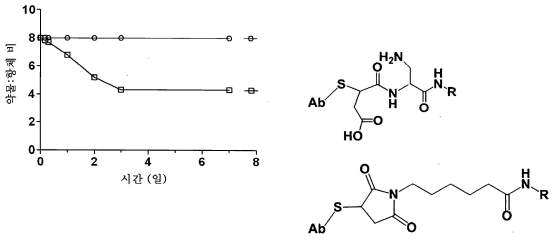
전체 청구항 수 : 총 17 항 심사관 : 이재정

(54) 발명의 명칭 **자가-안정화 링커 접합체**

(57) 요 약

본 발명은 자가-안정화 링커 조립체 구성요소를 포함하는 리간드-약물 접합체, 약물-링커, 링커 및 리간드-링커 접합체를 제공한다.

대 표 도



(52) CPC특허분류
A61K 47/6851 (2017.08)
A61P 31/00 (2018.01)
A61P 35/00 (2018.01)
A61P 37/00 (2018.01)

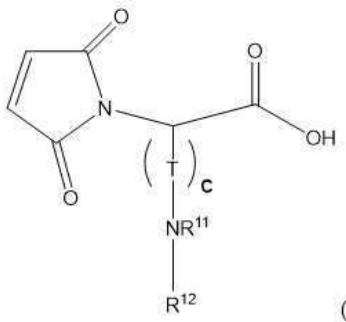
(30) 우선권주장
61/770,983 2013년02월28일 미국(US)
61/773,067 2013년03월05일 미국(US)
13/799,244 2013년03월13일 미국(US)

명 세 서

청구범위

청구항 1

화학식 (V)의 화합물 제조 방법으로서,



(V),

여기서,

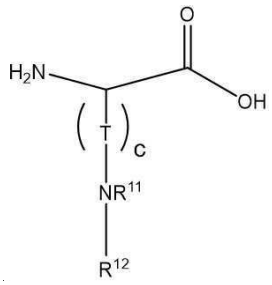
T는 -(C(R^9)(R^{10}))-이고;

R^9 및 R^{10}은 각각 독립적으로 H 또는 C_{1-3} 알킬이고;

c는 1 내지 4의 정수이고;

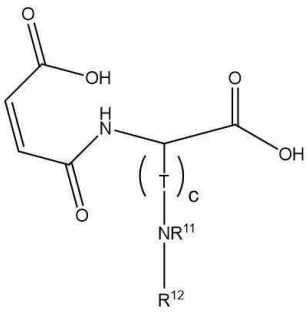
R^{11} 및 R^{12}는 각각 독립적으로 H 또는 C_{1-6} 알킬이고;

상기 방법은  의 구조로 표시되는 화합물을



의 구조로 표시되는 아민과 접촉시켜,

여기서 -(T)c-NR^{11}-R^{12}는 아민의 측쇄이고, NR^{11}-R^{12}는 아민의 측쇄 내의 염기성 기이고, -NR^{11}-R^{12}는 비보호되거나 또는 적합하게 보호되고;

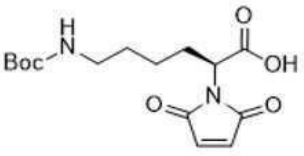


의 구조로 표시되는 말레암산을 형성하고;

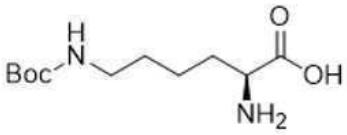
이어서 탈수고리화시켜 화학식 (V)의 화합물을 형성하는 것을 포함하는 것인, 방법.

청구항 2

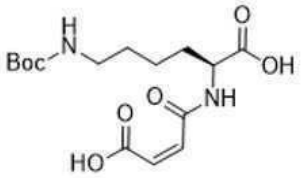
제1항에 있어서, 화학식 (V)의 화합물이 하기 화학식 (Va)의 구조로 표시되고:



(Va),



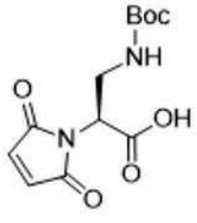
상기 방법은 의 구조로 표시되는 화합물을 말레산 무수물과 접촉시켜 하기 구조로 표시되는 말레암산을 형성하고:



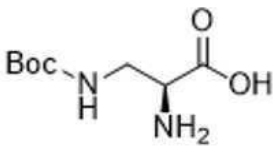
이어서 탈수고리화시켜 화학식 (Va)의 화합물을 형성하는 것을 포함하는 것인, 방법.

청구항 3

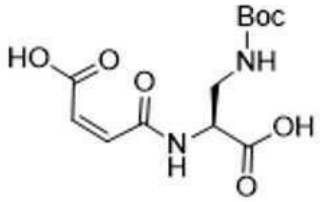
제1항에 있어서, 화학식 (V)의 화합물이 하기 화학식 (Vb)의 구조로 표시되고:



(Vb),



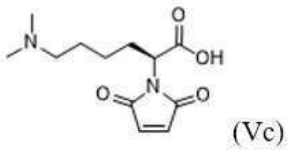
상기 방법은 의 구조로 표시되는 화합물을 말레산 무수물과 접촉시켜 하기 구조로 표시되는 말레암산을 형성하고:



이어서 탈수고리화시켜 화학식 (Vb)의 화합물을 형성하는 것을 포함하는 것인, 방법.

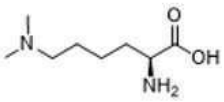
청구항 4

제1항에 있어서, 화학식 (V)의 화합물이 하기 화학식 (Vc)의 구조로 표시되고:

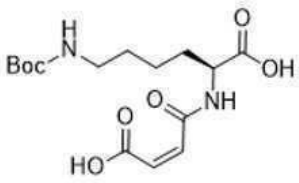


(Vc)

,



상기 방법은 의 구조로 표시되는 화합물을 말레산 무수물과 용해시켜 하기 구조로 표시되는 말레암산을 형성하고



이어서 탈수고리화시켜 화학식 (Vc)의 화합물을 형성하는 것을 포함하는 것인, 방법.

청구항 5

제1항 내지 제4항 중 어느 한 항에 있어서, 말레산 무수물과 접촉시켜 말레암산을 형성하는 것이 실온에서 일어나는 것인 방법.

청구항 6

제1항 내지 제4항 중 어느 한 항에 있어서, 말레산 무수물과 접촉시켜 말레암산을 형성하는 것이 아세트산을 포함하는 용매 중에서 일어나는 것인 방법.

청구항 7

제1항 내지 제4항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 탈수고리화가 125℃의 온도에서 일어나는 것인 방법.

청구항 8

제1항 내지 제4항 중 어느 한 항에 있어서, 탈수고리화가 톨루엔을 포함하는 용매의 존재 하에 트리에틸아민을 사용하여 일어나는 것인 방법.

청구항 9

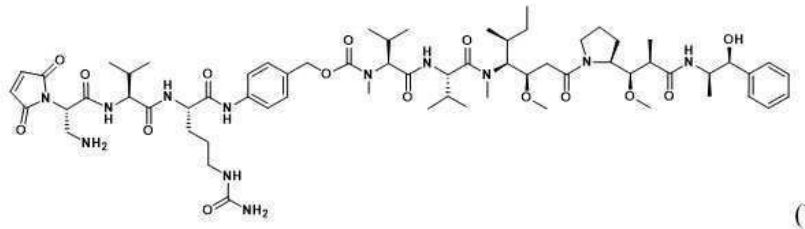
제4항에 있어서, 탈수고리화가 아세트산을 포함하는 용매의 존재 하에 일어나는 것인 방법.

청구항 10

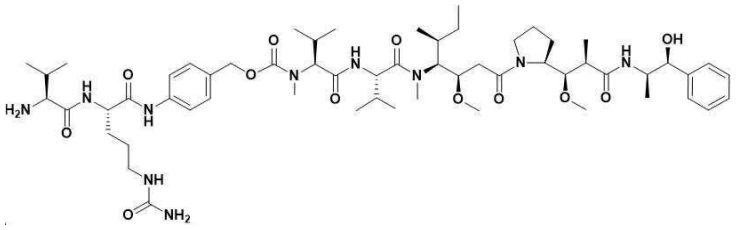
제1항에 있어서, 아민의 측쇄 내의 염기성 기가 boc에 의해 보호되는 것인 방법.

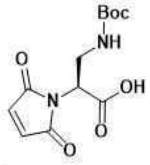
청구항 11

하기 화학식 (VI)의 구조로 표시되는 약물-링커 화합물의 제조 방법으로서:

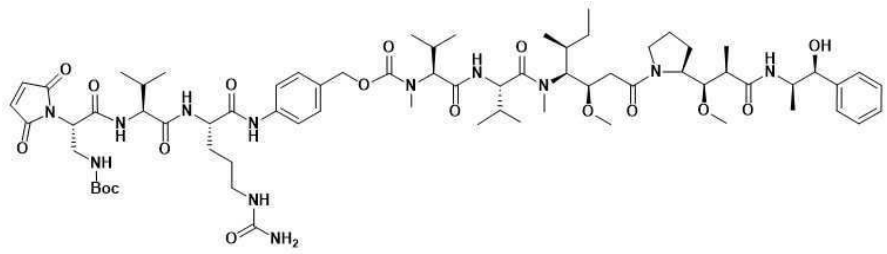


(VI),

상기 방법은  의 구조로 표시되는 화합물을



의 구조로 표시되는 화합물과 접촉시켜 하기 화학식 (VIa)의 화합물을 형성하는 것;



(VIa)

및 화학식 (VIa)의 화합물을 화학식 (VI)의 화합물로 전환시키는 것을 포함하는 것인, 방법.

청구항 12

제11항에 있어서, 화학식 (VIa)의 화합물을 화학식 (VI)의 화합물로 전환시키는 것이 화학식 (VIa)의 화합물을 트리플루오로아세트산 및 디클로로메탄을 포함하는 용매 중에 용해시키는 것을 포함하는 것인 방법.

청구항 13

제11항 또는 제12항에 있어서, 화학식 (VIa)의 화합물이 디메틸포름아미드를 포함하는 용매 중에서 형성되는 것인 방법.

청구항 14

제11항 또는 제12항에 있어서, 화학식 (VIa)의 화합물이 디이소프로필에틸아민의 존재 하에 형성되는 것인 방법.

청구항 15

제11항 또는 제12항에 있어서, 화학식 (VIa)의 화합물이 헥사플루오로포스페이트 아자벤조트리아졸 테트라메틸 우로늄의 존재 하에 형성되는 것인 방법.

청구항 16

제11항 또는 제12항에 있어서, 화학식 (VIa)의 화합물이 실온에서 형성되는 것인 방법.

청구항 17

제12항에 있어서, 화학식 (VIa)의 화합물이 실온에서 용해되는 것인 방법.

발명의 설명

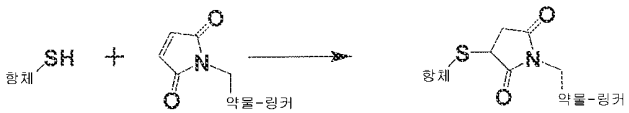
기 술 분 야

[0001] **계속성**

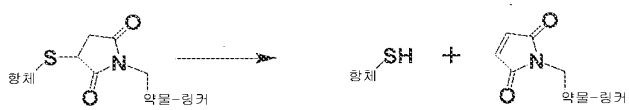
[0002] 본 출원은 2012년 5월 15일자 US 특허 가출원 제61/647,373호 및 2013년 3월 5일자 US 특허 가출원 제61/773,067호의 우선권을 주장하며, 또한 2013년 3월 13일자 US 출원 제13/799,244호의 우선권을 주장하는 바, 이들 각각은 그 전문이 모든 목적을 위해 본원에 포함된다.

배 경 기 술

[0003] 항체-약물 접합체 (ADC) 분야는 선별된 환자군의 치료에 대한 브렌툭시맙 벤도틴의 FDA 승인에 의해, 그리고 임상에서의 많은 다른 ADC들의 진전에 의해 상당한 발전을 이루었다. ADC의 링커(linker) 구성요소는 허용성이 큰 투여량에서 고도로 활성인 최적화된 치료제를 개발함에 있어서의 한가지 중요한 특징이다. 친전자성인 말레이미드 관능기는 티올 기와 반응하는 것에 대한 그의 높은 특이도 및 온건 조건하에서의 매우 빠른 티올 첨가 반응속도로 인하여 ADC의 제조에 매우 유용한 것으로 입증되어 있다.

[0004] 

[0005] 생체접합체(bioconjugate) 분야에서의 다수의 조사에 의해 알려져 있는 바와 같이, 친전자성 말레이미드 관능기와 항체의 유리 티올 사이의 반응의 티오-치환 생성물은 느리게 제거됨으로써 상기 반응을 역행할 가능성이 있다:

[0006] 

[0007] ADC의 정제된 제제에서 이와 같은 가역 반응이 발생할 경우에는, 제거 과정을 통하여 재생성되는 말레이미드와 티올이 단순히 다시 반응하여 무손상 접합체를 재형성하기 때문에, 반응이 매우 검출불가능하다. 그러나, 다른 티올이 존재하는 경우, 순수한 효과는 ADC의 항체로부터의 소정의 다른 가용한 티올로의 말레이미드의 전달일 수 있다. 이와 같은 과정이 혈장에서 발생하는 것으로 기록된 바 있는데, 이 경우 ADC의 말레이미드가 혈청 알부민의 시스테인 34로 전달된다 (문헌 [Alley et al., *Bioconjugate Chem.* 2008, 19, 759-765]). 이와 같은 과정은 ADC가 과도한 시스테인 또는 글루타티온의 존재하에 인큐베이션되는 경우에도 보고된 바 있다 (문헌 [Shen et al., *Nature Biotech*, 30(2):184-9, 2012]). 본 발명은 특히 이와 같은 전달 반응을 겪지 않는 생체접합체를 제공한다.

발명의 내용

[0008] **발명의 개요**

[0009] 본 발명은 특히 링커, 약물-링커, 리간드-약물 접합체, 리간드-링커 접합체, 리간드-기능성 작용제 접합체 및 기능성 작용제-링커, 그리고 이들의 제조 및 사용 방법을 제공한다. 상기 리간드-약물 접합체는 순환시 안정하면서도, 종양 세포 부근 또는 그 안에서 일단 방출되고 나면 세포 사멸을 야기할 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0010] 도 1은 인간 IgG1 쇄간 디술피드의 환원에 이어지는 생성 티올의 자가-안정화 링커와의 접합, 및 이후의 숙신이미드 고리의 가수분해를 도시하는 반응 개략도 (상부); 그리고 가수분해로 인한 항체 접합체의 분자량 변화를

모니터링하는 질량 분광측정법의 용도 (하부)를 제공한다.

도 2는 전기분무 질량 분광측정법에 의한 자가-안정화 항체 접합체의 숙신이미드 고리 가수분해의 시간별 추이를 도시한다. pH 7.2 및 22℃에서 말레이미도-DPR-val-cit-PAB-MMAE와의 완전히 환원된 cAC10의 접합을 수행한 다음, 표시된 시간에 샘플을 LC-MS에 의한 분석에 적용하였다 (상부). 생성되는% 가수분해 데이터를 시간에 대하여 플롯팅하고, 지수 방정식에 핏팅하여 동역학 파라미터들을 측정하였다 (하부).

도 3은 말레이미드와 염기성 기 (1급 아민) 사이의 간격을 변화시키면서 IgG1 항체 및 자가-안정화 링커를 사용하여 제조된 생체접합체의 가수분해 반응속도 프로파일을 제공한다. pH 8 및 37℃에서 접합을 수행한 다음, 즉시 질량 분광측정법에 의해 IgG1 경쇄 접합체의 가수분해를 모니터링하여, 시간의 함수로서 플롯팅하고, 지수 방정식에 핏팅하였다.

도 4는 말레이미드와 염기성 기 (1급 아민) 사이의 간격을 변화시키면서 IgG1 항체 및 자가-안정화 말레이미드 링커를 사용하여 제조된 생체접합체의 가수분해 반응속도 프로파일을 제공한다. pH 8 및 37℃에서 접합을 수행한 다음, 즉시 질량 분광측정법에 의해 IgG1 경쇄 접합체의 가수분해를 모니터링하여, 시간의 함수로서 플롯팅하고, 지수 방정식에 핏팅하였다.

도 5는 IgG1 항체 및 다양한 N-치환 말레이미드들을 사용하여 제조된 생체접합체의 가수분해 반응속도 프로파일을 제공한다. pH 7.4 및 22℃에서 접합을 수행한 다음, 즉시 질량 분광측정법에 의해 IgG1 경쇄 접합체의 가수분해를 모니터링하여, 시간의 함수로서 플롯팅하고, 지수 방정식에 핏팅하였다. 말레이미도-카프로일 접합체 (하부 구조)의 가수분해는 이러한 조건하에서 24시간 이내에 소정의 검출가능한 가수분해를 산출하기에는 너무 느리다. 카르복스아미드 전자 끄는 기 (EWG) 또는 1급 아민 (염기)의 존재는 가수분해를 촉진하며, 상기 2개의 조합 (상부 구조)은 이러한 온건한 조건하에서 20분 미만의 반감기로 가수분해되는 접합체로 이어진다.

도 6은 α-디아미노프로피온산 (α-DPR, 빈 원) 및 β-디아미노프로피온산 (β-DPR, 채워진 원)을 사용하여 제조된 자가-안정화 말레이미도 약물-링커의 가수분해 반응속도 프로파일을 제공한다. 서로 이성질체임에도 불구하고, 숙신이미드에 대비한 염기성 아미노기 및 전자 끄는 카르복스아미드의 위치지정이 숙신이미드 가수분해 속도에 있어서의 17-배 차이를 초래한다.

도 7은 과량의 티올을 함유하는 완충제 중에서 인큐베이션될 때의 자가-안정화 말레이미도-DPR 약물-링커를 사용하여 제조된 ADC 대 말레이미도-카프로일 약물 링커를 사용하여 제조된 것에 있어서의 시간 경과에 따른 약물 로딩량의 변화를 도시한다. 인큐베이션 후 시간 0 및 시간 14일에서의 2종 ADC의 역상 크로마토그램을 상부 패널에 나타내었다. 크로마토그래피 피크 지명 L0, L1, H0, H1, H2 및 H3은 각각 비접합 경쇄, 1개의 약물을 갖는 경쇄, 비접합 중쇄, 및 1, 2 또는 3개의 약물을 갖는 중쇄에 해당한다. 말레이미도-카프로일 약물 링커를 사용하여 제조된 것 (빈 정사각형)에 대비하여, 자가-안정화 말레이미도-DPR 약물-링커는 빈 원으로 표시하였다. 자가-안정화 약물-링커의 경우 (빈 원) 약물 로딩량이 항체 당 8개로 일정하게 유지되었으나, 말레이미도-카프로일 약물 링커의 경우 (빈 정사각형) 14일 동안 항체 당 4개 약물로 떨어짐으로써 말레이미드 제거에 의한 약물 상실을 반영하였다.

도 8은 래트 혈장에서 37℃로 인큐베이션될 때의 자가-안정화 말레이미도-DPR 약물-링커 및 말레이미도-카프로일 약물 링커를 사용하여 제조된 ADC에 있어서의 시간 경과에 따른 약물 로딩량의 변화를 도시한다 (R=val-cit-PAB-MMAE). 각 시점에서의 ADC 샘플을 Ig셀렉트 친화성 수지에 의해 정제한 후, ADC의 역상 HPLC 분석에 의해 그의 약물 로딩량을 평가하였다.

도 9는 래트 (빈 기호) 또는 인간 (채워진 기호) 혈장에서의 인큐베이션 동안의 말레이미도-카프로일 약물 링커 (정사각형) 또는 자가-안정화 말레이미드 링커 (원)를 통하여 항체에 접합된 약물의 안정성 프로파일을 제공한다 (R=val-cit-PAB-MMAE). 각 시점에 단백질 A 친화성 수지 상에 ADC를 포획하고, 그의 프로테아제-절단가능 링커를 통하여 효소적으로 약물을 방출시켰다. 다음에, 방출된 약물을 LC-MS/MS에 의해 정량하고, 개시 값에 대하여 표준화하였다. 각 시점은 t0에서 관찰되었던 접합된 약물의 %를 반영한다.

도 10은 자가-안정화 말레이미도-DPR 약물-링커 및 말레이미도-카프로일 약물 링커를 사용하여 제조된 ADC에 있어서의 생체내 (래트) 약물 로딩량의 감소를 도시한다 (R=val-cit-PAB-MMAE). ADC를 i.v.로 투여하고, 각 시점에서의 혈장 샘플을 Ig셀렉트 친화성 수지에 의해 정제한 후, ADC의 역상 HPLC 분석에 의해 그의 약물 로딩량을 평가하였다.

도 11은 ALCL (카르파스-299 세포주)의 뮤린 이종이식편 모델에서의 ADC의 항종양 활성을 도시한다. 항-CD30 항체 cAC10, 및 말레이미도-카프로일 기 (폐쇄된 원) 또는 자가-안정화 말레이미도-DPR 기 (빈 원) 중 어느 하

나를 통하여 항체에 연결된 val-cit-PAB-MMAE 세포독성 탑재물을 포함하는 약물-링커를 사용하여 ADC를 제조하였다. 종양을 대략 250 mm^3의 부피에 도달시킨 후, 1 mg/kg으로 매주 3회 투여 동안 투여하였다 (투여 군 당 6마리의 마우스). 자가-안정화 ADC 투여군은 6마리 동물 모두에서 완전한 반응 (검출가능한 종양 없음)을 경험하였으며, 5마리의 동물은 지속적인 퇴화를 경험한 반면, 말레이미도-카프로일 ADC는 완전한 반응을 경험하지 못하였다.

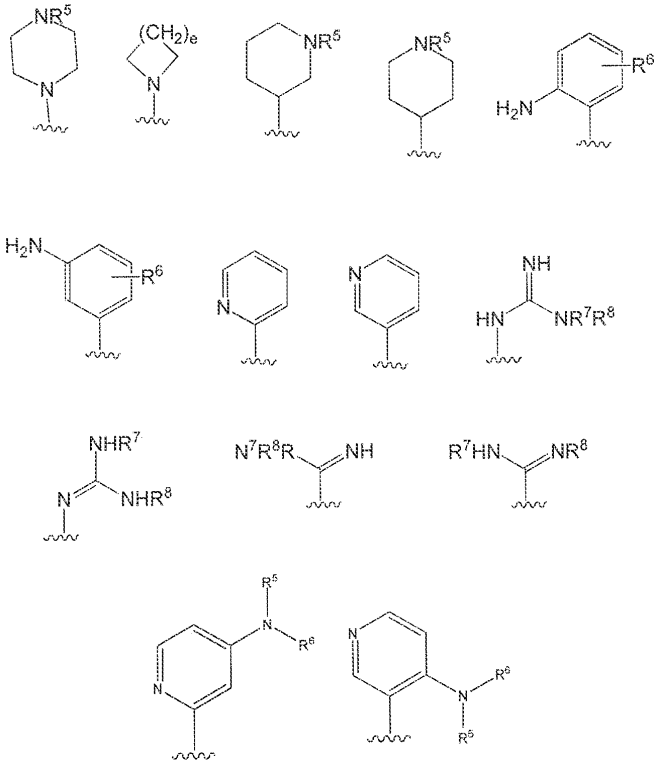
발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0011] **약어 및 정의**

[0012] 다르게 설명되지 않는 한, 본원에서 사용될 때의 하기 용어 및 구들은 하기하는 의미를 갖는 것으로 한다. 본원에서 상표명이 사용되는 경우, 문맥상 다르게 표시되지 않는 한, 그 상표명에는 상표명 제품의 제품 제제, 일반적인 약물 및 활성 제약 성분(들)이 포함된다.

[0013] "전자 끄는 기"라는 용어는 전자를 반응 중심으로부터 떼어 끌어당기는 관능기를 지칭한다. 예시적인 전자 끄는 기에는 -C(=O), -CN, $-NO_2$, $-CX_3$, -X, -COOR, $-CONR_2$, -COR, -COX, $-SO_2R$, $-SO_2OR$, $-SO_2NHR$, $-SO_2NR_2$, $-PO_3R_2$, $-P(O)(CH_3)NHR$, NO, $-NR_3^+$, $-CR=CR_2$ 및 -C≡CR이 포함되나, 이에 제한되는 것은 아니며, 여기서 X는 F, Br, Cl 또는 I이고, R은 각 경우에 수소 및 C_{1-6} 알킬로 이루어진 군으로부터 독립적으로 선택된다. 예시적인 전자 끄는 기에는 또한 아릴 기 (예컨대 페닐) 및 소정의 헤테로아릴 기 (예컨대 피리딘)가 포함될 수 있다. "전자 끄는 기"라는 용어에는 전자 끄는 기에 의해 추가로 치환된 아릴 또는 헤테로아릴이 포함된다. 바람직한 전자 끄는 기는 -C(=O), -CN, $-NO_2$, $-CX_3$ 및 -X이다.

[0014] "염기"라는 용어는 물을 탈양성자화시켜 히드록시드 이온을 생성시키는 관능기를 지칭한다. 예시적인 염기는 아민 및 질소 함유 헤테로사이클이다. 대표적인 염기에는 $-N(R^3)(R^4)$ (여기서 R^3 및 R^4는 H 또는 C_{1-6} 알킬, 바람직하게는 H 또는 메틸로부터 독립적으로 선택됨),

[0015] 

[0016] (상기 식에서, R^5, R^6, R^7 및 R^8은 각 경우에 수소 또는 C_{1-6} 알킬, 바람직하게는 H 또는 메틸로부터 독립적으로 선택되며, e는 0-4임)가 포함된다. 일부 측면에서, 염기는 질소계 염기이다.

[0017] "항체"라는 용어는 본원에서 광범위한 의미로 사용되는데, 구체적으로 무손상 모노클로날 항체, 폴리클로날 항

체, 단일특이성 항체, 다중특이성 항체 (예컨대 2특이성 항체), 및 원하는 생물학적 활성을 나타내는 항체 단편을 포괄한다. 무손상 항체는 본질적으로 하기 2개의 영역을 가진다: 가변 영역 및 불변 영역. 가변 영역은 표적 항원에 결합하여 그와 상호작용한다. 가변 영역에는 특정 항원 상의 특정 결합 부위를 인식하여 그에 결합하는 상보성 결정 영역 (CDR)이 포함된다. 불변 영역은 면역 시스템에 의해 인식되고 그와 상호작용할 수 있다 (예를 들면 문헌 [Janeway *et al.*, 2001, *Immuno. Biology, 5th Ed.*, Garland Publishing, New York] 참조). 항체는 모든 유형 (예컨대 IgG, IgE, IgM, IgD 및 IgA), 부류 (예컨대 IgG1, IgG2, lgG3, IgG4, IgA1 및 IgA2) 또는 하위부류의 것일 수 있다. 항체는 모든 적합한 종으로부터 유래할 수 있다. 일부 실시양태에서, 항체는 인간 또는 뮤린(murine) 기원의 것이다. 항체는 예를 들면 인간의 것, 인간화된 것 또는 키메라일 수 있다.

[0018] 본원에서 사용될 때의 "모노클로날 항체"라는 용어는 실질적으로 균질한 항체의 군집으로부터 수득되는 항체를 지칭하는데, 다시 말하자면 군집을 구성하는 개별 항체들이 미미한 양으로 존재할 수 있는 잠재적 자연-발생 돌연변이 이외에는 동일하다. 단일 항원 부위에 대하여 유도되므로, 모노클로날 항체는 고도로 특이성이다. 수식어 "모노클로날"은 실질적으로 균질한 항체 군집으로부터 수득될 때의 항체의 특징을 표시하는 것으로써, 어떠한 특별한 방법에 의한 항체의 생성을 필요로 하는 것으로 간주되어서는 아니 된다.

[0019] "무손상 항체"는 항체 종류에 해당하는 항원-결합 가변 영역은 물론, 경쇄 불변 도메인 (C_L) 및 중쇄 불변 도메인인 C_H1, C_H2, C_H3 및 C_H4를 포함하는 것이다. 불변 도메인은 자연 서열의 불변 도메인 (예컨대 인간 자연 서열 불변 도메인) 또는 그의 아미노산 서열 변이체일 수 있다.

[0020] "항체 단편"은 해당 항원-결합 또는 가변 영역을 포함하는 무손상 항체의 일부를 포함한다. 항체 단편의 예에는 Fab, Fab', $F(ab')_2$ 및 Fv 단편, 디아바디, 트리아바디, 테트라바디, 선형 항체, 단일-쇄 항체 분자, scFv, scFv-Fc, 항체 단편(들)로부터 형성되는 다중특이성 항체 단편, Fab 발현 라이브러리에 의해 생성되는 단편(들), 또는 표적 항원 (예컨대 암 세포 항원, 바이러스 항원 또는 미생물 항원)에 면역특이적으로 결합하는 상기 중 어느 것의 항원결정인자-결합 단편이 포함된다.

[0021] "항원"은 항체가 특이적으로 결합하는 것이다.

[0022] "특이적으로 결합하는" 및 "특이적으로 결합하다"라는 용어는 항체 또는 항체 유도체가 그의 해당 표적 항원과는 고도로 선택적인 방식으로 결합하며, 다수의 다른 항원과는 그렇지 않게 됨을 의미한다. 통상적으로, 항체 또는 항체 유도체는 약 1×10^{-7} M 이상, 바람직하게는 10^{-8} M 내지 10^{-9} M, 10^{-10} M, 10^{-11} M 또는 10^{-12} M의 친화성으로 결합하는데, 예정된 항원에는 예정된 항원 또는 밀접하게 관련된 항원이 아닌 다른 비-특이적 항원 (예컨대 BSA, 카세인)에의 결합에 대한 그의 친화성에 비해 2-배 이상 더 큰 친화성으로 결합한다.

[0023] "억제하다" 또는 "~의 억제"라는 용어는 측정가능한 양까지 감소시키는 것, 또는 완전히 방지하는 것을 의미한다.

[0024] "치료 유효량"이라는 용어는 포유동물에서 질환 또는 장애를 치료하는 데에 효과적인 약물의 양을 지칭한다. 암의 경우, 약물의 치료 유효량은 암 세포의 수를 감소시키거나; 종양 크기를 감소시키거나; 주변 기관으로의 암 세포 침윤을 억제하거나 (즉 어느 정도까지 늦추고 바람직하게는 중지시키거나); 종양 전이를 억제하거나 (즉 어느 정도까지 늦추고 바람직하게는 중지시키거나); 종양 성장을 어느 정도까지 억제하거나; 및/또는 암과 연관되어 있는 증상들 중 1종 이상을 어느 정도까지 경감할 수 있다. 약물이 기존 암 세포의 성장을 억제하거나 및/또는 그것을 사멸시킬 수 있는 정도까지, 그것은 세포억제성 및/또는 세포독성일 수 있다. 암 치료법의 경우, 효능은 예를 들면 질환 진행까지의 시간 (TTP)을 평가하는 것, 및/또는 반응율 (RR)을 측정하는 것에 의해 측정될 수 있다.

[0025] "실질적인" 또는 "실질적으로"라는 용어는 과반수, 즉 혼합물 또는 샘플 군집의 > 50%, 바람직하게는 군집의 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99% 초과를 지칭한다.

[0026] "세포내에서 절단된" 및 "세포내 절단"이라는 용어는 그에 의해 약물 모이어티 (D)와 리간드 단위 (예컨대 항체 (Ab)) 사이의 공유 결합물, 예컨대 링커가 파괴됨으로써 유리 약물, 또는 세포 내부에서 항체로부터 분리되는 접합체의 기타 대사물이 생성되는, 리간드 약물 접합체 (예컨대 항체 약물 접합체 (ADC) 등)에 대한 세포 내부에서의 대사 과정 또는 반응을 지칭한다. 따라서, 약물-링커-리간드 접합체의 절단된 모이어티는 세포내 대사물이다.

[0027] "세포독성 활성"이라는 용어는 약물-링커-리간드 접합체 화합물 또는 약물-링커-리간드 접합체의 세포내 대사물의 세포-사멸, 세포억제 또는 항-증식 효과를 지칭한다. 세포독성 활성은 세포의 절반이 생존하는 단위 부피당 농도 (몰 또는 질량 기준)인 IC_{50} 값으로 표현될 수 있다.

[0028] 본원에서 사용될 때의 "세포독성 작용제"라는 용어는 세포를 억제하거나 그의 기능을 억제하고/거나 세포의 파괴를 야기하는 물질을 지칭한다. 상기 용어에는 방사성 동위원소 (예컨대 ^{211}At, ^{131}I, ^{125}I, ^{90}Y, ^{186}Re, ^{188}Re, ^{153}Sm, ^{212}Bi, ^{32}P, ^{60}C, 그리고 Lu의 방사성 동위원소들), 화학치료제, 및 독소 예컨대 해당 합성 유사체 및 유도체를 포함한 세균, 진균, 식물 또는 동물 기원의 소형 분자 독소 또는 효소 활성 독소가 포함되는 것으로 한다.

[0029] "암" 및 "암성"이라는 용어는 통상적으로 조절되지 않는 세포 성장을 특징으로 하는 포유동물에서의 생리학적 이상 또는 장애를 지칭 또는 기술한다. "종양"은 1종 이상의 암성 세포를 포함한다.

[0030] 본원에서, "자가면역 질환"은 개체 자신의 조직 또는 단백질로부터 발생하고 그에 대하여 야기되는 질환 또는 장애이다.

[0031] "환자"의 예에는 인간, 래트, 마우스, 기니 피그, 원숭이, 돼지, 염소, 소, 말, 개, 고양이, 새 및 가금이 포함되나, 이에 제한되는 것은 아니다. 예시적인 실시양태에서, 환자는 인간이다.

[0032] 문맥상 다르게 표시되지 않는 한, "치료하다" 또는 "치료"라는 용어는 치료적 치료 및 재발을 방지하기 위한 예방적 수단을 지칭하는데, 그 목적은 암의 발병 또는 확산과 같은 원치 않는 생리학적 변화 또는 장애를 억제하거나 늦추는 (경감하는) 것이다. 본 발명의 목적상, 유익하거나 원하는 임상적 결과에는 검출가능한지 또는 검출불가능한지에 관계없이, 증상의 완화, 질환 정도의 축소, 질환의 안정화된 (즉 악화되지 않는) 상태, 질환 진행의 지연 또는 늦춤, 질환 상태의 개선 또는 경감, 및 회복 (부분적인지 또는 전체적인지에 관계없이)이 포함되나, 이에 제한되는 것은 아니다. "치료"는 치료를 받지 않는 경우 예상되는 생존과 비교하였을 때의 생존 연장을 의미할 수도 있다. 치료를 필요로 하는 대상에는 이미 이상 또는 장애를 가지고 있는 대상은 물론, 이상 또는 장애를 가지기 쉬운 대상도 포함된다.

[0033] 암의 맥락에서, "치료하는 것"이라는 용어에는 하기 중 어느 것 또는 전체가 포함된다: 종양 세포, 암 세포 또는 종양의 성장을 억제하는 것; 종양 세포 또는 암 세포의 복제를 억제하는 것; 전체적인 종양 부하를 감소시키거나 암성 세포의 수를 감소시키는 것; 및 질환과 연관된 1종 이상의 증상을 개선하는 것.

[0034] 자가면역 질환의 맥락에서, "치료하는 것"이라는 용어에는 하기 중 어느 것 또는 전체가 포함된다: 비제한적으로 자가면역 항체를 생성하는 세포를 포함하여 자가면역 질환 상태와 연관되어 있는 세포의 복제를 억제하는 것, 자가면역-항체 부하를 감소시키는 것, 및 자가면역 질환의 1종 이상 증상을 개선하는 것.

[0035] 본원에서 사용될 때, "검출 단위"라는 용어는 검출가능한 신호를 생성하거나 생성하도록 유도될 수 있는 소정의 분자를 지칭한다. 영상화 장비에 의해 검출될 수 있는 리포터 분자를 갖는 검출 단위에는 방사성, 상자성, 형광 또는 방사선비투과 화학 물질이 포함되나, 이에 제한되는 것은 아니다. 일부 실시양태에서, 검출 단위는 방사성 화합물, 화학발광제, 형광제 또는 색소원일 수 있다. 일부 실시양태에서, 검출 단위는 형광단과 같은 형광 분자일 수 있다.

[0036] 본원에서 사용될 때, "안정성 단위"라는 용어는 환자에게 투여되었을 때 예를 들면 리간드의 전신적인 보유를 증가시키는 것에 의해 접합체의 안정성을 촉진하는 화합물을 지칭한다. 안정성 단위는 접합체의 수용성을 증가시킬 수도 있다. 예시적인 안정성 단위는 폴리에틸렌 글리콜이다.

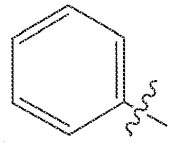
[0037] 본원에서 사용될 때, "제약상 허용되는 염"이라는 구는 화합물 (예컨대 약물, 약물-링커 또는 리간드-약물 접합체)의 제약상 허용되는 유기 또는 무기 염을 지칭한다. 화합물은 1개 이상의 아미노 기를 포함할 수 있으며, 그에 따라 아미노 기와의 산 첨가 염이 형성될 수 있다. 예시적인 염에는 술페이트, 트리플루오로아세테이트, 시트레이트, 아세테이트, 옥살레이트, 클로라이드, 브로마이드, 아이오다이드, 니트레이트, 비술페이트, 포스페이트, 산 포스페이트, 이소니코티네이트, 락테이트, 살리실레이트, 산 시트레이트, 타르트레이트, 올레에이트, 탄네이트, 판토테네이트, 비타르트레이트, 아스코르베이트, 숙시네이트, 말레에이트, 겐티시네이트, 푸마레이트, 글루코네이트, 글루쿠로네이트, 사카레이트, 포르메이트, 벤조에이트, 글루타메이트, 메탄술포네이트, 에탄술포네이트, 벤젠술포네이트, *p*-톨루엔술포네이트 및 파모에이트 (즉 1,1'-메틸렌-비스-(2-히드록시-3-나프토에이트)) 염이 포함되나, 이에 제한되는 것은 아니다. 제약상 허용되는 염은 아세테이트 이온, 숙시네이트 이온 또는 다른 반대이온과 같은 또 다른 분자의 포함과 연관될 수 있다. 반대이온은 모 화합물 상의 변화

를 안정화하는 모든 유기 또는 무기 모이어티일 수 있다. 또한, 제약상 허용되는 염은 그의 구조 중에 1개를 초과하는 하전된 원자를 가질 수 있다. 다중 하전 원자가 제약상 허용되는 염의 일부인 경우, 다수의 반대이온을 가질 수 있다. 따라서, 제약상 허용되는 염은 1개 이상의 하전된 원자 및/또는 1개 이상의 반대이온을 가질 수 있다.

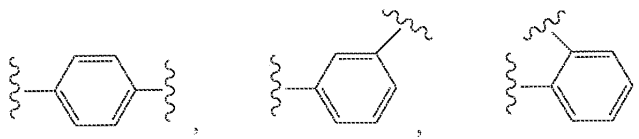
[0038] 다르게 표시되지 않는 한, 그 자체 또는 또 다른 용어의 일부로서의 "알킬"이라는 용어는 표시되는 수의 탄소 원자를 갖는 치환되거나 치환되지 않은 직쇄형 또는 분지형의 포화 또는 불포화 탄화수소를 지칭한다 (예를 들어 "-C_1-C_8 알킬" 또는 "-C_1-C_{10}" 알킬은 각각 1 내지 8개 또는 1 내지 10개의 탄소 원자를 갖는 알킬 기를 지칭함). 탄소 원자의 수가 표시되지 않는 경우, 알킬 기는 1 내지 8개의 탄소 원자를 가진다. 대표적인 직쇄형 "-C_1-C_8 알킬" 기에는 비제한적으로 -메틸, -에틸, -n-프로필, -n-부틸, -n-펜틸, -n-헥실, -n-헵틸 및 -n-옥틸이 포함되는 반면; 분지형 -C_1-C_8 알킬에는 비제한적으로 -이소프로필, -*sec*-부틸, -이소부틸, -*tert*-부틸, -이소펜틸 및 -2-메틸부틸이 포함되며; 불포화 -C_2-C_8 알킬에는 비제한적으로 -비닐, -알릴, -1-부테닐, -2-부테닐, -이소부틸레닐, -1-펜테닐, -2-펜테닐, -3-메틸-1-부테닐, -2-메틸-2-부테닐, -2,3-디메틸-2-부테닐, -1-헥실, -2-헥실, -3-헥실, -아세틸레닐, -프로피닐, -1-부티닐, -2-부티닐, -1-펜티닐, -2-펜티닐 및 -3-메틸-1-부티닐이 포함된다. 일부 실시양태에서, 알킬 기는 치환되지 않는다. 알킬 기는 1개 이상의 기에 의해 치환될 수 있다. 일부 측면에서, 알킬 기는 포화될 수 있다.

[0039] 다르게 표시되지 않는 한, 그 자체 또는 또 다른 용어의 일부로서의 "알킬렌"은 언급되는 수의 탄소 원자, 통상적으로는 1-10개의 탄소 원자를 가지며, 모 알칸의 동일하거나 2개의 서로 다른 탄소 원자로부터의 2개 수소 원자의 제거에 의해 유도되는 2개의 1가 라디칼 중심을 갖는, 치환되거나 치환되지 않은 포화의 분지형 또는 직쇄형 또는 시클릭 탄화수소 라디칼을 지칭한다. 통상적인 알킬렌 라디칼에는 하기가 포함되나, 이에 제한되는 것은 아니다: 메틸렌 (-CH_2-), 1,2-에틸 (-CH_2CH_2-), 1,3-프로필 (-$CH_2CH_2CH_2$-), 1,4-부틸 (-$CH_2CH_2CH_2CH_2$-) 등. 바람직한 측면에서, 알킬렌은 분지형 또는 직쇄형 탄화수소이다 (즉 시클릭 탄화수소가 아님).

[0040] 다르게 표시되지 않는 한, 그 자체 또는 또 다른 용어의 일부로서의 "아릴"은 모 방향족 고리 시스템의 단일 탄소 원자로부터의 1개 수소 원자의 제거에 의해 유도되는 6-20개 탄소 원자의 치환되거나 치환되지 않은 1가 카르보시클릭 방향족 탄화수소 라디칼을 의미한다. 일부 아릴 기는 예시적인 구조에서 "Ar"로 나타내어진다. 통상적인 아릴 기에는 벤젠, 치환 벤젠, 나프탈렌, 안트라센, 비페닐 등으로부터 유래하는 라디칼들이 포함되나, 이에 제한되는 것은 아니다. 예시적인 아릴 기는 하기와 같은 페닐 기이다:

[0041] 

[0042] 다르게 표시되지 않는 한, 그 자체 또는 또 다른 용어의 일부로서의 "아릴렌"은 2개의 공유 결합을 가지며 (즉 2가이며), 예시적인 기로서의 페닐로써 하기 구조에 나타낸 바와 같은 오르소, 메타 또는 파라 배열구조일 수 있는, 상기 정의된 바와 같은 아릴 기이다:

[0043] 

[0044] 다르게 표시되지 않는 한, 그 자체 또는 또 다른 용어의 일부로서의 "C_3-C_8 헤테로사이클"은 3 내지 8개의 탄소 원자 (고리 구성원으로도 지칭됨) 및 N, O, P 또는 S로부터 독립적으로 선택되는 1 내지 4개의 헤테로원자 고리 구성원을 가지며, 모 고리 시스템의 고리 원자로부터의 1개 수소 원자의 제거에 의해 유도되는 1가의 치환되거나 치환되지 않은 방향족 또는 비-방향족 모노시클릭 또는 비시클릭 고리 시스템을 지칭한다. 헤테로사이클의 1개 이상의 N, C 또는 S 원자는 산화될 수 있다. 헤테로원자를 포함하는 고리는 방향족 또는 비방향족일 수 있다. 다르게 표시되는 않는 한, 헤테로사이클은 임의의 헤테로원자, 또는 안정한 구조를 초래하는 탄소 원자에서 그의 현수 기에 결합되어 있다. C_3-C_8 헤테로사이클의 대표적인 예에는 피롤리디닐, 아제티디닐, 피페리디닐, 모르폴리닐, 테트라히드로푸라닐, 테트라히드로피라닐, 벤조푸라닐, 벤조티오펜, 인돌릴, 벤조피라졸릴, 피롤릴, 티오페닐 (티오펜), 푸라닐, 티아졸릴, 이미다졸릴, 피라졸릴, 피리미디닐, 피리디닐, 피라지닐,

피리다지닐, 이소티아졸릴 및 이속사졸릴이 포함되나, 이에 제한되는 것은 아니다. "C_3-C_8 헤테로아릴"은 방향족 C_3-C_8 헤테로사이클이다.

[0045] 다르게 표시되지 않는 한, 그 자체 또는 또 다른 용어의 일부로서의 "C_3-C_8 헤테로시클로"는 헤테로사이클 기의 수소 원자들 중 1개가 결합으로 대체되어 있는 (즉 2가인) 상기 정의된 C_3-C_8 헤테로사이클 기를 지칭한다. 그 자체 또는 또 다른 용어의 일부로서의 "C_3-C_8 헤테로아릴렌"은 헤테로아릴 기의 수소 원자들 중 1개가 결합으로 대체되어 있는 (즉 2가인) 상기 정의된 C_3-C_8 헤테로아릴 기를 지칭한다.

[0046] 다르게 표시되지 않는 한, 그 자체 또는 또 다른 용어의 일부로서의 "C_3-C_8 카르보사이클"은 모 고리 시스템의 고리 원자로부터의 1개 수소 원자의 제거에 의해 유도되는 3-, 4-, 5-, 6-, 7- 또는 8-원의 1가이며 치환되거나 치환되지 않은 포화 또는 불포화의 비-방향족 모노시클릭 또는 비시클릭 카르보시클릭 고리이다. 대표적인 -C_3-C_8 카르보사이클에는 시클로프로필, 시클로부틸, 시클로펜틸, 시클로펜타디에닐, 시클로헥실, 시클로헥세닐, 1,3-시클로헥사디에닐, 1,4-시클로헥사디에닐, 시클로헵틸, 1,3-시클로헵타디에닐, 1,3,5-시클로헵타트리에닐, 시클로옥틸 및 시클로옥타디에닐이 포함되나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0047] 다르게 표시되지 않는 한, 그 자체 또는 또 다른 용어의 일부로서의 "C_3-C_8 카르보시클로"는 카르보사이클 기의 수소 원자들 중 또 다른 것이 결합으로 대체되어 있는 (즉 2가인) 상기 정의된 C_3-C_8 카르보사이클 기를 지칭한다.

[0048] 다르게 표시되지 않는 한, 그 자체 또는 또 다른 용어와의 조합으로써의 "헤테로알킬"이라는 용어는 완전히 포화되거나 1 내지 3의 불포화도를 포함하며, 언급되는 수의 탄소 원자, 및 O, N, Si 및 S로 이루어진 군으로부터 선택되는 1 내지 10개, 바람직하게는 1 내지 3개의 헤테로원자로 구성되며, 여기서 질소 및 황 원자는 임의로 산화될 수 있으며, 질소 헤테로원자는 임의로 4급화될 수 있는, 안정한 직쇄 또는 분지쇄 탄화수소 또는 그의 조합을 의미한다. 헤테로원자(들) O, N 및 S는 헤테로알킬 기의 임의의 내부 위치, 또는 알킬 기가 분자의 나머지에 결합되는 위치에 위치될 수 있다. 헤테로원자 Si는 알킬 기가 분자의 나머지에 결합되는 위치를 포함하여 헤테로알킬 기의 어떠한 위치에도 위치될 수 있다. 그 예에는 $-CH_2-CH_2-O-CH_3$, $-CH_2-CH_2-NH-CH_3$, $-CH_2-CH_2-N(CH_3)-CH_3$, $-CH_2-S-CH_2-CH_3$, $-CH_2-CH_2-S(O)-CH_3$, $-NH-CH_2-CH_2-NH-C(O)-CH_2-CH_3$, $-CH_2-CH_2-S(O)_2-CH_3$, $-CH=CH-O-CH_3$, $-Si(CH_3)_3$, $-CH_2-CH=N-O-CH_3$ 및 $-CH=CH-N(CH_3)-CH_3$가 포함된다. 예를 들면 $-CH_2-NH-OCH_3$ 및 $-CH_2-O-Si(CH_3)_3$와 같이, 2개까지의 헤테로원자가 연속될 수 있다. 바람직한 실시양태에서, C_1 내지 C_4 헤테로알킬 또는 헤테로알킬렌은 1 내지 4개의 탄소 원자 및 1 또는 2개의 헤테로원자를 가지며, C_1 내지 C_3 헤테로알킬 또는 헤테로알킬렌은 1 내지 3개의 탄소 원자 및 1 또는 2개의 헤테로원자를 가진다. 일부 측면에서, 헤테로알킬 또는 헤테로알킬렌은 포화된다.

[0049] 다르게 표시되지 않는 한, 그 자체 또는 또 다른 치환기의 일부로서의 "헤테로알킬렌"이라는 용어는 $-CH_2-CH_2-S-CH_2-CH_2-$ 및 $-CH_2-S-CH_2-CH_2-NH-CH_2-$로 예시되는 바와 같은 헤테로알킬 (상기에서 논의된 바와 같음)로부터 유래하는 2가의 기를 의미한다. 헤테로알킬렌 기의 경우, 헤테로원자가 쇄 말단들 중 어느 하나 또는 모두를 차지할 수 있다. 거기에 더하여, 알킬렌 및 헤테로알킬렌 연결 기의 경우, 연결 기의 방향성을 내포하지 않는다.

[0050] "치환된 알킬" 및 "치환된 아릴"은 각각 1개 이상의 수소 원자가 각각 독립적으로 치환기에 의해 치환되어 있는 알킬 및 아릴을 의미한다. 통상적인 치환기에는 -X, -R, $-O^-$, -OR, -SR, $-S^-$, $-NR_2$, $-NR_3$, =NR, $-CX_3$, -CN, -OCN, -SCN, -N=C=O, -NCS, -NO, $-NO_2$, $=N_2$, $-N_3$, -NRC(=O)R, -C(=O)R, $-C(=O)NR_2$, $-SO_3^-$, $-SO_3H$, $-S(=O)_2R$; $-OS(=O)_2OR$, $-S(=O)_2NR$, -S(=O)R, $-OP(=O)(OR)_2$, $-P(=O)(OR)_2$, $-PO_3^-$, $-PO_3H_2$, $-AsO_2H_2$, -C(=O)R, -C(=O)X, -C(=S)R, $-CO_2R$, $-CO_2^-$, -C(=S)OR, -C(=O)SR, -C(=S)SR, $-C(=O)NR_2$, $-C(=S)NR_2$ 또는 $-C(=NR)NR_2$가 포함되나, 이에 제한되는 것은 아니며, 여기서 각 X는 독립적으로 할로겐 -F, -Cl, -Br 또는 -I이고; 각 R은 독립적으로 -H, $-C_1$-C_{20} 알킬, $-C_6$-C_{20} 아릴, $-C_3$-C_{14} 헤테로사이클, 보호 기 또는 전구약물 모이어티이다. 상기한 바와 같은 알킬렌, 카르보사이클, 카르보시클로, 아릴렌, 헤테로알킬, 헤테로알킬렌, 헤테로사이클, 헤테로시클로, 헤테로아

릴 및 헤테로아릴렌 기들 역시 유사하게 치환될 수 있다.

[0051] RG는 링커 단위 (즉 A, W, Y) 또는 약물 단위 D 중 어느 하나의 구성요소와 결합을 형성할 수 있는 반응성 부위 (RS)를 포함하는 반응성 기이다. RS는 반응성 기 (RG) 내의 반응성 부위이다. 반응성 기에는 디술피드 결합 또는 티오에테르 결합을 형성하는 술피드릴 기, 히드라존 결합을 형성하는 알데히드, 케톤 또는 히드라진 기, 펩티드 결합을 형성하는 카르복실 또는 아미노 기, 에스테르 결합을 형성하는 카르복실 또는 히드록시 기, 술폰아미드 결합을 형성하는 술폰산, 카르바메이트 결합을 형성하는 알콜, 및 술폰아미드 결합 또는 카르바메이트 결합을 형성하는 아민이 포함된다. 하기 표는 반응성 기, 반응성 부위, 그리고 반응성 부위의 반응 후 형성될 수 있는 예시적인 관능기의 예시이다. 표로써 제한되는 것은 아니다. 업계 숙련자라면, 표에 나타낸 R' 및 R" 부분이 RG를 예시적인 관능기들 중 하나로 전환함에 있어서 제공되는 결합 형성과 양립되는 사실상 모든 유기 모이어티 (예컨대 알킬 기, 아릴 기, 헤테로아릴 기 또는 치환된 알킬, 아릴 또는 헤테로아릴 기)라는 것을 알고 있을 것이다. 본 발명의 실시양태에 적용될 때의 R'가 경우에 따라 자가-안정화 링커 또는 임의의 제2 링커 중 1종 이상의 구성요소를 나타낼 수 있으며, R"가 경우에 따라 임의의 제2 링커, 약물 단위, 안정성 단위 또는 검출 단위 중 1종 이상의 구성요소를 나타낼 수 있다는 것 역시 알고 있을 것이다.

[0052]

RG	RS	예시적인 관능기
1) R'-SH	-S-	R'-S-R" R'-S-S-R"
2) R'-C(=O)OH	-C(=O)-	R'-C(=O)NH-R"
3) R'-C(=O)ONHS	-C(=O)-	R'-C(=O)NH-R"
4) R'S(=O)$_2$-OH	-S(=O)$_2$-	R'S(=O)$_2$NH-R"
5) R'-CH$_2$-X (X는 Br, I, Cl임)	-CH$_2$-	R'-CH$_2$-S-R"
6) R'-NH$_2$	-N-	R'-NHC(=O)R"

[0053] 일단 반응되고 나면, 반응성 부위 RS는 경우에 따라 링커 단위 또는 약물 단위의 구성요소와 새로운 결합을 형성할 수 있다는 것은 이해될 것이다. 링커 단위의 나머지에 연결된 후의 반응성 부위 RS는 통상적으로 그의 반응성을 상실한다.

[0054] 본원에서 사용될 때의 "디락탐"이라는 용어는 자가-안정화 링커 조립체에 존재하는 티오-치환 숙신이미드 및 염기와의 거대고리화 반응으로부터 형성되는 시클릭 아미드를 지칭한다.

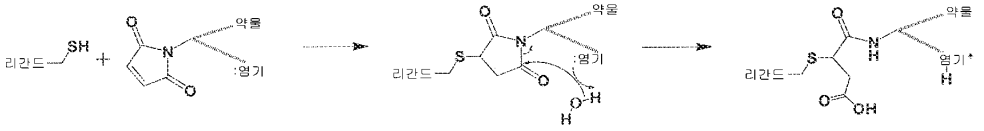
[0055] **총론**

[0056] 말레이미드 (또는 티오-치환된 숙신이미드)의 가수분해는 친핵체로 작용하는 물이 말레이미드 고리 (또는 숙신이미드 고리)의 친핵성 카르보닐 탄소 원자들 중 하나를 공격하는 친핵성 첨가 반응을 나타낸다. 이와 같은 반응의 속도는 카르보닐의 친핵성에 의해 영향을 받는데, 이미드 기의 질소 상에 존재하는 전자 공여 기 또는 전자 끄는 기의 치환에 따라 가변적일 수 있다. 가수분해 반응의 속도는 pH를 증가시키는 것에 의해 물의 친핵성을 효과적으로 증가시키는 수성 용매의 pH에 의해서도 영향을 받는다. N-치환된 말레이미드 상에의 염기성 기의 배치 역시 가수분해의 속도를 증가시킨다는 것이 본 발명자들에 의해 발견되었다. 말레이미드 상 N-치환기의 신중한 조작에 의해, 말레이미드 고리 상에서의 그의 전자 끄는 (그에 따른 그의 친전자성 증가) 영향력과 국소화된 염기성 (부근 물의 유효 친핵성을 증가시킴)의 조합을 사용함으로써, 모 말레이미드 또는 그의 티오-치환 숙신이미드 유도체 중 어느 하나의 가수분해 속도를 조정할 수 있다. 본 발명은 특히 티올과의 그의 반응이 말레산 유도체로의 그의 가수분해에 비해 더 빠르게 이루어지나, 단백질-기반 생체접합체의 제조에 매우 적합한 온건 조건하에서 완전한 가수분해를 달성하기에 충분하게 빠른 가수분해 속도를 갖는 티오-치환 숙신이미드를 산출하는, 유용한 범위 내에 속하는 가수분해 속도를 갖는 N-치환 말레이미드를 제공한다.

[0057] 부분적으로, 본 발명은 말레이미드에 근접한 염기성 관능기가, 안정한 생체접합체로 이어지는 말레이미드와 단백질 티올의 접합시 형성되는 티오-치환 숙신이미드의 가수분해를 촉매하게 된다는 발견에 기초하고 있다. 근접한 염기성 기를 전자 끄는 기와 추가로 조합하는 것에 의해, 티오-치환 숙신이미드 고리 가수분해의 속도는 바람직한 수준까지 조정될 수 있다. 가수분해의 속도에 영향을 주는 설계 파라미터에는 염기성 기의 pKa, 존재할 경우 전자 끄는 기의 강도, 및 말레이미드 카르보닐 탄소에 대한 양 기의 근접도가 포함된다. 가수분해 백

분율에 영향을 주는 설계 파라미터에는 말레이미드 카르보닐 탄소에 대한 염기의 특성 및 근접도가 포함된다.

[0058] 본 발명을 제한하는 것은 아니나, 개념상, 자가-안정화 링커 조립체를 포함하는 링커 단위는 본원에서 자가-안정화 링커 또는 자가-안정화 링커 단위로 지칭된다. 리간드 단위와의 접합 전의 자가-안정화 링커는 말레이미드 기를 포함한다. 자가-안정화 링커는 리간드 단위에의 접합 후 그 자신의 티오-치환 숙신이미드의 가수분해를 촉매하는 링커 단위 내의 염기에 대한 말레이미드 기의 근접도로 인하여 자가-안정화된다. 이는 개략적으로 하기로 표현된다:

[0059] 

[0060] 자가-안정화 링커라는 용어가 안정화 전 및 후 링커 단위 모두를 지칭한다는 것은 이해될 것이다.

[0061] 상기로 볼 때, 본 발명은 일 군의 실시양태들에서, 리간드 단위, 및 약물 단위, 검출 단위 또는 안정화 단위에서 선택되는 하나 이상의 기능성 작용제를 포함하는 리간드-기능성 작용제 접합체이며, 여기서 리간드 단위와 각각의 기능성 작용제(들)는 티오에테르 연결을 통하여 리간드 단위에 직접 접합된 숙신이미드 고리 또는 가수분해된 숙신이미드 고리; 및 자가-안정화 링커 조립체가 결핍되어 있는 리간드 약물 접합체에 비해 혈장에서 접합체를 안정화하기 위하여 (다시 말하자면 숙신이미드 고리 가수분해의 속도를 증가시키는 것에 의함) 작동가능하게 연결된 염기 및 전자 끄는 기 (숙신이미드를 통하여 리간드 단위에 접합됨)를 포함하는 자가-안정화 링커 조립체에 의해 결합되어 있는 것인 리간드-기능성 작용제 접합체를 제공한다. 일부 측면에서, 전자 끄는 기는 숙신이미드의 친전자성을 증가시킴으로써 그것이 물과 더 반응성이 되도록 배치되며, 염기는 숙신이미드 고리의 가수분해를 보조하도록 (예컨대 분자내 염기 촉매 기작에 의함) 배치된다. 일부 측면에서는, 염기가 숙신이미드 고리와 반응할 때 숙신이미드 고리 대신 디락탐이 형성된다. 또 다른 군의 실시양태들에서는, 링커 부분이 자가-안정화 링커 조립체를 포함하는 기능성 작용제-링커 단위가 제공된다. 또 다른 군의 실시양태들에서는, 링커 부분이 자가-안정화 링커 조립체를 포함하는 리간드-링커 접합체가 제공된다. 일부 실시양태에서는, 링커 부분이 임의의 제2 링커 조립체 (L^O)를 추가로 포함한다.

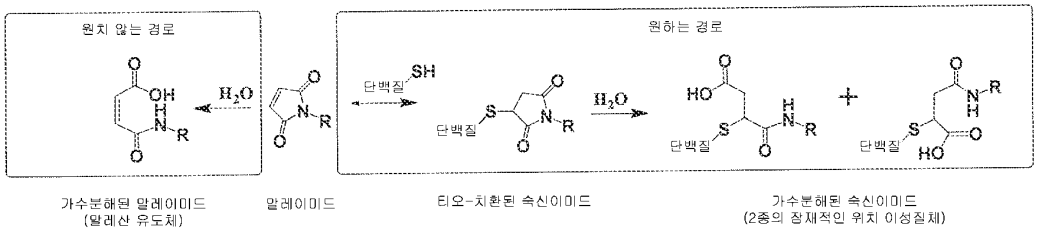
[0062] 일부 측면에서, 리간드-기능성 작용제 접합체는 리간드-약물 접합체이다. 따라서, 본 발명은 일군의 실시양태들에서, 리간드 단위 및 1개 이상의 약물 단위를 포함하는 리간드-약물 접합체이며, 여기서 리간드 단위와 각각의 약물 단위(들)는 티오에테르 연결을 통하여 리간드 단위에 직접 접합된 숙신이미드 고리 또는 가수분해된 숙신이미드 고리; 및 자가-안정화 링커 조립체가 결핍되어 있는 리간드 약물 접합체에 비해 혈장에서 접합체를 안정화하기 위하여 (다시 말하자면 숙신이미드 고리 가수분해의 속도를 증가시키는 것에 의함) 작동가능하게 연결되는 염기 및 전자 끄는 기 (숙신이미드 고리를 통하여 리간드 단위에 접합됨)를 포함하는 자가-안정화 링커 조립체에 의해 결합되어 있는 것인 리간드-약물 접합체를 제공한다. 일부 측면에서, 전자 끄는 기는 숙신이미드의 친전자성을 증가시킴으로써 그것이 물과 더 반응성이 되도록 배치되며, 염기는 숙신이미드 고리의 가수분해를 보조하도록 (예컨대 분자내 염기 촉매 기작에 의함) 배치된다. 일부 측면에서는, 염기가 숙신이미드 고리와 반응할 때 숙신이미드 고리 대신 디락탐이 형성된다. 또 다른 군의 실시양태들에서는, 링커 부분이 자가-안정화 링커 조립체를 포함하는 약물-링커 단위가 제공된다. 또 다른 군의 실시양태들에서는, 링커 부분이 자가-안정화 링커 조립체를 포함하는 리간드-링커 접합체가 제공된다. 일부 실시양태에서는, 링커 부분이 임의의 제2 링커 조립체 (L^O)를 추가로 포함한다. 일부 실시양태에서, 상기 제2 링커 조립체는 절단가능 단위, 및 임의로 스트레쳐(Stretcher) 및 스페이서(Spacer) 단위 중 1종 이상을 포함하는 방출가능 링커 조립체 (L^R)이다. 다른 일부 실시양태에서, 제2 링커 조립체는 스트레쳐 단위 및 스페이서 단위 중 1종 이상을 포함하는 비-방출가능 링커 조립체 (L^N)이다. 또 다른 실시양태에서, 본 발명은 자가-안정화 링커 조립체를 포함하는 리간드-약물 접합체를 사용한 암, 면역 질환, 감염 질환, 및 기타 질환 및 장애의 치료 방법을 제공한다.

[0063] 리간드-기능성 작용제 접합체 (또는 리간드-약물 접합체)의 링커 단위는 자가-안정화 링커 조립체 이외에도, 각 기능성 작용제 (또는 약물 단위)를 자가-안정화 링커 조립체에 결합시키는 임의의 제2 링커 조립체 (L^O)를 추가로 포함할 수 있다. 상기 제2 링커 조립체는 방출가능 링커 조립체 또는 비-방출가능 링커 조립체일 수 있다.

[0064] 본원에서, 링커 단위라는 용어는 자가-안정화 링커 조립체 및 임의의 제2 링커 조립체를 포함하는 리간드-기능성 작용제 접합체 (또는 리간드-약물 접합체)의 링커 부분을 지칭하는 데에 사용될 수 있다.

[0065] **자가-안정화 링커 조립체**

[0066] 자가-안정화 링커는 숙신이미드 고리의 접합-후 가수분해 속도가 조절가능하고 원하는 범위 내에 속하게 되도록 설계된다. 이와 같은 범위의 한계는 통상적으로 리간드-약물 접합체의 제조시 제기되는 관심사에 의해 좌우된다. 한편으로, 너무 느린 가수분해는 바람직하지 않은 제조 과정의 지연, 또는 단백질 백본의 손상을 유도할 수 있는 공격적인 pH 및 온도 조건을 필요로 하게 된다. 반대로, 물과 너무 반응성인 말레이미드는 그것이 이용가능한 단백질 티올과 반응할 수 있기도 전에 상응하는 말레산 유도체로 가수분해될 수 있다 (원치 않는 경로 참조):



[0067]

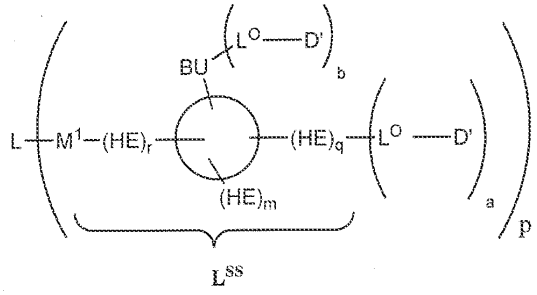
[0068] 그와 같은 말레산 유도체는 티올과 반응성이 아니며, 그에 따라 반응 경로가 생체접합체로 귀결되지 않는다. 따라서, 적용가능한 조건하에서 티올 첨가에 비해 더 빠른 가수분해를 받는 말레이미드는 유용한 반응물이 아니다. 일반적으로, 티오-치환된 숙신이미드의 가수분해 속도를 증가시키는 구조적 특징은 모 말레이미드의 가수분해 속도 역시 증가시키게 된다.

[0069] 본 발명의 자가-안정화 링커를 설계함에 있어서, 염기성 기의 pKa, 전자 끄는 기(들)의 강도, 및 말레이미드에 대한 양 기의 근접도가 상호-연관된 변수로써, 말레이미드 및 상응하는 티오-치환 숙신이미드 생성물 양자의 가수분해 속도에 영향을 주게 된다는 것이 이해될 것이다. 따라서, 전자 끄는 기 및 염기의 위치지정은 염기의 pKa 및 전자 끄는 기(들)의 강도에 따라 달라지게 된다. 숙련 기술자라면, 플루오로, 트리플루오로메틸 및 니트로와 같이 특별히 강한 전자 끄는 기들의 경우, 말레이미드로부터 기가 더 멀 수 있다는 것을 이해할 것이다. 일부 실시양태에서, 가수분해 반응은 거대-고리화 반응과 경쟁함으로써, 생성되는 접합체가 가수분해된 티오-치환 숙신이미드 접합체와 고리화된 티오-치환 디락탐 접합체의 비균질 혼합물을 포함할 수 있다. 바람직한 실시양태에서는, 디락탐이 형성되지 않을 것이다.

[0070] **선별된 본 발명 실시양태**

[0071] 일부 실시양태에서, 리간드-기능성 작용제 접합체는 하기 화학식 I 또는 그의 염 (예컨대 그의 제약상 허용되는 염)으로 나타내어진다:

[0072] <화학식 I>



[0073]

[0074] 상기 식에서,

[0075] L은 리간드 단위이고;

[0076] D'는 약물 단위, 검출 단위 또는 안정성 단위이고;

[0077] L^O는 임의의 제2 링커 조립체이고;

[0078] L^{SS}는 자가-안정화 링커 조립체이며, 여기서

[0079] M^1은 숙신이미드 고리 또는 가수분해된 숙신이미드이거나, 또는 BU와 함께 디락탐을 형성하고;

[0080] BU는 염기성 단위이고;

[0081] HE는 전자 끄는 기를 포함하는 가수분해 인핸서(enhancer)이고;

[0082] 원은, C_{1-8} 알킬렌, C_{1-8} 헤테로알킬렌, C_{6-10} 아릴렌 또는 C_{4-10} 헤테로아릴렌일 수 있으며 임의로 임의의 제2 링커 조립체 또는 D'에의 부착에 적합한 반응성 부위를 포함하는 스캐폴드(scaffold)를 나타내고;

[0083] 아래첨자 m, q 및 r은 각각 0 또는 1이고, m+q+r의 합계는 0, 1 또는 2이며, 단 m+q+r이 0인 경우 스캐폴드는 C_{6-10} 아릴렌 또는 C_{4-10} 헤테로아릴렌이고;

[0084] 아래첨자 a 및 b는 각각 0 또는 1이고, a+b의 합계는 1이고;

[0085] 아래첨자 p는 1 내지 20의 범위이다.

[0086] 일부 측면에서, r이 1인 경우, HE는 카르보닐 기 (즉 C(=O))를 포함하지 않는다.

[0087] 일부 측면에서, r은 0이다. 일부 측면에서, a는 1이며, b는 0이다. 다른 측면에서, a는 0이며, b는 1이다.

[0088] 일부 측면에서, m+q+r은 0이다. 그와 같은 측면에서, 스캐폴드는 C_{6-10} 아릴렌 또는 C_{4-10} 헤테로아릴렌이며, 전자 끄는 기로써 작용한다. 예시적인 아릴 및 헤테로아릴에는 페닐 및 피리디닐이 포함된다.

[0089] 일부 측면에서, m+q+r은 1 또는 2이다.

[0090] 일부 측면에서, 접합체는 a가 1이고 r이 0인 화학식 I 또는 그의 염으로 나타내어진다.

[0091] 일부 측면에서, 접합체는 L^0가 존재하며 방출가능 링커 조립체이고, 원이, C_{1-8} 알킬렌 또는 C_{1-8} 헤테로알킬렌 (바람직하게는 C_{1-4} 알킬렌 또는 C_{1-4} 헤테로알킬렌)인 스캐폴드를 나타내고, a가 1이며, r이 0이고, m+q의 합계가 1인 화학식 I 또는 그의 염으로 나타내어진다. 그와 같은 일부 측면에서, 스캐폴드는 C_{1-3} 알킬렌 또는 C_{1-3} 헤테로알킬렌이다. 그와 같은 일부 측면에서, 알킬렌은 직쇄형 또는 분지형이다.

[0092] 일부 측면에서, 접합체는 L^0가 존재하며 방출가능 링커 조립체이고, 원이, C_{1-8} 알킬렌 또는 C_{1-8} 헤테로알킬렌 (바람직하게는 C_{1-4} 알킬렌 또는 C_{1-4} 헤테로알킬렌)인 스캐폴드를 나타내고, a가 1이며, m 및 r이 0인 화학식 I 또는 그의 염으로 나타내어진다. 그와 같은 일부 측면에서, 스캐폴드는 C_{1-3} 알킬렌 또는 C_{1-3} 헤테로알킬렌이다. 그와 같은 일부 측면에서, 알킬렌은 직쇄형 또는 분지형이다.

[0093] 일부 측면에서, 접합체는 L^0가 존재하며 방출가능 링커 조립체이고, 원이, C_1, C_2, C_3 또는 C_4 직쇄 또는 분지쇄 알킬렌인 스캐폴드를 나타내며, a가 1이고, r이 0이며, m+q의 합계가 1인 화학식 I 또는 그의 염으로 나타내어진다.

[0094] 일부 측면에서, 접합체는 L^0가 존재하며 방출가능 링커 조립체이고, 원이, C_1, C_2, C_3 또는 C_4 직쇄 또는 분지쇄 알킬렌인 스캐폴드를 나타내며, a가 1이고, m 및 r이 0인 화학식 I 또는 그의 염으로 나타내어진다.

[0095] 일부 측면에서, 염기성 단위의 염기와 숙신이미드 (가수분해된 것 또는 비-가수분해된 것) 또는 디락탐의 질소 원자의 사이에 2개 이상 내지 6개 이하의 개재 원자가 존재하며, 전자 끄는 기와 숙신이미드 고리 (가수분해된 것 또는 비-가수분해된 것) 또는 디락탐의 질소 원자의 사이에 5개 이하의 원자, 4개 이하의 원자, 3개 이하의 원자 또는 2개 이하의 개재 원자가 존재한다.

[0096] 이러한 실시양태들 각각에서, 알킬렌 또는 헤테로알킬렌 쇄은 직쇄형 또는 분지형일 수 있다. 일부 측면에서, 알킬렌 또는 헤테로알킬렌 쇄은 직쇄형일 것이다. 다른 측면에서, 그것은 분지형일 것이다.

[0097] 이러한 실시양태들 각각에서, p는 1 내지 20, 바람직하게는 1 내지 12, 더욱 더 바람직하게는 1 내지 10 또는 1 내지 8의 범위일 수 있다.

[0098] 이러한 실시양태들 각각에서, M^1은 바람직하게는 숙신이미드 고리 (즉 비-가수분해된 것) 또는 가수분해된 숙신

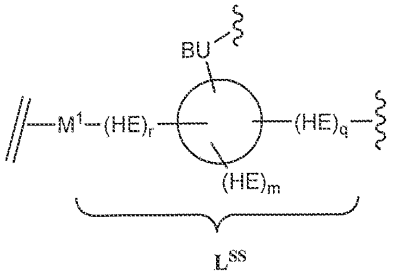
이미드 고리 (본원에서는 가수분해 숙신이미드로도 지칭됨)이다.

[0099] 이러한 실시양태들 각각에서, D'는 약물 단위 D일 수 있으며, 리간드-기능성 작용제 접합체는 리간드-약물 접합체일 수 있다.

[0100] 스캐폴드 자체가 임의의 제2 링커 조립체 또는 D'에 직접 연결되는 일부 측면에서 (예를 들면 q가 0이거나, q가 0이고 r이 0인 선별된 실시양태에서), 스캐폴드는 임의의 제2 링커 조립체 또는 D'에의 부착에 적합한 반응성 부위를 포함하게 된다.

[0101] 일부 실시양태에서, 자가-안정화 링커 조립체 (L^{SS})는 하기 화학식 II 또는 그의 염 (예컨대 제약상 허용되는 염)으로 나타내어진다:

[0102] <화학식 II>

[0103] 

[0104] 상기 식에서,

[0105] 파상선은 D' 또는 D에의 임의의 제2 링커 조립체의 부착 지점을 표시하며, //는 리간드 단위에의 부착 지점을 표시한다. 상기 자가-안정화 링커 조립체에서, M^1은 숙신이미드 고리, 또는 염기가 숙신이미드 고리와 반응할 때 형성되는 가수분해된 숙신이미드 고리 또는 디락탐을 나타내며, BU는 염기성 단위이고, HE는 전자 끄는 기를 포함하는 가수분해 인핸서이고; 원은, C_{1-8} 알킬렌, C_{1-8} 헤테로알킬렌, C_{6-10} 아릴렌 또는 C_{4-10} 헤테로아릴렌일 수 있으며 임의로 임의의 제2 링커 조립체 D' 또는 D에의 부착에 적합한 반응성 부위를 포함하는 스캐폴드를 나타내고; 아래첨자 m, q 및 r은 각각 0 또는 1이고, m+q+r의 합계는 0, 1 또는 2이며, 단 m+q+r이 0인 경우 스캐폴드는 C_{6-10} 아릴렌 또는 C_{4-10} 헤테로아릴렌이다.

[0106] 일부 측면에서, r이 1인 경우, HE는 카르보닐 기 (즉 C(=O))를 포함하지 않는다.

[0107] 일부 측면에서, 자가-안정화 링커 조립체는 r이 0인 화학식 II로 나타내어진다.

[0108] 일부 측면에서, m+q+r은 0이다. 그와 같은 측면에서는, C_{6-10} 아릴렌 또는 C_{4-10} 헤테로아릴렌이 전자 끄는 기로써 작용한다. 예시적인 아릴 및 헤테로아릴에는 페닐 및 피리디닐이 포함된다.

[0109] 일부 측면에서, m+q+r은 1 또는 2이다.

[0110] 일부 측면에서, 자가-안정화 링커 조립체는 원이, C_{1-8} 알킬렌 또는 C_{1-8} 헤테로알킬렌 (바람직하게는 C_{1-4} 알킬렌 또는 헤테로알킬렌)인 스캐폴드를 나타내며, r이 0이고, m+q의 합계가 1인 화학식 II 또는 그의 염으로 나타내어진다. 그와 같은 일부 측면에서, 스캐폴드는 C_{1-3} 알킬렌 또는 C_{1-3} 헤테로알킬렌이다. 그와 같은 일부 측면에서, 알킬렌은 직쇄형 또는 분지형 알킬렌이다.

[0111] 일부 측면에서, 자가-안정화 링커 조립체는 원이, C_{1-8} 알킬렌 또는 C_{1-8} 헤테로알킬렌 (바람직하게는 C_{1-4} 알킬렌 또는 헤테로알킬렌)인 스캐폴드를 나타내며, m 및 r이 0인 화학식 II 또는 그의 염으로 나타내어진다. 그와 같은 일부 측면에서, 스캐폴드는 C_{1-3} 알킬렌 또는 C_{1-3} 헤테로알킬렌이다. 그와 같은 일부 측면에서, 알킬렌은 직쇄형 또는 분지형 알킬렌이다.

[0112] 일부 측면에서, 자가-안정화 링커 조립체는 원이, C_1, C_2, C_3 또는 C_4 직쇄 또는 분지쇄 알킬렌인 스캐폴드를 나타내며, r이 0이고, m+q의 합계가 1인 화학식 II 또는 그의 염으로 나타내어진다.

[0113] 일부 측면에서, 자가-안정화 링커 조립체는 원이, C_1, C_2, C_3 또는 C_4 직쇄 또는 분지쇄 알킬렌인 스캐폴드를 나

타내며, m 및 r이 0인 화학식 II 또는 그의 염으로 나타내어진다.

[0114] 일부 측면에서, 염기성 단위의 염기와 숙신이미드 (가수분해된 것 또는 비-가수분해된 것) 또는 디락탐의 질소 원자의 사이에 2개 이상 내지 6개 이하의 개재 원자가 존재하며, 전자 끄는 기와 숙신이미드 고리 (가수분해된 것 또는 비-가수분해된 것) 또는 디락탐의 질소 원자의 사이에 5개 이하의 원자, 4개 이하의 원자, 3개 이하의 원자 또는 2개 이하의 개재 원자가 존재한다.

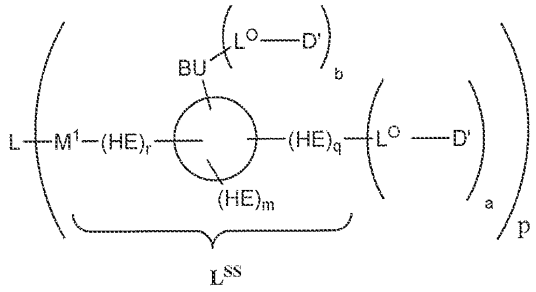
[0115] 이러한 실시양태들 각각에서, 알킬렌 또는 헤테로알킬렌 쇄은 바람직하게는 직쇄 또는 분지쇄일 것이다. 일부 측면에서, 알킬렌 또는 헤테로알킬렌 쇄은 직쇄일 것이다. 다른 측면에서, 그것은 분지쇄일 것이다.

[0116] 이러한 실시양태들 각각에서, M^1은 바람직하게는 숙신이미드 고리 또는 가수분해된 숙신이미드 고리이다.

[0117] 이러한 실시양태들 각각에서, D'는 바람직하게는 약물 단위 D이다.

[0118] 리간드-기능성 작용제 접합체가 하기 화학식 I 또는 그의 염을 가지며, 스캐폴드, L, M^1, HE, BU, L^0, D', 및 아래첨자 p, a, b, m, q 및 r 각각이 상기에서 제공된 의미를 갖는 본 발명의 실시양태로 돌아가면:

[0119] <화학식 I>

[0120] 

,

[0121] 선별되는 실시양태에는 하기인 것들이 포함된다:

[0122] 1) m은 1이고, q 및 r은 0임;

[0123] 2) q는 1이고, m 및 r은 0임;

[0124] 3) r은 1이고, m 및 q는 0임;

[0125] 4) m은 1이고, q 및 r은 0이고, a는 1임;

[0126] 5) q는 1이고, m 및 r은 0이고, a는 1임;

[0127] 6) r은 1이고, m 및 q는 0이고, a는 1임;

[0128] 7) m은 1이고, q 및 r은 0이고, D'는 약물 단위 D임;

[0129] 8) q는 1이고, m 및 r은 0이고, D'는 약물 단위 D임;

[0130] 9) r은 1이고, m 및 q는 0이고, D'는 약물 단위 D임;

[0131] 10) m은 1이고, q 및 r은 0이고, a는 1이고, D'는 약물 단위 D임;

[0132] 11) q는 1이고, m 및 r은 0이고, a는 1이고, D'는 약물 단위 D임; 또는

[0133] 12) r은 1이고, m 및 q는 0이고, a는 1이고, D'는 약물 단위 D임.

[0134] 상기 1), 2), 3), 4), 5), 6), 7), 8), 9), 10), 11) 및 12)의 선별된 실시양태 각각에 기초한 것들을 포함한 다른 선별된 실시양태에서, 염기성 단위 (BU)는 1급, 2급 아민 또는 3급 아민를 포함한다. 상기 1), 2), 3), 4), 5), 6), 7), 8), 9), 10), 11) 및 12)의 선별된 실시양태 각각에 기초한 것들을 포함한 또 다른 선별된 실시양태에서, 염기성 단위는 $-(C(R^9)(R^{10}))_xNH_2$, $-(C(R^9)(R^{10}))_xNHR^a$ 및 $-(C(R^9)(R^{10}))_xNR^a{}_2$로 이루어진 군으로부터 선택되며, 여기서 x는 0-4 (또는 1 내지 4)의 정수이고, 각 R^a는 C_{1-6} 알킬 및 C_{1-6} 할로알킬로 이루어진 군으로부터 독립적으로 선택되거나, 또는 2개의 R^a 기가 그들이 부착되어 있는 질소와 조합되어 아제티디닐, 피롤리디

닐 또는 피페리디닐 기를 형성하며, 단 x가 0인 경우 염기성 단위의 염기와 숙신이미드 (가수분해된 것 또는 비-가수분해된 것) 또는 디락탐의 질소 원자 사이에 2개 이상의 개재 원자가 존재하고, 각 R^9 및 R^{10}은 H 또는 C_{1-3} 알킬로부터 독립적으로 선택된다. 상기 1), 2), 3), 4), 5), 6), 7), 8), 9), 10), 11) 및 12)의 선별된 실시양태 각각에 기초한 것들을 포함한 또 다른 선별된 실시양태에서, 염기성 단위는 $-(CH_2)_xNH_2$, $-(CH_2)_xNHR^a$ 및 $-(CH_2)_xNR^a{}_2$로 이루어진 군으로부터 선택되며, 여기서 x는 0 내지 6 (바람직하게는 0 내지 4 또는 1 내지 4)의 정수이며, 단 x가 0인 경우 염기성 단위의 염기와 숙신이미드 (가수분해된 것 또는 비-가수분해된 것) 또는 디락탐의 질소 원자 사이에 2개 이상의 개재 원자가 존재하고, 각 R^a는 C_{1-6} 알킬 및 C_{1-6} 할로알킬로 이루어진 군으로부터 독립적으로 선택되거나, 또는 2개의 R^a 기가 그들이 부착되어 있는 질소와 조합되어 아제티디닐, 피롤리디닐 또는 피페리디닐 기를 형성한다. 또 다른 선별된 실시양태에서, x는 1 내지 4의 정수이다. 상기 1), 2), 3), 4), 5), 6), 7), 8), 9), 10), 11) 및 12)의 선별된 실시양태 각각에 기초한 것들을 포함한 또 다른 선별된 실시양태에서, 염기성 단위는 $-NH_2$, $-CH_2NH_2$, $-CH_2CH_2NH_2$, $-CH_2CH_2CH_2NH_2$ 또는 $-CH_2CH_2CH_2CH_2NH_2$이며, 단 염기성 단위가 $-NH_2$인 경우 염기와 숙신이미드 (가수분해된 것 또는 비-가수분해된 것) 또는 디락탐의 질소 원자 사이에 2개 이상의 개재 원자가 존재한다.

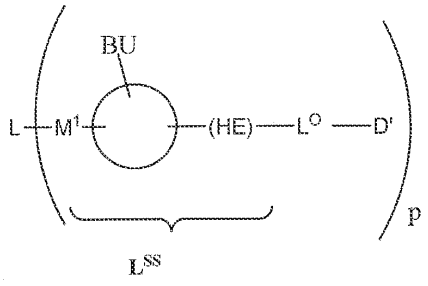
[0135] 상기 2), 5),8) 및 11)의 선별된 실시양태에 기초한 것들 및 선행 단락의 실시양태에 기초한 것들을 포함한 또 다른 선별된 실시양태에서, HE는 바람직하게는 카르보닐, 술포닐 또는 포스포릴 모이어티를 포함한다.

[0136] 상기 선별된 실시양태 각각에 기초한 것들을 포함한 (예컨대 상기 1), 2), 3), 4), 5), 6), 7), 8), 9), 10), 11) 및 12)의 선별된 실시양태 각각 및 선행 단락의 실시양태에 기초한 것들 포함) 또 다른 선별된 실시양태에서, 염기성 단위의 염기와 숙신이미드 (가수분해된 것 또는 비-가수분해된 것) 또는 디락탐의 질소 원자의 사이에 2개 이상 내지 6개 이하의 개재 원자가 존재하며, 전자 끄는 기와 숙신이미드 고리 (가수분해된 것 또는 비-가수분해된 것) 또는 디락탐의 질소 원자의 사이에 5개 이하의 원자, 4개 이하의 원자, 3개 이하의 원자 또는 2개 이하의 개재 원자가 존재한다.

[0137] 상기 선별된 실시양태 각각 (예컨대 상기 1), 2), 3), 4), 5), 6), 7), 8), 9), 10), 11) 및 12)의 선별된 실시양태 각각)에 기초한 것들 및 선행 단락의 실시양태에 기초한 것들을 포함한 또 다른 선별된 실시양태에서, M^1은 숙신이미드 고리 또는 가수분해된 숙신이미드이다.

[0138] 상기 선별된 실시양태 각각 (예컨대 상기 1), 2), 3), 4), 5), 6), 7), 8), 9), 10), 11) 및 12)의 선별된 실시양태 각각)에 기초한 것들 및 선행 단락의 실시양태에 기초한 것들을 포함한 또 다른 선별된 실시양태에서, 원은, C_{1-8} 알킬렌 또는 C_{1-8} 헤테로알킬렌 (바람직하게는 C_{1-4} 알킬렌 또는 C_{1-4} 헤테로알킬렌)인 스캐폴드를 나타낸다. 그와 같은 일부 측면에서, 알킬렌은 직쇄 또는 분지쇄 알킬렌이다.

[0139] 또 다른 선별된 실시양태에서, 리간드-기능성 작용제 접합체는 하기 화학식 또는 그의 제약상 허용되는 염을 가지며:



[0140] ,

[0141] 상기 식에서, 스캐폴드, L, M^1, HE, BU, L^0, D', 및 아래첨자 p 각각은 상기에서 제공된 의미를 갖는 바, 선별되는 실시양태에는 하기인 것들이 포함된다:

[0142] 1) 염기성 단위 (BU)가 1급, 2급 아민 또는 3급 아민을 포함하며, D'가 바람직하게는 약물 단위 D임.

[0143] 2) 염기성 단위가 $-(C(R^9)(R^{10}))_xNH_2$, $-(C(R^9)(R^{10}))_xNHR^a$ 및 $-(C(R^9)(R^{10}))_xNR^a{}_2$로 이루어진 군으로부터 선택되며,

여기서 x는 0-4 (또는 1-4)의 정수이고, 각 R^a는 C_{1-6} 알킬 및 C_{1-6} 할로알킬로 이루어진 군으로부터 독립적으로 선택되거나, 또는 2개의 R^a 기가 그들이 부착되어 있는 질소와 조합되어 아제티디닐, 피롤리디닐 또는 피페리디닐 기를 형성하며, 단 x가 0인 경우 염기성 단위의 염기와 숙신이미드 (가수분해된 것 또는 비-가수분해된 것) 또는 디락탐의 질소 원자 사이에 2개 이상의 개재 원자가 존재하고, R^9 및 R^{10}은 H 또는 C_{1-3} 알킬로부터 독립적으로 선택되고, D'는 바람직하게는 약물 단위 D임.

[0144] 3) 염기성 단위가 $-(CH_2)_xNH_2$, $-(CH_2)_xNHR^a$ 및 $-(CH_2)_xNR^a{}_2$로 이루어진 군으로부터 선택되며, 여기서 x는 0 내지 6 (바람직하게는 0 내지 4 또는 1 내지 4)의 정수이며, 단 x가 0인 경우 염기성 단위의 염기와 숙신이미드 (가수분해된 것 또는 비-가수분해된 것) 또는 디락탐의 질소 원자 사이에 2개 이상의 개재 원자가 존재하고, 각 R^a는 C_{1-6} 알킬 및 C_{1-6} 할로알킬로 이루어진 군으로부터 독립적으로 선택되거나, 또는 2개의 R^a 기가 그들이 부착되어 있는 질소와 조합되어 아제티디닐, 피롤리디닐 또는 피페리디닐 기를 형성하고, D'는 바람직하게는 약물 단위 D임. 또 다른 선별된 실시양태에서, x는 1 내지 4의 정수임.

[0145] 4) 염기성 단위가 $-NH_2$, $-CH_2NH_2$, $-CH_2CH_2NH_2$, $-CH_2CH_2CH_2NH_2$ 또는 $-CH_2CH_2CH_2CH_2NH_2$이며, 단 염기성 단위가 $-NH_2$인 경우 염기와 숙신이미드 (가수분해된 것 또는 비-가수분해된 것) 또는 디락탐의 질소 원자 사이에 2개 이상의 개재 원자가 존재하고; D'는 바람직하게는 약물 단위 D임.

[0146] 상기의 선별된 실시양태 각각에 기초한 것들을 포함한 또 다른 선별된 실시양태에서, HE는 카르보닐, 술포닐 또는 포스포릴 모이어티를 포함하고, D'는 바람직하게는 약물 단위 D이다.

[0147] 상기의 선별된 실시양태 각각에 기초한 것들을 포함한 또 다른 선별된 실시양태에서, 염기성 단위의 염기와 숙신이미드 (가수분해된 것 또는 비-가수분해된 것) 또는 디락탐의 질소 원자의 사이에 2개 이상 내지 6개 이하의 개재 원자가 존재하며, 전자 끄는 기와 숙신이미드 고리 (가수분해된 것 또는 비-가수분해된 것) 또는 디락탐의 질소 원자의 사이에 5개 이하의 원자, 4개 이하의 원자, 3개 이하의 원자 또는 2개 이하의 개재 원자가 존재하고, D'는 바람직하게는 약물 단위 (D)이다.

[0148] 상기의 선별된 실시양태 각각에 기초한 것들을 포함한 또 다른 선별된 실시양태에서, M^1은 숙신이미드 고리 또는 가수분해된 숙신이미드이고, D'는 바람직하게는 약물 단위 (D)이다.

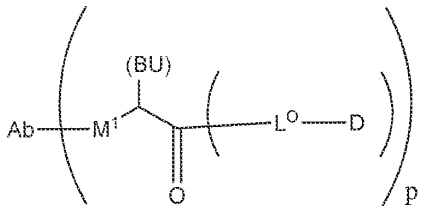
[0149] 상기의 선별된 실시양태 각각에 기초한 것들을 포함한 또 다른 선별된 실시양태에서, 원은, C_{1-8} 알킬렌 또는 C_{1-8} 헤테로알킬렌 (바람직하게는 C_{1-4} 알킬렌 또는 C_{1-4} 헤테로알킬렌)인 스캐폴드를 나타내고, D'는 바람직하게는 약물 단위 (D)이다. 그와 같은 일부 측면에서, 알킬렌은 직쇄 또는 분지쇄 알킬렌이다.

[0150] 상기의 선별된 실시양태 각각에 기초한 것들을 포함한 또 다른 선별된 실시양태에서, HE는 카르보닐이고, D'는 바람직하게는 약물 단위 (D)이다.

[0151] 상기의 선별된 실시양태 각각에 기초한 것들을 포함한 또 다른 선별된 실시양태에서, HE는 카르보닐이고, 원은, 직쇄 C_{1-8} 알킬렌 또는 C_{1-8} 헤테로알킬렌 (바람직하게는 C_{1-4} 알킬렌 또는 C_{1-4} 헤테로알킬렌)인 스캐폴드를 나타내고, D'는 바람직하게는 약물 단위 (D)이다.

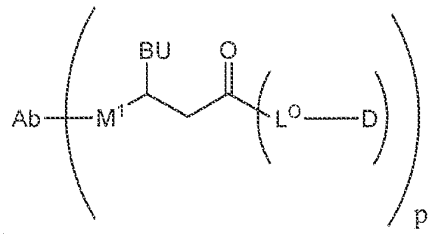
[0152] 상기의 선별된 실시양태 각각에 기초한 것들을 포함한 또 다른 선별된 실시양태에서, HE는 카르보닐이고, 원은, 분지쇄 C_{1-8} 알킬렌 또는 C_{1-8} 헤테로알킬렌 (바람직하게는 C_{1-4} 알킬렌 또는 C_{1-4} 헤테로알킬렌)인 스캐폴드를 나타내고, D'는 바람직하게는 약물 단위 (D)이다.

[0153] 또 다른 선별된 실시양태에서, 리간드-약물 접합체는 하기 화학식 또는 그의 제약상 허용되는 염을 가지며:

[0154] 

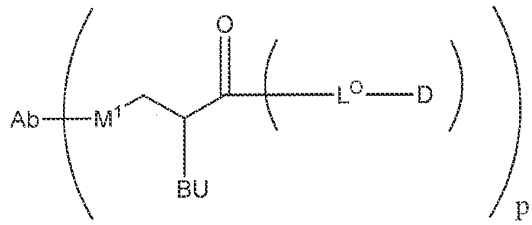
[0155] 상기 식에서, 리간드 부분은 항체 (Ab)이고, 아래첨자 p는 1 내지 20 (바람직하게는 1 내지 12)의 범위이며, M^1, BU, L^0는 본원에서 제공되는 실시양태들 중 어느 것에서 기술되는 바와 같고, D는 약물 단위이다. 예를 들어, 일부 측면에서, L^0는 방출가능 링커 조립체이며, BU는 $-(CH_2)_xNH_2$, $-(CH_2)_xNHR^a$ 및 $-(CH_2)_xNR^a{}_2$이며, 여기서 x는 1-4의 정수이며, 각 R^a는 C_{1-6} 알킬 및 C_{1-6} 할로알킬로 이루어진 군으로부터 독립적으로 선택되거나, 또는 2개의 R^a 기가 그들이 부착되어 있는 질소와 조합되어 아제티디닐, 피롤리디닐 또는 피페리디닐 기를 형성한다. 또 다른 측면에서, L^0는 방출가능 링커 조립체이며, BU는 $-CH_2NH_2$, $-CH_2CH_2NH_2$, $-CH_2CH_2CH_2NH_2$ 또는 $-CH_2CH_2CH_2CH_2NH_2$이다. 일부 측면에서, Ab는 비-항체 단백질로 대체될 수 있다. M^1은 바람직하게는 숙신이미드 고리 또는 가수분해된 숙신이미드 고리이다.

[0156] 또 다른 선별된 실시양태에서, 리간드-약물 접합체는 하기 화학식 또는 그의 제약상 허용되는 염을 가지며:

[0157] 

[0158] 상기 식에서, 리간드 부분은 항체 (Ab)이고, 아래첨자 p는 1 내지 20 (바람직하게는 1 내지 12)의 범위이며, M^1, BU 및 L^0는 본원에서 제공되는 실시양태들 중 어느 것에서 기술되는 바와 같고, D는 약물 단위이다. 예를 들어, 일부 측면에서, L^0는 방출가능 링커 조립체이며, BU는 $-(CH_2)_xNH_2$, $-(CH_2)_xNHR^a$ 및 $-(CH_2)_xNR^a{}_2$이며, 여기서 x는 1-4의 정수이며, 각 R^a는 C_{1-6} 알킬 및 C_{1-6} 할로알킬로 이루어진 군으로부터 독립적으로 선택되거나, 또는 2개의 R^a 기가 그들이 부착되어 있는 질소와 조합되어 아제티디닐, 피롤리디닐 또는 피페리디닐 기를 형성한다. 또 다른 측면에서, L^0는 방출가능 링커 조립체이며, BU는 $-CH_2NH_2$, $-CH_2CH_2NH_2$, $-CH_2CH_2CH_2NH_2$ 또는 $-CH_2CH_2CH_2CH_2NH_2$이다. 일부 측면에서, Ab는 비-항체 단백질로 대체될 수 있다. M^1은 바람직하게는 숙신이미드 고리 또는 가수분해된 숙신이미드 고리이다.

[0159] 또 다른 선별된 실시양태에서, 리간드-약물 접합체는 하기 화학식 또는 그의 제약상 허용되는 염을 가지며:

[0160] 

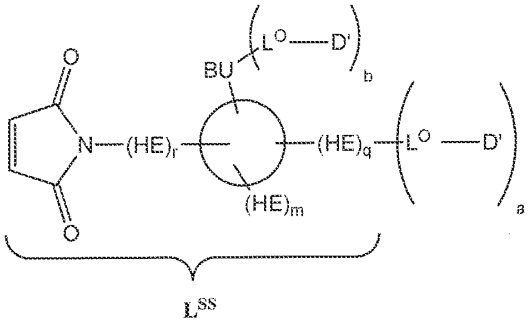
[0161] 상기 식에서, 리간드 부분은 항체 (Ab)이고, 아래첨자 p는 1 내지 20 (바람직하게는 1 내지 12)의 범위이며, M^1, BU 및 L^0는 본원에서 제공되는 실시양태들 중 어느 것에서 기술되는 바와 같고, D는 약물 단위이다. 예를 들어, 일부 측면에서, L^0는 방출가능 링커 조립체이며, BU는 $-(CH_2)_xNH_2$, $-(CH_2)_xNHR^a$ 및 $-(CH_2)_xNR^a{}_2$이며, 여기서 x는 0-4의 정수이며, 각 R^a는 C_{1-6} 알킬 및 C_{1-6} 할로알킬로 이루어진 군으로부터 독립적으로 선택되거나, 또는 2개의 R^a 기가 그들이 부착되어 있는 질소와 조합되어 아제티디닐, 피롤리디닐 또는 피페리디닐 기를 형성한다. 또 다른 측면에서, L^0는 방출가능 링커 조립체이며, BU는 $-NH_2$, $-CH_2NH_2$, $-CH_2CH_2NH_2$, $-CH_2CH_2CH_2NH_2$ 또는 $-CH_2CH_2CH_2CH_2NH_2$이다. 일부 측면에서, Ab는 비-항체 단백질로 대체될 수 있다. M^1은 바람직하게는 숙신이미드

고리 또는 가수분해된 숙신이미드 고리이다.

[0162] 본 개시에 의해 제공되는 다양한 리간드-기능성 작용제 접합체 및 리간드-약물 접합체들을 기술한 바, 업계 숙련자라면, 구성요소 조립체들 역시 유용하다는 것을 알고 있을 것이다. 이에 따라, 본 발명은 기능성 작용제-링커 접합체 (예컨대 약물-링커 접합체), 링커 및 리간드-링커 조립체를 제공한다.

[0163] **기능성 작용제-링커 접합체**

[0164] 또 다른 실시양태에서, 본 발명은 하기 화학식 또는 그의 염 (예컨대 제약상 허용되는 염)을 갖는 기능성 작용제-링커 접합체 (예컨대 약물-링커 접합체)를 제공한다:

[0165] 

[0166] 상기 식에서,

[0167] D'는 약물 단위, 검출 단위 또는 안정성 단위이고;

[0168] L^O는 임의의 제2 링커 조립체이고;

[0169] L^{SS}는 자가-안정화 링커 조립체이며, 여기서

[0170] BU는 염기성 단위이고;

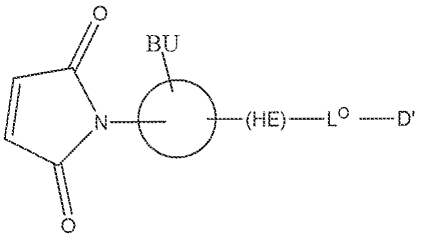
[0171] HE는 전자 끄는 기를 포함하는 가수분해 인핸서이고;

[0172] 원은, C_{1-8} 알킬렌, C_{1-8} 헤테로알킬렌, C_{6-10} 아릴렌 또는 C_{4-10} 헤테로아릴렌일 수 있으며 임의로 임의의 제2 링커 조립체 또는 D'에의 부착에 적합한 반응성 부위를 포함하는 스캐폴드를 나타내고;

[0173] 아래첨자 m, q 및 r은 각각 0 또는 1이고, m+q+r의 합계는 0, 1 또는 2이며, 단 m+q+r이 0인 경우 스캐폴드는 C_{6-10} 아릴렌 또는 C_{4-10} 헤테로아릴렌이고;

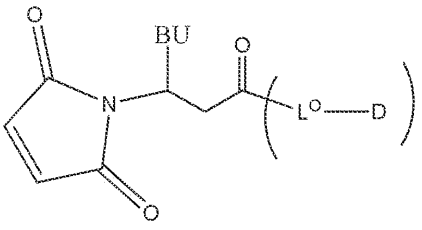
[0174] 아래첨자 a 및 b는 각각 0 또는 1이고, a+b의 합계는 1이다.

[0175] 소정의 선별된 실시양태에서, 기능성 작용제-링커 접합체는 하기 화학식 또는 그의 염으로 나타내어지는 반면:

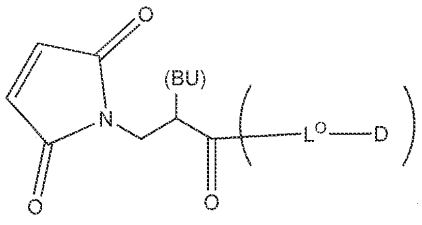
[0176] 

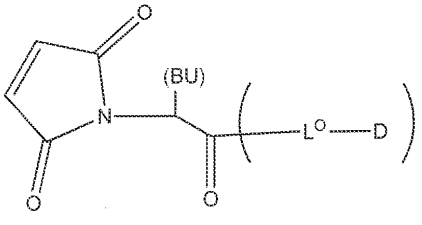
,

[0177] 다른 선별된 실시양태에서, 약물-링커 접합체는 하기 화학식 또는 그의 염으로 나타내어지며:

[0178] 

,

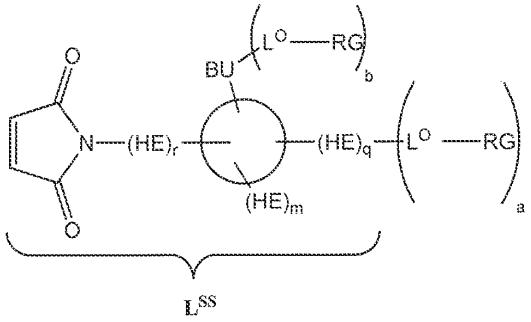
[0179]  , 또는

[0180]  ,

[0181] 상기 식에서, 원, HE, BU, L^0 및 D'는 화학식 I에 대하여 본원에서 제공되는 의미를 가지고, D는 약물 단위이다. 또한, 원, HE, BU, L^0 및 D'에 대하여 구체적으로 언급되는 선별된 실시양태들 (화학식 I 또는 본원에서 제공되는 접합체들 중 어느 것에 대한 것) 각각이 이러한 약물-링커 접합체에 동일하게 적용가능하다. 바람직한 측면에서, D'는 약물 단위 D이다.

[0182] **링커**

[0183] 역시 본원에서 제공되는 것은 하기 화학식 또는 그의 염 (예컨대 제약상 허용되는 염)을 갖는 링커이다:

[0184] 

[0185] 상기 식에서,

[0186] RG는 약물 단위를 부착시키는 데에 적합한 L^0 말단의 반응성 기 (반응성 부위를 포함함)이며;

[0187] L^0는 존재하는 임의의 제2 링커 조립체이고;

[0188] L^{SS}는 자가-안정화 링커 조립체이며, 여기서

[0189] BU는 염기성 단위이고;

[0190] HE는 전자 끄는 기를 포함하는 가수분해 인핸서이고;

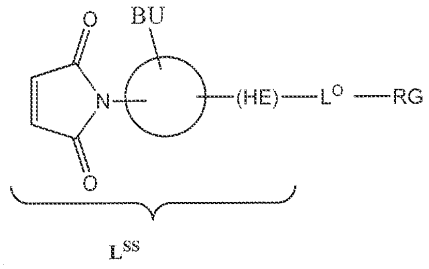
[0191] 원은, C_{1-8} 알킬렌, C_{1-8} 헤테로알킬렌, C_{6-10} 아릴렌 또는 C_{4-10} 헤테로아릴렌일 수 있으며 임의로 임의의 제2 링커 조립체 또는 약물 단위에의 부착에 적합한 반응성 부위를 포함하는 스캐폴드를 나타내고;

[0192] 아래첨자 m, q 및 r은 각각 0 또는 1이고, m+q+r의 합계는 0, 1 또는 2이며, 단 m+q+r이 0인 경우 스캐폴드는 C_{6-10} 아릴렌 또는 C_{4-10} 헤테로아릴렌이고;

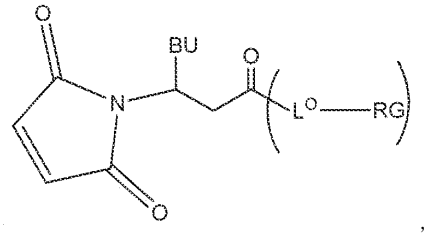
[0193] 아래첨자 a 및 b는 각각 0 또는 1이고, a+b의 합계는 1이다.

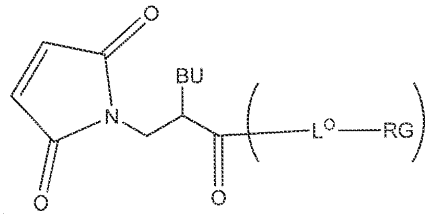
[0194] 링커가 검출 단위 또는 안정성 단위에 결합되는 일부 측면에서, RG는 약물 단위 대신 검출 단위 또는 안정성 단위와 결합을 형성할 수 있는 반응성 부위를 포함하는 반응성 기이다.

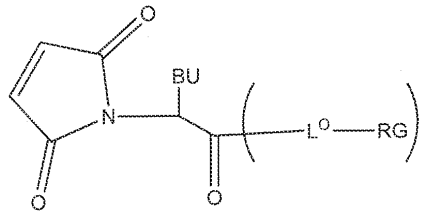
[0195] 소정의 선별된 실시양태에서, 링커는 하기 화학식 또는 그의 염으로 나타내어지는 반면:

[0196] 

[0197] 다른 선별된 실시양태에서, 링커는 하기 화학식 또는 그의 염 (예컨대 제약상 허용되는 염)으로 나타내어지며:

[0198]  ,

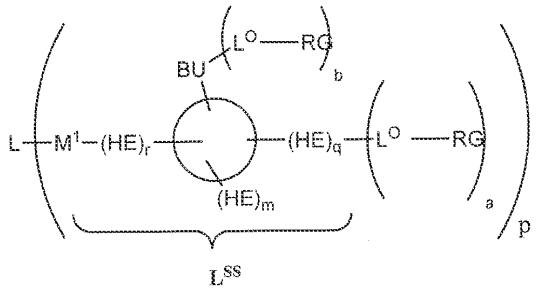
[0199]  , 또는

[0200] 

[0201] 상기 식에서, 원, HE, BU, L^0 및 RG는 상기에서 제공된 의미를 가진다. 또한, BU, L^0 및 RG에 대하여 구체적으로 언급되는 선별된 실시양태들 (본원에서 제공되는 접합체들 중 어느 것에 대한 것) 각각이 이러한 링커에 동일하게 적용가능하다.

[0202] **리간드-링커 접합체**

[0203] 역시 본원에서 제공되는 것은 하기 화학식 또는 그의 염 (예컨대 제약상 허용되는 염)을 갖는 리간드-링커 접합체이다:

[0204] 

[0205] 상기 식에서,

[0206] L은 리간드 단위이고;

[0207] 아래첨자 p는 1 내지 20의 범위이고;

[0208] RG는 약물 단위를 부착시키는 데에 적합한 L^0 말단의 반응성 기 (반응성 부위를 포함함)이고;

[0209] L^0는 존재하는 임의의 제2 링커 조립체이고;

[0210] L^{SS}는 자가-안정화 링커 조립체이며, 여기서

[0211] M^1은 숙신이미드 고리 또는 가수분해된 숙신이미드이고;

[0212] BU는 염기성 단위이고;

[0213] HE는 전자 끄는 기를 포함하는 가수분해 인핸서이고;

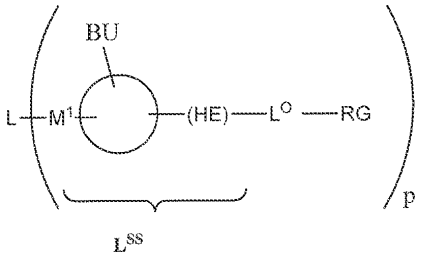
[0214] 원은, C_{1-8} 알킬렌, C_{1-8} 헤테로알킬렌, C_{6-10} 아릴렌 또는 C_{4-10} 헤테로아릴렌일 수 있으며 임의로 임의의 제2 링커 조립체 또는 약물 단위에의 부착에 적합한 반응성 부위를 포함하는 스캐폴드를 나타내고;

[0215] 아래첨자 m, q 및 r은 각각 0 또는 1이고, m+q+r의 합계는 0, 1 또는 2이며, 단 m+q+r이 0인 경우 스캐폴드는 C_{6-10} 아릴렌 또는 C_{4-10} 헤테로아릴렌이고;

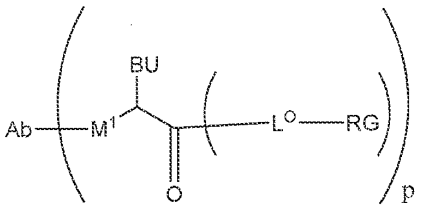
[0216] 아래첨자 a 및 b는 각각 0 또는 1이고, a+b의 합계는 1이다.

[0217] 리간드-링커 접합체가 약물 단위 대신 검출 단위 또는 안정성 단위에 결합되는 일부 측면에서, RG는 약물 단위 대신 검출 단위 또는 안정성 단위와 결합을 형성할 수 있는 반응성 부위를 포함하는 반응성 기이다.

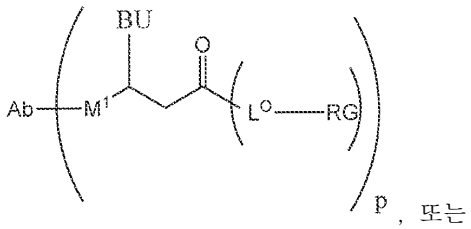
[0218] 소정의 선별된 실시양태에서, 리간드-링커 접합체는 하기 화학식 또는 그의 염으로 나타내어지는 반면:

[0219] 

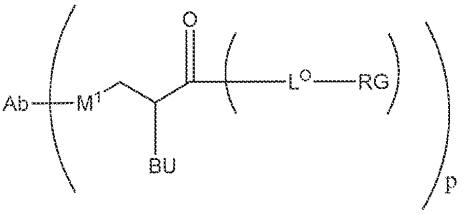
[0220] 다른 선별된 실시양태에서, 리간드-링커 접합체는 하기 화학식 또는 그의 염 (예컨대 제약상 허용되는 염)으로 나타내어지며:

[0221] 

,

[0222] 

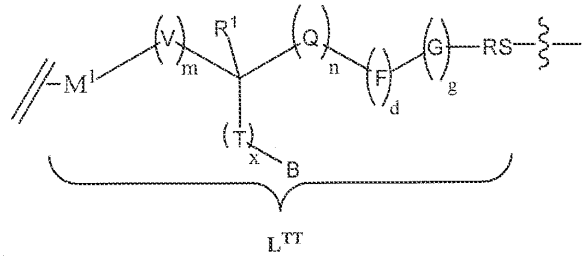
, 또는

[0223] 

[0224] 상기 식에서, L은 항체 (Ab)이고, 원, HE, M^1, BU, L^0 및 RG는 상기에서 제공된 의미를 가진다. 또한, Ab, M^1, BU, L^0 및 RG에 대하여 구체적으로 언급되는 선별된 실시양태들 (본원에서 제공되는 접합체들 중 어느 것에 대한 것) 각각이 이러한 리간드-링커 접합체에 동일하게 적용가능하다.

[0225] 본 발명의 일부 실시양태에서, 자가-안정화 링커 조립체는 L^{SS}의 구조로 나타내어지는 대신 L^{TT}로 나타내어지며, 하기 화학식 III 또는 그의 제약상 허용되는 염을 가진다:

[0226] <화학식 III>

[0227] 

[0228] 상기 식에서,

[0229] 파상선은 임의의 제2 링커 조립체 또는 약물 단위의 부착 지점을 표시하며, //는 리간드 단위에의 부착 지점을 표시하고;

[0230] M^1은 비-가수분해 또는 가수분해 숙신이미드이거나, 또는 M^1은 B와 디락탐을 형성하며 (예컨대 B가 숙신이미드 고리와 반응하는 경우, 디락탐이 형성됨), 여기서 숙신이미드 또는 디락탐은 티오에테르 연결을 통하여 리간드 단위에 접합되고;

[0231] V, Q, T 및 G는 $-(C(R^9)(R^{10}))-$으로부터 독립적으로 선택되고;

[0232] R^1은 H 또는 C_{1-3} 알킬이고;

[0233] R^9 및 R^{10}은 각 경우에 H 또는 C_{1-3} 알킬로부터 독립적으로 선택되고;

[0234] F는 $C(E^1)(E^2)$이며, 여기서 E^1 및 E^2는 수소, 전자 끄는 기로부터 독립적으로 선택되거나, 또는 E^1 및 E^2는 함께 (=O)이고;

[0235] RS는 임의의 제2 링커 조립체 또는 약물 단위의 구성요소에의 접합을 위한 반응성 부위이고;

[0236] g는 0 내지 5이고;

[0237] m은 0 내지 5이고;

[0238] n은 0 내지 5이고;

[0239] d는 0 또는 1이고;

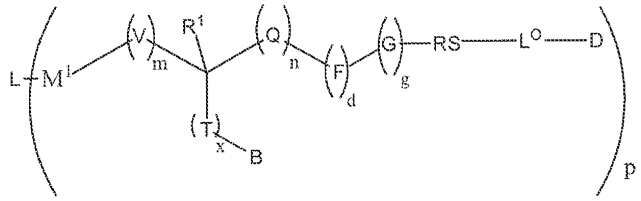
[0240] x는 0 내지 4이며, 단 m이 0인 경우 x는 1 내지 4이고;

[0241] B는 염기이다.

[0242] 일부 측면에서는, 각 리간드 단위에 결합된 1 내지 20개의 약물-링커가 존재한다.

[0243] 선별된 실시양태에서, 리간드-약물 접합체는 하기 화학식 IIIa 또는 그의 제약상 허용되는 염을 가진다:

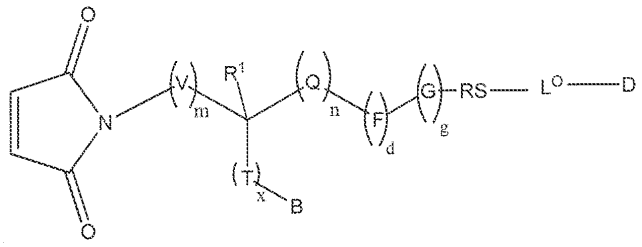
[0244] <화학식 IIIa>



[0245]

[0246] 선별된 실시양태에서, 약물-링커는 하기 화학식 IIIb 또는 그의 제약상 허용되는 염을 가진다:

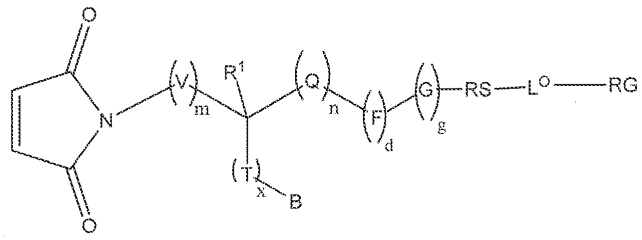
[0247] <화학식 IIIb>



[0248]

[0249] 선별된 실시양태에서, 링커는 하기 화학식 IIIc 또는 그의 제약상 허용되는 염을 가진다:

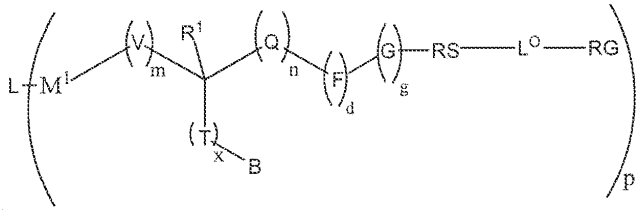
[0250] <화학식 IIIc>



[0251]

[0252] 선별된 실시양태에서, 리간드-링커 접합체는 하기 화학식 IIId 또는 그의 제약상 허용되는 염을 가진다:

[0253] <화학식 IIId>



[0254]

[0255] 화학식 IIIa, IIIb, IIIc 및 IIId 또는 이들의 제약상 허용되는 염에서:

[0256] L은 존재할 경우 리간드 단위이고;

[0257] L^0는 임의의 제2 링커 조립체이고;

[0258] RG는 존재할 경우 약물 단위를 부착시키는 데에 적합한 L^0 말단의 반응성 기 (반응성 부위를 포함함)이고;

[0259] M^1은 존재할 경우 비-가수분해 또는 가수분해 숙신이미드이거나, 또는 M^1은 B와 디락탐을 형성하고 (예컨대 염기가 숙신이미드 고리와 반응하는 경우, 디락탐이 형성됨), 여기서 숙신이미드 또는 디락탐은 티오에테르 연결을 통하여 리간드 단위에 접합되고;

[0260] V, Q, T 및 G는 $-(C(R^9)(R^{10}))-$으로부터 독립적으로 선택되고;

[0261] R^1은 H 또는 C_{1-3} 알킬이고;

[0262] R^9 및 R^{10}은 각 경우에 H 또는 C_{1-3} 알킬로부터 독립적으로 선택되고;

[0263] F는 $C(E^1)(E^2)$이며, 여기서 E^1 및 E^2는 수소, 전자 끄는 기로부터 독립적으로 선택되거나, 또는 E^1 및 E^2는 함께 (=O)이고;

[0264] RS는 임의의 제2 링커 조립체 또는 약물 단위의 구성요소에의 접합을 위한 반응성 부위이고;

[0265] g는 0 내지 5이고;

[0266] m은 0 내지 5이고;

[0267] n은 0 내지 5이고;

[0268] d는 0 또는 1이고;

[0269] x는 0 내지 4이며, 단 m이 0인 경우 x는 1 내지 4이고;

[0270] p는 존재할 경우 1 내지 20, 바람직하게는 1 내지 12의 범위이고;

[0271] B는 염기이다.

[0272] 화학식 III (IIIa, IIIb, IIIc 및 IIId 포함) 및 그의 제약상 허용되는 염에 있어서, 전자 끄는 기가 F (예컨대 E^1, E^2 또는 E^1 및 E^2) 또는 반응성 부위 RS 중 어느 하나로 표시되게 된다는 것은 이해될 것이다. 예를 들어, d가 0인 경우, 또는 E^1 및 E^2가 수소인 경우, 반응성 부위는 전자 끄는 기로 작용하게 된다. 일부 측면에서, d가 0인 경우, RS는 -C(=O)-이다. 일부 측면에서는, n, d 및 g가 0이거나, 또는 m, n, d 및 g가 0이며, RS는 -C(=O)-이다.

[0273] 리간드-약물 접합체, 약물-링커, 링커 또는 리간드-링커 접합체가 화학식 III (또는 경우에 따라 화학식 IIIa, IIIb, IIIc 또는 IIId) 또는 그의 제약상 허용되는 염으로 나타내어지는 예시적인 실시양태에는 m이 0인 것들; m이 0이고, n이 0, 1, 2 또는 3인 것들; x가 1인 것들; x가 0이고 n이 0, 1, 2 또는 3인 것들; 및 m이 0이고, n이 0이며, x가 1인 것들이 포함된다. 예시적인 실시양태에서는 R^9 및 R^{10}이 수소인 본원에서 기술되는 것들이 포함된다. 예시적인 실시양태에서는 E^1 및 E^2가 H, -CN, $-NO_2$, $-CX_3$으로부터 독립적으로 선택되며, 여기서 X가 할로겐이거나, 또는 E^1 및 E^2가 함께 (=O)인 것들이 포함된다. 나머지 치환기들은 정의된 바와 같다.

[0274] 리간드-약물 접합체, 약물-링커, 링커 또는 리간드-링커 접합체가 화학식 III (또는 경우에 따라 화학식 IIIa, IIIb, IIIc 또는 IIId) 또는 그의 제약상 허용되는 염으로 나타내어지는 예시적인 실시양태에는 하기 (i) 내지 (xxxvii), 그리고 조합 또는 하위조합이 서로 충돌하지 (예컨대 p가 동시에 약 4이면서 약 8일 수 없으므로, xxx와 xxxi는 충돌함) 않는다는 전제하에 (i) 내지 (xxxvii)의 임의 조합 또는 하위조합이 포함된다:

[0275] (i) E^1 및 E^2가 수소, -CN, $-NO_2$, $-CX_3$ 및 -X로부터 독립적으로 선택되며, 여기서 X가 할로겐이거나, 또는 E^1 및 E^2가 함께 (=O)인 것들;

[0276] (ii) m이 0이고, n이 0, 1, 2 또는 3인 것들;

[0277] (iii) x가 1인 것들;

[0278] (iv) x가 4인 것들;

[0279] (v) x가 0이고, n이 0, 1, 2 또는 3인 것들;

[0280] (vi) m이 0이고, n이 0이며, x가 1인 것들;

[0281] (vii) d가 1이고, g가 1 내지 5인 것들;

[0282] (viii) d가 1이고, g가 2 내지 5인 것들;

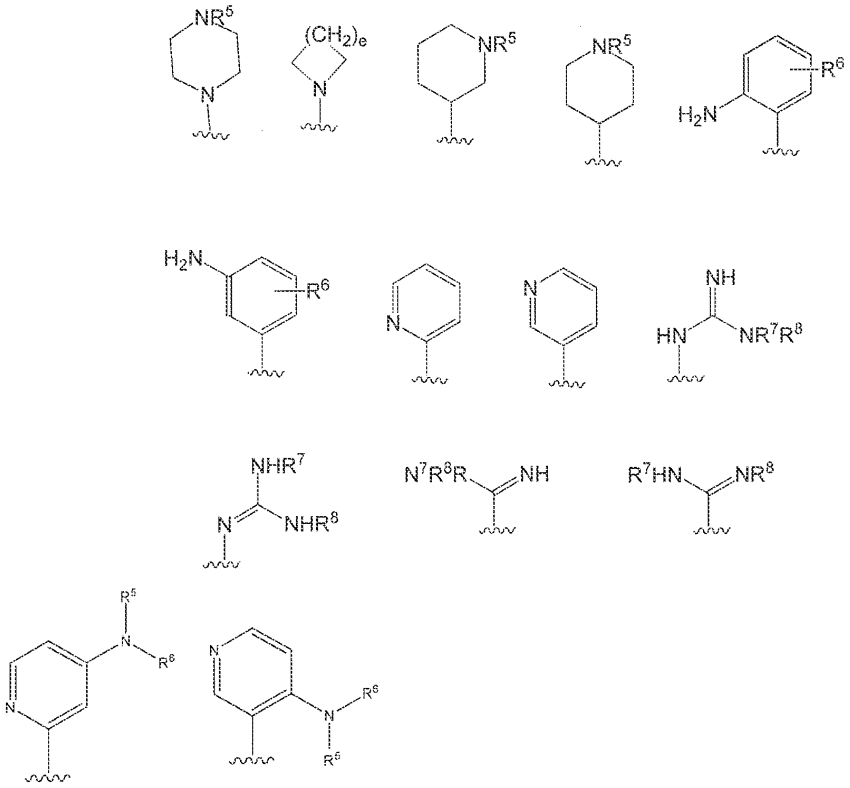
[0283] (ix) n, d 및 g가 0인 것들;

[0284] (x) m, n, d 및 g가 0인 것들;

[0285] (xi) RS가 -C(=O)-인 것들;

[0286] (xii) E^1 및 E^2가 함께 (=O)인 것들;

[0287] (xiii) B가 하기 또는 $-N(R^3)(R^4)$인 것들:

[0288] 

[0289] (상기 식에서, R^3, R^4, R^5, R^6, R^7 및 R^8은 H 또는 C_{1-6} 알킬로부터 독립적으로 선택되며, e는 0 내지 4임);

[0290] (xiv) B가 $-N(R^3)(R^4)$이며, 여기서 R^3 및 R^4가 H 또는 C_{1-6} 알킬로부터 독립적으로 선택되는 것들;

[0291] (xv) B가 (xiii) 또는 (xiv)에서와 같으며, R^3, R^4, R^5, R^6, R^7 및 R^8이 H 또는 C_{1-3} 알킬로부터 독립적으로 선택되는 것들;

[0292] (xvi) B가 (xiii) 또는 (xiv)에서와 같으며, R^3, R^4, R^5, R^6, R^7 및 R^8이 H 또는 메틸로부터 독립적으로 선택되는 것들;

[0293] (xvii) B가 (xiii) 또는 (xiv) 또는 (xvi)에서와 같으며, R^3 및 R^4가 수소인 것들;

[0294] (xviii) B가 (xiii) 또는 (xiv) 또는 (xvi)에서와 같으며, R^3 및 R^4 중 1종 이상이 수소인 것들;

[0295] (xix) B가 (xiii) 또는 (xiv) 또는 (xvi)에서와 같으며, R^3 및 R^4 중 1종 이상이 수소가 아닌 것들;

[0296] (xx) R^1, R^9 및 R^{10}이 H 또는 메틸로부터 독립적으로 선택되는 것들;

[0297] (xxi) R^1, R^9 및 R^{10}이 수소인 것들;

[0298] (xxii) R^1, R^9 및 R^{10}이 H 또는 메틸로부터 독립적으로 선택되는 것들;

[0299] (xxiii) 절단가능 단위가 존재하는 것들;

[0300] (xxiv) 절단가능 단위가 존재하고, 화학식 $-(AA\text{-}AA)_{1-6}-$을 가지며, 여기서 AA는 각 경우에 아미노산로부터 독립

적으로 선택되는 것들;

[0301] (xxv) 절단가능 단위가 존재하며, 약물 단위에 직접 접합되는 것들;

[0302] (xxvi) 절단가능 단위가 존재하며, 절단가능 펩티드, 디술피드 또는 히드라존 결합을 통하여 약물 단위에 직접 접합되는 것들;

[0303] (xxvii) 절단가능 단위가 존재하며, 스페이서 및 스트레쳐 단위가 부재하는 것들;

[0304] (xxviii) 약물이 아우리스타틴인 것들;

[0305] (xxix) M^1이 가수분해 또는 비-가수분해 숙신이미드인 것들;

[0306] (xxx) p가 약 4인 것들;

[0307] (xxxi) p가 약 8인 것들;

[0308] (xxxii) 자가-안정화 링커 단위의 티오-치환된 숙신이미드 가수분해의 t1/2이 pH 7.4 및 22℃에서 약 10분 내지 약 2.5시간인 것들;

[0309] (xxxiii) 자가-안정화 링커 단위의 티오-치환된 숙신이미드 가수분해의 t1/2이 pH 7.4 및 22℃에서 약 10분 내지 약 1시간인 것들;

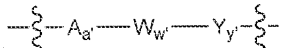
[0310] (xxxiv) 자가-안정화 링커 단위의 티오-치환된 숙신이미드 가수분해의 t1/2이 pH 7.4 및 22℃에서 약 10분 내지 약 30분인 것들;

[0311] (xxxv) 리간드 단위가 항체인 것들;

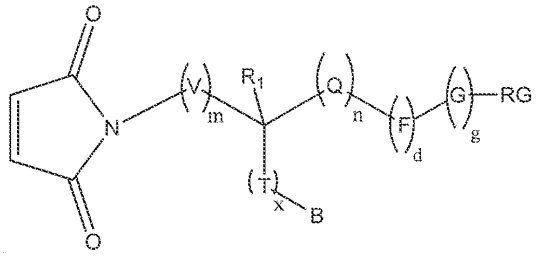
[0312] (xxxvi) 리간드 단위가 항체이며, 쇄간 디술피드의 시스테인 잔기를 통하여 링커 단위에 결합되는 것들;

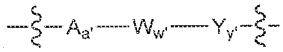
[0313] (xxxvii) 리간드 단위가 모노클로날 항체인 것들.

[0314] 예를 들면, 선별된 실시양태에서, m은 0이며, n은 0, 1, 2 또는 3이다. 다른 선별된 실시양태에서, m은 0이며, n은 0이고, x는 1이다. 이러한 선별된 실시양태들 중 어느 것에서, d는 1일 수 있으며, g는 1 내지 5일 수 있거나, 또는 d는 1일 수 있고, g는 2 내지 5일 수 있다. 이러한 실시양태들 중 어느 것에서는, (i), (iii) 또는 (xi)-(xxxvi) 중 1종 이상이 적용될 수 있다.

[0315] 리간드-약물 접합체, 약물-링커, 링커 또는 리간드-링커 접합체가 화학식 III (또는 경우에 따라 화학식 IIIa, IIIb, IIIc 또는 IIId) 또는 그의 제약상 허용되는 염으로 나타내어지는 선별된 실시양태들 각각에서, 임의의 제2 링커 조립체는 하기 화학식  으로 표시될 수 있으며, 여기서 -A-는 임의의 스트레쳐 단위이고, 아래첨자 a'는 0 또는 1이고; -W-는 임의의 절단가능 단위이고, 아래첨자 w'는 0 또는 1이고; -Y-는 임의의 스페이서 단위이고, 아래첨자 y'는 0 또는 1이다.

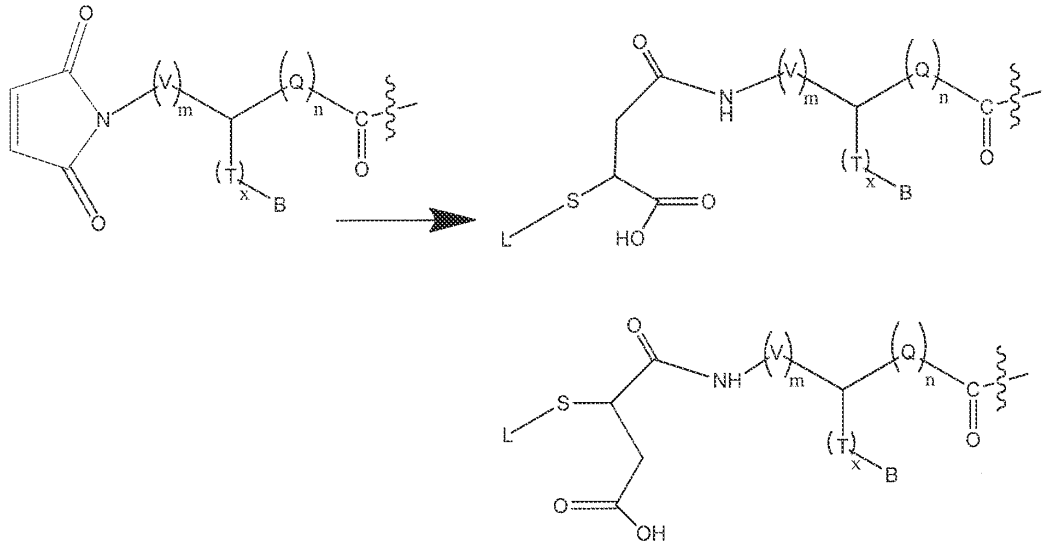
[0316] 역시 포함되는 것은 링커가 하기 화학식 또는 그의 제약상 허용되는 염을 갖는 선별된 실시양태이다:

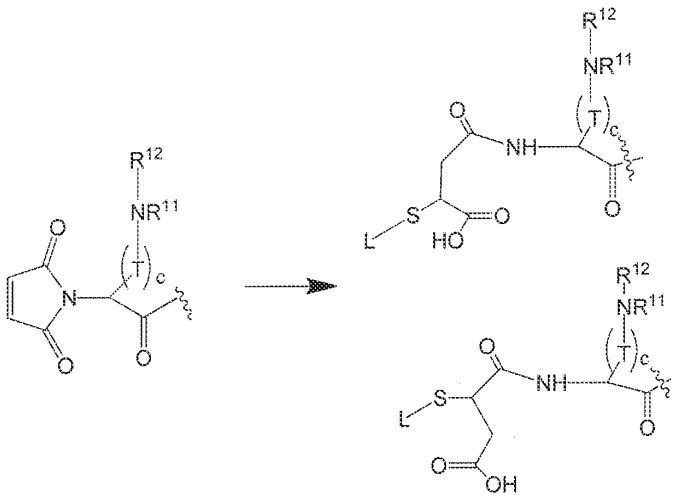
[0317] 

[0318] 상기 식에서, V, T, B, R^1, Q, F, G, m, x, n, d 및 g는 화학식 III에 대하여 정의된 바와 같으며, RG는 제2 링커 조립체가 부재하는 경우 약물 단위 D에의 접합, 또는 제2 링커 조립체의 구성요소에의 접합을 위한 반응성 부위 RS를 포함하는 반응성 기이며, 여기서 상기 제2 링커 조립체 제2 링커는 하기 화학식  을 가지며, 여기서 -A-는 임의의 스트레쳐 단위이고, 아래첨자 a'는 0 또는 1이고; -W-는 임의의 절단가능 단위이고, 아래첨자 w'는 0 또는 1이고; -Y-는 임의의 스페이서 단위이고, 아래첨자 y'는 0 또는 1임).

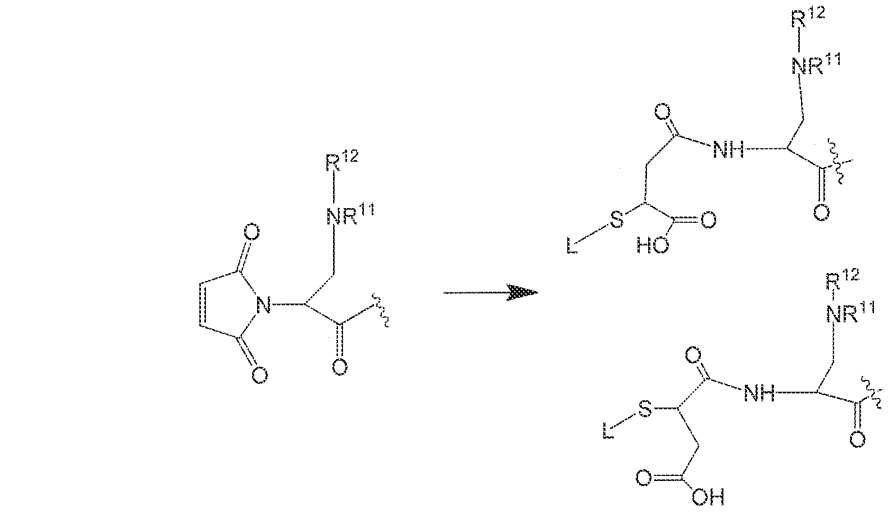
[0319] **추가적인 본 발명 실시양태**

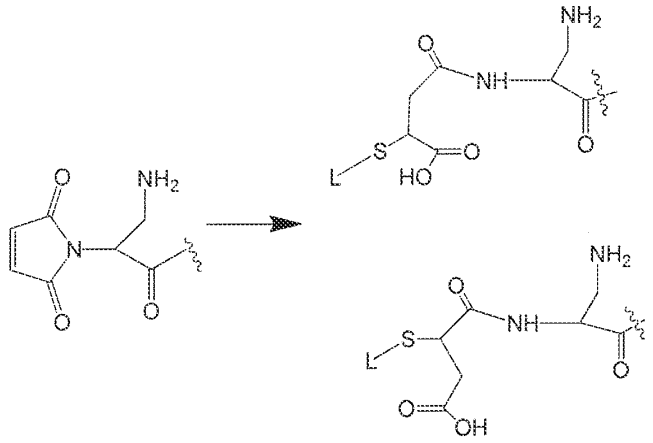
[0320] 리간드와의 접합, 및 접합시 형성되는 티오-치환 숙신이미드의 후속 접합 및 가수분해 전의 예시적인 자가-안정화 링커 조립체는 하기 또는 그의 제약상 허용되는 염과 같다:



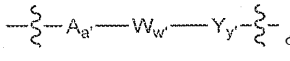


[0321]

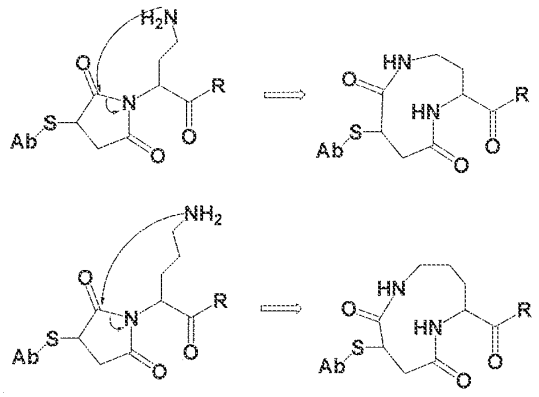




[0322]

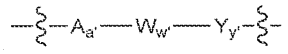
[0323] 상기 식에서, V, Q, T, m, n, x 및 B는 화학식 III 또는 임의의 다른 선별된 실시양태에 대하여 상기 정의된 바와 같으며, c는 1 내지 4이고, R^{11} 및 R^{12}는 각 경우에 H 또는 C_1-C_6 알킬로부터 독립적으로 선택된다. 예시적인 실시양태에서, c는 1 또는 4이다. 가수분해된 티오-숙신이미드의 "S"는 리간드 (예컨대 항체)의 황 원자를 나타낸다. 파상선은 제2 링커 조립체 또는 약물 단위에의 연결을 표시한다. 예시적인 실시양태에서, 파상선은 하기의 제2 링커 조립체  에의 연결을 표시하며, 여기서 -A-는 임의의 스트레쳐 단위이고, 아래첨자 a'는 0 또는 1이고; -W-는 임의의 절단가능 단위이고, 아래첨자 w'는 0 또는 1이고; -Y-는 임의의 스페이서 단위이고, 아래첨자 y'는 0 또는 1이다. 1개를 초과하는 (예컨대 1 내지 20개의) 약물-링커가 각 리간드에 결합될 수 있다는 것은 이해될 것이다.

[0324] 본 발명의 일부 측면에서, 자가-안정화 링커 조립체는 거대-고리화에 적용됨으로써 하기와 같이 디락탐을 형성할 수 있는데, 여기서 R은 접합체의 나머지를 나타낸다:

[0325] 

[0326] **제2 링커 조립체**

[0327] 임의의 제2 링커는 다양한 연결 기들을 포함할 수 있다. 구체적으로 언급되는 실시양태를 포함하여 본원에서 제공되는 실시양태들 각각에서는, L^{0}가 존재하며 하기 화학식을 가질 수 있다:

[0328] 

[0329] 상기 식에서,

[0330] -A-는 임의의 스트레쳐 단위이며, 아래첨자 a'는 0 또는 1이고;

[0331] -W-는 임의의 절단가능 단위이며, 아래첨자 w'는 0 또는 1이고;

[0332] -Y-는 임의의 스페이서 단위이며, 아래첨자 y'는 0 또는 1이다.

[0333] 임의의 제2 링커 조립체는 방출가능 링커 조립체 L^{R}일 수 있다. 그러한 실시양태에서, w는 1이다. 일부 다른 측면에서, 임의의 제2 링커 조립체는 비-방출가능 링커 조립체이다. 그러한 실시양태에서, w는 0이며, 약물의 방출은 전체 단백질 분해 경로 (즉 비-절단가능 경로)를 통한다.

[0334] **리간드 단위**

[0335] 본 발명의 일부 실시양태에서는, 리간드 단위가 존재한다. 리간드 단위 (L-)는 표적 모이어티에 특이적으로 결합하는 표적화 작용제(targeting agent)이다. 리간드는 세포 구성요소 (세포 결합 작용제) 또는 다른 대상 표적 분자에 특이적으로 결합할 수 있다. 일부 측면에서, 리간드 단위는 리간드 단위가 상호작용하는 특정 표적 세포 군집에 약물 단위를 전달하는 작용을 한다. 리간드에는 단백질, 폴리펩티드 및 펩티드가 포함되나, 이에 제한되는 것은 아니다. 적합한 리간드 단위에는 예를 들면 항체, 예컨대 전체-길이 항체 및 그의 항원 결합 단편, 인터페론, 림포카인, 호르몬, 성장 인자 및 집락-자극 인자, 비타민, 영양소-수송 분자 (예컨대 비제한적으로 트랜스페린), 또는 임의의 다른 세포 결합 분자 또는 물질이 포함된다. 일부 측면에서, 리간드는 비-항체 단백질 표적화 작용제이다. 일부 측면에서는, D'가 검출 단위 또는 안정성 단위이고 리간드 단위가 단백질 (예컨대 비-항체 단백질)인 리간드-기능성 작용제가 제공된다.

[0336] 일부 측면에서, 리간드 단위는 리간드의 술피드릴 기를 통하여 자가-안정화 염기성 단위의 말레이미드와 결합을 형성함으로써, 티오-치환된 숙신이미드를 형성시킨다. 술피드릴 기는 리간드의 자연 상태인 리간드, 예를 들면 자연-발생 잔기 상에 존재할 수 있거나, 또는 화학적 변형을 통하여 리간드에 도입될 수 있다.

[0337] 생체접합체에서 약물 접합 부위가 접합의 용이성, 약물-링커 안정성, 생성 생체접합체의 생물물리학적 특성에 대한 효과 및 시험관내 세포독성을 포함한 수많은 파라미터에 영향을 줄 수 있다는 것이 관찰되었다. 약물-링커 안정성과 관련하여, 리간드에 대한 약물-링커의 접합 부위는 제거 반응에 적용되어 약물 링커가 생체접합체의 리간드로부터 예를 들면 혈장에 있는 경우의 알부민, 유리 시스테인 또는 글루타티온의 반응성 티올과 같은 생체접합체의 환경 중에 존재하는 대안적인 반응성 티올로 전달되는 접합된 약물-링커의 능력에 영향을 줄 수 있다. 본 발명 자가-안정화 링커의 사용은 비-자가-안정화 알킬 말레이미드가 사용되는 경우 (예컨대 말레이미도-카프로일 약물 링커)에 약물-링커의 제거 반응 및 이후의 전달에 감수성인 부위에서 티올 잔기에 접합되는 경우에 특히 유리하다. 그와 같은 부위에는 예를 들면 쇄간 디술피드는 물론, 선별된 시스테인 조작 부위가 포함된다. 본 발명 자가-안정화 링커의 사용은 안정한 연결, 및 각 리간드 단위에 다수의 약물을 결합시키는 능

력을 제공한다.

[0338] 한 측면에서, 리간드 단위는 1개 이상의 술피드릴 기를 도입하도록 화학적으로 변형될 수 있는 1개 이상의 리신 잔기를 가진다. 리신을 변형시키는 데에 사용될 수 있는 반응물에는 N-숙신이미딜 S-아세틸티오아세테이트 (SATA) 및 2-이미노티올란 히드로클로라이드 (트라웃 반응물(Traut's Reagent))가 포함되나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0339] 또 다른 실시양태에서, 리간드 단위는 1개 이상의 술피드릴 기를 가지도록 화학적으로 변형될 수 있는 1개 이상의 탄수화물 기를 가질 수 있다.

[0340] 또 다른 실시양태에서, 리간드는 항체이며, 술피드릴 기는 쇄간 디술피드의 환원에 의해 생성된다. 따라서, 일부 실시양태에서, 링커 단위는 환원된 쇄간 디술피드의 시스테인 잔기에 접합된다.

[0341] 또 다른 실시양태에서, 술피드릴 기는 예를 들면 시스테인 잔기의 도입에 의해 화학적으로 항체에 도입된다. 따라서, 일부 실시양태에서, 링커 단위는 도입된 시스테인 잔기에 접합된다.

[0342] 유용한 비-면역반응성 단백질, 폴리펩티드 또는 펩티드 리간드에는 트랜스페린, 표피 성장 인자 ("EGF"), 봄베신, 가스트린, 가스트린-방출 펩티드, 혈소판-유래 성장 인자, IL-2, IL-6, 전환 성장 인자 ("TGF"), 예컨대 TGF-α 및 TGF-β, 백시니아 성장 인자 ("VGF"), 인슐린 및 인슐린-유사 성장 인자 I 및 II, 소마토스타틴, 렉틴, 및 저밀도 지질단백질 유래의 아포단백질이 포함되나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0343] 특히 바람직한 리간드는 항체이다. 유용한 폴리클로날 항체는 면역화된 동물의 혈청으로부터 유래하는 비균질 항체 분자 군집이다. 유용한 모노클로날 항체는 특정 항원 결정인자 (예컨대 암 세포 항원, 바이러스 항원, 미생물 항원, 단백질, 펩티드, 탄수화물, 화학물질, 핵산 또는 이들의 단편)에 대한 균질 항체 군집이다. 대상-항원에 대한 모노클로날 항체 (mAb)는 배양물 중 연속 세포 주에 의한 항체 분자의 생성을 제공하는 업계 공지의 소정 기술을 사용하여 제조될 수 있다.

[0344] 유용한 모노클로날 항체에는 인간 모노클로날 항체, 인간화된 모노클로날 항체 또는 키메라 인간-마우스 (또는 다른 종) 모노클로날 항체가 포함되나, 이에 제한되는 것은 아니다. 항체에는 전체-길이 항체 및 그의 항원 결합 단편이 포함된다. 인간 모노클로날 항체는 업계에 알려져 있는 많은 기술들 중 어느 것 (예컨대 문헌 [Teng *et al.*, 1983, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 80:7308-7312]; [Kozbor *et al.*, 1983, *Immunology Today* 4:72-79]; 및 [Olsson *et al.*, 1982, *Meth. Enzymol* 92:3-16])에 의해 제조될 수 있다.

[0345] 항체는 표적 세포 (예컨대 암 세포 항원, 바이러스 항원 또는 미생물 항원), 또는 종양 세포 또는 매트릭스에 결합되어 있는 다른 항체에 면역특이적으로 결합하는 항체의 기능적으로 활성인 단편, 유도체 또는 유사체일 수 있다. 이와 관련하여, "기능적으로 활성인"은 단편, 유도체 또는 유사체가 그 단편, 유도체 또는 유사체가 유래하는 항체와 동일한 항원을 인식하는 항-항-개별특이형 항체를 도출할 수 있음을 의미한다. 구체적으로, 예시적인 실시양태에서는, 항원을 특이적으로 인식하는 CDR 서열의 C-말단인 프레임워크 및 CDR 서열의 결실에 의해, 이뮤노글로불린 분자의 개별특이형의 항원성이 향상될 수 있다. 어느 CDR 서열이 항원에 결합하는지를 측정하기 위해서는, CDR 서열을 포함하는 합성 펩티드가 업계에 알려져 있는 소정의 결합 검정법 (예컨대 BIA 코어 검정)에 의한 항원과의 결합 검정에서 사용될 수 있다 (예컨대 문헌 [Kabat *et al.*, 1991, *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, Fifth Edition, National Institute of Health, Bethesda, Md]; [Kabat E *et al.*, 1980, *J. Immunology* 125(3):961-969] 참조).

[0346] 다른 유용한 항체에는 비제한적으로 $F(ab')_2$ 단편, Fab 단편, Fvs, 단일 쇄 항체, 디아바디, 트리아바디, 테트라바디, scFv, scFv-FV, 또는 항체와 동일한 특이성을 갖는 소정의 다른 항체와 같은 항체 단편들이 포함된다.

[0347] 또한, 표준 재조합 DNA 기술을 사용하여 제조될 수 있는 인간 및 비-인간 부분 모두를 포함하는 키메라 및 인간화 모노클로날 항체와 같은 재조합 항체가 유용한 항체이다. 키메라 항체는 서로 다른 부분이 예를 들면 뮤린 모노클로날으로부터 유래하는 가변 영역 및 인간 이뮤노글로불린 불변 영역을 갖는 것들과 같이 서로 다른 동물 종으로부터 유래하는 분자이다 (예컨대 그 전문이 본원에 참조로써 개재되는 U.S. 특허 제4,816,567호; 및 U.S. 특허 제4,816,397호 참조). 인간화된 항체는 비-인간 종으로부터의 1개 이상의 상보성 결정 영역 (CDR) 및 인간 이뮤노글로불린 분자로부터의 프레임워크 영역을 갖는 비-인간 종으로부터의 항체 분자이다 (예컨대 그 전문이 본원에 참조로써 개재되는 U.S. 특허 제5,585,089호 참조). 이와 같은 키메라 및 인간화 모노클로날 항체는 업계에 알려져 있는 재조합 DNA 기술에 의해, 예를 들면 각각 그 전문이 본원에 참조로써 개재되는 국제 공개 제WO 87/02671호; 유럽 특허 공개 제0 184 187호; 유럽 특허 공개 제0 171 496호; 유럽 특허 공개 제0 173 494

호; 국제 공개 제WO 86/01533호; U.S. 특허 제4,816,567호; 유럽 특허 공개 제012 023호; 문헌 [Berter *et al.*, 1988, *Science* 240:1041-1043]; [Liu *et al.*, 1987, *Proc. Natl Acad Sci. USA* 84:3439-3443]; [Liu *et al.*, 1987, *J. Immunol.* 139:3521-3526]; [Sun *et al.*, 1987, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84:214-218]; [Nishimura *et al.*, 1987, *Cancer. Res.* 47:999-1005]; [Wood *et al.*, 1985, *Nature* 314:446-449]; 및 [Shaw *et al.*, 1988, *J. Natl. Cancer Inst.* 80:1553-1559]; [Morrison, 1985, *Science* 229:1202-1207]; [Oi *et al.*, 1986, *BioTechniques* 4:214]; U.S. 특허 제5,225,539호; 문헌 [Jones *et al.*, 1986, *Nature* 321:552-525]; [Verhoeyan *et al.*, 1988, *Science* 239:1534]; 및 [Beidler *et al.*, 1988, *J. Immunol.* 141:4053-4060]에 기술되어 있는 방법들을 사용하여 제조될 수 있다.

[0348] 완전한 인간 항체가 특히 바람직한데, 내인성 이뮤노글로불린 중쇄 및 경쇄 유전자는 발현할 수 없으나 인간 중쇄 및 경쇄 유전자는 발현할 수 있는 트랜스제닉 마우스를 사용하여 제조될 수 있다.

[0349] 항체에는 모두 변형된 것으로써, 다시 말하자면 해당 공유 결합이 항체가 그의 항원 결합 면역특이성을 유지하는 것을 가능케 한다는 전제하에 소정 유형 분자의 공유 결합에 의한 것인 유사체 및 유도체가 포함된다. 제한하고자 하는 것은 아니나 예를 들면, 항체의 유도체 및 유사체에는 예컨대 글리코실화, 아세틸화, 페길화, 인산화, 아미드화, 공지의 보호/차단 기에 의한 유도체화, 단백질분해 절단, 세포 항체 단위 또는 다른 단백질로의 연결 등에 의해 추가로 변형된 것들이 포함된다. 수많은 화학적 변형들 중 어떠한 것도 비제한적으로 특이적 화학 절단, 아세틸화, 포르밀화, 투니카마이신 존재하에서의 대사 합성 등을 포함한 공지의 기술에 의해 수행될 수 있다. 또한, 유사체 또는 유도체는 1종 이상의 비자연 아미노산을 포함할 수 있다.

[0350] 항체는 Fc 수용체와 상호작용하는 아미노산 잔기에 변형 (예컨대 치환, 결실 또는 첨가)을 가질 수 있다. 구체적으로, 항체는 항-Fc 도메인과 FcRn 수용체 사이의 상호작용에 연관되어 있는 것으로 확인된 아미노산 잔기에 변형을 가질 수 있다 (예컨대 그 전문이 본원에 참조로써 개재되는 국제 공개 제WO 97/34631호 참조).

[0351] 암 세포 항원에 대하여 면역특이적인 항체는 시중에서 입수될 수 있거나, 또는 예를 들면 화학적 합성 또는 재조합 발현 기술과 같은 업계 숙련자에게 알려져 있는 소정의 방법에 의해 제조될 수 있다. 암 세포 항원에 대하여 면역특이적인 항체를 코딩하는 뉴클레오티드 서열은 예를 들면 진뱅크(GenBank) 데이터베이스 또는 그와 유사한 데이터베이스, 문헌 공개로부터, 또는 일상적인 클로닝 및 서열분석에 의해 입수될 수 있다.

[0352] 특정 실시양태에서는, 공지의 암 치료용 항체가 사용될 수 있다. 암 세포 항원에 대하여 면역특이적인 항체는 시중에서 입수될 수 있거나, 또는 예를 들면 재조합 발현 기술과 같은 업계 숙련자에게 알려져 있는 소정의 방법에 의해 제조될 수 있다. 암 세포 항원에 대하여 면역특이적인 항체를 코딩하는 뉴클레오티드 서열은 예를 들면 진뱅크 데이터베이스 또는 그와 유사한 데이터베이스, 문헌 공개로부터, 또는 일상적인 클로닝 및 서열분석에 의해 입수될 수 있다.

[0353] 또 다른 특정 실시양태에서는, 본 발명의 조성물 및 방법에 따라 자가면역 질환 치료용 항체가 사용된다. 자가면역 항체를 생성시키는 것을 담당하는 세포의 항원에 대하여 면역특이적인 항체는 소정의 조직 (예컨대 대학교의 과학자 또는 회사)으로 부터 입수될 수 있거나, 또는 예를 들면 화학적 합성 또는 재조합 발현 기술과 같은 업계 숙련자에게 알려져 있는 소정의 방법에 의해 제조될 수 있다. 또 다른 실시양태에서, 자가면역 질환의 치료에 면역특이적인 유용한 항체에는 항-핵 항체; 항-ds DNA; 항-ss DNA, 항-카르디오리핀 항체 IgM, IgG; 항-인지질 항체 IgM, IgG; 항-SM 항체; 항-미토콘드리아 항체; 갑상선 항체; 마이크로좀 항체; 갑상선글로불린 항체; 항-SCL-70 항체; 항-Jo 항체; 항-U_1RNP 항체; 항-La/SSB 항체; 항-SSA; 항-SSB 항체; 항-벽 세포 항체; 항-히스톤 항체; 항-RNP 항체; C-ANCA 항체; P-ANCA 항체; 항-중심체 항체; 항-피브릴라린 항체 및 항-GBM 항체가 포함되나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0354] 소정 실시양태에서, 유용한 항체는 활성화된 림프구 상에서 발현되는 수용체 또는 수용체 복합체에 결합할 수 있다. 상기 수용체 또는 수용체 복합체는 이뮤노글로불린 유전자 상과 구성원, TNF 수용체 상과 구성원, 인테그린, 시토카인 수용체, 케모카인 수용체, 주 조직적합성 단백질, 렉틴 또는 보체 조절 단백질을 포함할 수 있다. 적합한 이뮤노글로불린 상과 구성원의 비-제한적인 예는 CD2, CD3, CD4, CD8, CD19, CD20, CD22, CD28, CD30, CD70, CD79, CD90, CD152/CTLA-4, PD-1 및 ICOS이다. 적합한 TNF 수용체 상과 구성원의 비-제한적인 예는 CD27, CD40, CD95/Fas, CD134/OX40, CD137/4-1BB, TNF-R1, TNFR-2, RANK, TACI, BCMA, 오스테오프로테게린, Apo2/TRAIL-R1, TRAIL-R2, TRAIL-R3, TRAIL-R4 및 APO-3이다. 적합한 인테그린의 비-제한적인 예는 CD11a, CD11b, CD11c, CD18, CD29, CD41, CD49a, CD49b, CD49c, CD49d, CD49e, CD49f, CD103 및 CD104이다. 적합한 렉틴의 비-제한적인 예는 C-형, S-형 및 I-형 렉틴이다.

[0355] **약물 단위 D**

[0356] 약물 단위 (D)는 본원에서 세포독성, 세포억제성 또는 면역억제성 작용제로도 지칭되는 소정의 세포독성, 세포억제성 또는 면역억제성 약물일 수 있다. 약물 단위는 링커 단위와 결합을 형성할 수 있는 원자를 가진다. 일부 실시양태에서, 약물 단위 D는 링커 단위와 결합을 형성할 수 있는 질소 원자를 가진다. 다른 실시양태에서, 약물 단위 D는 링커 단위와 결합을 형성할 수 있는 카르복실산을 가진다. 다른 실시양태에서, 약물 단위 D는 링커 단위와 결합을 형성할 수 있는 술피드릴 기를 가진다. 다른 실시양태에서, 약물 단위 D는 링커 단위와 결합을 형성할 수 있는 히드록실 기 또는 케톤을 가진다.

[0357] 유용한 종류의 세포독성 또는 면역억제성 작용제에는 예를 들면 항튜불린 작용제, 아우리스타틴, DNA 부홈(minor groove) 바인더, DNA 복제 억제제, 알킬화제 (예를 들면 백금 복합체 예컨대 시스-플라틴, 모노(백금), 비스(백금) 및 3-핵 백금 복합체 및 카르보플라틴), 안트라사이클린, 안티바이오틱스, 안티폴레이트, 항대사물질, 화학요법 민감화제, 듀오카르마이신, 에토포시드, 플루오르화 피리미딘, 이온운반체, 렉시트롭신, 니트로소우레아, 플라티놀, 사전-형성 화합물, 퓨린 항대사물질, 퓨로마이신, 방사선 민감화제, 스테로이드, 탁산, 토포이소머라제 억제제, 빈카 알칼로이드 등이 포함된다. 유용한 종류의 세포독성 작용제의 구체적인 예에는 예를 들면 DNA 부홈 바인더, DNA 알킬화제 및 튜불린 억제제가 포함된다. 예시적인 세포독성 작용제에는 예를 들면 아우리스타틴, 캄프토테신, 듀오카르마이신, 에토포시드, 마이탄신 및 마이탄시노이드 (예컨대 DM1 및 DM4), 탁산, 벤조디아제핀 (예컨대 피롤[1,4]벤조디아제핀 (PBD), 인돌리노벤조디아제핀 및 옥사졸리디노벤조디아제핀) 및 빈카 알칼로이드가 포함된다. 선별된 벤조디아제핀 함유 약물들이 WO 2010/091150호, WO 2012/112708호, WO 2007/085930호 및 WO 2011/023883호에 기술되어 있다.

[0358] 개별적인 세포독성 또는 면역억제성 작용제에는 예를 들면 안드로겐, 안트라마이신 (AMC), 아스파라기나제, 5-아자시티딘, 아자티오프린, 블레오마이신, 부술판, 부티오닌 술폭스이민, 칼리케아미신, 캄프토테신, 카르보플라틴, 카르무스틴 (BSNU), CC-1065, 클로람부실, 시스플라틴, 콜히친, 시클로포스파미드, 시타라빈, 시티딘 아라비노시드, 시토칼라신 B, 다카르바진, 닥티노마이신 (구 악티노마이신), 다우노루비신, 데카르바진, 도세탁셀, 독소루비신, 에토포시드, 에스트로겐, 5-플루오르데옥시우리딘, 5-플루오로우라실, 젬시타빈, 그라미시딘 D, 히드록시우레아, 이다루비신, 이포스파미드, 이리노테칸, 로무스틴 (CCNU), 마이탄신, 메클로레타민, 멜팔란, 6-메르캅토퓨린, 메토트렉세이트, 미트라마이신, 미토마이신 C, 미톡산트론, 니트로이미다졸, 파클리탁셀, 팔리톡신, 플리카마이신, 프로카르비진, 리족신, 스트렙토조토신, 테노포시드, 6-티오구아닌, 티오TEPA, 토포테칸, 빈블라스틴, 빈크리스틴, 비노렐빈, VP-16 및 VM-26이 포함된다.

[0359] 일부 전형적인 실시양태에서, 적합한 세포독성 작용제에는 예를 들면 DNA 부홈 바인더 (예컨대 에네다인 및 렉시트롭신, CBI 화합물; 또한 U.S. 특허 제6,130,237호 참조), 듀오카마이신 (U.S. 공개 제20060024317호 참조), 탁산 (예컨대 파클리탁셀 및 도세탁셀), 퓨로마이신, 빈카 알칼로이드, CC-1065, SN-38, 토포테칸, 모르폴리노-독소루비신, 리족신, 시아노모르폴리노-독소루비신, 에키노마이신, 콤브레타스타틴, 네트롭신, 에포틸론 A 및 B, 에스트라무스틴, 크립토피신, 세마도틴, 마이탄시노이드, 디스코데르몰리드, 엘류테로빈 및 미톡산트론이 포함된다.

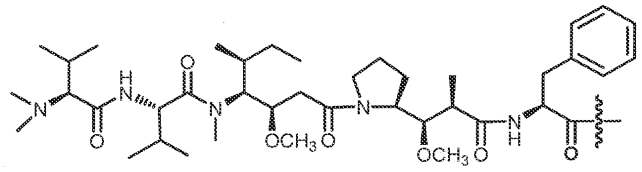
[0360] 일부 실시양태에서, 약물 단위는 항-튜불린 작용제이다. 항-튜불린 작용제의 예에는 탁산 (예컨대 탁솔(Taxol)® (파클리탁셀), 탁소테레(Taxotere)® (도세탁셀)), T67 (툴라리크(Tularik)) 및 빈카 알칼로이드 (예컨대 빈크리스틴, 빈블라스틴, 빈데신 및 비노렐빈)이 포함되나, 이에 제한되는 것은 아니다. 다른 항튜불린 작용제에는 예를 들면 베카틴 유도체, 탁산 유사체 (예컨대 에포틸론 A 및 B), 노코다졸, 콜히친 및 콜시미드, 에스트라무스틴, 크립토피신, 세마도틴, 마이탄시노이드, 콤브레타스타틴, 디스코데르몰리드 및 엘류테로빈이 포함된다.

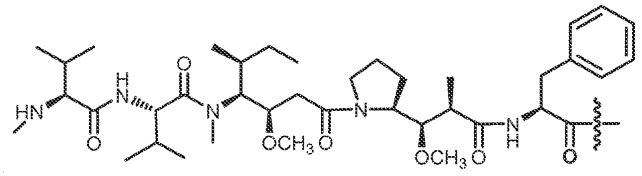
[0361] 소정 실시양태에서, 세포독성 작용제는 또 다른 군의 항-튜불린 작용제인 마이탄신 또는 마이탄시노이드이다 (이뮤노젠(Immunogen), Inc. 사; 또한 문헌 [Chari *et al.*, 1992, *Cancer Res.* 52:127-131] 및 U.S. 특허 제8,163,888호 참조).

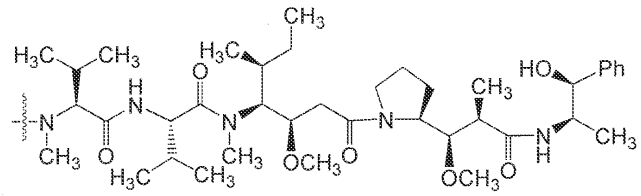
[0362] 일부 실시양태에서, 약물 단위는 아우리스타틴이다. 아우리스타틴에는 AE, AFP, AEB, AEVB, MMAF 및 MMAE가 포함되나, 이에 제한되는 것은 아니다. 아우리스타틴의 합성 및 구조에 대해서는 각각 그 전문이 모든 목적에 있어서 참조로써 개재되는 U.S. 특허 출원 공개 제2003-0083263호, 2005-0238649호, 2005-0009751호, 2009-0111756호 및 2011-0020343호; 국제 특허 공개 제WO 04/010957호, 국제 특허 공개 제WO 02/088172호 및 U.S. 특허 제7,659,241호 및 8,343,928호에 기술되어 있다. 본 발명의 전형적인 아우리스타틴은 튜불린에 결합함으

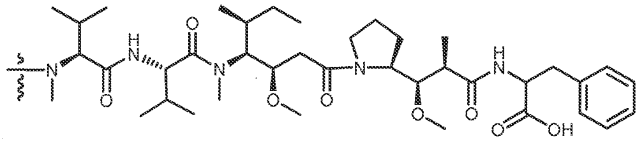
로써 원하는 세포 주에 대하여 세포독성 또는 세포억제성 효과를 발휘한다.

[0363] 전형적인 아우리스타틴 약물 단위는 하기 화학식 또는 그의 제약상 허용되는 염을 갖는 바, 식 중 파상선은 링커 단위에의 결합 부위를 표시한다:

[0364] 

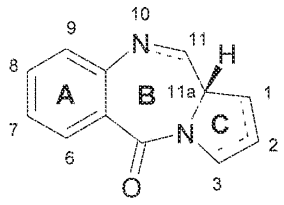
[0365] 

[0366]  , 또는

[0367] 

[0368] 일부 실시양태에서, 약물은 벤조디아제핀 (벤조디아제핀 함유 약물 예컨대 피롤[1,4]벤조디아제핀 (PBD), 인돌리노벤조디아제핀 및 옥사졸리디노벤조디아제핀 포함)이다.

[0369] PBD는 하기의 일반적인 구조를 가지나, 그의 방향족 A 고리 및 피롤 C 고리 양자에서의 치환기의 수, 유형 및 위치, 그리고 C 고리의 포화도에서 차이가 있을 수 있다:

[0370] 

[0371] B-고리에는, N10-C11 위에 이민 (N=C), 카르비놀아민 (NH-CH(OH)), 또는 카르비놀아민 메틸 에테르 (NH-CH(OMe)) 중 어느 하나가 존재하는데, 이는 DNA를 알킬화하는 것을 담당하는 친전자성 중심이다. 알려져 있는 모든 자연 생성물이 키랄 C11a 위치에서 (S)-배열구조를 갖는데, 이는 거기에 C 고리에서 A 고리 방향으로 보았을 때 오른쪽 회전을 제공한다. 이는 B-형 DNA의 부홈과의 동일나선성(isohelicity)을 위한 적절한 3-차원 형상을 거기에 부여함으로써, 결합 부위에서의 꼭 들어맞는 정합성으로 이어진다. 부홈에서 첨가생성물을 형성하는 PBD의 능력은 그것이 DNA 프로세싱을 방해하는 것을 가능케 함으로써, 항종양제로서의 그의 사용을 가능케 한다. 이러한 분자들의 생물학적 활성은 예를 들면 유연성 알킬렌 링커에 의해 그의 C8/C'-히드록실 관능기들을 통하여 2개의 PBD 단위를 함께 결합하는 것에 의해 강력화될 수 있다. PBD 이량체는 주로 그의 생물학적 활성을 담당하는 것으로 여겨지는 팔린드롬 5'-Pu-GATC-Py-3' 가닥간 가교-결합과 같은 서열-선택성 DNA 손상을 형성하는 것으로 생각된다.

[0372] 리간드-약물 접합체가 세포 주에 대하여 세포억제성 또는 세포독성 효과를 발휘하는지 여부를 측정하는 데에 사용될 수 있는 수많은 상이한 검정들이 존재한다. 리간드-약물 접합체가 세포 주에 대하여 세포억제성 또는 세포독성 효과를 발휘하는지 여부를 측정하기 위한 일 예에서는, 티미딘 도입 검정이 사용된다. 예를 들면, 96-웰 플레이팅된 밀도 5,000 세포/웰의 세포를 72-시간의 기간 동안 배양하되, 72-시간 기간 중 최종 8시간 동안

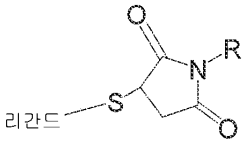
0.5 μCi의 ^{3}H-티미딘에 노출시키고, 리간드-약물 접합체의 존재 및 부재하에서 배양물 중 세포로의 ^{3}H-티미딘 도입을 측정한다. 배양물 중 세포가 동일한 조건하에 배양되었으나 리간드-약물 접합체와 접촉하지 않은 동일 세포 주의 세포에 비해 감소된 ^{3}H-티미딘 도입을 갖는 경우, 리간드-약물 접합체는 세포 주에 대하여 세포억제성 또는 세포독성 효과를 갖는 것이다.

[0373] 리간드-약물 접합체가 세포 주에 대하여 세포억제성 또는 세포독성 효과를 발휘하는지 여부를 측정하기 위한 또 다른 예에서는, 세포에서 뉴트럴 레드, 트라이판 블루 또는 알라마르(ALAMAR)™ 블루와 같은 염료의 흡수를 측정하는 것에 의해 생존력이 측정된다 (예컨대 문헌 [Page *et al.*, 1993, *Intl. J. of Oncology* 3:473-476] 참조). 그와 같은 검정에서는, 염료를 함유하는 배지에서 세포를 인큐베이션하고, 세포를 세척한 후, 염료의 세포 흡수를 반영하는 나머지 염료를 분광광도측정에 의해 측정한다. 단백질-결합 염료인 술포로다민 B (SRB)가 세포독성을 측정하는 데에 사용될 수도 있다 (문헌 [Skehan *et al.*, 1990, *J. Nat'l Cancer Inst.* 82:1107-12]). 바람직한 리간드-약물 접합체에는 세포 주에 대하여 1000 ng/ml 미만, 바람직하게는 500 ng/ml 미만, 더욱 바람직하게는 100 ng/ml 미만, 더욱 더 바람직하게는 50 ng/ml 미만, 또는 심지어는 10 ng/ml 미만의 IC_{50} 값 (50% 세포 사멸을 산출하는 mAB 농도로 정의됨)을 갖는 것들이 포함된다.

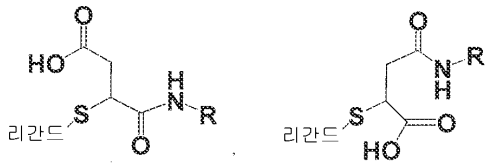
[0374] 약물을 링커에 연결시키기 위한 일반적인 절차에 대해서는 업계에 알려져 있다. 예를 들면, U.S. 특허 제8,163,888호, 7,659,241호, 7,498,298호, U.S. 공개 제US20110256157호 및 국제 출원 제WO2011023883호 및 WO2005112919호를 참조하라.

[0375] **M^{1} - 숙신이미드**

[0376] 티오에테르 연결을 통하여 리간드 단위에 접합된 비-가수분해 숙신이미드 (본원에서는 숙신이미드 고리로도 지칭됨)는 하기와 같이 표시될 수 있으며, 식 중 R은 임의로 약물 단위, 검출 단위 또는 안정성 단위에 접합된 링커 단위의 나머지를 나타낸다:

[0377] 

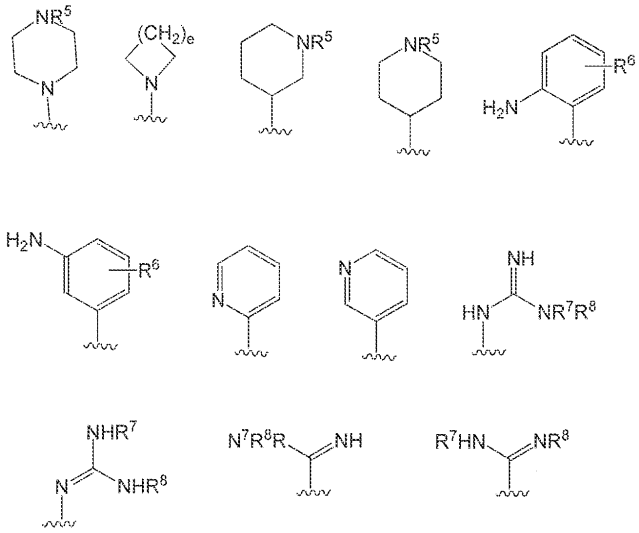
[0378] 티오에테르 연결을 통하여 리간드 단위에 접합된 가수분해 숙신이미드 (본원에서는 가수분해 숙신이미드 고리로도 지칭됨)는 하기와 같은 그의 2종의 위치 이성질체 중 1종으로 표시될 수 있으며, 식 중 R은 임의로 약물 단위, 검출 단위 또는 안정성 단위에 접합된 링커 단위의 나머지를 나타낸다:

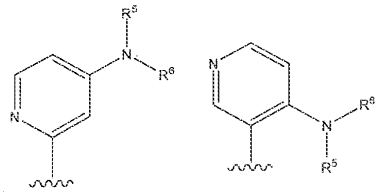
[0379] 

[0380] 비-가수분해 숙신이미드 및 가수분해 숙신이미드의 표시에서, 각 리간드에 접합된 1 내지 20개, 바람직하게는 1 내지 12개, 1 내지 10개 또는 1 내지 8개의 자가-안정화 링커가 존재할 수 있다는 것은 이해될 것이다. 일부 측면에서는, 각 리간드에 접합된 1 내지 20개, 바람직하게는 1 내지 12개, 1 내지 10개 또는 1 내지 8개의 약물-링커가 존재한다. 또한, 리간드가 결합되어 있지 않은 본원에서 기술되는 접합체의 경우, 숙신이미드는 말레이미드로서의 불포화 형태에 있다 (티올 또는 리간드와 반응성일 수 있음).

[0381] **염기성 단위**

[0382] 화학식 I은 물론, 자가-안정화 링커 (L^{SS})를 포함하는 다른 화학식에서, 염기성 단위 (BU)는 본질적으로 히드록시드 이온 (또는 물)이 부근의 숙신이미드 기를 공격하여 가수분해시키는 것을 촉진할 수 있는 소정의 염기일 수 있다. 따라서, BU는 소정의 "염기"를 나타내나, 통상적으로는 결합되어 있는 아민 또는 질소 함유 헤테로사이클을 포함하는 기이고; 상기 아민 또는 질소 함유 헤테로사이클은 염기성 단위의 염기로서 작용한다. 대표적인 아민에는 $-N(R^{3})(R^{4})$ (여기서 R^{3} 및 R^{4}는 H 또는 C_{1-6} 알킬, 바람직하게는 H 또는 메틸로부터 독립적으로 선택됨),

[0383] 

[0384] 

[0385] (상기 식에서 R^5, R^6, R^7 및 R^8은 각 경우에 수소 또는 C_{1-6} 알킬, 바람직하게는 H 또는 메틸로부터 독립적으로 선택되며, e는 0-4임)가 포함된다. 상기 식에서, 파상선은 결합 기 (통상적으로 알킬렌 링커 $-(C(R^9)(R^{10}))_x-$)에의 부착 지점을 표시하며, 여기서 아래첨자 x는 0 내지 6 (또는 1 내지 6)의 정수이며, 단 x가 0인 경우 염기성 단위의 염기와 숙신이미드 (가수분해된 것 또는 비-가수분해된 것) 또는 디락탐의 질소 원자의 사이에 2개 이상의 개재 원자가 존재하며, R^9 및 R^{10}은 H 또는 C_{1-3} 알킬로부터 독립적으로 선택된다. 일부 측면에서, 알킬렌 링커는 $-(CH_2)_x-$이며, 여기서 아래첨자 x는 0 내지 6 (또는 1 내지 6)의 정수이며, 단 x가 0인 경우 염기성 단위의 염기와 숙신이미드 (가수분해된 것 또는 비-가수분해된 것) 또는 디락탐의 질소 원자의 사이에 2개 이상의 개재 원자가 존재한다. 아래첨자 x는 바람직하게는 0 내지 4, 1 내지 4, 또는 1 내지 3, 또는 2 내지 3, 또는 2 내지 4이나, 0, 1, 2, 3 또는 4일 수도 있다. 따라서, 일부 실시양태에서, 염기성 단위는 $-(CH_2)_xNH_2$, $-(CH_2)_xNHR^a$ 및 $-(CH_2)_xNR^a{}_2$로 이루어진 군으로부터 선택되게 되며, 여기서 x는 0 내지 4, 1 내지 4, 또는 1 내지 3, 또는 2 내지 3, 또는 2 내지 4의 정수이나, 0, 1, 2, 3 또는 4일 수도 있고, 각 R^a는 C_{1-6} 알킬 및 C_{1-6} 할로알킬로 이루어진 군으로부터 독립적으로 선택되거나, 또는 2개의 R^a 기가 그들이 부착되어 있는 질소와 조합되어 아제티디닐, 피롤리디닐 또는 피페리디닐 기를 형성한다. 바람직한 측면에서, 염기성 단위의 염기는 질소계 염기일 것이다.

[0386] **가수분해 인핸서 (HE) 및 전자 끄는 기**

[0387] 화학식 I은 물론, 자가-안정화 링커 (L^{SS})를 포함하는 다른 화학식의 가수분해 인핸서 (HE)는 본질적으로 부근 숙신이미드 기의 가수분해를 촉진할 수 있는 소정의 전자 끄는 기일 수 있다. 가수분해는 히드록시드 이온 (또는 물)이 부근의 숙신이미드 기를 공격하여 가수분해시키는 것; 또는 부근의 숙신이미드 기가 가수분해에 더 민감하게 되도록 하는 것을 돕는 염기성 단위 (BU)에 의해 추가로 촉진될 수 있다. 따라서, HE에는 전자를 반응 중심으로부터 떼어 끌어당기는 관능기가 포함될 수 있다. 예시적인 전자 끄는 기에는 -C(=O), (=O), -CN, $-NO_2$, $-CX_3$, -X, -COOR, $-CONR_2$, -COR, -COX, $-SO_2R$, $-SO_2OR$, $-SO_2NHR$, $-SO_2NR_2$, $-PO_3R_2$, -P(O)(CH_3)NHR, NO, $-NR_3^+$, $-CR=CR_2$ 및 $-C\equiv CR$이 포함되나, 이에 제한되는 것은 아니며, 여기서 X는 F, Br, Cl 또는 I이고, R은 각 경우에 수소 및 C_{1-6} 알킬로 이루어진 군으로부터 독립적으로 선택된다. 예시적인 전자 끄는 기에는 또한 아릴

기 (예컨대 페닐) 및 소정의 헤테로아릴 기 (예컨대 피리딘)가 포함될 수 있다. "전자 끄는 기"라는 용어에는 전자 끄는 기에 의해 추가로 치환된 아릴 또는 헤테로아릴이 포함된다.

[0388] 일부 실시양태에서, HE는 카르보닐, 술포닐 또는 포스포릴 모이어티를 포함한다. 일부 실시양태에서, 가부순해인핸서 (HE)는 $-CH_2C(O)-$, $-C(O)-$, $-C(O)CH_2-$, $-CH_2CH_2C(O)-$ 또는 $-CH_2C(O)NH-$이다.

[0389] HE가 제2 링커 조립체 또는 약물 단위 또는 안정성 단위 또는 검출 단위에 직접 연결되는 일부 실시양태에서, HE는 임의의 제2 링커 조립체 또는 약물 단위에의 부착에 적합한 반응성 부위를 포함하게 된다. 일부 측면에서, 전자 끄는 기는 그 자체가 전자 끄는 기, 및 임의의 제2 링커 조립체 또는 약물 단위에의 결합을 위한 반응성 부위 모두로 작용하게 된다 (예컨대 $-C(=O)-$).

[0390] **임의의 제2 링커 조립체 (L^0)**

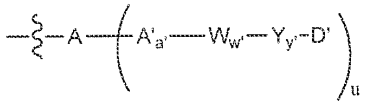
[0391] 상기에서 언급된 바와 같이, 임의의 제2 링커 조립체는 하기 화학식으로 나타내어질 수 있다:

[0392]

[0393] 상기 식에서, -A-는 임의의 스트레쳐 단위이며, 아래첨자 a'는 0 또는 1이고; -W-는 임의의 절단가능 단위이며, 아래첨자 w'는 0 또는 1이고; -Y-는 임의의 스페이서 단위이며, 아래첨자 y'는 0 또는 1이다. 임의의 스트레쳐 단위에 인접한 파상선은 자가-안정화 링커 조립체에의 결합 부위를 표시하며, 임의의 스페이서 단위에 인접한 파상선은 약물 단위에의 결합 부위를 표시한다.

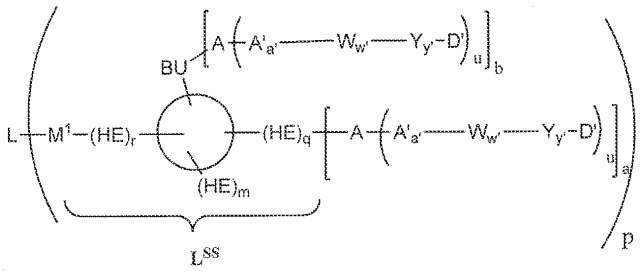
[0394] 리간드 단위에 약물 단위, 검출 단위 또는 안정성 단위를 연결시키는 일반적인 방법에 대해서는 업계에 알려져 있으며, 업계 공지의 링커가 본원에서 기술되는 교시를 사용하여 자가-안정화 링커 조립체와의 사용을 위하여 개조되거나, 또는 염기성 구성요소 및/또는 전자 끄는 기를 포함하도록 변형될 수 있다. 예를 들면, 아우리스타틴 및 마이탄신 ADC가 현재 암 치료용으로 임상 개발 중에 있다. 모노메틸 아우리스타틴 E는 프로테아제 절단가능 펩티드 링커를 통하여 항체에 접합되며, 모노메틸 아우리스타틴 F는 말레이미도카프로산을 통하여 항체에 직접 접합되고, DM1은 디술피드를 통하여, 또는 직접 이종이관능성(heterobifunctional) SMCC 링커를 통하여 접합되며, DM4는 디술피드 링커를 통하여 접합된다. 이러한 링커 시스템들은 본원에서 기술되는 교시를 사용하여 자가-안정화 링커 조립체와의 사용을 위하여 개조되거나, 또는 염기성 구성요소 및/또는 전자 끄는 기를 포함하도록 변형됨으로써, 사용되는 링커 시스템에 따라 절단가능 또는 비-절단가능 시스템에 의한 약물의 방출을 제공할 수 있다. 디술피드, 티오에테르, 펩티드, 히드라진, 에스테르 또는 카르바메이트 결합 모두가 약물 단위를 링커 단위에 연결시키는 데에 사용될 수 있는 결합의 예이다. 스트레쳐 단위, 절단가능 단위 및 스페이서 단위에 대해서는 하기에서 더욱 상세하게 기술된다.

[0395] 본 발명에 포함시켜 역시 고려되는 것은 분지형 링커이다. 이에 따라, 한 측면에서는, 하기 화학식으로 나타내어지는 바와 같이, 링커 단위 내에서의 분지화, 예를 들면 각 자가-안정화 링커 조립체에 대한 1개를 초과하는 약물 단위 또는 검출 단위 또는 안정성 단위의 결합을 가능케 하는 방식으로 스트레쳐 단위가 설계된다:

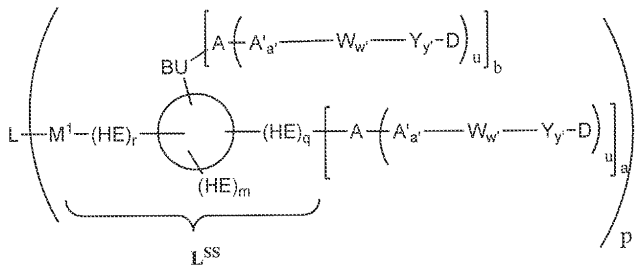
[0396] 

[0397] 상기 식에서, 파상선은 자가-안정화 링커 조립체에의 결합 부위를 표시하며, -W-는 임의의 절단가능 단위이고, 아래첨자 w'는 0 또는 1이고; -Y-는 임의의 스페이서 단위이고, 아래첨자 y'는 0 또는 1이고; u는 2 내지 20 (바람직하게는 2 내지 10)이고; A는 스트레쳐 단위이며, A'는 A 말단의 임의의 스트레쳐 단위 구성요소이고, a'는 0 또는 1이다. 각 A', W, Y 및 D'는 동일하거나 서로 다를 수 있다. 각 절단가능 단위는 스트레쳐 단위 상의 동일하거나 상이한 관능기를 통하여 스트레쳐 단위 (A 또는 A' 중 어느 것)에 결합될 수 있다. 일부 측면에서, D'는 약물 단위 D이다.

[0398] 분지형 또는 비-분지형 링커 중 어느 하나를 갖는 예시적인 리간드-기능성 작용제 접합체 또는 리간드-약물 접합체는 하기 화학식 또는 그의 염 (예컨대 제약상 허용되는 염)을 가진다:

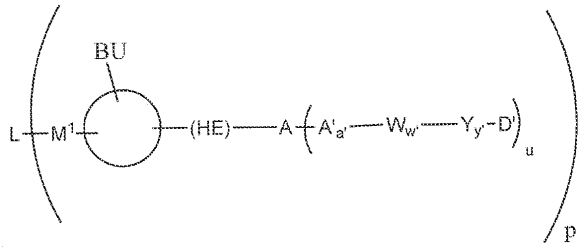
[0399] 

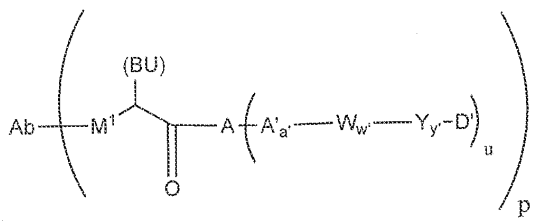
또는

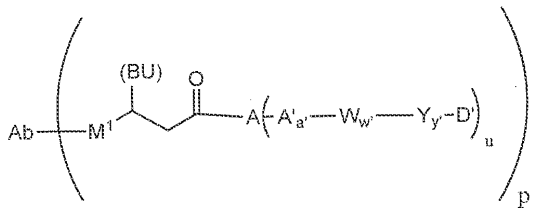
[0400] 

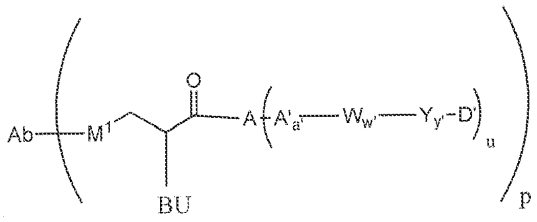
[0401] 상기 식에서, L, M^1, HE, BU, D' 및 아래첨자 p, a, b, m, q 및 r 각각은 화학식 I 및 화학식 I의 선별된 실시양태들 중 어느 것에 대하여 제공된 의미를 가지며, D는 약물 단위이고, 원은, C_{1-8} 알킬렌, C_{1-8} 헤테로알킬렌, C_{6-10} 아릴렌 또는 C_{4-10} 헤테로아릴렌일 수 있으며 임의로 A, W, Y 또는 D' (또는 경우에 따라 D)에의 부착에 적합한 반응성 부위를 포함하는 스캐폴드를 나타내며; -W-는 임의의 절단가능 단위이고, 아래첨자 w'는 0 또는 1이고; -Y-는 임의의 스페이서 단위이고, 아래첨자 y'는 0 또는 1이며, A는 스트레쳐 단위이고, A'는 A 말단의 임의의 스트레쳐 단위 구성요소이고; a'는 0 또는 1이고; u는 1 내지 20 (바람직하게는 1 내지 10)이며, 여기서 u가 2 내지 20인 경우 A는 존재하고, u가 1인 경우 A는 존재하거나 부재할 수 있다. 각 A', W, Y 및 D' (또는 경우에 따라 D)는 동일하거나 서로 다를 수 있다. 각 절단가능 단위는 스트레쳐 단위 상의 동일하거나 상이한 관능기를 통하여 스트레쳐 단위 (A 또는 A' 중 어느 하나)에 결합될 수 있다. 일부 측면에서, w'는 1이다. 일부 측면에서, w'는 1이며, a'는 0이다. 링커가 분지되지 않는 측면에서, u는 1이며, a'는 0이다. 링커가 분지되는 다른 측면에서, u는 2 내지 20 (바람직하게는 2 내지 10)이다. 이러한 선별된 실시양태들 각각에서, 원은, C_{1-8} 알킬렌 또는 C_{1-8} 헤테로알킬렌 (바람직하게는 C_{1-4} 알킬렌 또는 C_{1-4} 헤테로알킬렌), 또는 C_{1-3} 알킬렌 또는 C_{1-3} 헤테로알킬렌인 스캐폴드를 나타낼 수 있다. 그와 같은 일부 측면에서, 알킬렌은 직쇄형 또는 분지형이다.

[0402] 분지형 또는 비-분지형 링커 중 어느 하나를 갖는 리간드-기능성 작용제 접합체는 하기 화학식 또는 그의 염 (예컨대 제약상 허용되는 염)으로 나타내어질 수 있다:

[0403] 

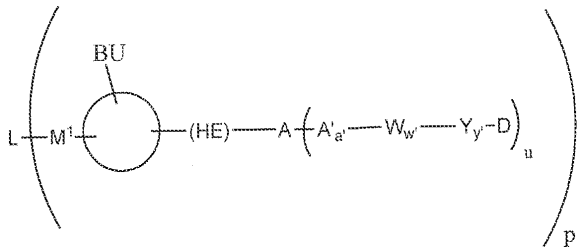
[0404] 

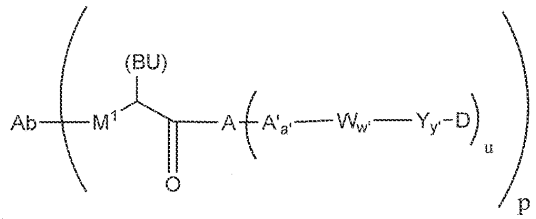
[0405] 

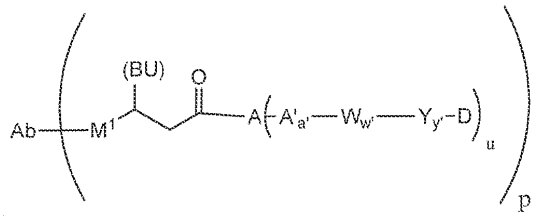
[0406] 

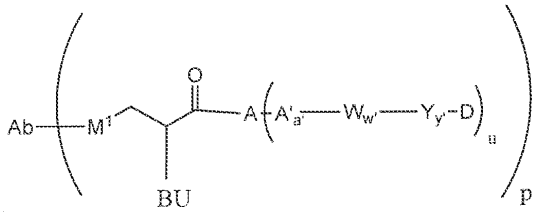
[0407] 상기 식에서, L, M^1, HE, BU, D' 및 아래첨자 p 각각은 화학식 I 및 화학식 I의 선별된 실시양태들 중 어느 것에 대하여 제공된 의미를 가지며, 원은, C_{1-8} 알킬렌, C_{1-8} 헤테로알킬렌, C_{6-10} 아릴렌 또는 C_{4-10} 헤테로아릴렌일 수 있고 임의로 A, W, Y 또는 D'에의 부착에 적합한 반응성 부위를 포함하는 스캐폴드를 나타내며; -W-는 임의의 절단가능 단위이고, 아래첨자 w'는 0 또는 1이고; -Y-는 임의의 스페이서 단위이고, 아래첨자 y'는 0 또는 1이며, A는 스트레쳐 단위이고, A'는 A 말단의 임의의 스트레쳐 단위 구성요소이고; a'는 0 또는 1이고; u는 1 내지 20 (바람직하게는 1 내지 10)이며, 여기서 u가 2 내지 20인 경우 A는 존재하고, u가 1인 경우 A는 존재하거나 부재할 수 있다. 각 A', W, Y 및 D'는 동일하거나 서로 다를 수 있다. 각 절단가능 단위는 스트레쳐 단위 상의 동일하거나 상이한 관능기를 통하여 스트레쳐 단위 (A 또는 A' 중 어느 하나)에 결합될 수 있다. 일부 측면에서, w'는 1이다. 일부 측면에서, w'는 1이며, a'는 0이다. 링커가 분지되지 않는 측면에서, u는 1이며, a'는 0이고, A는 존재하거나 부재할 수 있다. 링커가 분지되는 다른 측면에서, u는 2 내지 20 (바람직하게는 2 내지 10)이다. 일부 바람직한 실시양태에서, BU는 $-(CH_2)_xNH_2$, $-(CH_2)_xNHR^a$ 및 $-(CH_2)_xNR^a{}_2$로 이루어진 군으로부터 선택되며, 여기서 x는 0-4의 정수이고, 각 R^a는 C_{1-6} 알킬 및 C_{1-6} 할로알킬로 이루어진 군으로부터 독립적으로 선택되거나, 또는 2개의 R^a 기가 그들이 부착되어 있는 질소와 조합되어 아제티디닐, 피롤리디닐 또는 피페리디닐 기를 형성하며, 단 염기성 단위의 염기와 숙신이미드 (가수분해된 것 또는 비-가수분해된 것)의 질소 원자의 사이에 2개 이상의 개재 원자가 존재한다. 그와 같은 일부 측면에서, X는 0-4이며, 각 R^a는 C_{1-6} 알킬이다.

[0408] 분지형 또는 비-분지형 링커 중 어느 하나를 갖는 리간드-약물 접합체는 하기 화학식 또는 그의 염 (예컨대 제약상 허용되는 염)으로 나타내어질 수 있다:

[0409] 

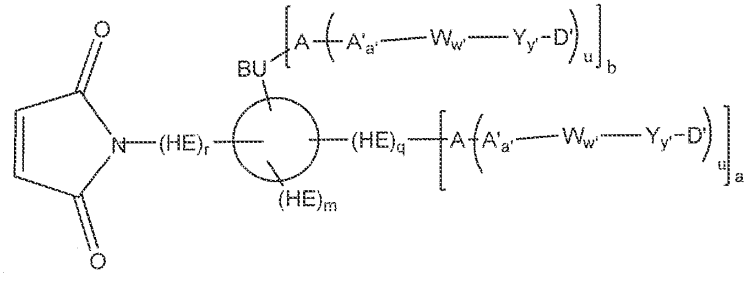
[0410] 

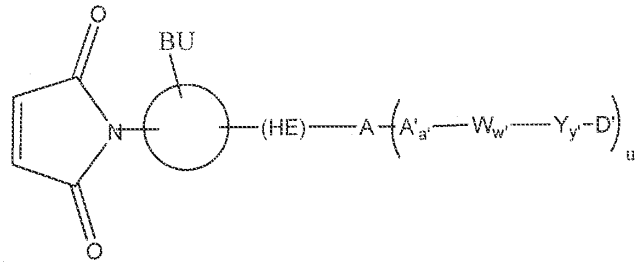
[0411] 

[0412] 

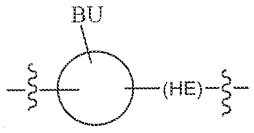
[0413] 상기 식에서, L, M^1, HE, BU 및 아래첨자 p 각각은 화학식 I 및 화학식 I의 선별된 실시양태들 중 어느 것에 대하여 제공된 의미를 가지며, D는 약물 단위이고, 원은, C_{1-8} 알킬렌, C_{1-8} 헤테로알킬렌, C_{6-10} 아릴렌 또는 C_{4-10} 헤테로아릴렌일 수 있으며 임의로 A, W, Y 또는 D에의 부착에 적합한 반응성 부위를 포함하는 스캐폴드를 나타내고; -W-는 임의의 절단가능 단위이며, 아래첨자 w'는 0 또는 1이고; -Y-는 임의의 스페이서 단위이며, 아래첨자 y'는 0 또는 1이고, A는 스트레쳐 단위이며, A'는 A 말단의 임의의 스트레쳐 단위 구성요소이고; a'는 0 또는 1이고; u는 1 내지 20 (바람직하게는 1 내지 10)이며, 여기서 u가 2 내지 20인 경우 A는 존재하고, u가 1인 경우 A는 존재하거나 부재할 수 있다. 각 A', W, Y 및 D는 동일하거나 서로 다를 수 있다. 각 절단가능 단위는 스트레쳐 단위 상의 동일하거나 상이한 관능기를 통하여 스트레쳐 단위 (A 또는 A' 중 어느 하나)에 결합될 수 있다. 일부 측면에서, w'는 1이다. 일부 측면에서, w'는 1이며, a'는 0이다. 링커가 분지되지 않는 측면에서, u는 1이며, a'는 0이고, A는 존재하거나 부재할 수 있다. 링커가 분지되는 다른 측면에서, u는 2 내지 20 (바람직하게는 2 내지 10)이다. 일부 바람직한 실시양태에서, BU는 $-(CH_2)_xNH_2$, $-(CH_2)_xNHR^a$ 및 $-(CH_2)_xNR^a{}_2$로 이루어진 군으로부터 선택되며, 여기서 x는 0-4의 정수이고, 각 R^a는 C_{1-6} 알킬 및 C_{1-6} 할로알킬로 이루어진 군으로부터 독립적으로 선택되거나, 또는 2개의 R^a 기가 그들이 부착되어 있는 질소와 조합되어 아제티디닐, 피롤리디닐 또는 피페리디닐 기를 형성하며, 단 염기성 단위의 염기와 숙신이미드 (가수분해된 것 또는 비-가수분해된 것)의 질소 원자의 사이에 2개 이상의 개재 원자가 존재한다. 그와 같은 일부 측면에서, X는 0-4이며, 각 R^a는 C_{1-6} 알킬이다.

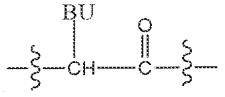
[0414] 분지형 또는 비-분지형 링커 중 어느 하나를 갖는 기능성 작용제-링커 접합체는 하기 화학식 또는 그의 염 (예컨대 제약상 허용되는 염)으로 나타내어질 수 있다:

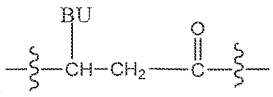
[0415] 

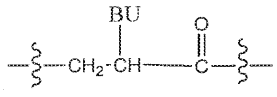
[0416] 

[0417] 상기 식에서, HE, BU, D' 및 아래첨자 p, a, b, m, q 및 r 각각은 화학식 I 및 화학식 I의 선별된 실시양태들 중 어느 것에 대하여 제공된 의미를 가지며, 원은, C_{1-8} 알킬렌, C_{1-8} 헤테로알킬렌, C_{6-10} 아릴렌 또는 C_{4-10} 헤테로아릴렌일 수 있고 임의로 A, W, Y 또는 D'에의 부착에 적합한 반응성 부위를 포함하는 스캐폴드를 나타내며; -W-는 임의의 절단가능 단위이고, 아래첨자 w'는 0 또는 1이고; -Y-는 임의의 스페이서 단위이고, 아래첨자 y'는 0 또는 1이며, A는 스트레쳐 단위이고, A'는 A 말단의 임의의 스트레쳐 단위 구성요소이고; a'는 0 또는 1이고; u는 1 내지 20 (바람직하게는 1 내지 10)이며, 여기서 u가 2 내지 20인 경우 A는 존재하고, u가 1인 경우 A는 존재하거나 부재할 수 있다. 각 A', W, Y 및 D'는 동일하거나 서로 다를 수 있다. 각 절단가능 단위는 스트레쳐 단위 상의 동일하거나 상이한 관능기를 통하여 스트레쳐 단위 (A 또는 A' 중 어느 하나)에 결합될 수 있다. 일부 측면에서, w'는 1이다. 일부 측면에서, w'는 1이며, a'는 0이다. 링커가 분지되지 않는 측면에서, u는 1이며, a'는 0이고, A는 존재하거나 부재할 수 있다. 링커가 분지되는 다른 측면에서, u는 2 내지 20 (바람직하게는 2 내지 10)이다. 이러한 선별된 실시양태들 각각에서, 원은, C_{1-8} 알킬렌 또는 C_{1-8} 헤테로알킬렌 (바람직하게는 C_{1-4} 알킬렌 또는 C_{1-4} 헤테로알킬렌), 또는 C_{1-3} 알킬렌 또는 C_{1-3} 헤테로알킬렌인 스캐폴드를 나타낼 수 있다. 그와 같은 일부 측면에서, 알킬렌은 직쇄형 또는 분지형이다. 이러한 선별된 실시양태들 각각에서, D'는 D일 수 있다.

[0418] 일부 측면에서, 

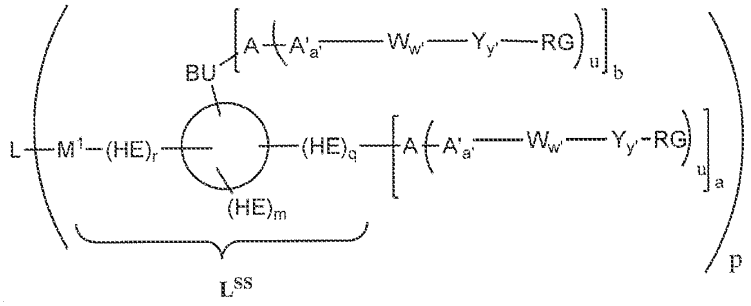
는 하기로 나타내어진다: 

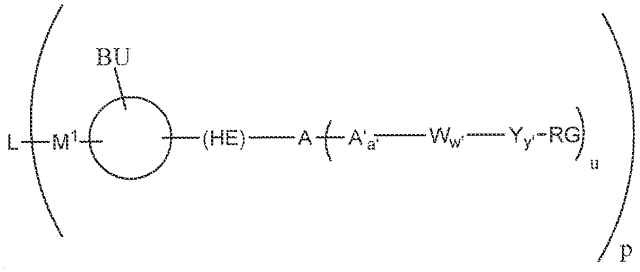
, 

또는 

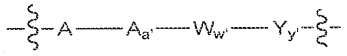
. 그와 같은 일부 측면에서, D'는 D이다. 일부 바람직한 실시양태에서, BU는 $-(CH_2)_xNH_2$, $-(CH_2)_xNHR^a$ 및 $-(CH_2)_xNR^a{}_2$로 이루어진 군으로부터 선택되며, 여기서 x는 0-4의 정수이고, 각 R^a는 C_{1-6} 알킬 및 C_{1-6} 할로알킬로 이루어진 군으로부터 독립적으로 선택되거나, 또는 2개의 R^a 기가 그들이 부착되어 있는 질소와 조합되어 아제티디닐, 피롤리디닐 또는 피페리디닐 기를 형성하며, 단 염기성 단위의 염기와 숙신이미드 (가수분해된 것 또는 비-가수분해된 것)의 질소 원자의 사이에 2개 이상의 개재 원자가 존재한다. 그와 같은 일부 측면에서, X는 0-4이며, 각 R^a는 C_{1-6} 알킬이다.

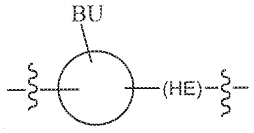
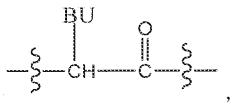
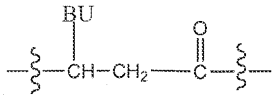
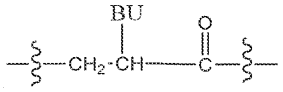
[0419] 분지형 또는 비-분지형 링커 중 어느 하나를 갖는 리간드-링커 접합체는 하기 화학식 또는 그의 염 (예컨대 제약상 허용되는 염)으로 나타내어질 수 있다:

[0420] 

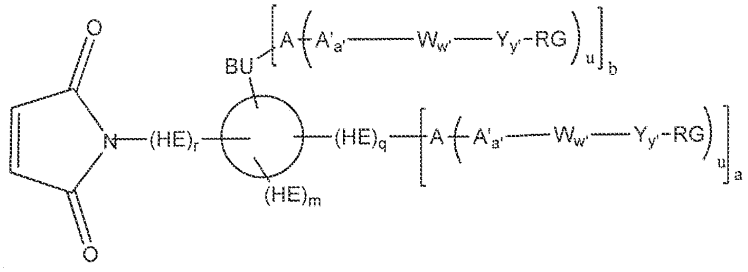
[0421] 

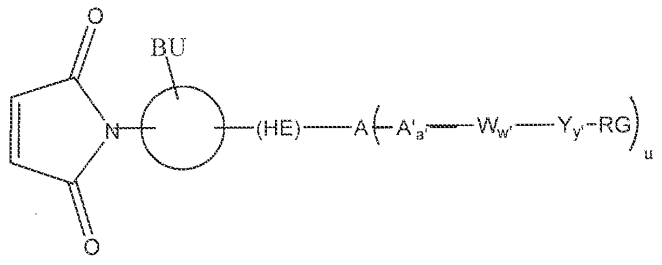
[0422] 상기 식에서, L, M^1, HE, BU 및 아래첨자 p, a, b, m, q 및 r 각각은 화학식 I 및 화학식 I의 선별된 실시양태

들 중 어느 것에 대하여 제공된 의미를 가지며, 원은, C_{1-8} 알킬렌, C_{1-8} 헤테로알킬렌, C_{6-10} 아릴렌 또는 C_{4-10} 헤테로아릴렌일 수 있고 임의로 A, W, Y 또는 D에의 부착에 적합한 반응성 부위를 포함하는 스캐폴드를 나타내며; RG는 약물 단위 (또는 다르게는 검출 단위 또는 안정성 단위)를 부착시키는 데에 적합한  말단의 반응성 기 (반응성 부위 포함)이고, -W-는 임의의 절단가능 단위이며, 아래첨자 w'는 0 또는 1이고; -Y-는 임의의 스페이서 단위이며, 아래첨자 y'는 0 또는 1이고, A는 스트레쳐 단위이며, A'는 A 말단의 임의의 스트레쳐 단위 구성요소이고; a'는 0 또는 1이고; u는 1 내지 20 (바람직하게는 1 내지 10)이며, 여기서 u가 2 내지 20인 경우 A는 존재하고, u가 1인 경우 A는 존재하거나 부재할 수 있다. 각 A', W, Y 및 D는 동일하거나 서로 다를 수 있다. 각 절단가능 단위는 스트레쳐 단위 상의 동일하거나 상이한 관능기를 통하여 스트레쳐 단위 (A 또는 A' 중 어느 하나)에 결합될 수 있다. 일부 측면에서, w'는 1이다. 일부 측면에서, w'는 1이며, a'는 0이다. 링커가 분지되지 않는 측면에서, u는 1이며, a'는 0이고, A는 존재하거나 부재할 수 있다. 링커가 분지되는 다른 측면에서, u는 2 내지 20 (바람직하게는 2 내지 10)이다. 이러한 선별된 실시양태들 각각에서, 원은, C_{1-8} 알킬렌 또는 C_{1-8} 헤테로알킬렌 (바람직하게는 C_{1-4} 알킬렌 또는 C_{1-4} 헤테로알킬렌), 또는 C_{1-3} 알킬렌 또는 C_{1-3} 헤테로알킬렌인 스캐폴드를 나타낼 수 있다. 그와 같은 일부 측면에서, 알킬렌은 직쇄형 또는 분지형이다.

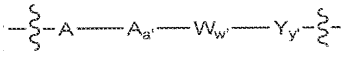
[0423] 일부 측면에서,  는 하기로 나타내어진다:  ,  또는  . 일부 바람직한 실시양태에서, BU는 $-(CH_2)_xNH_2$, $-(CH_2)_xNHR^a$ 및 $-(CH_2)_xNR^a{}_2$로 이루어진 군으로부터 선택되며, 여기서 x는 0-4의 정수이고, 각 R^a는 C_{1-6} 알킬 및 C_{1-6} 할로알킬로 이루어진 군으로부터 독립적으로 선택되거나, 또는 2개의 R^a 기가 그들이 부착되어 있는 질소와 조합되어 아제티디닐, 피롤리디닐 또는 피페리디닐 기를 형성하며, 단 염기성 단위의 염기와 숙신이미드 (가수분해된 것 또는 비-가수분해된 것)의 질소 원자의 사이에 2개 이상의 개재 원자가 존재한다. 그와 같은 일부 측면에서, X는 0-4이며, 각 R^a는 C_{1-6} 알킬이다.

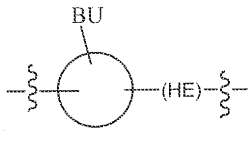
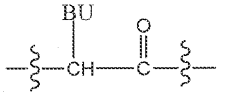
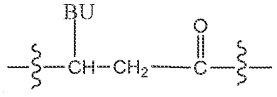
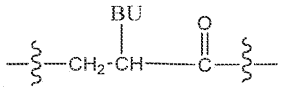
[0424] 분지형 또는 비-분지형 링커는 하기 화학식 또는 그의 염 (예컨대 제약상 허용되는 염)으로 나타내어질 수 있다:

[0425] 

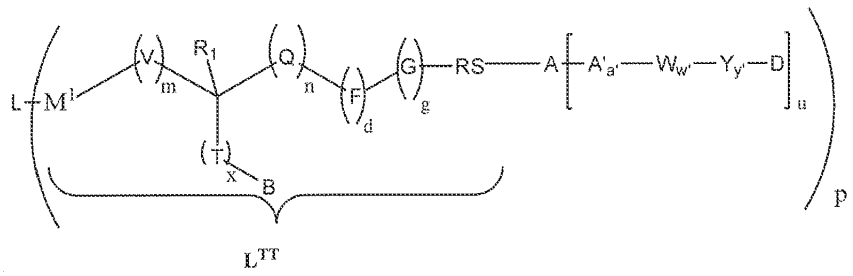
[0426] 

[0427] 상기 식에서, 스캐폴드, HE, BU 및 아래첨자 a, b, m, q 및 r 각각은 화학식 I 및 화학식 I의 선별된 실시양태들 중 어느 것에 대하여 제공된 의미를 가지며, 원은, C_{1-8} 알킬렌, C_{1-8} 헤테로알킬렌, C_{6-10} 아릴렌 또는 C_{4-10} 헤

테로아릴렌일 수 있고 임의로 A, W, Y 또는 D에의 부착에 적합한 반응성 부위를 포함하는 스캐폴드를 나타내며; RG는 약물 단위 (또는 다르게는 검출 단위 또는 안정성 단위)를 부착시키는 데에 적합한  말단의 반응성 기 (반응성 부위 포함)이고, -W-는 임의의 절단가능 단위이며, 아래첨자 w'는 0 또는 1이고; -Y-는 임의의 스페이서 단위이며, 아래첨자 y'는 0 또는 1이고, A는 스트레쳐 단위이며, A'는 A 말단의 임의의 스트레쳐 단위 구성요소이고; a'는 0 또는 1이고; u는 1 내지 20 (바람직하게는 1 내지 10)이며, 여기서 u가 2 내지 20인 경우 A는 존재하고, u가 1인 경우 A는 존재하거나 부재할 수 있다. 각 A', W, Y 및 D는 동일하거나 서로 다를 수 있다. 각 절단가능 단위는 스트레쳐 단위 상의 동일하거나 상이한 관능기를 통하여 스트레쳐 단위 (A 또는 A' 중 어느 하나)에 결합될 수 있다. 일부 측면에서, w'는 1이다. 일부 측면에서, w'는 1이며, a'는 0이다. 링커가 분지되지 않는 측면에서, u는 1이며, a'는 0이고, A는 존재하거나 부재할 수 있다. 링커가 분지되는 다른 측면에서, u는 2 내지 20 (바람직하게는 2 내지 10)이다. 이러한 선별된 실시양태들 각각에서, 원은, C_{1-8} 알킬렌 또는 C_{1-8} 헤테로알킬렌 (바람직하게는 C_{1-4} 알킬렌 또는 C_{1-4} 헤테로알킬렌), 또는 C_{1-3} 알킬렌 또는 C_{1-3} 헤테로알킬렌인 스캐폴드를 나타낼 수 있다. 그와 같은 일부 측면에서, 알킬렌은 직쇄형 또는 분지형이다.

[0428] 일부 측면에서,  는 하기로 나타내어진다:  ,  또는  . 일부 바람직한 실시양태에서, BU는 $-(CH_2)_xNH_2$, $-(CH_2)_xNHR^a$ 및 $-(CH_2)_xNR^a{}_2$로 이루어진 군으로부터 선택되며, 여기서 x는 0-4의 정수이고, 각 R^a는 C_{1-6} 알킬 및 C_{1-6} 할로알킬로 이루어진 군으로부터 독립적으로 선택되거나, 또는 2개의 R^a 기가 그들이 부착되어 있는 질소와 조합되어 아제티디닐, 피롤리디닐 또는 피페리디닐 기를 형성하며, 단 염기성 단위의 염기와 숙신이미드 (가수분해된 것 또는 비-가수분해된 것)의 질소 원자의 사이에 2개 이상의 개재 원자가 존재한다. 그와 같은 일부 측면에서, X는 0-4이며, 각 R^a는 C_{1-6} 알킬이다.

[0429] 일부 다른 측면에서, 분지형 또는 비-분지형 링커 중 어느 하나를 갖는 예시적인 리간드-약물 접합체는 하기 화학식 또는 그의 제약상 허용되는 염을 가진다:

[0430] 

[0431] 상기 식에서, L, M^1, V, R^1, T, B, Q, F, G 및 RS, 그리고 아래첨자 p, m, x, n, d 및 g 각각은 화학식 III 및 화학식 III의 선별된 실시양태들 중 어느 것에 대하여 제공된 의미를 가지며, L은 리간드 단위이고, -W-는 임의의 절단가능 단위이며, 아래첨자 w'는 0 또는 1이고; -Y-는 임의의 스페이서 단위이며, 아래첨자 y'는 0 또는 1이고, A는 스트레쳐 단위이며, A'는 A 말단의 임의의 스트레쳐 단위 구성요소이고; a'는 0 또는 1이고; u는 1 내지 20 (바람직하게는 1 내지 10)이며, 여기서 u가 2 내지 20인 경우 A는 존재하고, u가 1인 경우 A는 존재하거나 부재할 수 있다. 각 A', W, Y 및 D는 동일하거나 서로 다를 수 있다. 각 절단가능 단위는 스트레쳐 단위 상의 동일하거나 상이한 관능기를 통하여 스트레쳐 단위 (A 또는 A' 중 어느 하나)에 결합될 수 있다. 일부 측면에서, w'는 1이다. 일부 측면에서, w'는 1이며, a'는 0이다. 링커가 분지되지 않는 측면에서, u는 1이며, a'는 0이고, A는 존재하거나 부재할 수 있다. 링커가 분지되는 다른 측면에서, u는 2 내지 20 (바람직하게는 2 내지 10)이다.

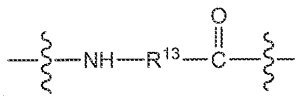
[0432] 스트레쳐 단위, 절단가능 단위 및 스페이서 단위에 대해서는 하기에서 더욱 상세하게 기술된다.

[0433] **스트레쳐 단위**

[0434] 존재할 경우, 스트레쳐 단위 (-A-)는 링커 단위의 프레임워크를 연장함으로써, 자가-안정화 링커 조립체와 약물 단위 사이에 더 먼 거리를 제공한다. 스트레쳐 단위는 절단가능 단위가 존재하는 경우 자가-안정화 링커 조립체를 절단가능 단위에, 절단가능 단위는 부재하나 스페이서 단위는 존재하는 경우 자가-안정화 링커 조립체를 스페이서 단위에, 그리고 절단가능 단위 및 스페이서 단위 모두가 부재하는 경우 자가-안정화 링커 조립체를 약물 단위에 연결할 수 있다. 기술된 바와 같이, 스트레쳐 단위는 1개를 초과하는 절단가능 단위, 스페이서 단위 및/또는 약물 단위에 결합할 수 있다.

[0435] 스트레쳐 단위는 또한 스트레쳐 단위의 구성요소에 따라 약물-링커의 물리화학적 특성을 변경시키는 작용을 할 수 있다. 일부 측면에서는, 약물-링커의 용해도를 증가시키기 위하여 스트레쳐 단위가 첨가되게 되는데, 1개 또는 다수의 용해도-향상 기 예컨대 이온 기 또는 수용성 중합체를 포함하게 된다. 수용성인 것에는 통상적으로 실온에서 물에 가용성인 소정의 분절 또는 중합체가 포함되며, 폴리(에틸렌)글리콜 기는 물론, 폴리에틸렌이민과 같은 다른 중합체들도 포함된다.

[0436] 스트레쳐 단위는 1개 또는 다수의 스트레쳐 기를 포함할 수 있다. 대표적인 스트레쳐 기에는 예를 들면 -NH-C_1-C_{10} 알킬렌-, -NH-C_1-C_{10} 알킬렌-NH-C(O)-C_1-C_{10} 알킬렌-, -NH-C_1-C_{10} 알킬렌-C(O)-NH-C_1-C_{10} 알킬렌-, -NH-$(CH_2CH_2O)_s$-, -NH-$(CH_2CH_2O)_s$-CH_2-, -NH-$(CH_2CH_2NH)_s$-$(CH_2)_s$, -NH-$(CH_2CH_2NH)_s$-$(CH_2)_s$-NH-C(O)-$(CH_2)_s$, -NH-(C_3-C_8 카르보시클로)-, -NH-(아릴렌)- 및 -NH-(C_3-C_8 헤테로시클로)-가 포함되며, 여기서 각 s는 독립적으로 1-10이다. 링커 단위 또는 약물 단위의 나머지에의 연결을 위한 카르보닐 기를 갖는 예시적인 스트레쳐 기는 하기 화학식과 같으며:

[0437] 

[0438] 상기 식에서, R^{13}은 -C_1-C_{10} 알킬렌-, -C_3-C_8 카르보시클로-, -아릴렌-, -C_1-C_{30} 헤테로알킬렌-, -C_3-C_8 헤테로시클로-, -C_1-C_{10} 알킬렌-아릴렌, -아릴렌-C_1-C_{10} 알킬렌-, -C_1-C_{10} 알킬렌-(C_3-C_8 카르보시클로)-, -(C_3-C_8 카르보시클로)-C_1-C_{10} 알킬렌-, -C_1-C_{10} 알킬렌-(C_3-C_8 헤테로시클로)-, -(C_3-C_8 헤테로시클로)-C_1-C_{10} 알킬렌-, -$(CH_2CH_2O)_{1-10}$-$(CH_2)_{1-3}$- 또는 -$(CH_2CH_2NH)_{1-10}$-$(CH_2)_{1-3}$-이다. 일부 실시양태에서, R^{13}은 -C_1-C_{10} 알킬렌- 또는 -C_1-C_{30} 헤테로알킬렌-이다. 일부 실시양태에서, R^{13}은 -C_1-C_{10} 알킬렌-, -$(CH_2CH_2O)_{1-10}$-$(CH_2)_{1-3}$- 또는 -$(CH_2CH_2NH)_{1-10}$-$(CH_2)_{1-3}$-이다. 일부 실시양태에서, R^{13}은 -C_1-C_{10} 알킬렌-, 폴리에틸렌글리콜 또는 폴리에틸렌이민이다.

[0439] 비-절단가능 약물 방출 시스템이 업계에 알려져 있으며, 스트레쳐 단위 및/또는 스페이서 단위로서 본 발명의 자가-안정화 링커 조립체와 함께 사용하기 위하여 개조될 수 있다. 일반적으로 안정한 공유 방식으로 약물 단위를 리간드에 연결시킬 수 있는 비-절단가능 링커는 산-유도 절단, 광-유도 절단, 펩티다제- 또는 에스테라제-유도 절단 및 디술피드 결합 절단에 대하여 실질적으로 내성이다. 약물은 단백질분해성 리간드 분해와 같은 대안적인 기작들을 통하여 비-절단가능 링커를 포함하는 리간드 약물 접합체로부터 방출된다.

[0440] 마이탄시노이드 약물과 리간드 사이에 비-절단가능 링커를 형성하는 가교-결합 반응물들이 업계에 잘 알려져 있으며, 본원에서 사용하기 위하여 개조될 수 있다. 마이탄시노이드 약물과 리간드 사이에 비-절단가능 링커를 형성하는 예시적인 가교-결합 반응물은 말레이미도 또는 할로아세틸-기재 모이어티를 포함한다. 거기에는 N-숙신이미딜 4-(말레이미도메틸)시클로헥산카르복실레이트 (SMCC), SMCC의 "장쇄" 유사체 (LC-SMCC)인 N-숙신이미딜-4-(N-말레이미도메틸)-시클로헥산-1-카르복시-(6-아미도카프로에이트), κ-말레이미도운데칸산 N-숙신이미딜 에스테르 (KMUA), γ-말레이미도부티르산 N-숙신이미딜 에스테르 (GMBS), ε-말레이미도카프로산 N-히드록시숙신이미드 에스테르 (EMCS), m-말레이미도벤조일-N-히드록시숙신이미드 에스테르 (MBS), N-(α-말레이미도아세톡시)-숙신이미드 에스테르 [AMAS], 숙신이미딜-6-(β-말레이미도프로피온아미도)헥사노에이트 (SMPH), N-숙신이미딜 4-(p-말레이미도페닐)-부티레이트 (SMPB), 및 N-(p-말레이미도페닐)이소시아네트 (PMPI), N-숙신이미딜-4-(요오도아세틸)-아미노벤조에이트 (SIAB), N-숙신이미딜 요오도아세테이트 (SIA), N-숙신이미딜 브로모아세테이

트 (SBA) 및 N-숙신이미딜 3-(브로모아세트아미도)프로피오네이트 (SBAP)가 포함된다. 본 발명의 자가-안정화 링커 조립체와의 조합으로써 사용하기 위한 추가적인 스트레쳐 단위들은 예를 들면 그 전문이 모든 목적에 있어서 본원에 참조로써 개재되는 U.S. 특허 제8,142,784호에서 찾아볼 수 있다.

[0441] **절단가능 단위**

[0442] 존재할 경우, 절단가능 단위 (-W-)는 스페이서 단위가 존재하는 경우 자가-안정화 링커 조립체를 스페이서 단위에, 또는 스페이서 단위가 부재하는 경우 자가-안정화 링커 조립체를 약물 단위에 연결할 수 있다. 자가-안정화 링커 조립체로부터 스페이서 단위 또는 약물 단위로의 연결은 스트레쳐 단위가 부재하는 경우 자가-안정화 링커 조립체로부터 직접 유래할 수 있거나, 또는 스트레쳐 단위가 존재하는 경우 스트레쳐 단위를 통할 수 있다.

[0443] 일부 실시양태에서, 절단가능 단위는 일 단부에서는 자가-안정화 링커 조립체에, 그리고 타 단부에서는 약물 단위에 직접 접합되게 된다. 다른 실시양태에서, 절단가능 단위는 일 단부에서는 스트레쳐 단위에, 그리고 타 단부에서는 약물 단위에 직접 접합되게 된다. 또 다른 실시양태에서, 절단가능 단위는 일 단부에서는 스트레쳐 단위에, 그리고 타 단부에서는 스페이서 단위에 직접 접합되게 된다. 또 다른 실시양태에서, 절단가능 단위는 일 단부에서는 자가-안정화 링커 조립체에, 그리고 타 단부에서는 스페이서 단위에 직접 접합되게 된다. 본원 기술의 구체적으로 기술된 자가-안정화 링커 조립체들 중 어느 것이 이러한 실시양태들에 사용될 수 있다.

[0444] 절단가능 단위는 약물 단위 또는 스페이서 단위와 절단가능한 결합을 형성할 수 있다. 절단가능한 결합을 형성하기 위한 반응성 기에는 예를 들면 디술피드 결합을 형성하는 술피드릴 기, 히드라존 결합을 형성하는 알데히드, 케톤 또는 히드라진 기, 펩티드 결합을 형성하는 카르복실 또는 아미노 기, 및 에스테르 결합을 형성하는 카르복실 또는 히드록시 기가 포함될 수 있다.

[0445] 절단가능 단위의 특성은 광범위하게 달라질 수 있다. 예를 들면, 절단가능 링커에는 디술피드 교환을 통하여 절단가능한 디술피드 포함 링커, 산성 pH에서 절단가능한 산-불안정성 링커, 및 히드롤라제, 펩티다제, 에스테라제 및 글루코로니다제에 의해 절단가능한 링커가 포함된다.

[0446] 일부 측면에서, 절단가능 단위의 구조 및 서열은 표적 부위에 존재하는 효소의 작용에 의해 단위가 절단되도록 하는 것이다. 다른 측면에서, 절단가능 단위는 다른 기작에 의해 절단가능할 수 있다. 절단가능 단위는 1개 또는 다수의 절단 부위를 포함할 수 있다.

[0447] 일부 실시양태에서, 절단가능 단위는 1개의 아미노산 또는 1개 이상의 아미노산 서열을 포함할 수 있다. 절단가능 단위는 예를 들면 모노펩티드, 디펩티드, 트리펩티드, 테트라펩티드, 펜타펩티드, 헥사펩티드, 헵타펩티드, 옥타펩티드, 노나펩티드, 데카펩티드, 운데카펩티드 또는 도데카펩티드 단위를 포함할 수 있다.

[0448] 물론 절단가능 결합이 존재한다는 전제하에, 각 아미노산은 자연 또는 비자연일 수 있거나, 및/또는 D- 또는 L-이성질체일 수 있다. 일부 실시양태에서, 절단가능 단위는 자연 아미노산만을 포함할 수 있다. 일부 측면에서, 절단가능 단위는 연속되는 서열에 1 내지 12개의 아미노산을 포함할 수 있다.

[0449] 일부 실시양태에서, 각 아미노산은 알라닌, 아르기닌, 아스파르트산, 아스파라긴, 히스티딘, 글리신, 글루탐산, 글루타민, 페닐알라닌, 리신, 류신, 세린, 티로신, 트레오닌, 이소류신, 프롤린, 트립토판, 발린, 시스테인, 메티오닌, 셀레노시스테인, 오르니틴, 페니실라민, β-알라닌, 아미노알칸산, 아미노알킨산, 아미노알칸디산, 아미노벤조산, 아미노헤테로시클로-알칸산, 헤테로시클로-카르복실산, 시트룰린, 스타틴, 디아미노알칸산, 및 이들의 유도체로 이루어진 군으로부터 독립적으로 선택된다. 일부 실시양태에서, 각 아미노산은 알라닌, 아르기닌, 아스파르트산, 아스파라긴, 히스티딘, 글리신, 글루탐산, 글루타민, 페닐알라닌, 리신, 류신, 세린, 티로신, 트레오닌, 이소류신, 프롤린, 트립토판, 발린, 시스테인, 메티오닌 및 셀레노시스테인으로 이루어진 군으로부터 독립적으로 선택된다. 일부 실시양태에서, 각 아미노산은 알라닌, 아르기닌, 아스파르트산, 아스파라긴, 히스티딘, 글리신, 글루탐산, 글루타민, 페닐알라닌, 리신, 류신, 세린, 티로신, 트레오닌, 이소류신, 프롤린, 트립토판 및 발린으로 이루어진 군으로부터 독립적으로 선택된다. 일부 실시양태에서, 각 아미노산은 단백질형성(proteinogenic) 또는 비-단백질형성 아미노산에서 선택된다.

[0450] 또 다른 실시양태에서, 각 아미노산은 하기의 L-(자연) 아미노산으로 이루어진 군으로부터 독립적으로 선택된다: 알라닌, 아르기닌, 아스파르트산, 아스파라긴, 히스티딘, 글리신, 글루탐산, 글루타민, 페닐알라닌, 리신, 류신, 세린, 티로신, 트레오닌, 이소류신, 트립토판 및 발린.

[0451] 또 다른 실시양태에서, 각 아미노산은 이러한 자연 아미노산들의 하기 D-이성질체로 이루어진 군으로부터 독립

적으로 선택된다: 알라닌, 아르기닌, 아스파르트산, 아스파라긴, 히스티딘, 글리신, 글루탐산, 글루타민, 페닐알라닌, 리신, 류신, 세린, 티로신, 트레오닌, 이소류신, 트립토판 및 발린.

[0452] 일부 실시양태에서, 절단가능 단위와 약물 단위 사이의 결합은 종양-연관 프로테아제를 포함한 1종 이상의 효소에 의해 효소적으로 절단됨으로써 약물 단위 (-D)를 방출할 수 있는데, 한 실시양태에서 그것은 방출시 생체 내에서 양성자화됨으로써 약물 (D)을 제공한다.

[0453] 유용한 절단가능 단위는 특정 효소, 예를 들면 종양-연관 프로테아제에 의한 효소적 절단용으로 그의 선택성이 설계 및 최적화될 수 있다. 한 실시양태에서, 절단가능 단위와 약물 단위 또는 스페이서 단위 사이의 연결 (또는 결합)은 해당 절단이 카텝신 B, C 및 D, 또는 플라스민 프로테아제에 의해 촉매되도록 하는 것이다.

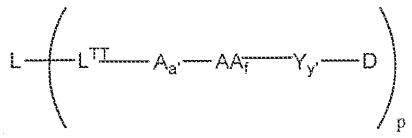
[0454] 소정 실시양태에서, 절단가능 단위는 자연 아미노산만을 포함할 수 있다. 다른 실시양태에서, 절단가능 단위는 비-자연 아미노산만을 포함할 수 있다. 일부 실시양태에서, 절단가능 단위는 비-자연 아미노산에 연결된 자연 아미노산을 포함할 수 있다. 일부 실시양태에서, 절단가능 단위는 자연 아미노산의 D-이성질체에 연결된 자연 아미노산을 포함할 수 있다.

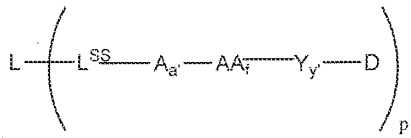
[0455] 예시적인 절단가능 단위는 디펩티드인 -Val-Cit-, -Phe-Lys- 또는 -Val-Ala이다.

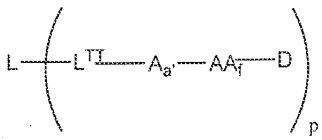
[0456] 일부 실시양태에서, 절단가능 단위는 펩티드를 포함하게 되며, 1 내지 12개의 아미노산을 포함하게 된다. 그와 같은 일부 실시양태에서, 펩티드는 약물 단위에 직접 접합되게 되며, 스페이서 단위는 부재하게 된다. 그와 같은 일부 실시양태에서는, 스트레쳐 단위 및 스페이서 단위가 부재하게 된다. 한 측면에서, 펩티드는 디펩티드일 수 있다.

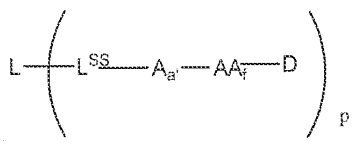
[0457] 일부 실시양태에서, 절단가능 단위 $-W_w-$는 $-(-AA-)_{1-12}-$ 또는 $(-AA-AA-)_{1-6}$으로 나타내어지며, 여기서 AA는 각 경우에 자연 또는 비-자연 아미노산로부터 독립적으로 선택된다. 한 측면에서, AA는 각 경우에 자연 아미노산로부터 독립적으로 선택된다. 업계 숙련자라면, 아미노산이 통상적으로 아미노산에 존재하는 관능성 단위, 예컨대 그의 카르복실산 또는 아미노 말단을 통하여 약물 단위 또는 스페이서 단위에 연결된다는 것을 알고 있을 것이다.

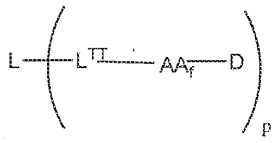
[0458] 그와 같은 일부 측면에서, 리간드-약물 접합체 및 약물-링커는 하기 화학식 또는 그의 염으로 나타내어지며, 식 중 L, L^{SS}, L^{TT}, A, a', AA, Y, y', D 및 p는 본원에서 기술되는 실시양태들 중 어느 것에서 정의된 바와 같고, f는 1 내지 12의 정수이다:

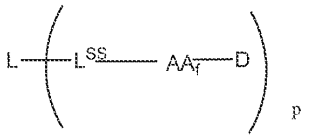
[0459] 

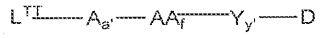
[0460] 

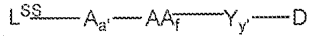
[0461] 

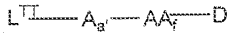
[0462] 

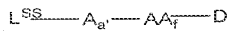
[0463] 

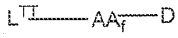
[0464] 

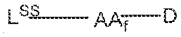
[0465] 

[0466] 

[0467] 

[0468] 

[0469]  , 또는

[0470] 

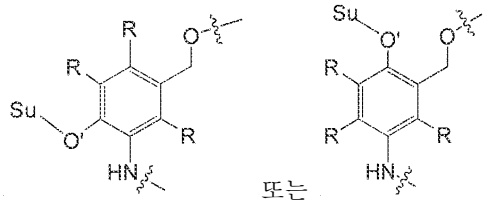
[0471] 상기 화학식에서 반영되지는 않았지만, 이와 같은 화학식들이 분지형 링커를 포함하도록 본원에서 교시되는 바와 같이 변형될 수 있다는 것, 즉 다수의 약물 단위가 각 자가-안정화 링커 조립체에 결합될 수 있다는 것은 이해될 것이다.

[0472] 다른 측면에서, 절단가능 단위는 글루코로니드 단위, 바람직하게는 1 또는 2개의 글루코로니드 단위를 포함하게 된다. 그와 같은 일부 실시양태에서, 글루쿠로니드 단위는 글리코시드 결합 (-O'-)을 통하여 자가-파괴형 (self-immolative) 스페이서에 연결된 당 모이어티 (Su)를 포함한다:

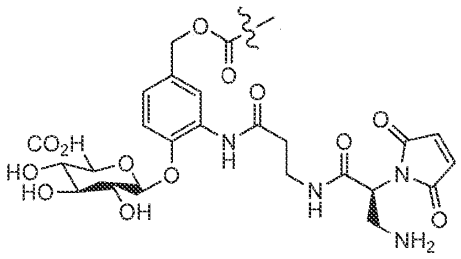
[0473] -[Su-O'-Y]-

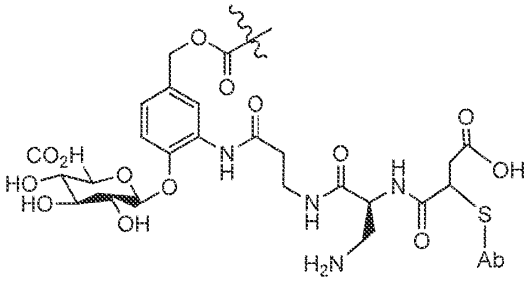
[0474] 글리코시드 결합 (-O'-)은 통상적으로 인간 리소좀 β-글루쿠로니다제에 의해 절단가능한 결합과 같은 β-글루쿠로니다제-절단 부위이다.

[0475] 일부 측면에서, -[Su-O'-Y]- 는 하기 화학식으로 나타내어진다:

[0476]  또는

[0477] 상기 식에서, Su는 당 모이어티이며, -O'-는 글리코시드 결합을 나타내고; 각 R은 독립적으로 수소, 할로겐, -CN 또는 $-NO_2$이며; 여기서 질소 원자에 인접한 파상선 결합은 스트레쳐 단위 또는 리간드에의 공유 결합을 표시하고, 산소에 인접한 파상선 결합은 스페이서 단위 또는 약물 단위에의 공유 결합을 표시한다. 항체에의 접합 전 및 접합 후의 글루코로니드를 포함하는 예시적인 링커 단위는 하기와 같으며, 여기서 파상선은 약물 단위 또는 스페이서 단위에의 결합을 표시하고, Ab는 항체를 나타내며, S는 항체의 황 원자이다. 1개를 초과하는 자가-안정화 조립체가 각 항체에 결합될 수 있다는 것은 이해될 것이다:

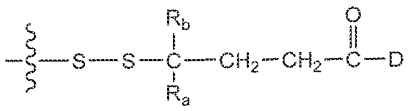




[0478]

[0479] 일부 실시양태에서는, 절단가능 단위 자체가 스페이서 단위 또는 약물 단위의 황 원자와 결합을 형성함으로써 디술피드 또는 차폐된 디술피드를 형성할 수 있는 황 원자를 포함하게 된다. 절단은 디술피드의 2개 황 원자 사이에서 이루어진다. 그와 같은 일부 실시양태에서, 황 원자들 중 1개는 약물 단위로부터 절단되며, 추가적인 방출 기작이 존재하지 않는다는 전제하에, 다른 황 원자는 약물 단위에 결합되어 유지된다. 황 원자를 갖는 절단가능 단위를 포함하는 링커 단위는 스페이서 단위 또는 약물 단위의 황 원자와 결합을 형성함으로써 디술피드 또는 차폐된 디술피드를 형성할 수 있다.

[0480] 예시적인 링커에는 예를 들면 하기의 약물-링커가 포함되며, 식 중 파상선은 링커 단위의 나머지에 대한 결합 부위를 표시하고, D는 마이탄시노이드 약물이며, R_a 및 R_b는 H 또는 메틸로부터 독립적으로 선택된다:



[0481]

[0482] 다양한 디술피드 링커들이 업계에 알려져 있으며, 본 발명에서 사용하기 위하여 개조될 수 있는데, 예를 들면 SATA (N-숙신이미딜-S-아세틸티오아세테이트), SPDP (N-숙신이미딜-3-(2-피리딜디티오)프로피오네이트), SPDB (N-숙신이미딜-3-(2-피리딜디티오)부티레이트), SMPT (N-숙신이미딜-옥시카르보닐-알파-메틸-알파-(2-피리딜-디티오)톨루엔), 및 SPP (N-숙신이미딜 4-(2-피리딜디티오)펜타노에이트)를 사용하여 형성될 수 있는 것들이 포함된다 (예컨대 문헌 [Thorpe *et al.*, 1987, *Cancer Res.* 47:5924-5931]; [Wawrzynczak *et al.*, In *Immunoconjugates: Antibody Conjugates in Radioimagery and Therapy of Cancer* (C.W. Vogel ed., Oxford U. Press, 1987)] 참조. 또한, U.S. 특허 제4,880,935호 참조).

[0483] 일부 실시양태에서, 절단가능 링커는 pH-민감성이며, 예를 들면 리소좀에서 가수분해가능한 (예컨대 히드라존, 세미카르바존, 티오세미카르바존, 시스-아코니틱 아미드, 오르소에스테르, 아세탈 또는 케탈 기) 산-불안정성 링커가 포함되어 사용될 수 있게 된다 (예컨대 U.S. 특허 제5,122,368호; 5,824,805호; 5,622,929호; 문헌 [Dubowchik and Walker, 1999, *Pharm. Therapeutics* 83:67-123]; [Neville *et al.*, 1989, *Biol. Chem.* 264:14653-14661] 참조). 이와 같은 링커는 혈액 중의 것과 같은 중성 pH 조건하에서는 상대적으로 안정하나, 대략 리소좀의 pH인 pH 5.5 또는 5.0 미만에서는 불안정하다.

[0484] 일부 실시양태에서, 절단가능 단위는 약물 단위에 직접 접합되게 되며, 스페이서 단위는 부재하게 되고, 절단가능 단위는 절단가능 펩티드, 디술피드 또는 히드라존 결합을 통하여 약물 단위에 연결되게 된다.

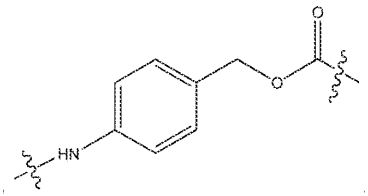
[0485] **스페이서 단위**

[0486] 스페이서 단위 (-Y-)는 존재할 경우 절단가능 단위를 약물 단위에, 또는 스트레처 단위를 약물 단위에, 또는 자가-안정화 링커 조립체를 약물 단위에 연결한다. 스트레처 단위와 마찬가지로, 스페이서 단위는 존재할 경우

링커 단위의 프레임워크를 연장하는 작용을 할 수 있다. 스페이서 단위는 다수의 자가-파괴형 또는 비-자가 파괴형 기를 포함할 수 있다. 일부 실시양태에서, 스페이서 단위는 1개 이상의 자가-파괴형 기를 포함한다. 이와 같은 맥락에서, "자가-파괴형 기"라는 용어는 2개의 이격된 화학 모이어티들을 보통은 안정한 삼분체 분자(tripartite molecule)로 함께 공유 연결시킬 수 있는 2관능성 화학 모이어티를 지칭한다. 제1 모이어티에 대한 그의 결합이 절단되는 경우, 그것은 자발적으로 제2 화학 모이어티로부터 분리되게 된다. 다른 실시양태에서, 스페이서 단위는 자가-파괴형이 아니다. 이러한 실시양태에서는, 스페이서 단위의 일부 또는 전부가 약물 단위에 결합되어 유지된다.

[0487] 일부 실시양태에서, -Y-는 자가-파괴형 기이며, 자가-파괴형 기의 메틸렌 탄소 원자를 통하여 절단가능 단위에 연결되고, 카르보네이트, 카르바메이트 또는 에테르 기를 통하여 약물 단위에 직접 연결 결합된다.

[0488] 일부 실시양태에서, -Yy-는 그의 페닐렌 부분이 $-C_1-C_8$ 알킬, -O-(C_1-C_8 알킬), -할로겐, -니트로 또는 -시아노에 의해 임의 치환되어 있는 p-아미노벤질 알콜 (PAB) 단위이다. 또 다른 실시양태에서, -Yy-는 카르보네이트기일 수 있다. 비치환 PAB 단위는 하기와 같다:

[0489] 

.

[0490] 자가-파괴형 기의 다른 예로는 2-아미노이미다졸-5-메탄올 유도체 (예컨대 문헌 [Hay *et al.*, 1999, *Bioorg. Med. Chem, Lett.* 9:2237] 참조) 및 오르소 또는 파라-아미노벤질아세탈과 같이 전자적으로 PAB 기와 유사한 방향족 화합물이 포함되나, 이에 제한되는 것은 아니다. 치환 및 비치환 4-아미노부티르산 아미드 (예컨대 문헌 [Rodrigues *et al.*, 1995, *Chemistry Biology* 2:223] 참조), 적절하게 치환된 비시클로[2.2.1] 및 비시클로[2.2.2] 고리 시스템 (예컨대 문헌 [Storm *et al.*, 1972, *J. Amer. Chem. Soc.* 94:5815] 참조) 및 2-아미노페닐프로피온산 아미드 (예컨대 문헌 [Amsberry *et al.*, 1990, *J. Org. Chem.* 55:5867] 참조)과 같이 아미드 결합 가수분해시 고리화에 적용되는 스페이서가 사용될 수 있다. 글리신의 a-위치에서 치환되어 있는 아민-함유 약물의 제거 (예컨대 문헌 [Kingsbury *et al.*, 1984, *J. Med. Chem.* 27: 1447] 참조) 역시 자가-파괴형 기의 예이다.

[0491] 다른 적합한 스페이서 단위에 대해서는 그의 개시내용이 본원에 참조로써 개재되는 U.S. 특허 출원 공개 제2005-0238649호에 개시되어 있다.

[0492] 본 발명의 조성물 및 방법과 함께 사용될 수 있는 예시적인 스트레쳐 단위, 절단가능 단위 및 스페이서 단위들은 각각 그 전문이 모든 목적에 있어서 본원에 참조로써 개재되는 WO 2004010957호, WO 2007/038658호, WO 2005/112919호, U.S. 특허 제6,214,345호, 7,659,241호, 7,498,298호, 7,968,687호, 8,163,888호 및 U.S. 공개 제2009-0111756호, 2009-0018086호, 2009-0274713호에 기술되어 있다.

[0493] 접합체가 약물 단위 대신 안정성 단위 또는 검출 단위에 접합되는 실시양태에서, 임의의 제2 링커 조립체는 통상적으로 부재하게 된다. 제2 링커 조립체가 존재하는 실시양태에서는, 스트레쳐 단위는 일반적으로 존재하게 되나, 절단가능 단위 및 스페이서 단위는 부재하게 된다. 스트레쳐 단위는 링커 단위의 프레임워크를 연장함으로써 자가-안정화 조립체와 검출 단위 또는 안정성 단위 사이에 더 먼 거리를 제공하게 된다. 그와 같은 측면에서, 스트레쳐 단위는 자가-안정화 링커 조립체를 검출 단위 또는 안정성 단위에 연결시킬 수 있다.

[0494] **약물 로딩**

[0495] 리간드 당 자가-안정화 링커의 수는 p로 나타내어진다. 링커가 분지되지 않는 실시양태에서, p는 리간드 분자 (예컨대 항체) 당 약물-링커 분자 (또는 검출-링커 또는 안정성-링커 분자)의 수를 나타낸다. 맥락에 따라, p는 리간드 당 자가-안정화 링커의 평균 수 (또는 링커가 분지되지 않는 실시양태에서는, 리간드 (예컨대 항체) 당 약물-링커 분자 (또는 검출-링커 또는 안정성-링커 분자)의 평균 수)를 나타낼 수 있다. 변수 p는 1 내지 20, 통상적으로는 1 내지 12, 1 내지 10의 범위이며, 바람직하게는 1 내지 8이다. 일부 바람직한 실시양태에서, p가 항체 당 자가-안정화 링커의 평균 수를 나타내는 경우, p는 약 2 내지 약 5의 범위이다. 일부 실시양태에서, p는 약 2, 약 4 또는 약 8이다. 일부 바람직한 실시양태에서, p가 항체 당 약물-링커 분자의 평균 수를 나타내는 경우, p는 약 2 내지 약 5의 범위이다. 일부 실시양태에서, p는 약 2, 약 4 또는 약

8이다. 자가-안정화 링커 당 D'의 수는 u로 나타내어진다. u는 1 내지 10의 범위이다.

[0496] 접합 반응으로부터의 조제물에서의 리간드 단위 당 약물 단위의 평균 수는 질량 분광법, ELISA 검정, HIC 및 HPLC와 같은 통상적인 수단에 의해 특성화될 수 있다. p와 관련한 약물-링커-리간드 접합체의 양적 분포 역시 측정될 수 있다. 일부 경우에서는, 역상 HPLC 또는 전기영동과 같은 수단에 의해, 다른 약물 부하를 갖는 리간드-약물 접합체로부터의 p가 소정 값인 균질 리간드-약물 접합체의 분리, 정제 및 특성화가 달성될 수도 있다.

[0497] **자가-안정화 링커 조립체 (L^{SS} 또는 L^{TT}) 및 가수분해 속도**

[0498] 자가-안정화 링커 조립체는 스트레쳐 단위가 존재하는 경우 리간드 단위를 스트레쳐 단위에 연결하거나, 스트레쳐 단위가 부재하고 절단가능 단위가 존재하는 경우 리간드 단위를 절단가능 단위에 연결하거나, 스트레쳐 단위 및 절단가능 단위가 부재하고 스페이서 단위가 존재하는 경우 리간드 단위를 스페이서 단위에 연결하거나, 또는 스트레쳐 단위, 절단가능 단위 및 스페이서 단위가 부재하는 경우 리간드 단위를 D' (예컨대 약물 단위)에 연결한다. 일부 실시양태에서는, 스트레쳐 단위, 절단가능 단위 및 스페이서 단위가 부재하게 되므로, 자가-안정화 링커 조립체가 D' (예컨대 약물 단위)에 직접 접합되게 된다. 다른 실시양태에서는, 스트레쳐 단위, 절단가능 단위 및 스페이서 단위 중 1종 이상이 존재하게 된다.

[0499] 리간드-약물 접합체의 일부일 때의 자가-안정화 링커의 티오-치환된 숙신이미드가 가수분해에 적용되는 속도는 가수분해의 t1/2을 사용하여 정량될 수 있다. 가수분해의 t1/2은 언급되는 조건 (예컨대 pH 7.4 및 22℃)하에서 대상 화합물의 절반이 가수분해되는 데에, 즉 개환에 적용되는 데에 걸리는 시간을 지칭한다. 본 발명의 일부 실시양태에서, 하기의 검정 및 언급되는 조건을 사용할 때, 자가-안정화 링커 단위의 티오-치환 숙신이미드 가수분해의 t1/2은 4시간 미만, 바람직하게는 3시간 미만, 더욱 더 바람직하게는 2시간 미만, 1시간 미만, 45분 미만, 30분 미만, 15분 미만이다.

[0500] 가수분해된 생성물은 비가수분해 접합체에 비해 18 달톤 더 큰 분자량을 가지므로, 항체 시스테인에의 접합에 이어지는 말레이미도 약물 링커의 가수분해 반응 속도는 질량 분광측정법에 의해 측정될 수 있다. 인간 IgG1의 쇄간 디술피드의 환원은 경쇄 상의 1개의 환원된 시스테인 및 중쇄 상의 3개의 환원된 시스테인을 생성시킨다. 다음에, pH 7.4 및 22℃에서 자가-안정화 말레이미드 약물-링커가 환원된 항체에 접합된 후, 접합된 경쇄와 중쇄를 분리하는 역상 HPLC 컬럼을 통하여 고-해상도 전기분무 질량 분광측정기에 도입될 수 있다. 이렇게 접합된 경쇄 및 중쇄의 질량이 측정되고, 표준 질량 분광측정법 데이터 처리 소프트웨어 (예컨대 매스링크스(MassLynx))에 의해 피크 강도가 측정될 수 있다. 시간 경과에 따른 연속 주입을 수행함으로써, 원래의 비가수분해 접합체 질량에 해당하는 피크의 소멸 및 가수분해된 접합체의 질량에 해당하는 피크의 출현이 모니터링될 수 있으며, 피크의 강도가 측정됨으로써, 각 시점에서의 가수분해된 접합체의 백분율이 계산될 수 있다. 가수분해 백분율 대 시간을 플롯팅함으로써, 곡선이 생성되며 (예컨대 프리즘(PRISM) 사용), 그것은 t1/2을 위한 파라미터를 포함하는 지수 현상에 대한 표준 방정식에 핏팅될 수 있다.

[0501] 일부 측면에서, 자가-안정화 링커는 자가-안정화 링커의 말레이미드 구성요소가 리간드 단위에의 접합 전에는 실질적으로 가수분해에 적용되지 않도록 설계될 수 있다.

[0502] 본 발명의 일부 실시양태에서, 자가-안정화 링커의 티오-치환 숙신이미드 가수분해의 t1/2은 약 7 내지 약 7.5 (예컨대 7.4)의 pH 및 약 22℃의 온도에서 약 5 또는 약 10분 내지 약 24시간, 바람직하게는 약 5 또는 약 10분 내지 약 12시간, 더욱 바람직하게는 약 5 또는 약 10분 내지 약 5시간, 더욱 바람직하게는 약 5 또는 약 10분 내지 약 2.5시간, 더욱 더 바람직하게는 약 5 또는 약 10분 내지 약 1시간, 더욱 더 바람직하게는 약 5 또는 약 10분 내지 약 30분, 더욱 더 바람직하게는 약 5 또는 약 10분 내지 약 20분, 더욱 더 바람직하게는 약 10분 내지 약 15분이다.

[0503] 가수분해의 t1/2이 상기에서 언급된 바와 같은 그와 같은 일부 실시양태에서, 가수분해는 완전히 진행된다. 완전한 가수분해는 티오-치환된 숙신이미드의 90%가 가수분해되는 경우에 달성된 것으로 간주된다. 바람직하게는, 95% 이상, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 100%의 가수분해가 달성될 수 있다. 일부 실시양태에서는, 가수분해 반응은 디락탐 형성과 경쟁하게 됨으로써, 완료를 달성하지 못하게 된다. 그와 같은 일부 실시양태에서는, 반응 생성물의 90% 이상이 가수분해된 티오-치환 숙신이미드 리간드-약물 접합체 또는 티오-치환 디락탐 리간드-약물 접합체 양자의 조합이 되게 된다. 바람직하게는, 반응 생성물의 적어도 95% 이상, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 100%가 가수분해된 티오-치환 리간드-약물 접합체 또는 티오-치환 디락탐 리간드-약물 접합체 양자의 조합이 되게 된다. 가수분해의 백분율은 최종시점의 접합체의 질량 분광측정 데이터로부터 원래의 비가수분해 접합체의 질량에 해당하는 피크의 강도 및 가수분해된 접합체의 질량에 해당하는 피크의 강도를 측정하고, 피크

강도들의 합계를 사용하여 가수분해 백분율 및 비가수분해 백분율을 측정하는 것에 의해 계산될 수 있다.

[0504] 그의 가수분해의 t1/2 및/또는 가수분해 반응 효율로써 리간드-약물 접합체를 특성화하는 것 이외에도, 제거 반응에 적용되고 약물-링커가 리간드 단위로부터 리간드-약물 접합체 환경에 존재하는 대안적인 반응성 티올로 전달되는 리간드-약물 접합체의 능력에 의해, 리간드-약물 접합체의 안정성이 특성화될 수 있다. 일부 실시양태에서, 약물-링커는 하기의 검정 및 언급되는 조건하에서는 리간드로부터의 해리를 나타내지 않거나 실질적으로 나타내지 않게 된다. "리간드로부터의 해리가 실질적으로 없음"이라는 구는 샘플 중 약물-링커의 40% 미만, 바람직하게는 20% 미만, 더욱 더 바람직하게는 10% 미만, 더욱 더 바람직하게는 5% 미만 또는 2% 미만이 리간드로부터 해리되는 경우에 달성된 것으로 간주된다.

[0505] 항체로부터의 효소-절단가능 링커를 포함하는 약물-링커의 제거는 하기의 방법에 의해 생체외 혈장에서 측정될 수 있다. 접합체를 멸균 혈장 중에 위치시키고, 37℃에서 인큐베이션한다. 인큐베이션 개시시 및 1시간 내지 1주 또는 그 이상의 여러 시점에, 분취량을 제거하여 -80℃로 냉동시킨다. 시점 완료시, 샘플을 단백질 A 친화성 수지로 통과시켜 항체를 포획하고, 수지를 완충제로 세척한 다음, 적절한 효소 (예컨대 펩티드-기재 절단가능 링커의 경우 파페인 또는 프로테이나제 K)를 사용한 처리에 의해 포획된 항체로부터 약물을 방출시킨다. 이후, 표준 LC-MS 방법론에 의해 방출된 약물이 정량될 수 있는데, 각 시점에 측정된 약물의 양을 인큐베이션 전 분취량에 대하여 측정된 약물의 양으로 나눔으로써, 각 시점에 항체에 접합되어 유지되는 약물의 백분율을 측정한다. 이와 같은 검정의 정밀도는 동일한 약물-링커의 동위원소 표지된 버젼을 사용하여 제조됨으로써 그의 질량 차이에 의해 그로부터 방출되는 약물이 LC-MS 검정에서 시험 약물-링커로부터 방출되는 약물과는 독립적으로 검출될 수 있도록 되어 있는 내부 표준 항체-약물 접합체를 포함시키는 것에 의해 향상될 수 있다. 이와 같은 동위원소 표지 내부 표준 항체-약물 접합체는 단백질 A 포획 단계 직전에 동일한 양으로 각 샘플에 첨가된다. 다음에, 통상적인 LC-MS 기술에 의해, 시험 ADC로부터 방출된 약물의 정량이 내부 표준으로부터의 신호에 대하여 비례측정에 의해 수행된다.

[0506] 항체 (또는 다른 리간드)로부터의 말레이미드 약물-링커의 제거를 평가하기 위한 대안적인 방법은 모 접합체로부터 제거되는 소정의 말레이미드와 반응하게 되는 매우 과량인 소형-분자 티올 (예컨대 N-아세틸 시스테인, NAC)의 존재하에 완충제 (예컨대 포스페이트-완충된 염수) 중에서 약간 상승된 pH (예컨대 pH 8.0)로 접합체를 인큐베이션하는 것이다. NAC에 접합된 약물-링커 또는 모 리간드-접합체를 검출하고 정량하기 위하여, LC-MS 검정이 수행될 수 있다. 후자의 경우, 리간드-접합체 대 비접합 리간드의 비가 측정될 수 있는데, 리간드-접합체가 안정하다면, 시간이 지나면서 일정하게 유지될 것이다. 추가적인 방법들은 실시예 부문에서 제공된다.

[0507] **암의 치료**

[0508] 리간드-약물 접합체는 종양 세포 또는 암 세포의 증식을 억제하거나, 종양 또는 암 세포에서 세포자멸사를 야기하거나, 또는 환자에서 암을 치료하는 데에 유용하다. 따라서, 리간드-약물 접합체는 다양한 암 치료 환경에서 사용될 수 있다. 리간드-약물 접합체는 종양 세포 또는 암 세포로 약물을 전달하는 데에 사용될 수 있다. 이론에 얽매이고자 하는 것은 아니나, 한 실시양태에서는, 리간드-약물 접합체의 리간드 단위가 암-세포 또는 종양-세포-연관 항원에 결합하거나 그와 결합된 후, 리간드-약물 접합체가 수용체-매개 세포내이입 또는 다른 내재화 기작을 통하여 종양 세포 또는 암 세포 내부로 흡수 (내재화)될 수 있다. 항원은 종양 세포 또는 암 세포에 결합될 수 있거나, 또는 종양 세포 또는 암 세포와 연관되어 있는 세포외 매트릭스 단백질일 수 있다. 일단 세포에 진입하고 나면, 링커 시스템의 구성요소에 따라 절단가능 또는 비-절단가능 기작을 통하여 약물이 세포내에 방출된다. 대안적인 실시양태에서는, 종양 세포 또는 암 세포 외부에서 리간드-약물 접합체로부터 약물 또는 약물 단위가 절단된 후, 이어서 약물 또는 약물 단위가 세포에 침투한다.

[0509] 리간드-약물 접합체는 접합-특이적인 종양 또는 암 약물 표적화를 제공함으로써, 약물의 일반적인 독성을 감소시킬 수 있다. 일부 실시양태에서, 링커 단위는 혈액 중에서 리간드-약물 접합체를 안정화함으로써, 일단 세포 내부에 진입하고 난 후에도 약물을 방출할 수 있다.

[0510] 한 실시양태에서, 리간드 단위는 종양 세포 또는 암 세포에 결합한다.

[0511] 또 다른 실시양태에서, 리간드 단위는 종양 세포 또는 암 세포의 표면상에 존재하는 종양 세포 또는 암 세포 항원에 결합한다.

[0512] 또 다른 실시양태에서, 리간드 단위는 종양 세포 또는 암 세포와 연관되어 있는 세포외 매트릭스 단백질인 종양 세포 또는 암 세포 항원에 결합한다.

[0513] 특정 종양 세포 또는 암 세포에 대한 리간드 단위의 특이성은 가장 효과적으로 치료되는 종양 또는 암을 확인하

는 데에 중요할 수 있다. 예를 들어, BR96 리간드 단위를 갖는 리간드 약물 접합체는 폐, 유방, 결장, 난소 및 췌장의 것을 포함한 항원 양성 암종들을 치료하는 데에 유용할 수 있다. 항-CD30 또는 항-CD70 결합 리간드 단위를 갖는 리간드-약물 접합체는 혈액암을 치료하는 데에 유용할 수 있다.

[0514] 리간드 약물 접합체를 사용하여 치료될 수 있는 다른 구체적인 암 유형에는 하기 표 1에 개시되어 있는 것들이 포함되나, 이에 제한되는 것은 아니다:

[0515] <표 1>

[0516] 비제한적으로 하기를 포함한 고형 종양:

[0517] 섬유육종, 점액육종, 지방육종, 연골육종, 골육종, 척삭종, 혈관육종, 내피육종, 림프관육종, 림프관내피육종, 활막종, 중피종, 유잉 종양, 평활근육종, 횡문근육종, 결장암, 결장직장암, 신장암, 췌장암, 골암, 유방암, 난소암, 전립선암, 식도암, 위암, 구강암, 비암, 인후암, 편평 세포 암종, 기저 세포 암종, 선암종, 한선 암종, 피지선 암종, 유두 암종, 유두 선암종, 낭선암종, 수질 암종, 기관지원성 암종, 신세포 암종, 간암, 담관 암종, 융모막암종, 고환종, 배아 암종, 빌름스 종양, 자궁경부암, 자궁암, 고환암, 소세포 폐 암종, 방광 암종, 폐암, 상피 암종, 신경아교종, 다형성 아교모세포종, 별아교세포종, 수질모세포종, 두개인두종, 뇌실막세포종, 송과체종, 혈관모세포종, 청신경종, 핍지교종, 수막종, 피부암, 흑색종, 신경모세포종, 망막모세포종

[0518] 비제한적으로 하기를 포함한 혈액-계 암:

[0519] 급성 림프모세포성 백혈병 "ALL", 급성 림프모세포성 B-세포 백혈병, 급성 림프모세포성 T-세포 백혈병, 급성 골수모세포성 백혈병 "AML", 급성 전골수세포성 백혈병 "APL", 급성 단핵모세포성 백혈병, 급성 적백혈구성 백혈병, 급성 거대모세포성 백혈병, 급성 골수단핵구성 백혈병, 급성 비림프구성 백혈병, 급성 비분화 백혈병, 만성 골수세포성 백혈병 "CML", 만성 림프구성 백혈병 "CLL", 모발 세포 백혈병, 다발성 골수종

[0520] 급성 및 만성 백혈병:

[0521] 림프모세포성, 골수성, 림프구성, 골수세포성 백혈병

[0522] 림프종:

[0523] 호지킨병, 비-호지킨성 림프종, 다발성 골수종, 발덴스트롬 마크로글로불린혈증, 중쇄 질환, 진성 적혈구증가증

[0524] **다중-모드 암 요법**

[0525] 비제한적으로 종양, 전이, 또는 조절되지 않는 세포 성장을 특징으로 하는 기타 질환 또는 장애를 포함한 암은 리간드-약물 접합체의 투여에 의해 치료 또는 억제될 수 있다.

[0526] 다른 실시양태에서는, 유효량의 리간드-약물 접합체 및 화학치료제를 그를 필요로 하는 환자에게 투여하는 것을 포함하는 암의 치료 방법이 제공된다. 한 실시양태에서, 화학치료제는 그를 사용한 암의 치료가 불응성인 것으로 밝혀져 있지 않은 것이다. 또 다른 실시양태에서, 화학치료제는 그를 사용한 암의 치료가 불응성인 것으로 밝혀져 있는 것이다. 리간드-약물 접합체는 암 치료로서 수술도 받은 바 있는 환자에게 투여될 수 있다.

[0527] 일부 실시양태에서, 환자는 방사선 요법과 같은 추가적인 치료도 받는다. 특정 실시양태에서, 리간드-약물 접합체는 화학치료제 또는 방사선 요법과 동시에 투여된다. 또 다른 특정 실시양태에서는, 리간드 약물 접합체의 투여 전 또는 이후에 화학치료제 또는 방사선 요법이 투여된다.

[0528] 화학치료제는 연속되는 기간에 걸쳐 투여될 수 있다. 화학치료제들 중 어느 하나 또는 그들의 조합, 관리용 화학치료제(들)의 소정 표준이 투여될 수 있다.

[0529] 추가로, 화학요법 또는 방사선 요법에 대한 대안으로써 리간드-약물 접합체를 사용한 암의 치료 방법이 제공되는데, 여기서 화학요법 또는 방사선 요법은 치료되는 대상체에 대하여 예컨대 허용되지 않거나 견딜 수 없는 부작용을 초래함으로써 너무 독성이라고 입증되어 있거나 입증될 수 있는 것이다. 치료되는 환자는 임의로 어떤 치료가 허용되는거나 견딜수 있는 것으로 밝혀지는지에 따라 수술, 방사선 요법 또는 화학요법과 같은 또 다른 암 치료와 함께 치료될 수 있다.

[0530] **자가면역 질환의 치료**

[0531] 리간드-약물 접합체는 자가면역 질환을 생성시키는 세포를 사멸시키거나 그의 복제를 억제하는 데에, 또는 자가면역 질환을 치료하는 데에 유용하다. 따라서, 리간드-약물 접합체는 환자에서의 자가면역 질환의 치료를 위한

다양한 환경에서 사용될 수 있다. 리간드-약물 접합체는 약물을 표적 세포로 전달하는 데에 사용될 수 있다. 이론에 얽매이고자 하는 것은 아니나, 한 실시양태에서, 리간드-약물 접합체는 표적 세포 표면상의 항원과 결합하며, 이후 리간드 약물 접합체는 수용체-매개 세포내이입을 통하여 표적-세포 내부로 흡수된다. 일단 세포에 진입하고 나면, 링커 단위 내의 1개 이상의 특이적인 펩티드 서열이 절단됨으로써, 약물 또는 약물 단위의 방출을 초래한다. 다음에, 방출된 약물 또는 약물 단위는 세포질 내에서 자유롭게 이동하여 세포독성 또는 세포억제성 활성을 유도한다. 대안적인 실시양태에서, 약물은 표적 세포의 외부에서 리간드-약물 접합체로부터 절단되며, 이후 약물 또는 약물 단위가 세포로 침투한다.

[0532] 한 실시양태에서, 리간드 단위는 자가면역 항원에 결합한다. 한 측면에서, 상기 항원은 자가면역 상태에 연관되어 있는 세포의 표면 상에 존재한다.

[0533] 또 다른 실시양태에서, 리간드 단위는 세포의 표면 상에 존재하는 자가면역 항원에 결합한다.

[0534] 한 실시양태에서, 리간드 단위는 자가면역 질환 상태와 연관되어 있는 활성화된 림프구에 결합한다.

[0535] 추가적인 실시양태에서, 리간드-약물 접합체는 특정 자가면역 질환과 연관되어 있는 자가면역 항체를 생성시키는 세포를 사멸시키거나 그의 증식을 억제한다.

[0536] 리간드 약물 접합체를 사용하여 치료될 수 있는 구체적인 자가면역 질환의 유형에는 Th2 림프구 관련 장애 (예컨대 아토피성 피부염, 아토피성 천식, 코결막염, 알레르기성 비염, 오멘 증후군, 전신성 경화증 및 이식편 대 숙주 질환); Th1 림프구-관련 장애 (예컨대 류마티스 관절염, 다발성 경화증, 건선, 쇼그렌 증후군, 하시모토 갑상선염, 그레이브병, 원발성 담즙성 간경변증, 베게너 육아종증 및 결핵); 활성화된 B 림프구-관련 장애 (예컨대 전신성 홍반 루푸스, 굿파스쳐 증후군, 류마티스 관절염 및 유형 I 당뇨병); 및 하기 표 2에 개시되어 있는 것들이 포함되나, 이에 제한되는 것은 아니다:

[0537] <표 2>

[0538] 활성 만성 간염, 애디슨병, 알레르기성 폐포염, 알레르기 반응, 알레르기성 비염, 알포트 증후군, 아나필락시스, 강직 척추염, 항-인지질 증후군, 관절염, 회충증, 아스페르길루스증, 아토피성 알레르기, 아토피성 피부염, 아토피성 비염, 베체트병, 조류 사육자병, 기관지 천식, 카플란 증후군, 심근병증, 복강 질환, 샤가스병, 만성 사구체신염, 코간 증후군, 저온 응집병, 선천성 풍진 감염, 크레스트 증후군, 크론병, 한랭글로불린혈증, 쿠싱 증후군, 피부근육염, 원판상 루푸스, 드레슬러 증후군, 이튼-램버트 증후군, 에코바이러스 감염, 뇌척수염, 내분비 눈병증, 엡스타인-바르 바이러스 감염, 말 폐기종, 홍반, 에반 증후군, 펠티 증후군, 섬유근육통, 푹스 섬모체염, 위선 위축, 위장관 알레르기, 거세포 동맥염, 사구체신염, 굿파스쳐 증후군, 이식편 대 숙주 질환, 그레이브병, 길랑-바레병, 하시모토 갑상선염, 용혈성 빈혈, 헤노흐-쇤라인 자색반, 특발성 부신 위축, 특발성 폐 섬유염, IgA 신장병증, 염증성 창자 질환, 인슐린-의존성 당뇨병, 청소년성 관절염, 청소년성 당뇨병 (유형 I), 램버트-이튼 증후군, 제엽염, 편평 태선, 루포이드 간염, 루푸스, 림프구감소증, 메니에르병, 혼합 결합 조직 질환, 다발성 경화증, 중증 근무력증, 악성 빈혈, 다분비선 증후군, 초로성 치매, 원발성 무감마글로불린혈증, 원발성 담즙성 간경변증, 건선, 건선 관절염, 레이노 현상, 재발성 유산, 레이터 증후군, 류마티스열, 류마티스 관절염, 샘프터 증후군, 주혈흡충증, 슈미트 증후군, 공피증, 슐만 증후군, 쇼그렌 증후군, 근강직 증후군, 교감성 안염, 전신성 홍반 루푸스, 타카야수 동맥염, 일시적 동맥염, 갑상선염, 혈소판감소증, 갑상선중독증, 독성 표피 괴사, 유형 B 인슐린 저항성, 유형 I 당뇨병, 궤양성 결장염, 포도막염, 백반증, 발덴스트롬 마크로글로불린혈증, 베게너 육아종증

[0539] **자가면역 질환의 다중-약물 요법**

[0540] 유효량의 리간드-약물 접합체 및 자가면역 질환 치료용으로 알려져 있는 또 다른 치료제를 그를 필요로 하는 환자에게 투여하는 것을 포함하는 자가면역 질환의 치료 방법 역시 개시된다.

[0541] **감염성 질환의 치료**

[0542] 리간드-약물 접합체는 감염성 질환을 생성시키는 세포를 사멸시키거나 그의 증식을 억제하는 데에, 또는 감염성 질환을 치료하는 데에 유용한다. 따라서, 리간드-약물 접합체는 환자에서의 감염성 질환의 치료를 위한 다양한 환경에서 사용될 수 있다. 리간드-약물 접합체는 표적 세포로 약물을 전달하는 데에 사용될 수 있다. 한 실시양태에서, 리간드 단위는 감염성 질환 세포에 결합한다.

[0543] 한 실시양태에서, 접합체는 특정 감염성 질환을 생성시키는 세포를 사멸시키거나 그의 증식을 억제한다.

[0544] 리간드-약물 접합체를 사용하여 치료될 수 있는 구체적인 감염성 질환의 유형에는 하기 표 3에 개시되어 있는 것들이 포함되나, 이에 제한되는 것은 아니다:

[0545] <표 3>

[0546] 세균 질환:

[0547] 디프테리아, 백일해, 잠재성 세균혈증, 요로 감염, 위창자염, 연조직염, 후두개염, 기관염, 아데노이드 비대, 인두후 농양, 농가진, 농창, 폐렴, 심장내막염, 패혈성 관절염, 폐렴구균, 복막염, 세균혈증, 수막염, 급성 화농성 수막염, 요도염, 자궁경부염, 직장염, 인두염, 자궁관염, 부고환염, 임질, 매독, 리스테리아증, 탄저병, 노카르디아증, 살모넬라, 장티푸스, 이질, 결막염, 굴염, 브루셀라증, 야토병, 콜레라, 가래톳 흑사병, 파상풍, 괴사성 장염, 방선균증, 혼합 혐기성 감염, 매독, 재귀열, 렙토스피라증, 라임병, 서교열, 결핵, 림프절염, 나병, 클라미디아, 클라미디아성 폐렴, 트라코마, 봉입체 결막염

[0548] 전신성 진균 질환:

[0549] 히스토플라스마증, 콕시디오이데스진균증, 분아균증, 스포로트리쿰증, 크립토코쿠스증, 전신성 칸디다증, 아스페르길루스증, 털곰팡이증, 균종, 색소진균증

[0550] 리케챠 질환:

[0551] 발진티푸스, 록키산 홍반열, 에를리히증, 동방 진드기-매개 리케챠병, 리케챠폭스, Q열, 바르토넬라증

[0552] 기생성 질환:

[0553] 말라리아, 바베시아증, 아프리카 수면병, 샤가스병, 리슈만편모충증, 덤-덤열, 톡소플라스마증, 수막뇌염, 각막염, 엔트아메바증, 편모충증, 와포자충증, 이소스포라증, 원포자충증, 미포자충증, 회충증, 편충 감염, 구충 감염, 요충 감염, 안구 유충 이행증, 선모충증, 기니 벌레병, 림프구 사상충증, 로아증, 회선사상충증, 개 심장사상충 감염, 주혈흡충증, 물놀이가려움증, 동양 폐 흡충, 동양 간 흡충, 간질증, 비대흡충증, 고양이간흡충증, 촌충 감염, 포충병, 폐포 포충병

[0554] 바이러스 질환:

[0555] 홍역, 아급성 경화성 범뇌염, 감기, 볼거리, 풍진, 장미진, 제5병, 수두, 호흡기 세포융합 바이러스 감염, 크루프, 세기관지염, 감염성 단핵구증, 회색질척수염, 포진성구협염, 수족구병, 보른홀름병, 성기 헤르페스, 성기 사마귀, 무균 수막염, 심장근육염, 심장막염, 위창자염, 후천성 면역결핍 증후군 (AIDS), 인간 면역결핍 바이러스 (HIV), 라이 증후군, 카와사키 증후군, 인플루엔자, 기관지염, 바이러스성 "보행성" 폐렴, 급성 열성 호흡기 질환, 급성 인두결막열, 유행성 각결막염, 단순 헤르페스 바이러스 1 (HSV-1), 단순 헤르페스 바이러스 2 (HSV-2), 대상포진, 세포거대성 봉입체병, 광견병, 진행성 다초점성 뇌백질병증, 쿠루, 치명적 가족성 불면증, 크로이츠펠트-야곱병, 게르스트만-슈투로이슬러-샤잉커병, 열대성 강직성 대마비, 서부 말 뇌염, 캘리포니아 뇌염, 세인트루이스 뇌염, 황열, 뎅기, 림프구성 맥락수막염, 라사열, 출혈열, 한타바이러스 폐 증후군, 마르부르크 바이러스 감염, 에볼라 바이러스 감염, 마마

[0556] **감염성 질환의 다중-약물 요법**

[0557] 리간드-약물 접합체 및 항-감염성 질환 작용제인 또 다른 치료제를 그를 필요로 하는 환자에게 투여하는 것을 포함하는 감염성 질환의 치료 방법이 개시된다.

[0558] **조성물 및 투여 방법**

[0559] 본 발명은 본원에서 기술되는 리간드-약물 접합체 및 제약상 허용되는 담체를 포함하는 제약 조성물을 제공한다. 상기 리간드-약물 접합체는 리간드 단위가 결합하는 항원의 발현과 연관되어 있는 장애의 치료를 위하여 화합물이 환자에게 투여되는 것을 가능케 하는 소정의 형태일 수 있다. 예를 들면, 접합체는 액체 또는 고체의 형태일 수 있다. 바람직한 투여 경로는 비경구이다. 비경구 투여에는 피하 주사, 정맥내, 근육내, 흉골내 주사 또는 주입 기술이 포함된다. 한 측면에서, 조성물은 비경구로 투여된다. 한 측면에서, 화합물은 정맥내로 투여된다.

[0560] 본 발명은 또한 본원에서 기술되는 리간드-기능성 작용제 접합체 및 제약상 허용되는 담체를 포함하는 제약 조성물을 제공한다. 상기 리간드-약물 접합체는 장애의 치료를 위하여, 또는 진단 목적으로 화합물이 환자에게 투여되는 것을 가능케 하는 소정의 형태일 수 있다.

[0561] 제약 조성물은 환자에의 조성물의 투여시 화합물이 생체이용가능하게 되도록 제제화될 수 있다. 조성물은 1개 이상 투약 단위의 형태를 취할 수 있는데, 예를 들면 정제는 단일 투약 단위일 수 있다.

[0562] 제약 조성물을 제조하는 데에 사용되는 물질은 사용되는 양에서 비-독성일 수 있다. 업계 일반의 숙련자라면, 제약 조성물 중 활성 성분(들)의 최적 투약량이 다양한 인자들에 따라 달라지게 된다는 것을 잘 알고 있을 것이다. 관련 인자에는 비제한적으로 동물의 유형 (예컨대 인간), 화합물의 구체적인 형태, 투여 방식 및 사용되는 조성물이 포함된다.

[0563] 조성물은 예를 들면 액체의 형태일 수 있다. 액체는 주사에 의한 전달에 유용할 수 있다. 주사에 의한 투여용 조성물에는, 계면활성제, 보존제, 침윤제, 분산제, 현탁제, 완충제, 안정화제 및 등장화제 중 1종 이상이 포함될 수도 있다.

[0564] 그것이 용액인지, 현탁액인지 또는 다른 유사한 형태인지에 관계없이, 액체 조성물은 하기 중 1종 이상을 포함할 수도 있다: 멸균 희석제 예컨대 주사용수, 염수 용액, 바람직하게는 생리 염수, 링거 용액, 등장성 나트륨 클로라이드, 용매 또는 현탁 매체로 작용할 수 있는 고정 오일 예컨대 합성 모노 또는 디글리세리드, 폴리에틸렌 글리콜, 글리세린, 시클로덱스트린, 프로필렌 글리콜 또는 기타 용매; 항세균제 예컨대 벤질 알콜 또는 메틸 파라벤; 항산화제 예컨대 아스코르브산 또는 나트륨 비술파이트; 킬레이팅제 예컨대 에틸렌디아민테트라아세트산; 완충제 예컨대 아미노산, 아세테이트, 시트레이트 또는 포스페이트; 세제 예컨대 비이온계 계면활성제, 폴리올; 및 장성 조정을 위한 작용제 예컨대 나트륨 클로라이드 또는 덱스트로스. 비경구 조성물은 유리, 플라스틱 또는 기타 재료로 제조된 앰풀, 일회용 주사기 또는 다수-투여용 바이알에 봉입될 수 있다. 생리 염수가 예시적인 아주반트이다. 주사가능 조성물은 바람직하게는 멸균되어 있다.

[0565] 특정 장애 또는 이상의 치료에 효과적인 접합체의 양은 장애 또는 이상의 특성에 따라 달라지게 되며, 표준 임상 기술에 의해 결정될 수 있다. 또한, 최적 투약량 범위를 확인하는 것을 돕기 위하여, 임의로 시험관내 또는 생체내 검정이 사용될 수 있다. 조성물에 사용될 정확한 투여량은 투여 경로 및 질환 또는 장애의 중증도에 따라서도 달라지게 되는데, 진료의의 판단 및 각 환자의 상황에 따라 결정되어야 한다.

[0566] 조성물은 적합한 투약량이 수득될 수 있도록 하는 유효량의 화합물을 포함한다. 통상적으로, 이와 같은 양은 조성물의 중량을 기준으로 약 0.01% 이상의 화합물이다.

[0567] 정맥내 투여의 경우, 조성물은 동물 체중 kg 당 약 0.01 내지 약 100 mg의 리간드-약물 접합체를 포함할 수 있다. 한 측면에서, 조성물은 동물 체중 kg 당 약 1 내지 약 100 mg의 리간드-약물 접합체를 포함할 수 있다. 또 다른 측면에서, 투여되는 양은 화합물 약 0.1 내지 약 25 mg/kg (체중)의 범위일 수 있다.

[0568] 일반적으로, 환자에게 투여되는 화합물의 투약량은 보통 약 0.01 mg/kg 내지 약 100 mg/kg (대상체의 체중)이다. 일부 실시양태에서, 환자에게 투여되는 투약량은 약 0.01 mg/kg 내지 약 15 mg/kg (대상체의 체중) 사이이다. 일부 실시양태에서, 환자에게 투여되는 투약량은 약 0.1 mg/kg 내지 약 15 mg/kg (대상체의 체중) 사이이다. 일부 실시양태에서, 환자에게 투여되는 투약량은 약 0.1 mg/kg 내지 약 20 mg/kg (대상체의 체중) 사이이다. 일부 실시양태에서, 투여되는 투약량은 약 0.1 mg/kg 내지 약 5 mg/kg 또는 약 0.1 mg/kg 내지 약 10 mg/kg (대상체의 체중) 사이이다. 일부 실시양태에서, 투여되는 투약량은 약 1 mg/kg 내지 약 15 mg/kg (대상체의 체중) 사이이다. 일부 실시양태에서, 투여되는 투약량은 약 1 mg/kg 내지 약 10 mg/kg (대상체의 체중) 사이이다. 일부 실시양태에서, 투여되는 투약량은 치료 주기 동안 약 0.1 내지 4 mg/kg, 더욱 더 바람직하게는 0.1 내지 3.2 mg/kg, 더욱 더 바람직하게는 0.1 내지 2.7 mg/kg (대상체의 체중) 사이이다.

[0569] 리간드-기능성 작용제 접합체 (예컨대 리간드-약물 접합체)는 어떠한 통상적인 경로에 의해서도, 예를 들면 주입 또는 일시주사에 의해, 상피 또는 점막피부 내면 (예컨대 경구 점막, 직장 및 장 점막)을 통한 흡수에 의해 투여될 수 있다. 투여는 전신성이거나 국소적일 수 있다. 다양한 전달 시스템들이 알려져 있는데, 예를 들면 리포좀, 미세입자, 미세캡슐, 캡슐 내로의 캡슐화가 화합물을 투여하는 데에 사용될 수 있다. 소정 실시양태에서는, 1종을 초과하는 화합물 또는 조성물이 환자에게 투여된다.

[0570] "담체"라는 용어는 그와 함께 화합물이 투여되는 희석제, 아주반트 또는 부형제를 지칭한다. 그와 같은 제약용 담체는 물 또는 오일과 같은 액체일 수 있는데, 땅콩 오일, 대두 오일, 무기 오일, 참깨 오일과 같은 석유, 동물, 식물 또는 합성 기원의 것들이 포함된다. 담체는 염수, 아카시아 검, 젤라틴, 전분 페이스트, 활석, 케라틴, 콜로이드 실리카, 우레아일 수 있다. 또한, 보조제, 안정화제, 증점제, 윤활제 및 착색제가 사용될 수 있다. 한 실시양태에서, 환자에게 투여될 때, 화합물 또는 조성물 및 제약상 허용되는 담체는 멸균되어 있다. 화합물이 정맥내로 투여되는 경우, 물이 예시적인 담체이다. 염수 용액, 그리고 덱스트로스 및 글리세롤 수용

액이 특히 주사가능 용액용 액체 담체로서 사용될 수도 있다. 적합한 제약용 담체에는 전분, 글루코스, 락토스, 수크로스, 젤라틴, 맥아, 쌀, 밀가루, 백악, 실리카 겔, 나트륨 스테아레이트, 글리세롤 모노스테아레이트, 활석, 나트륨 클로라이드, 건조 탈지유, 글리세롤, 프로필렌, 글리콜, 물, 에탄올과 같은 부형제들도 포함된다. 본 발명의 조성물은 원할 경우 적은 양의 침윤제 또는 에멀션화제, 또는 pH 완충제를 함유할 수도 있다.

[0571] 한 실시양태에서, 접합체는 일상적인 절차에 따라 동물, 특히 인간에 대한 정맥내 투여용으로 적합화된 제약 조성물로서 제제화된다. 통상적으로, 정맥내 투여용 담체 또는 비히클은 멸균 등장성 완충제 수용액이다. 필요할 경우, 조성물은 가용화제를 포함할 수도 있다. 정맥내 투여용 조성물은 임의로 주사 부위에서의 통증을 완화하기 위하여 리그노카인과 같은 국소 마취제를 포함할 수 있다. 일반적으로, 성분들은 별도의 것, 또는 단위 투약 형태에 함께 혼합된 것 중 어느 하나로, 예를 들면 활성 작용제의 양이 표시되는 앰풀 또는 샤세와 같은 기밀 밀봉된 용기 중 건조 동결건조 분말 또는 무수 농축물로서 공급된다. 접합체가 주입에 의해 투여되어야 하는 경우, 그것은 예를 들면 멸균 제약 등급의 물 또는 염수를 포함하는 주입 병을 사용하여 분배될 수 있다. 접합체가 주사에 의해 투여되는 경우에는, 투여 전에 성분들이 혼합될 수 있도록, 주사용 멸균수 또는 염수의 앰풀이 제공될 수 있다.

[0572] 제약 조성물은 일반적으로 멸균되며, 실질적으로 등장성이고, U.S. 식품의약국의 모든 우수 제조 실행 (GMP) 규제에 완전히 부합하도록 제제화된다.

[0573] 본 발명의 제약 조성물은 본 발명의 리간드 약물 접합체 및 제약상 허용되는 담체를 포함한다. 바람직한 일부 실시양태에서는, 제약 조성물에 존재하는 전체, 또는 실질적으로 전체, 또는 50% 초과의 리간드 약물 접합체가 가수분해된 티오-치환 숙신이미드를 포함한다. 바람직한 일부 실시양태에서는, 제약 조성물에 존재하는 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99% 초과의 리간드 약물 접합체가 가수분해된 티오-치환 숙신이미드를 포함한다.

[0574] **리간드-약물 접합체의 제조 방법**

[0575] 또 다른 측면에서, 본 발명은 자가-안정화 링커를 포함하는 리간드-약물 접합체 또는 리간드-기능성 작용제 접합체의 제조 방법을 제공한다.

[0576] 일부 실시양태에서, 본 발명의 방법은 본원에서 기술되는 바와 같은 약물-링커 또는 링커 단위를 제공하는 단계, 상기 약물-링커 또는 링커 단위를 리간드 단위의 술피드릴 기에 접합시킴으로써 접합체를 형성시키는 단계, 생성 접합체가 가수분해 반응에 적용되는 것을 가능케 함으로써 티오-치환된 가수분해 숙신이미드를 포함하는 리간드-약물 접합체를 형성시키는 단계를 포함한다.

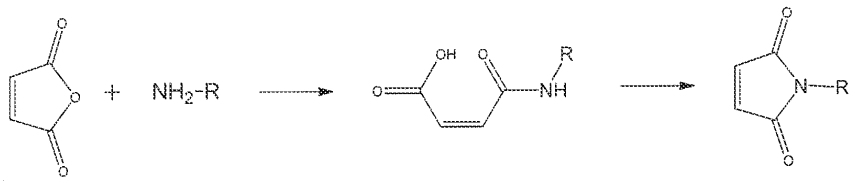
[0577] 티오-치환된 숙신이미드 가수분해의 속도는 리간드에 대한 약물-링커의 접합 후 반응 조건을 조정하는 것에 의해, 예를 들면 pH 또는 온도를 조정하는 것에 의해 조작될 수 있다. 본 발명의 일부 실시양태에서는, 전체, 실질적으로 전체, 또는 50%, 60%, 70%, 80%, 85%, 90% 또는 심지어는 95% 이상의 티오-치환 숙신이미드가 반응 조건의 조작 없이도 가수분해되는데, 다시 말하자면 가수분해 반응이 접합 반응과 동일한 반응 조건하에서 이루어진다. 일부 실시양태에서는, 전체, 실질적으로 전체, 또는 50%, 60%, 70%, 80%, 85%, 90% 또는 심지어는 95% 이상의 티오-치환 숙신이미드가 접합 후 20분 내지 4시간에, 바람직하게는 접합 후 20분 내지 2시간에 가수분해된다. 예시적인 실시양태에서, 접합 조건은 약 7.4의 pH 및 약 22℃의 온도이다.

[0578] 일부 실시양태에서, 리간드-약물 접합체의 제조 방법은 자가-안정화 링커를 포함하는 약물-링커 또는 링커 단위를 제공하는 단계; 상기 약물-링커 또는 링커 단위를 리간드의 술피드릴 기에 접합시킴으로써 비-가수분해 티오-치환 숙신이미드를 포함하는 리간드-약물 접합체를 형성시키는 단계; 전체, 실질적으로 전체, 또는 50%, 60%, 70%, 80% 또는 심지어는 85% 이상의 숙신이미드가 접합 후 10분 내지 4시간에 가수분해되는 가수분해 반응에 비-가수분해 티오-치환 숙신이미드가 적용되는 것을 가능케 하는 단계를 포함한다. 일부 실시양태에서는, 전체, 실질적으로 전체, 또는 50%, 60%, 70%, 80%, 85%, 90% 또는 심지어는 95% 이상의 숙신이미드가 접합 후 10분, 20분, 40분, 60분, 90분 또는 120분까지 가수분해된다. 일부 실시양태에서, 가수분해 반응은 접합 반응과 동일한 반응 조건하에서 이루어진다. 예시적인 실시양태에서, 접합 조건은 약 7.4의 pH 및 약 22℃의 온도이다.

[0579] **자가-안정화 링커의 합성 방법**

[0580] 본 발명은 특히 자가-안정화 링커를 제공한다. 자가-안정화 링커 단위의 제조 방법은 본 발명의 영역 내에 포괄된다.

[0581] 말레이미드 화합물은 통상적으로 1급 아민의 말레산 무수물과의 반응에 이어지는 말레암산의 탈수고리화(cyclodehydration)에 의해, 상응하는 아민으로부터 제조된다. 말레이미드 화합물 제조의 전체 반응식을 하기 반응식에 나타낸다:

[0582] 

[0583] 개시 아민의 측쇄에 염기성 기를 포함하는 말레이미드의 제조를 위해서는, 필요할 경우 그와 같은 염기성 기가 보호되어야 한다. 적절한 보호 기는 말레이미드 제조 조건하에서 안정해야 하며, 또한 나중에 말레이미드의 존재하에서는 제거가능해야 한다. 적합한 보호 기는 산 불안정성 보호 기로 구성되나, 이에 제한되는 것은 아니다. "Boc" 보호 기는 바람직한 보호 기 중 하나이다.

[0584] 말레이미드 제조의 제1 단계인 말레암산의 형성은 매우 용이해서, 보통 화학량론 과량의 말레산 무수물을 함유하는 현탁액에 대한 느린 아민의 첨가에 의해 우수한 수율로 달성될 수 있다.

[0585] 제2 단계인 말레암산의 탈수고리화는 업계 숙련자에게 알려져 있는 수많은 방식으로 달성될 수 있다. 예를 들면, 화학 탈수제의 사용이 이와 같은 단계를 달성하기 위한 잘 확립되어 있는 방법이었다. 아미노산의 말레이미드로의 탈수고리화를 수행하는 데에는, 알콜, 예컨대 DCC/HOBt를 이성질체화하는 것과 조합된 카르보디이미드가 사용되어 왔다.

[0586] 산 촉매 존재하에서의 공비 증류를 사용한 열적 탈수고리화는 말레이미드를 생성시키는 또 다른 잘 알려져 있는 방법이다. 공비 용매의 사용은 그것이 형성될 경우 물 공동-생성물의 효율적인 제거를 가능케 함으로써, 반응을 말레이미드 방향으로 진행시킨다. 적합한 공비 용매에는 시클로헥산, 벤젠, 톨루엔, 에틸벤젠, 메시틸렌 등이 포함된다. 톨루엔이 가장 바람직한 것으로 생각되는데, 그것이 주변 압력에서는 110℃에서 비등하기 때문이다. 더욱 열역학적으로 안정한 트랜스 (푸마람산) 구조로의 있을 수 있는 말레암산의 열적 이성질체화를 최소화하기 위해서는, 200℃ 미만의 비점이 바람직하다.

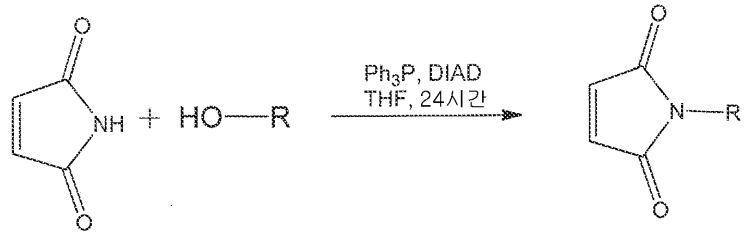
[0587] 극성 비양성자성 공동-용매의 사용은 전체적인 수율 향상은 물론 탈수고리화 시간을 감소시키는 데에 유리할 수 있다. 디메틸포름아미드, 디메틸아세트아미드, 아세토니트릴, N-메틸피롤리돈, 디메틸술폭시드 및 술포네이트를 포함한 수종의 극성 비양성자성 용매들이 유용한 것으로 주장되어 왔다. 가장 유용한 극성 비양성자성 용매는 디메틸포름아미드이다.

[0588] 특허 US 5,973,166호에 따르면, 비양성자성 용매를 대신한 소정 아민염의 도입 역시 말레이미드 형성에 유리할 수 있다.

[0589] 용매를 사용하지 않고 말레산 무수물 및 적절한 아민으로부터 시작하는 일단계 마이크로파 보조 말레이미드 합성이 보고된 바도 있다 (문헌 [H.N. Borah, et al., J. Chem. Research (S), 1998, 272-272]).

[0590] 말레이미드 형성을 위한 용매로서 물을 사용하는 예는 문헌 [ARKIVOC, 2001 (v) 60-67 by V. Ondrus, et al.]에 보고되어 있다.

[0591] 다르게는, 하기 반응식에 나타낸 바와 같이, 말레이미드 화합물은 예를 들면 미츠노부(Mitsunobu) 반응 조건을 사용하여 말레이미드 및 적절한 알콜로부터 생성될 수 있다 (문헌 [M.A. Walker, Tetrahedron Letters, 1994, v. 35, n 5, pp. 665-668]):

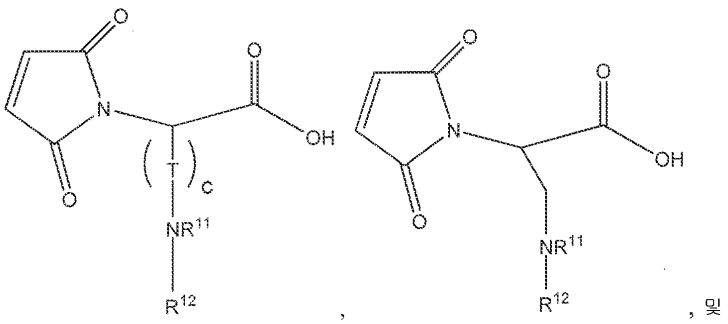
[0592] 

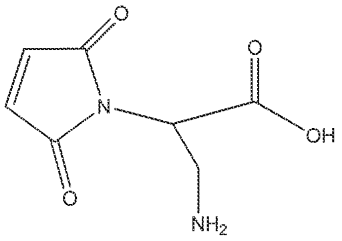
[0593] 본 발명의 자가-안정화 링커 조립체는 업계에 알려져 있는 방법들과의 조합으로써 본원에서 기술되는 교시를 사용하여, 스트레쳐 단위, 절단가능 단위, 스페이서 단위 또는 약물 단위에 연결된다. 링커 및 약물-링커는 업계

에 알려져 있는 방법들과의 조합으로써 본원에서 기술되는 교시를 사용하여, 리간드 단위에 접합된다. 예를 들면, 쇄간 디술피드에의 접합의 경우, 항체는 쇄간 디술피드 시스테인 잔기들 중 일부 또는 그 전체를 환원시켜 고도로 친핵성인 시스테인 티올 기를 형성시키기 위하여 디티오트레이톨 (DTT)과 같은 환원제로 처리될 수 있다. 완전히 환원된 항체 또는 부분적으로 환원된 항체는 이후 링커 단위의 말레이미드에 접합될 수 있다. 예시적인 실시양태에서, 접합 조건은 온건한 것으로써, 약 7의 pH 및 약 22℃의 온도이다.

[0594] **중간체**

[0595] 본 발명은 자가-안정화 링커를 제조하는 데에 사용하기 위한 중간체들을 제공한다. 중간체에는 하기가 포함되며, 여기서 T, c, R^{11} 및 R^{12}는 이전에 기술된 바와 같다:





[0596]

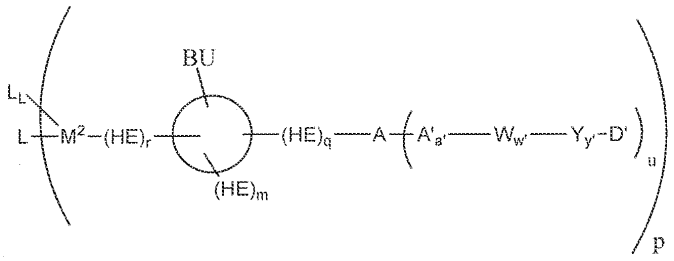
[0597] **모노-티오-치환 또는 디-티오-치환 말레이미드 또는 숙신이미드 자가-안정화 링커**

[0598] 모노 티오-치환 숙신이미드의 가수분해 속도를 증가시키기 위하여 자가-안정화 링커를 설계하는 것 이외에, 자가-안정화 링커는 모노-티오-치환 말레이미드, 디-티오-치환 말레이미드 또는 디-티오-치환 숙신이미드의 가수분해 속도를 증가시키는 데에도 사용될 수 있다.

[0599] 상기로 볼 때, 일군의 실시양태에서, 본 발명은 리간드 단위, 및 약물 단위, 검출 단위 또는 안정성 단위에서 선택되는 1종 이상의 기능성 작용제를 포함하는 리간드-기능성 작용제 접합체이며, 여기서 리간드 단위와 각각의 기능성 작용제(들)는 1개 또는 2개의 티오에테르 연결을 통하여 리간드 단위에 직접 접합된 숙신이미드 고리, 말레이미드 고리, 가수분해된 숙신이미드 고리 또는 가수분해된 말레이미드 고리; 및 자가-안정화 링커 조립체가 결핍되어 있는 리간드-기능성 작용제 접합체에 비해 혈장에서 접합체를 안정화하기 위하여 (다시 말하자면 숙신이미드 또는 말레이미드 고리 가수분해의 속도를 증가시키는 것에 의함) 작동가능하게 연결된 염기 및 전자 끄는 기를 포함하는 자가-안정화 링커 조립체에 의해 결합되어 있는 것인 리간드-기능성 작용제 접합체를 제공한다. 일부 측면에서, 전자 끄는 기는 숙신이미드 또는 말레이미드의 친전자성을 증가시킴으로써 그것이 물과 더 반응성이 되도록 배치되며, 염기는 숙신이미드 또는 말레이미드 고리의 가수분해를 보조하도록 (예컨대 분자내 염기 촉매 기작에 의함) 배치된다.

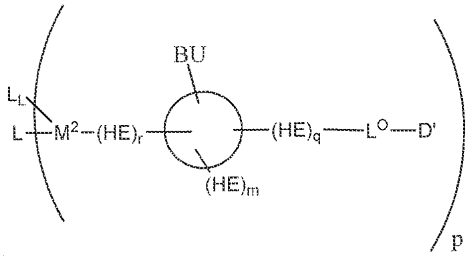
[0600] 일부 실시양태에서, 리간드-기능성 작용제 접합체는 하기 화학식 IV 또는 IVa 또는 그의 염 (예컨대 그의 제약상 허용되는 염)으로 나타내어진다:

[0601] <화학식 IV>



[0602]

[0603] <화학식 IVa>



[0604]

[0605] 상기 식에서,

[0606] L은 리간드 단위이고;

[0607] L_L은 존재하거나 부재할 수 있는 리간드 단위이며, 여기서 L 및 L_L은 동일하거나 상이한 리간드 단위일 수 있고;

[0608] D'는 약물 단위, 검출 단위 또는 안정성 단위이고;

[0609] L^0는 임의의 제2 링커 조립체이고;

[0610] M^2는 티오에테르 연결을 통하여 L 또는 L_L 중 적어도 하나에 접합된 말레이미드 고리, 가수분해된 말레이미드, 숙신이미드 고리 또는 가수분해된 숙신이미드이고;

[0611] BU는 염기성 단위이고;

[0612] HE는 전자 끄는 기를 포함하는 가수분해 인핸서이고;

[0613] 원은, C_{1-8} 알킬렌, C_{1-8} 헤테로알킬렌, C_{6-10} 아릴렌 또는 C_{4-10} 헤테로아릴렌일 수 있으며 임의로 L^0, A, W, Y 또는 D'에의 부착에 적합한 반응성 부위를 포함하는 스캐폴드를 나타내고;

[0614] 아래첨자 m, q 및 r은 각각 0 또는 1이고, m+q+r의 합계는 0, 1 또는 2이며, 단 m+q+r이 0인 경우 스캐폴드는 C_{6-10} 아릴렌 또는 C_{4-10} 헤테로아릴렌이고;

[0615] 아래첨자 p는 1 내지 20의 범위이고;

[0616] -W-는 임의의 절단가능 단위이며,

[0617] 아래첨자 w'는 0 또는 1이고;

[0618] -Y-는 임의의 스페이서 단위이며,

[0619] 아래첨자 y'는 0 또는 1이고;

[0620] -A-는 임의의 스트레쳐 단위이며,

[0621] -A'-는 A 말단의 임의의 스트레쳐 단위 구성요소이고;

[0622] a'는 0 또는 1이고;

[0623] u는 1 내지 20이며, 단 u가 2 내지 20인 경우 A는 존재하고, u가 1인 경우 A는 존재하거나 부재할 수 있다.

[0624] L, HE 및 BU, L^0, A, W 및 Y는 리간드-약물 접합체에 대하여 제공된 의미를 가진다. 또한, 원, L, HE, BU, L^0, A, W 및 Y에 대한 구체적으로 언급된 선별된 실시양태들 각각이 이러한 접합체에 동일하게 적용가능하다. L 및 L_L은 상이한 리간드 단위이거나, 동일한 리간드 단위일 수 있다. L 및 L_L이 동일한 리간드 단위인 실시양태에서, 숙신이미드 또는 말레이미드는 리간드 단위의 동일하거나 상이한 폴리펩티드 쇄 상에서 리간드 단위에 접합될 수 있다.

[0625] r이 1인 일부 측면에서, HE는 카르보닐 기 (즉 C(=O))를 포함하지 않는다.

[0626] 일부 측면에서, m+q+r은 0, 1 또는 2이다.

[0627] 일부 측면에서, r은 0이다.

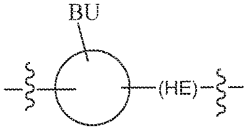
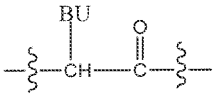
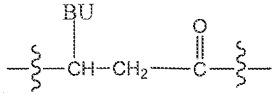
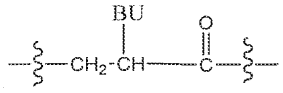
[0628] 일부 측면에서, 리간드-기능성 작용제 접합체는 r 및 m이 0이고 q가 1인 화학식 IV 또는 IVa 또는 그의 염으로 나타내어진다.

[0629] 일부 측면에서, 리간드-기능성 작용제 접합체는 원이, C_{1-8} 알킬렌 또는 C_{1-8} 헤테로알킬렌 (바람직하게는 C_{1-4} 알킬렌 또는 C_{1-4} 헤테로알킬렌)인 스캐폴드를 나타내며, r이 0이고, m+q의 합계가 1인 화학식 IV 또는 IVa 또는 그의 염으로 나타내어진다. 그와 같은 일부 측면에서, 스캐폴드는 C_{1-3} 알킬렌 또는 C_{1-3} 헤테로알킬렌이다. 그와 같은 일부 측면에서, 알킬렌은 직쇄형 또는 분지형이다.

[0630] 일부 측면에서, 리간드-기능성 작용제 접합체는 원이, C_{1-8} 알킬렌 또는 C_{1-8} 헤테로알킬렌 (바람직하게는 C_{1-4} 알킬렌 또는 C_{1-4} 헤테로알킬렌)인 스캐폴드를 나타내며, m 및 r이 0인 화학식 IV 또는 IVa 또는 그의 염으로 나타내어진다. 그와 같은 일부 측면에서, 스캐폴드는 C_{1-3} 알킬렌 또는 C_{1-3} 헤테로알킬렌이다. 그와 같은 일부 측면에서, 알킬렌은 직쇄형 또는 분지형이다.

[0631] 일부 측면에서, 리간드-기능성 작용제 접합체는 원이, C_1, C_2, C_3 또는 C_4 직쇄 또는 분지쇄 알킬렌인 스캐폴드를 나타내며, r이 0이고, m+q의 합계가 1인 화학식 IV 또는 IVa 또는 그의 염으로 나타내어진다.

[0632] 일부 측면에서, 리간드-기능성 작용제 접합체는 원이, C_1, C_2, C_3 또는 C_4 직쇄 또는 분지쇄 알킬렌인 스캐폴드를 나타내며, m 및 r이 0인 화학식 IV 또는 IVa 또는 그의 염으로 나타내어진다.

[0633] 일부 측면에서는, m 및 r이 0이며,  가 하기로 나타내어진다:  ,  또는  .

[0634] 일부 측면에서, 염기성 단위의 염기와 말레이미드 또는 숙신이미드 (가수분해된 것 또는 비-가수분해된 것)의 질소 원자의 사이에 2개 이상 내지 6개 이하의 개재 원자가 존재하며, 전자 끄는 기와 말레이미드 또는 숙신이미드 (가수분해된 것 또는 비-가수분해된 것)의 질소 원자의 사이에 5개 이하의 원자, 4개 이하의 원자, 3개 이하의 원자 또는 2개 이하의 개재 원자가 존재한다.

[0635] 일부 측면에서, M^2는 숙신이미드 고리 또는 가수분해된 숙신이미드이며, L_L은 존재한다. 일부 측면에서, M^2는 숙신이미드 고리 또는 가수분해된 숙신이미드이며, L_L은 부재한다. 일부 측면에서, M^2는 말레이미드 고리 또는 가수분해된 말레이미드이며, L_L은 존재한다. 일부 측면에서, M^2는 말레이미드 고리 또는 가수분해된 말레이미드이며, L_L은 부재한다. 일부 측면에서, M^2가 말레이미드 고리 또는 가수분해된 말레이미드인 경우, L_L은 존재하거나 부재하며, M^2가 숙신이미드 고리 또는 가수분해된 숙신이미드인 경우, L_L은 존재한다. 이러한 실시양태들 각각에서, L 및 L_L이 존재하는 경우, L 및 L_L 은 동일한 리간드 단위 또는 상이한 리간드 단위일 수 있다. L 및

L_L이 존재하며 동일한 리간드 단위인 일부 측면에서, 말레이미드 또는 숙신이미드는 리간드 단위의 동일하거나 상이한 폴리펩티드 쇄 상에서 리간드 단위에 접합될 수 있다.

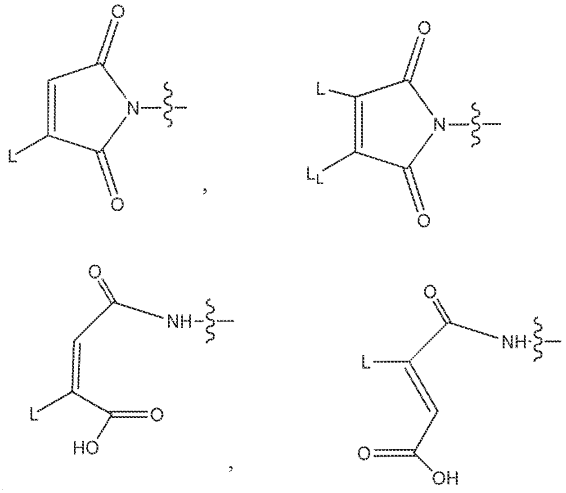
[0636] 이러한 실시양태들 각각에서, 알킬렌 또는 헤테로알킬렌 쇄은 직쇄형 또는 분지형일 수 있다. 일부 측면에서, 알킬렌 또는 헤테로알킬렌 쇄은 직쇄형일 것이다. 다른 측면에서, 그것은 분지형일 것이다.

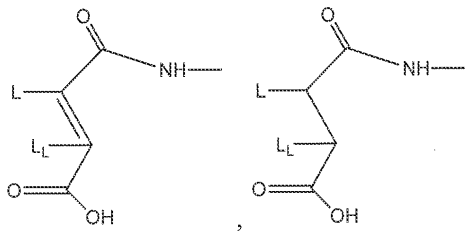
[0637] 이러한 실시양태들 각각에서, p는 1 내지 20, 바람직하게는 1 내지 12, 더욱이는 1 내지 10 또는 1 내지 8의 범위일 수 있다.

[0638] 스캐폴드 자체가 임의의 제2 링커 조립체 또는 D'에 직접 연결되는 일부 측면에서 (예를 들면 q가 0이거나, q가 0이고 r이 0인 선별된 실시양태에서), 스캐폴드는 임의의 제2 링커 조립체 또는 D'에의 부착에 적합한 반응성 부위를 포함하게 된다.

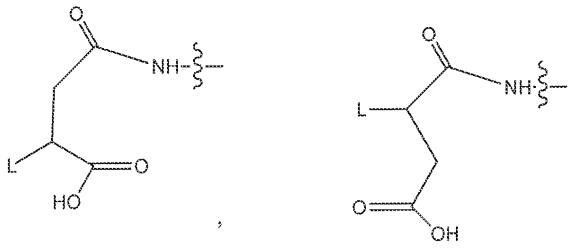
[0639] 스캐폴드 자체가 임의의 제2 링커 조립체 또는 D'에 직접 연결되는 일부 측면에서 (예를 들면 q가 0이거나, q가 0이고 r이 0인 선별된 실시양태에서), 스캐폴드는 A 또는 D'에의 부착에 적합한 반응성 부위를 포함하게 된다.

[0640] 말레이미드 고리는 비-가수분해 및 가수분해 형태 모두에서 하기에 예시한 바와 같이 1개 또는 2개의 티오에테르 연결을 통하여 리간드 단위에 접합될 수 있으며, 숙신이미드 고리는 비-가수분해 및 가수분해 형태 모두에서 하기에 예시한 바와 같이 2개의 티오에테르 연결을 통하여 리간드 단위에 접합될 수 있는데, 여기서 파상선은 링커 접합체 또는 링커-기능성 작용제 접합체의 나머지에 대한 부착 지점을 표시한다:

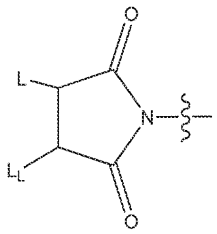
[0641] 



,



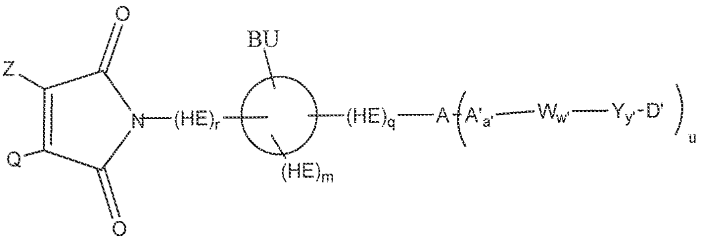
,



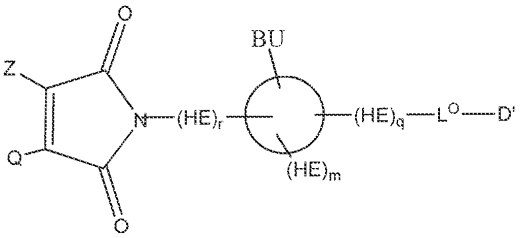
[0642]

[0643] 말레이미드 고리, 가수분해된 말레이미드, 숙신이미드 고리 또는 가수분해된 숙신이미드가 2개의 티오에테르 연결을 통하여 리간드에 접합되는 실시양태에서, p는 통상적으로 1 내지 10, 또는 1 내지 8, 또는 1 내지 4의 범위이며, 말레이미드 또는 숙신이미드는 리간드의 동일하거나 상이한 폴리펩티드 쇄에 접합될 수 있다. 일부 측면에서, 리간드는 항체이다. 다른 측면에서, 리간드는 비-항체 단백질이다.

[0644] 분지형 또는 비-분지형 링커 중 어느 하나를 갖는 기능성 작용제-링커 접합체는 하기 화학식 또는 그의 염 (예컨대 그의 제약상 허용되는 염)으로 나타내어질 수 있다:



[0645]



[0646]

[0647] 상기 식에서,

[0648] D'는 약물 단위, 검출 단위 또는 안정성 단위이고;

[0649] L^0는 임의의 제2 링커 조립체이고;

[0650] Q 및 Z는 수소 또는 할로겐이며, 여기서 Q 및 Z 중 적어도 하나는 할로겐이고;

[0651] BU는 염기성 단위이고;

[0652] HE는 전자 끄는 기를 포함하는 가수분해 인핸서이고;

[0653] 원은, C_{1-8} 알킬렌, C_{1-8} 헤테로알킬렌, C_{6-10} 아릴렌 또는 C_{4-10} 헤테로아릴렌일 수 있으며 임의로 L^0, A, W, Y 또는 D'에의 부착에 적합한 반응성 부위를 포함하는 스캐폴드를 나타내고;

[0654] 아래첨자 m, q 및 r은 각각 0 또는 1이고, m+q+r의 합계는 0, 1 또는 2이며, 단 m+q+r이 0인 경우 스캐폴드는 C_{6-10} 아릴렌 또는 C_{4-10} 헤테로아릴렌이고;

[0655] -W-는 임의의 절단가능 단위이며,

[0656] 아래첨자 w'는 0 또는 1이고;

[0657] -Y-는 임의의 스페이서 단위이며,

[0658] 아래첨자 y'는 0 또는 1이고;

[0659] A는 임의의 스트레쳐 단위이며,

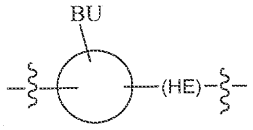
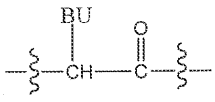
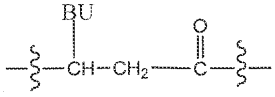
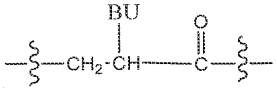
[0660] A'는 A 말단의 임의의 스트레쳐 단위 구성요소이고;

[0661] a'는 0 또는 1이고;

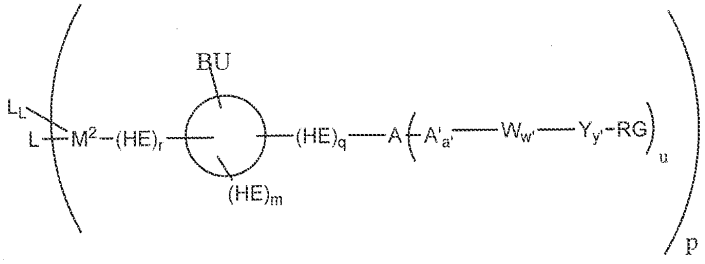
[0662] u는 1 내지 20이며, 단 u가 2 내지 20인 경우 A는 존재하고, u가 1인 경우 A는 존재하거나 부재할 수 있다.

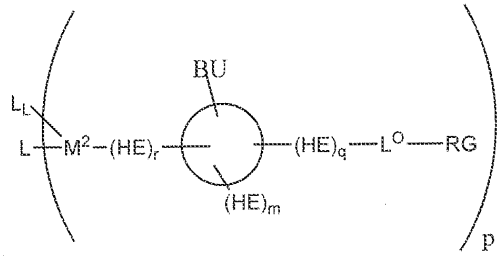
[0663] 일부 측면에서, 상기 할로겐은 브로민이다.

[0664] HE 및 BU, L^0, A, W 및 Y는 약물-링커 접합체에 대하여 제공된 의미를 가진다. 또한, 원, HE, BU, L^0, A, W 및 Y에 대한 구체적으로 언급된 선별된 실시양태들 각각이 이러한 접합체에 동일하게 적용가능하다.

[0665] 일부 측면에서는, m 및 r이 0이며,  가 하기로 나타내어진다:  ,  또는  .

[0666] 분지형 또는 비-분지형 링커 중 어느 하나를 갖는 리간드-링커 접합체는 하기 화학식 또는 그의 염 (예컨대 그의 제약상 허용되는 염)으로 나타내어질 수 있다:

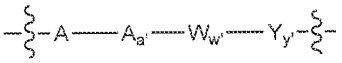
[0667] 

[0668] 

[0669] 상기 식에서,

[0670] L은 리간드 단위이고;

[0671] L_L은 존재하거나 부재할 수 있는 리간드 단위이며, 여기서 L 및 L_L은 동일하거나 상이한 리간드 단위일 수 있고;

[0672] RG는 약물 단위, 검출 단위 또는 안정성 단위를 부착시키는 데에 적합한 L^0 또는  말단의 반응성 기 (반응성 부위 포함)이고;

[0673] L^0는 존재하는 임의의 제2 링커 조립체이고;

[0674] M^2는 티오에테르 연결을 통하여 L 또는 L_L 중 적어도 하나에 접합된 말레이미드 고리, 가수분해된 말레이미드, 숙신이미드 고리 또는 가수분해된 숙신이미드이고;

[0675] BU는 염기성 단위이고;

[0676] HE는 전자 끄는 기를 포함하는 가수분해 인핸서이고;

[0677] 원은, C_{1-8} 알킬렌, C_{1-8} 헤테로알킬렌, C_{6-10} 아릴렌 또는 C_{4-10} 헤테로아릴렌일 수 있으며 임의로 L^0, A, W, Y 또는 FA에의 부착에 적합한 반응성 부위를 포함하는 스캐폴드를 나타내고;

[0678] 아래첨자 m, q 및 r은 각각 0 또는 1이고, m+q+r의 합계는 0, 1 또는 2이며, 단 m+q+r이 0인 경우 스캐폴드는 C_{6-10} 아릴렌 또는 C_{4-10} 헤테로아릴렌이고;

[0679] 아래첨자 p는 1 내지 20의 범위이고;

[0680] W-는 임의의 절단가능 단위이며,

[0681] 아래첨자 w'는 0 또는 1이고;

[0682] -Y-는 임의의 스페이서 단위이며,

[0683] 아래첨자 y'는 0 또는 1이고;

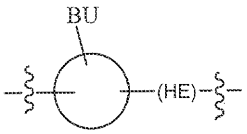
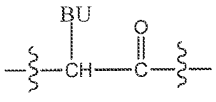
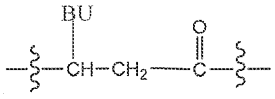
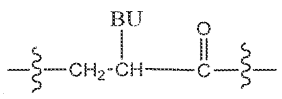
[0684] A는 임의의 스트레쳐 단위이며,

[0685] A'는 A 말단의 임의의 스트레쳐 단위 구성요소이고;

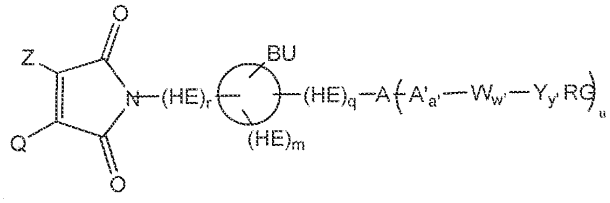
[0686] a'는 0 또는 1이고;

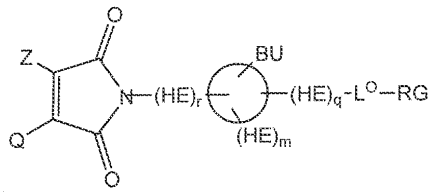
[0687] u는 1 내지 20이며, 단 u가 2 내지 20인 경우 A는 존재하고, u가 1인 경우 A는 존재하거나 부재할 수 있다.

[0688] L, HE 및 BU, L^0, A, W 및 Y는 리간드-약물 접합체에 대하여 제공된 의미를 가진다. 또한, 원, L, HE, BU, L^0, A, W 및 Y에 대한 구체적으로 언급된 선별된 실시양태들 각각이 이러한 접합체에 동일하게 적용가능하다.

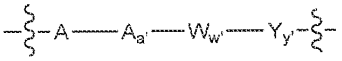
[0689] 일부 측면에서는, r 및 m이 0이며,  가 하기로 나타내어진다:  ,  또는  .

[0690] 분지형 또는 비-분지형 링커는 하기 화학식 또는 그의 염 (예컨대 그의 제약상 허용되는 염)으로 나타내어질 수 있다:

[0691] 

[0692] 

[0693] 상기 식에서,

[0694] RG는 약물 단위, 검출 단위 또는 안정성 단위를 부착시키는 데에 적합한 L^0 또는  말단의 반응성 기 (반응성 부위 포함)이고;

[0695] L^0는 존재하는 임의의 제2 링커 조립체이고;

[0696] Q 및 Z는 수소 또는 할로겐이며, 여기서 Q 및 Z 중 적어도 하나는 할로겐이고;

[0697] BU는 염기성 단위이고;

[0698] HE는 전자 끄는 기를 포함하는 가수분해 인핸서이고;

[0699] 원은, C_{1-8} 알킬렌, C_{1-8} 헤테로알킬렌, C_{6-10} 아릴렌 또는 C_{4-10} 헤테로아릴렌일 수 있으며 임의로 L^0, A, W, Y 또는 RG에의 부착에 적합한 반응성 부위를 포함하는 스캐폴드를 나타내고;

[0700] 아래첨자 m, q 및 r은 각각 0 또는 1이고, m+q+r의 합계는 0, 1 또는 2이며, 단 m+q+r이 0인 경우 스캐폴드는 C_{6-10} 아릴렌 또는 C_{4-10} 헤테로아릴렌이고;

[0701] W-는 임의의 절단가능 단위이며,

[0702] 아래첨자 w'는 0 또는 1이고;

[0703] -Y-는 임의의 스페이서 단위이며,

[0704] 아래첨자 y'는 0 또는 1이고;

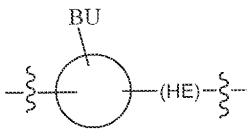
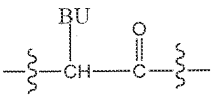
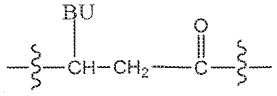
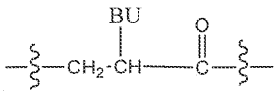
[0705] A는 임의의 스트레쳐 단위이며,

[0706] A'는 A 말단의 임의의 스트레쳐 단위 구성요소이고;

[0707] a'는 0 또는 1이고;

[0708] u는 1 내지 20이며, 단 u가 2 내지 20인 경우 A는 존재하고, u가 1인 경우 A는 존재하거나 부재할 수 있다.

[0709] HE 및 BU, L^0, A, W 및 Y는 리간드-약물 접합체에 대하여 제공된 의미를 가진다. 또한, 원, HE, BU, L^0, A, W 및 Y에 대한 구체적으로 언급된 선별된 실시양태들 각각이 이러한 접합체에 동일하게 적용가능하다.

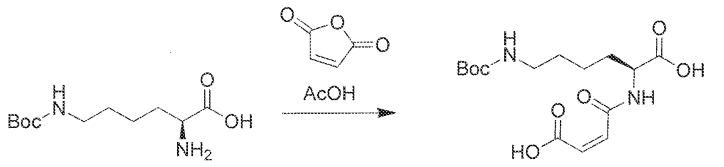
[0710] 일부 측면에서는, r 및 m이 0이며,  가 하기로 나타내어진다:  ,  또는  .

[0711] 모노- 또는 디-티오-치환된 할로말레이미드는 물론 디-티오치환된 숙신이미드의 제조 방법들이 그들을 리간드에 접합시키는 방법인 것으로 업계에 알려져 있는데, 예를 들면 문헌 [Ryan et al., *Chem. Commun.*, 2011, 47, 5452-5454] 및 [Smith et al., *J. Am. Chem. Soc.* 2010, 132(6), 1960-1965]을 참조하라.

[0712] **실시예**

[0713] 실시예 1 - 대표적인 자가-안정화 구성요소의 합성

[0714] **말레일-리신(boc)OH**

[0715] 

화학식: $C_{11}H_{22}N_2O_4$
분자량: 246.30

화학식: $C_{15}H_{24}N_2O_7$
분자량: 344.36

[0716] 50 ml 원형저 플라스크에서, H-Lys(boc)-OH (246 mg, 1 mmol) 및 말레산 무수물 (98 mg, 1 mmol)을 1 ml (4 부피)의 아세트산에 용해시키고, 용액을 실온에서 3시간 동안 교반하였다. 반응 혼합물을 회전증발기(rotovap)에서 오일로 농축하고, ~10 ml의 디클로로메탄을 첨가함으로써 생성물을 침전시켰다. 진공 여과에 의해 침전물을 수집한 후, 디클로로메탄으로 세척하고, 진공 오븐에서 밤새 건조하였다. 270 mg의 생성물을 백색의 분말로서 회수하였다 (85% 수율).

[0717] **말레오일-리신(boc)-OH**

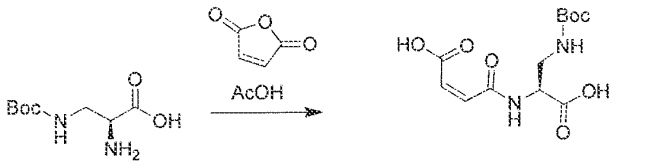
[0718] 

화학식: $C_{15}H_{24}N_2O_7$
분자량: 344.36

화학식: $C_{15}H_{22}N_2O_6$
분자량: 326.34

[0719] 응축기가 장착된 50 ml 원형저 플라스크 중 분자 체 상에서, 말레일-Lys(boc)-OH (100 mg, 0.29 mmol)를 톨루엔 (3 ml) 및 트리에틸아민 (224 μL)에 현탁시켰다. 용해도를 향상시키기 위하여, DMA (~150 μL)를 첨가하였다. 용액을 125℃로 가열하고, 4시간 동안 환류시키자, LCMS에 의해 반응이 완료된 것으로 나타났다. 반응 혼합물을 회전증발기에서 농축하여 건조한 후, DMSO에 재용해시키고, 정제용 HPLC에 의해 정제하였다. 56 mg의 생성물을 백색의 고체로서 단리하였다 (60% 수율).

[0720] **말레일-DPR(boc)OH**

[0721] 

화학식: $C_8H_{16}N_2O_4$
분자량: 204.22

화학식: $C_{12}H_{18}N_2O_7$
분자량: 302.28

[0722] 말레일-리신(boc)OH와 동일한 방식으로 말레일-DPR(boc)-OH를 제조하였다 (503 mg, 67%).

[0723] **말레오일-DPR(boc)OH**



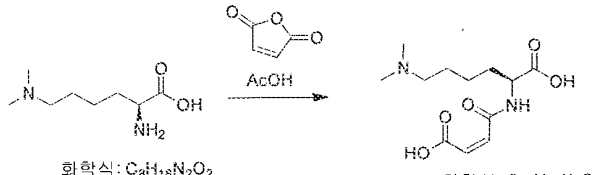
화학식: $C_{12}H_{18}N_2O_7$
분자량: 302.28

화학식: $C_{12}H_{16}N_2O_6$
분자량: 284.27

[0724]

[0725] 말레오일-Lys(boc)와 동일한 방식으로 말레오일-DPR(boc)-OH를 제조하였다 (340 mg, 71%).

[0726] **말레일-디메틸리신**



화학식: $C_8H_{18}N_2O_2$
분자량: 174.24

화학식: $C_{12}H_{20}N_2O_5$
분자량: 272.30

[0727]

[0728] 디클로로메탄의 첨가 후 생성물을 침전시키지 않았다는 것 이외에는 말레일-lys(boc)-OH와 동일한 방식으로 말레일-디메틸리신을 제조하였다. 대신, 1:1 디클로로메탄/헥산을 사용하여 백색의 발포물이 수득될 때까지 오일을 공동-증발시키고, 고진공하에서 밤새 건조하였다 (109 mg, 99%).

[0729] **말레오일-디메틸리신**



화학식: $C_{12}H_{20}N_2O_5$
분자량: 272.30

화학식: $C_{12}H_{18}N_2O_4$
분자량: 254.28

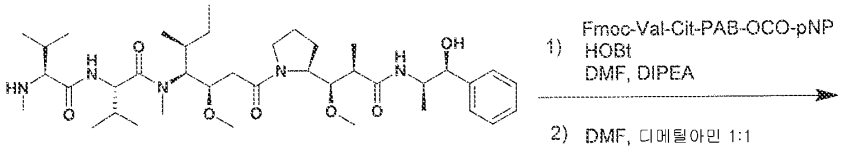
[0730]

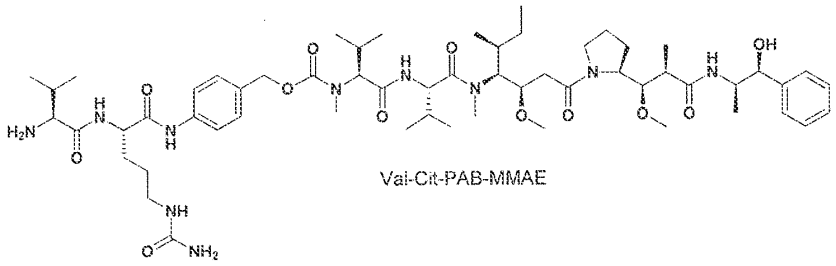
[0731] 10 ml 원형저 플라스크에서, 말레일-디메틸리신 (100 mg)을 아세트산 (1 ml)에 용해시키고, 4시간 동안 환류시켰다. 4시간 후, 반응 혼합물을 회전증발기에서 농축하여 건조하고, 고진공하에서 백색의 발포물로 건조하였다. 조 물질의 NMR은 6.9 ppm에서의 단일선 및 개시 물질로부터의 올레핀계 양성자의 비를 기준으로 ~80%의 전환율을 나타낸다.

[0732] 실시예 2 - mDPR-Val-Cit-PAB-MMAE의 합성

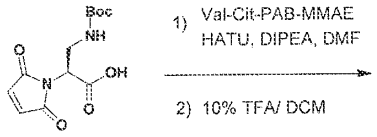
[0733] 표준 펩티드 커플링 방법을 사용하여 Boc-보호된 mDPR을 Val-Cit-PAB-MMAE에 커플링시킴으로써, mDPR-Val-Cit-PAB-MMAE를 제조하였다. Boc 기는 최종 단계에서 제거하였다.

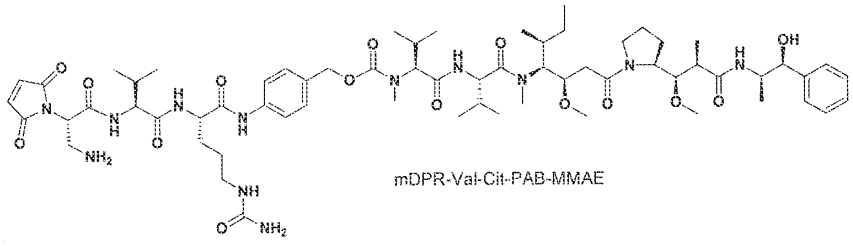
[0734] 반응식:





[0735]





[0736]

[0737] *Fmoc-Val-Cit-PAB-MMAE의 제조*

[0738] MMAE (5.34 g, 6.94 mmol), Fmoc-Val-Cit-PAB-OCO-pNP (5.0 g, 6.94 mmol) 및 HOBt (1.4 mmol)를 N_2로 퍼징되는 250 ml 원형저 플라스크에 충전하고, 15 ml의 DMA에 용해시켰다. 다음에, DIPEA (2.44 ml, 14 mmol)를 첨가하고, 용액을 불활성 분위기하에 실온에서 밤새 교반하였다. 40분에 걸쳐 30% MeCN (0.05% TFA) 내지 100% MeCN (0.05% TFA)의 선형 구배를 사용하는 정제용 HPLC에 의해, 생성물을 단리하였다. 생성물을 함유하는 분획을 회전증발기에서 백색의 분말로 농축함으로써, 3.2 g (34%)을 산출하였다.

[0739] *Val-Cit-PAB-MMAE의 제조*

[0740] DMF 7 ml 및 디에틸아민 7 ml 중 Fmoc-Val-Cit-PAB-MMAE 3.2 g의 용액을 실온에서 3시간 동안 교반하였다. 다음에, 반응 혼합물을 회전증발기에서 진한 오일로 농축하였다. 생성물을 디에틸 에테르 (100 ml) 중에서 침전시키고 여과함으로써, 오프 화이트색상의 분말로서 2.0 g의 생성물을 산출한 후, 추가적인 정제 없이 사용하였다.

[0741] *mDPR(boc)Val-Cit-PAB-MMAE의 제조*

[0742] 50 ml 원형저 플라스크에서, mDPR(boc)-OH (25 mg, 0.089 mmol), Val-Cit-PAB-MMAE (100 mg, 0.089 mmol) 및 HATU (41 mg, 0.107 mmol)를 2 ml DMF에 용해시켰다. DIPEA (34 μL)를 첨가하고, 용액을 실온에서 1시간 동안 교반하였다. 반응 혼합물을 1 ml의 DMSO로 희석한 후, 정제용 HPLC에 의해 생성물을 단리하였다 (70 mg, 56%).

[0743] *mDPR-Val-Cit-PAB-MMAE의 제조*

[0744] 상기 물질을 2 ml의 10% TFA/디클로로메탄에 용해시키고, 실온에서 1시간 동안 교반하였다. 반응 혼합물을 농축하여 건조한 후, 1 ml DMSO 중에 재구성시키고, 정제용 HPLC에 의해 정제하였다 (56 mg, 86%).

[0745] 실시예 3 - 티오숙신이미드 가수분해의 모니터링

[0746] 접합체에 대한 물의 첨가가 관찰가능한 접합체 분자량의 18 달톤 증가를 초래하기 때문에, 자가-안정화 생체적합체의 티오숙신이미드 가수분해는 전기분무 질량 분광측정법에 의해 모니터링될 수 있다. 인간 IgG1 항체의 쇄간 디술피드를 완전히 환원시키고 생성되는 시스테인들에 말레이미드를 접합시킴으로써 접합체가 제조될 때, 항체의 각 경쇄는 단일 말레이미드 변형을 포함하게 되며, 각 중쇄는 3개의 말레이미드 변형을 포함하게 된다 (도 1 상부 참조). 따라서, 생성되는 티오숙신이미드의 완전한 가수분해시, 경쇄의 질량은 18달톤 증가하게 되는 반면, 중쇄의 질량은 54 달톤 증가하게 된다. 이는 완전히 환원된 항-CD30 항체 cAC10에 대한 본 발명 자가-안정화 말레이미드 약물-링커 (mDPR-Val-Cit-PAB-MMAE, 분자량 1289 Da)의 접합 및 이후의 가수분해로써 도 1 (하부)에 도시되어 있다. 중쇄 상의 단일 N-연결 글리코실화 부위의 존재가 비접합 항체에서 관찰되는 질량의 비균질성을 초래한다.

[0747] 실시예 4 - t1/2 가수분해의 모니터링

[0748] 시간 경과에 따라 자가-안정화 생체접합체 (mDPR-Val-Cit-PAB-MMAE)의 질량 스펙트럼에서의 비-가수분해 및 가수분해 피크의 강도를 모니터링하는 것에 의해, 가수분해 반응속도가 평가될 수 있다. 이는 시간에 대하여 각 시점에 가수분해된 총 개체수의%를 플롯팅함으로써 수행된다 (도 2, 상부). 다음에, 이러한 데이터는 하기 지수 방정식에 핏팅되며:

[0749] $$Y = Y_{max} \times \left(1 - e^{(-Kt)}\right),$$

[0750] 여기서 Y는 시점 t에서의 관찰된 % 가수분해이고, Ymax는 점근 최대 % 가수분해이며, K는 가수분해 속도 상수이다. 가수분해 반응의 반감기는 하기로 정의된다:

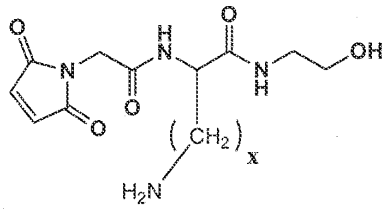
[0751] $$t_{1/2} = {\ln(2)}/{K}$$

[0752] 이와 같은 절차가 환원된 hIgG1 항체의 경쇄에서 수행되는 경우, 경쇄 당 1개의 접합 부위만이 존재하며 반응이 18 달톤의 질량 변화를 동반한 비가수분해 종으로부터 가수분해된 종으로의 단순 진행이기 때문에, 분석이 상당히 간단하다. 중쇄에서 이와 같은 분석을 수행하는 것은 총 3개의 접합 부위가 존재함으로써 접합체가 가수분해에 적용될 때 +18, +36 및 +54 달톤인 일련의 피크들을 산출한다는 사실에 의해 복잡해진다. 중쇄의 분석은 다중 글리코형(glycoform)의 존재로 인하여 더 복잡해진다. 도 2에 나타낸 분석은 가장 풍부한 글리코형으로부터 발생하는 피크만을 평가하고 (54195 Da으로부터 54250 Da으로의 전이), 이러한 피크를 전체 중쇄 글리코형 군집의 합리적인 대리물인 것으로 가정함으로써 수행하였다. 도 2에 드러나 있는 바와 같이, 경쇄 및 중쇄에 대하여 관찰되는 반응속도 프로파일은 매우 유사하다. 이러한 이유로, 그리고 상기에서 언급된 중쇄 상에서의 가수분해 속도 정량의 가중되는 복잡성으로 인하여, 항체에 접합된 자가-안정화 말레이미드의 가수분해 속도를 특성화하는 대부분의 데이터는 경쇄 가수분해의 평가로부터 측정하였다.

[0753] 이와 같은 방법론의 한 가지 한계는 전기분무 이온화 과정이 관찰되는 피크에서 적은 비율의 나트륨 첨가생성물을 산출하는 경향이 있다는 것으로써 (도 2의 데이터를 생성시키는 데에 사용된 조건하에서는 대략 10%), 그것은 모 질량에 비해 22 달톤 더 큰 관찰 질량을 가진다. 많은 질량 분광측정기들이 25,000 달톤을 초과하는 총 분자 질량을 갖는 단백질에서의 가수분해로부터 발생하는 +18의 질량으로부터 이와 같은 +22의 질량을 해상하기에 충분하게 높은 해상도를 가지고 있지 못하다. 따라서, 가수분해도가 낮을 때의 이른 시점에서, 대략 +20 달톤에서의 피크의 출현은 실험적으로 용이하게 분리될 수 없는 이러한 2가지 효과의 조합이다. 결과적으로, 조기 시점에서의 가수분해 생성물의% 추정은 과추정일 가능성이 있으나, 이와 같은 효과의 크기는 반응이 완료로 진행되면서 감소한다.

[0754] 실시예 5 - 자가-안정화 링커 조립체의 말레이미드와 염기성 기 사이의 간격 평가

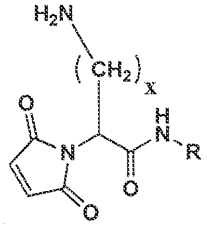
[0755] 말레이미드에 인접한 염기성 아미노 기의 존재가 그 말레이미드를 사용하여 제조된 티오숙신이미드의 가수분해를 촉진함으로써 안정한 생체접합체를 초래하게 된다는 가설을 세웠다. 말레이미드와 염기성 아미노 기 사이의 거리는 그와 같은 자가-안정화 단위의 설계에 있어서 중요한 파라미터로 생각되었다. 이와 같은 간격의 역할을 평가하기 위하여, 하기의 일반적인 구조를 사용하여 일련의 말레이미드들을 제조하였다:



[0756]

[0757] 상기 식에서, x는 1 내지 4로 가변적이다. 다음에, 이러한 말레이미드를 pH 8 및 37℃에서 완전히 환원된 인간 IgG1에 접합시키고, 가수분해 속도를 측정하기 위하여 즉시 전기분무 질량 분광측정법에 의해 모니터링하였다. 염기성 기와 말레이미드 사이의 거리는 가수분해 속도에 반비례하는데 -- 다시 말하자면, 거리가 더 멀수록 가수분해는 더 느리다. 이와 같은 결과는 염기성 아미노 기를 말레이미드에 가깝게 위치지정하는 것이 말레이미드를 사용하여 제조되는 생체접합체의 숙신이미드 고리 가수분해 속도 증가를 초래한다는 것을 예시한다. 그러나, 본원에서 시험된 가장 짧은 간격 (x=1)을 사용하더라도, 완전한 가수분해를 달성하기 위해서는 항체 접합체가 pH 8 및 37℃에서 대략 5시간 동안 유지되어야 하였다 (약 5의 반감기). 장기간 동안의 그와 같은 조건에의 항체 또는 다른 단백질의 노출은 잠재적으로 공유 변형 및 잘못접힘(misfolding) 사례를 초래할 수 있으므로, 더욱 더 빠른 가수분해 속도를 갖는 말레이미드를 탐색하였다.

[0758] 더 빠른 가수분해 속도를 갖는 생체접합체를 제조하기 위하여, 하기의 일반적인 구조를 사용하여 일련의 말레이미드들을 제조하였다:



[0759]

[0760] 상기 식에서 x = 1 내지 4이며, R = val-cit-PAB-MMAE이다. 다음에, 이러한 말레이미드를 pH 8 및 37℃에서 완전히 환원된 인간 IgG1에 접합시키고, 가수분해 속도를 측정하기 위하여 즉시 전기분무 질량 분광측정법에 의해 모니터링하였다. 도 4 (상부)에 나타낸 바와 같이, 이와 같은 일련의 구조적으로 관련되어 있는 화합물들 사이에서, 염기성 기와 말레이미드 사이의 거리는 가수분해 반응의 진행에 깊은 영향을 발휘한다. 선행 실시예에서와 마찬가지로, 말레이미드와 염기성 아민 사이의 거리가 더 짧을수록, 가수분해는 더 빠르다. 염기성 조건 (즉 높은 pH)이 말레이미드 및 숙신이미드 고리 가수분해의 속도를 증가시키는 것으로 알려져 있기 때문에, 이와 같은 효과는 일반적인 염기 기작에 의한 분자내 촉매의 예일 가능성이 있다. 이와 같은 군에서, x=2 및 x=3인 화합물들은 3시간 인큐베이션 동안 완전한 가수분해를 달성하지 못하였으며, 대신 각각 대략 80% 및 50%에서 (플롯은 최대로 달성되는 가수분해에 대하여 표준화됨) 점근선에 도달하였다. 이와 같은 현상은 숙신이미드 고리 상에서의 1급 아민의 직접 친핵성 공격과 같은 경쟁 반응으로부터 발생할 수 있거나, 또는 2상 가수분해 반응속도로 이어지는 말레이미드의 이성질체성 불순물로 인한 것일 수 있다.

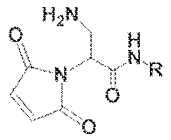
[0761] 실시예 6 - 가수분해 반응속도

[0762] 이전의 실시예는 모 분자의 염기성 기와 말레이미드 사이의 거리에 따라 생체접합체에서 염기성 기가 숙신이미드 고리 가수분해 속도에 대하여 가질 수 있는 영향력을 예시하고 있다. 그러나, 전자 끄는 또는 -공여 기의 존재는 고리 가수분해의 속도에도 영향을 주게 될 것으로 예상되는데, 이들 기가 고리의 카르보닐 탄소에서의 전자 밀도 (및 그에 따른 친전자성)에 영향을 줄 것이기 때문이다. 실시예 5의 접합체에서, 카르복스아미드 기는 고리의 질소 대비 알파 위치에 존재한다 (즉 고리의 질소와 카르복스아미드의 카르보닐 탄소 사이에 하나의 탄소 원자가 존재함). 카르복스아미드는 약한 전자 끄는 기이기 때문에, 그의 존재는 관찰되는 가수분해 속도에 영향을 줄 가능성이 있다. 관찰되는 가수분해 속도에 대한 염기성 아미노 기 및 전자 끄는 카르복스아미드 기의 상대적인 기여에 대해 더 잘 이해하기 위하여, 일련의 말레이미드들을 pH 7.4, 22℃에서 환원된 인간 IgG1 항체에 접합시키고, 질량 분광측정법에 의해 가수분해 속도를 측정하였다 (도 5). 이들 말레이미드는 알파 위치에 카르복스아미드만을 (삼각형), 베타 위치에 1급 아민만을 (역삼각형), 또는 카르복스아미드와 1급 아민 모두를 (원) 포함하였다. 말레이미드 부근에 어떠한 기도 포함하지 않는 대조 말레이미드도 평가하였지만, 그의 가수분해는 너무 느려서 이러한 조건하에서는 반응이 관찰되지 않았으므로, 데이터를 플롯팅하지 않았다. 이러

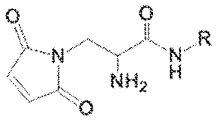
한 조건하에서, 염기 및 전자 끄는 기 모두를 포함하는 자가-안정화 말레이미드는 겨우 12분의 가수분해 $t_{1/2}$을 갖는 생체접합체를 생성시킨 반면, 아민만을 포함하는 말레이미드는 2.5시간의 $t_{1/2}$을 산출하였으며, 카르복스아미드만을 포함하는 말레이미드는 24시간의 $t_{1/2}$을 산출하였다. 이와 같은 결과는 염기성 기와 전자 끄는 기가 동시에 작용하여 바람직한 온건 조건하에서의 생체접합체의 제조에 가장 적합한 매우 빠른 가수분해 반응속도를 갖는 접합체를 산출한다는 것을 표시한다. 디아미노프로피오닐 말레이미드를 사용하여 제조된 접합체 (원)가 매우 온건한 조건하에서의 15분 미만의 $t_{1/2}$, 및 약 2시간 이내의 100% 완료에 근접하는 반응으로써, 이상적인 가수분해 특성을 나타낸다.

[0763] 실시예 7 - 자가-안정화 링커 조립체의 말레이미드와 카르복스아미드 기 사이의 간격 평가

[0764] 상기 실시예 5 및 6에서 나타낸 자가-안정화 디아미노프로피오닐 말레이미도 약물-링커 산 (DPR)을 사용하여 제조되는 접합체에서 관찰되는 빠르고 완전한 숙신이미드 가수분해는 설계에 있어서의 염기성 기 및 전자 끄는 기 모두의 중요성을 표시한다. 생성되는 접합체의 가수분해 거동에 대한 이러한 2종 구성요소의 역할을 추가로 평가하기 위하여, 디아미노프로피온산을 사용하여 제2의 이성질체 말레이미도 약물-링커를 제조하였다. 구조는 α-말레이미도 DPR 및 β-말레이미도 DPR로 지칭되는데, 하기에 나타내었다:



α-말레이미도 DPR



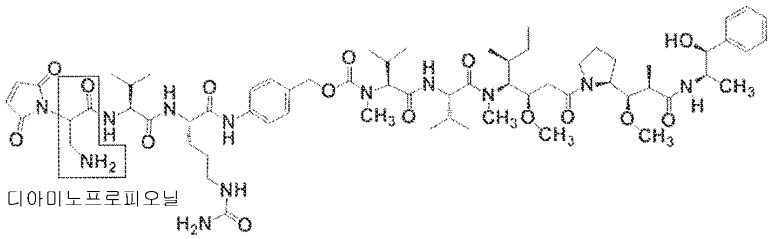
β-말레이미도 DPR

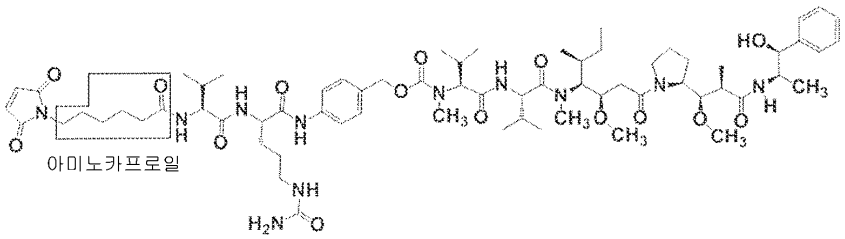
[0765] R = val-cit-PAB-MMAE

[0766] 양 DPR 말레이미드는 2개의 탄소 원자에 의해 말레이미도 질소로부터 분리된 염기성 1급 아민을 보유하고 있다. 양자는 전자 끄는 카르복스아미드 기도 보유하고 있으나, 카르복스아미드의 말레이미도 질소로부터의 거리가 1 내지 2개 탄소 단위 (각각 α 및 β)로 가변적이다. 마지막으로, 염기성 아민과 카르복스아미드 사이의 분리 역시 1 내지 2개 탄소 단위 (각각 β 및 α)로 가변적이다. 전체적으로, 이는 β-DPR에서 카르복스아미드가 말레이미드 고리에 대해서는 더 작은 전자 끄는 영향력을 발휘하나, 1급 아민에 대해서는 α-DPR에 비해 더 큰 전자 끄는 영향력을 발휘한다는 것을 의미한다. 이는 말레이미드의 친전자성 및 1급 아민의 염기성 모두를 감소시킴으로써, 가수분해의 속도를 느리게 할 것으로 예상된다. 이들 말레이미도 약물-링커를 환원된 항체에 접합시키고 숙신이미드 가수분해에 대하여 모니터링하였을 때, α-DPR에서에 비해 β-DPR에서 17-배 더 낮은 가수분해 속도가 관찰되었다 (도 6). 이와 같은 예는 염기성 기와 전자 끄는 기의 상대적 위치지정이 어떻게 가수분해 속도를 '조정'하는 데에 사용될 수 있는지를 예시하고 있다.

[0767] 실시예 8-15

[0768] 자가-안정화 약물-링커를 사용하여 제조된 ADC의 안정성 및 약학적 활성을 평가하기 위하여, 자가-안정화 말레이미도-약물-링커를 제조하였다. 이와 같은 약물-링커는 프로테아제-절단가능 val-cit PAB 자가-파괴형 기를 통하여 세포독성 작용제 MMAE에 커플링된 말레이미도-DPR 기 (본원에서는 말레이미도-DPR-val-cit-PAB-MMAE로 지칭됨)를 포함한다. 비교에는, 비자가-안정화 약물-링커 (본원에서는 말레이미도-카프로일-val-cit-PAB-MMAE로 지칭됨)를 사용하였다. 이러한 작용제들 사이의 유일한 차이는 말레이미드와 val-cit 링커 발린 기 사이의 단위이다. 이러한 약물-링커들의 말레이미드 단위는 말레산 무수물, 그리고 단일-보호된 각각 디아미노프로피온산 및 아미노카프로산을 사용하여 제조될 수 있다.





[0769]

[0770] 실시예 8 - 완충제 중에서의 리간드-약물 접합체의 안정성 평가

[0771] 표준 완충제 시스템 중에서, 티올-말레이미드 화학을 사용하여 제조된 생체접합체로부터의 말레이미드 제거는 본질적으로 검출불가능한데, 제거된 말레이미드가 빠르게 다시 티올과 반응함으로써 무손상 접합체 측으로 훨씬 더 치우쳐 있는 평형을 초래하기 때문이다. 그러나, 완충제에 대한 티올 포집제의 첨가는 생체접합체로부터 제거되는 말레이미드가 대신 포집제와 반응함으로써 지속되는 관찰가능한 단백질로부터의 말레이미드의 상실을 초래할 수 있는 시스템을 창출한다. 비-안정화 카프로일 약물-링커와 함께 자가-안정화 디아미노프로피오닐(DPR) 말레이미도 약물-링커를 사용하여 제조된 항체-약물 접합체들을 사용하여, 그와 같은 시스템을 사용하는 실험을 수행하였다. ADC는 완전히 환원된 인간화 IgG1을 사용하여, 말레이미도-DPR-val-cit-PAB-MMAE 또는 말레이미도-카프로일-val-cit-PAB-MMAE 중 어느 하나의 항체 당 8개 약물로 제조하였다. 약물 로딩은 이전에 기술된 바와 같은 중합체 PLRP-S 컬럼상 역상 HPLC (문헌 [Sun 2005])에 의해 확인하였다. 전기분무 질량 분광측정법에 의해, 자가-안정화 링커의 완전한 숙신이미드 가수분해도 확인하였다. 이러한 ADC들을 포집제로서 10 mM N-아세틸시스테인을 함유하는 150 mM 트리스(Tris) 완충제 pH 8 중에 2.5 mg/mL로 위치시키고, 37℃에서 2주 동안 인큐베이션하였다. 인큐베이션 동안의 7개 시점에, 각 ADC의 분취량을 제거하여 -80℃로 냉동시켰다. 시간-경과 완료시, 약물:항체 비를 측정하기 위하여, 상기한 역상 HPLC법에 의해 모든 샘플을 분석하였다. 이와 같은 연구의 결과를 도 7에 나타내었다. 자가-안정화 DPR 말레이미도 약물-링커를 사용하여 제조된 ADC는 이와 같은 시간경과에 걸쳐 최소한의 약물 상실을 나타낸 반면 (14일 동안 항체 당 8.0개의 약물에서 7.9개의 약물로), 카프로일 말레이미도 약물-링커를 사용하여 제조된 ADC는 이러한 조건하에서 그의 약물 로딩량의 대략 절반을 상실하였다 (14일 동안 항체 당 8.0개의 약물에서 3.9개의 약물로).

[0772] 실시예 9 - 생체외 혈장 안정성 (역상법)

[0773] 실시예 8에서 기술된 역상 HPLC법에 의한 비-인간 혈장 샘플에서의 인간화된 ADC의 약물 로딩량 평가는 먼저 인간 Fc도메인에 선택적으로 결합하는 Ig셀렉트(IgSelect) 수지 (GE 헬스케어(Healthcare) 사)를 사용하여 ADC를 단리하는 것에 의해 달성될 수 있다. 완전히 환원된 인간 IgG1을 사용하여, 말레이미도-DPR-val-cit-PAB-MMAE 또는 말레이미도-카프로일-val-cit-PAB-MMAE 중 어느 하나의 항체 당 8개 약물로 ADC를 제조하였다. 이러한 ADC (0.25 mg/mL)를 멸균 래트 혈장 중에서 37℃로 7일 동안 인큐베이션하였다. 인큐베이션 동안의 7개 시점에, 각 ADC의 50 μL 분취량을 제거하여 -80℃로 냉동시켰다. 시간경과 완료시, 각 샘플로부터 ADC를 정제하고, 약물:항체 비를 측정하기 위하여 역상 HPLC에 의해 분석하였다. 이와 같은 연구의 결과를 도 8에 플롯팅하였다. 완충제에서 관찰되었던 바와 마찬가지로, 래트 혈장에서의 자가-안정화 말레이미드를 사용하여 제조된 ADC의 인큐베이션 역시 말레이미도-카프로일 ADC 유래 약물의 대략 절반 상실을 초래하는 조건하에서 관찰가능한 약물 상실을 적게 초래하거나, 초래하지 않는다.

[0774] 실시예 10 - 생체외 혈장 안정성 (접합된 약물법)

[0775] 두 번째 검정 포맷을 이용하여 체외에서 래트 및 인간 혈장에서의 ADC 안정성을 평가하였다. 항체당 4개 티올 수준까지 부분적으로 환원된 인간 IgG1을 사용하여 (항체 당 4개의 약물을 갖는 ADC로 이어짐), 말레이미도-DPR-val-cit-PAB-MMAE 또는 말레이미도-카프로일-val-cit-PAB-MMAE 중 어느 하나의 항체 당 4개 약물로 ADC를 제조하였다. 이러한 2종의 ADC를 래트 및 인간 혈장에 첨가하고, 37℃로 7일 동안 인큐베이션하였다. 이와 같

은 인큐베이션 동안의 7개 시점에, 시간경과의 종료시까지 분취량을 제거하여 -80℃로 냉동시켰다. 다음에, 각 샘플로부터 ADC를 단리하고, 이전에 기술된 바와 같이 (문헌 [Sanderson 2005]), 단리된 ADC로부터 단백질분해에 의해 MMAE를 방출시켰다. 다음에, LC-MS/MS에 의해 방출된 MMAE를 정량하고, 각 ADC의 개시 값에 대하여 표준화하였다 (도 9). 래트 및 인간 혈장 모두에서, 자가-안정화 말레이미드를 사용하여 제조된 ADC는 이러한 조건하에서 약물을 적게 상실하거나 상실하지 않은 반면, 말레이미도-카프로일 ADC에서는 대략 약물의 절반이 상실되었다.

[0776] 실시예 11 - 생체내 안정성

[0777] 상기 실시예 10에서 기술된 바와 같이, Ig셀렉트 수지를 사용한 정제에 이어지는 역상 HPLC 분석에 의해 래트 혈장에서 ADC에 대하여 약물:항체 비가 측정될 수 있다. 이와 같은 방법을 래트에서의 생체내 약동학 실험으로부터 유래하는 샘플에 적용하였다. 항체당 평균 4개 티올까지 부분적으로 환원된 인간화 IgG1을 사용하여 (4의 약물:항체 비로 이어짐), 말레이미도-DPR-val-cit-PAB-MMAE 또는 말레이미도-카프로일-val-cit-PAB-MMAE 중 어느 하나의 항체 당 4개 약물로 ADC를 제조하였다. 이러한 ADC를 이전에 기술된 바와 같이 (문헌 [Sanderson 2005]) 소수성 상호작용 크로마토그래피에 의해 추가로 정제함으로써, 항체 당 4개 약물을 포함하는 종을 단리하였다. 이러한 ADC를 스프래그-도울리(Sprague-Dawley) 래트에 10 mg/kg으로 정맥내 투여하였다. 5개 시점에서, 각 투여군에 속하는 3마리의 동물을 희생시키고, 수집된 혈액을 혈장에 처리한 후, -80℃로 냉동시켰다. 연구 완료시, 샘플 부피를 변화시킨 것 이외에는 상기한 Ig셀렉트 수지법에 의해, 모든 샘플을 처리하였다. 이와 같은 연구에서의 각 시점의 약물:항체 비를 도 10에 플롯팅하였다. 생체외 래트 혈장에서 관찰되었던 것과 마찬가지로, 자가-안정화 말레이미드를 사용하여 제조된 ADC는 항체 당 4.1개 약물의 개시 값으로부터 7일 후 항체 당 3.6개 약물의 값으로 떨어짐으로써 (12% 감소), 최소한의 생체 내 약물 상실을 나타낸다. 이와 같은 동일한 시간경과 동안, 말레이미도-카프로일 링커를 사용하여 제조된 ADC의 약물:항체 비는 3.9의 개시 값으로부터 1.5의 값으로 떨어졌다 (61% 감소). 이는 생체외에서 관찰되는 자가-안정화 약물 링커의 증가된 안정성이 생체내 환경에 반영된다는 것을 예시한다.

[0778] 실시예 12 - 약동학

[0779] 말레이미도-카프로일 ADC는 말레이미드 제거를 통한 약물 상실의 경향이 있는 반면, 자가-안정화 말레이미드 ADC는 그렇지 않기 때문에, 2종 ADC의 등가 투여 후 항체-접합된 약물에의 노출이 더 클 것으로 예상하는 것은 합리적이다. 이와 같은 예상을 확인하기 위하여, 항체당 평균 4개 티올까지 부분적으로 환원된 인간 IgG1을 사용하여 (4의 약물:항체 비로 이어짐), 말레이미도-DPR-val-cit-PAB-MMAE 또는 말레이미도-카프로일-val-cit-PAB-MMAE 중 어느 하나의 항체 당 4개 약물로 ADC를 제조하였다. 이러한 2종의 ADC를 스프래그-도울리 래트에 2 mg/kg으로 투여하고, 7개 시점에 혈액 샘플을 수집하여, 혈장에 처리하였다. 보정 곡선의 준비를 위한 각 ADC의 표준과 함께, 이들 혈장 샘플을 상기 실시예 10에서 기술된 mAb 선별 수지 포획 및 파페인 방출 절차에 적용함으로써, 항체-접합된 MMAE의 농도를 측정하였다. 항체-접합된 약물 농도는 자가-안정화 약물-링커를 사용하여 제조된 ADC에서 더 높았는데, 시간에 따라 차이의 크기가 증가하였다 (데이터는 나타내지 않음). 최초 항체-접합 약물 농도는 중첩성인데, ADC의 투여량 및 약물:항체 비의 등가성을 반영한다. 그러나, 1일차 이내에 차이가 관찰되며, 3일까지 2-배 차이에 도달한다. 이러한 더 높은 농도는 말레이미드-카프로일 ADC에 비해 자가-안정화 ADC에서 대략 40% 더 큰 항체-접합 약물 AUC를 초래하였다.

[0780] 실시예 13 - 독성학

[0781] 독성학에서의 자가-안정화 말레이미드의 영향을 평가하기 위하여, 항체당 평균 4개 티올까지 부분적으로 환원된 (4의 평균 약물:항체 비로 이어짐) 인간화 IgG1 (어떠한 래트 항원에 대해서도 결합이 알려져 있지 않음)을 사용하여, 말레이미도-DPR-val-cit-PAB-MMAE 또는 말레이미도-카프로일-val-cit-PAB-MMAE 중 어느 하나의 항체 당 4개 약물로 ADC를 제조하였다. 이들 ADC를 10 mg/kg으로 암컷 CD®IGS 래트 (찰스 리버 래보래토리즈(Charles River Laboratories) 사)에 정맥내 투여하였다 (시험 항목 당 6 마리의 래트 더하기 비히클만을 투여받는 6마리의 래트). 투여 전 및 3개 투여-후 시점에, 혈액학, 및 독성 바이오마커에 대한 혈청 화학 분석용으로 혈액 샘플을 수집하였다. 말레이미도-카프로일 ADC에서에 비해 자가-안정화 접합체에서 MMAE ADC에 의해 유도되는 호중구감소증이 덜 중증인 것으로 보였다 (데이터는 나타내지 않음).

[0782] 실시예 14 - 방출된 약물의 혈장 농도

[0783] 상기 실시예 13에서 기술된 독성학 실험은 투여 1시간 및 24시간 후의 혈액 채취물도 포함하였는데, 그것을 투여 4일 및 7일 후 샘플과 함께 LC-MS/MS에 의해 혈장에서 비접합 MMAE에 대하여 분석하였다. 이와 같은 분석의

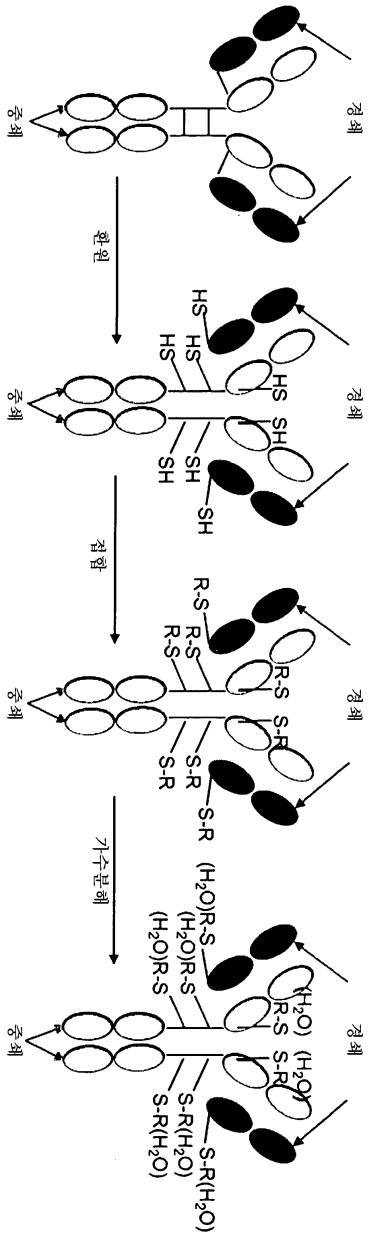
결과는 순환성 MMAE의 최대 농도가 말레이미도-카프로일-val-cit-PAB-MMAE에 비해 자가-안정화 말레이미도-DPR-val-cit-PAB-MMAE ADC에서 약 2-배 더 낮음을 표시하였다 (데이터는 나타내지 않음).

[0784] 실시예 15 - 이종이식편 활성

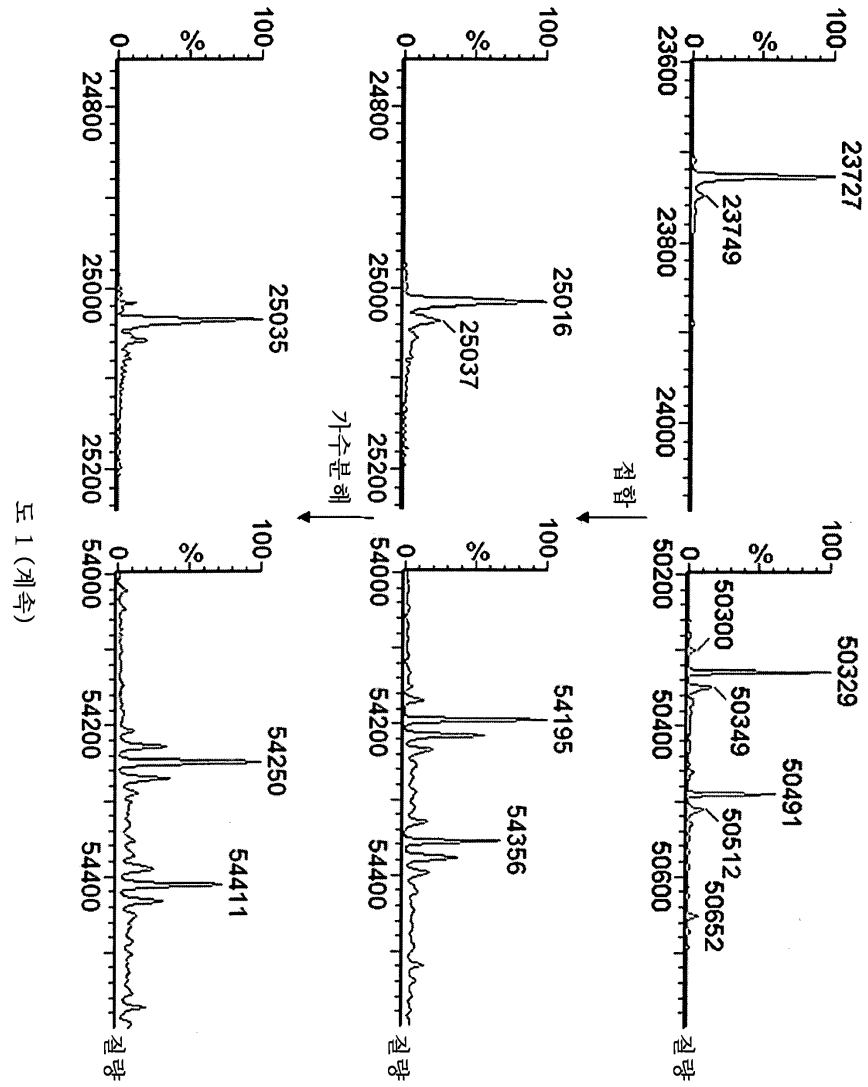
[0785] ADC의 항종양 활성에 대한 자가-안정화 약물-링커의 영향을 평가하기 위하여, 말레이미도-카프로일 기 또는 자가-안정화 말레이미도-DPR 기 중 어느 하나를 통하여 항체에 연결된 val-cit-PAB-MMAE 세포독성 탑재물을 포함하는 약물-링커를 사용하여, 항-CD30 항체 cAC10과 접합체를 제조하였다. 이러한 ADC를 CD30+ 인간 악성종양의 2종의 별도 뮤린 이종이식편 모델에서 평가하였다. 첫 번째 모델 (도 11)에서는, 카르파스(Karpas)-299 (인간 ALCL) 세포를 암컷 SCID 마우스에 피하로 이식하고, 종양을 대략 250 mm^3의 부피로 성장시킨 후, 1 mg/kg으로 매주 3회 투여 동안 투여하였다 (투여 군 당 6마리의 마우스). 말레이미도-카프로일 ADC가 투여된 6마리의 마우스 모두가 비처리 군에 비해 약간의 종양 성장 지연을 경험하였으며, 2마리의 동물은 부분적인 종양 수축을 경험하였으나; 모든 종양이 성장함으로써, 전체 군이 대형 종양으로 인하여 안락사되었다. 자가-안정화 ADC 투여군은 6마리 동물 모두에서 완전한 반응 (검출가능한 종양 없음)을 경험하였는데, 5마리의 동물은 연구 과정 동안 지속적인 퇴화를 경험하였으며, 1마리의 동물만이 연구 55일차에 그의 종양이 복구됨으로써 희생되었다. 이와 같은 연구의 결과는 자가-안정화 약물-링커를 사용하여 제조된 ADC의 상당히 더 큰 생체내 항종양 활성을 표시한다. 두 번째 모델에서는, L428 (인간 호지킨 림프종) 세포를 암컷 NSG 마우스에 피하로 이식하고, 종양을 대략 100 mm^3의 부피로 성장시킨 후, 1 mg/kg으로 4일마다 4회 투여 동안 투여하였다 (투여 군 당 6마리의 마우스). 양 ADC 투여군의 모든 동물들이 치료 동안 상당한 성장 지연을 경험하였으나, 연구 28일차 후에는 모든 종양들이 성장하기 시작하여, 말레이미도-카프로일 및 자가-안정화 ADC 사이에 유의성 있는 차이가 없었다. 따라서, 이종이식편 연구에서 자가-안정화 ADC에 관찰되는 항종양 활성의 향상은 모델-의존성인 것으로 보인다.

도면

도면1

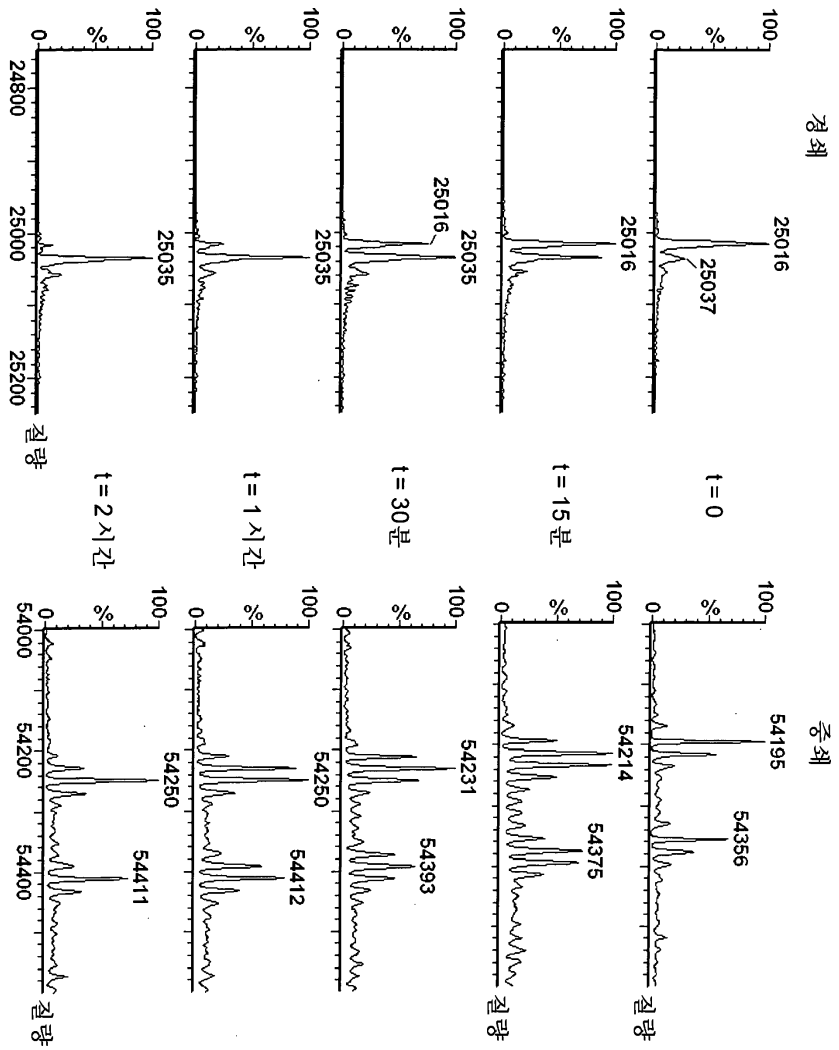


도면1a

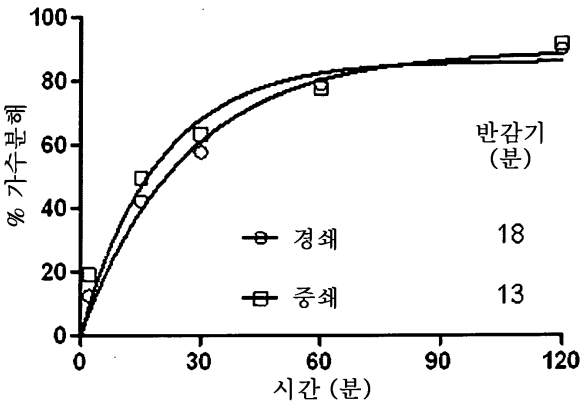

100
%
0
23600
23727
23749
23800
24000
결합
50200
50300
50329
50349
50400
50491
50512
50600
50652
질량
24800
25000
25016
25037
25200
가수분해
54000
54195
54200
54356
54400
54250
54411
54400
질량

도 1 (계속)

도면2

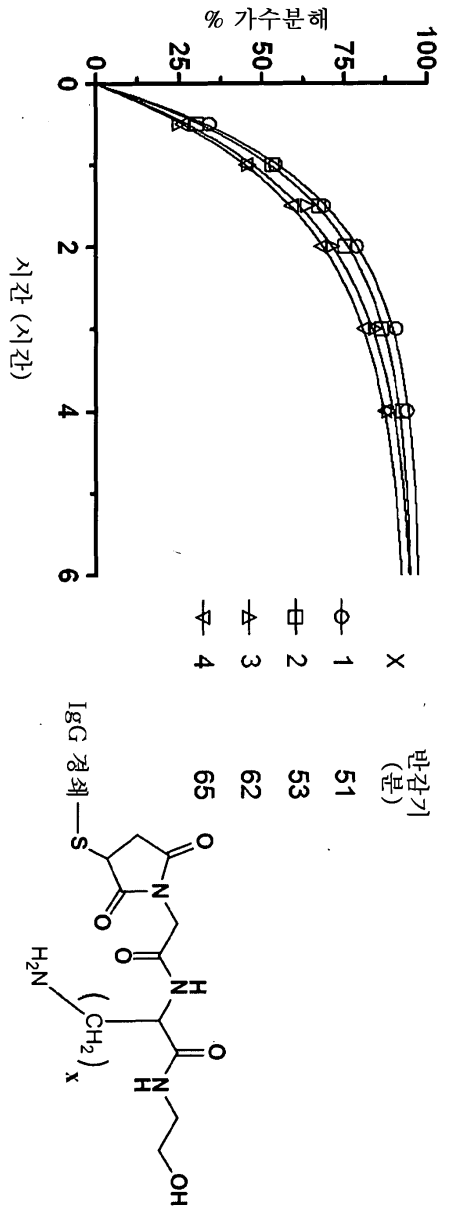


도면2a

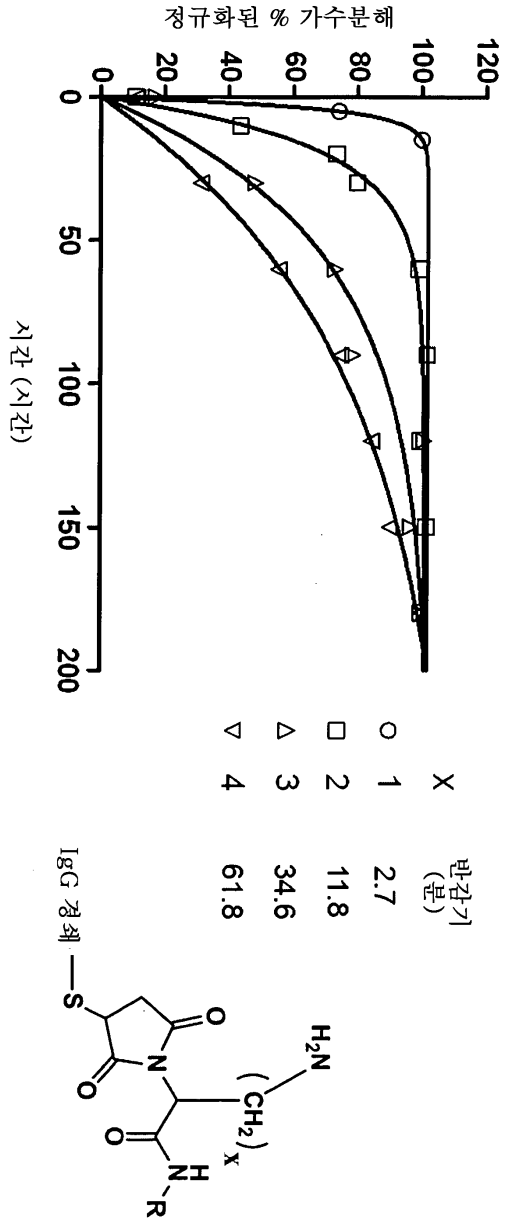


도 2 (계속)

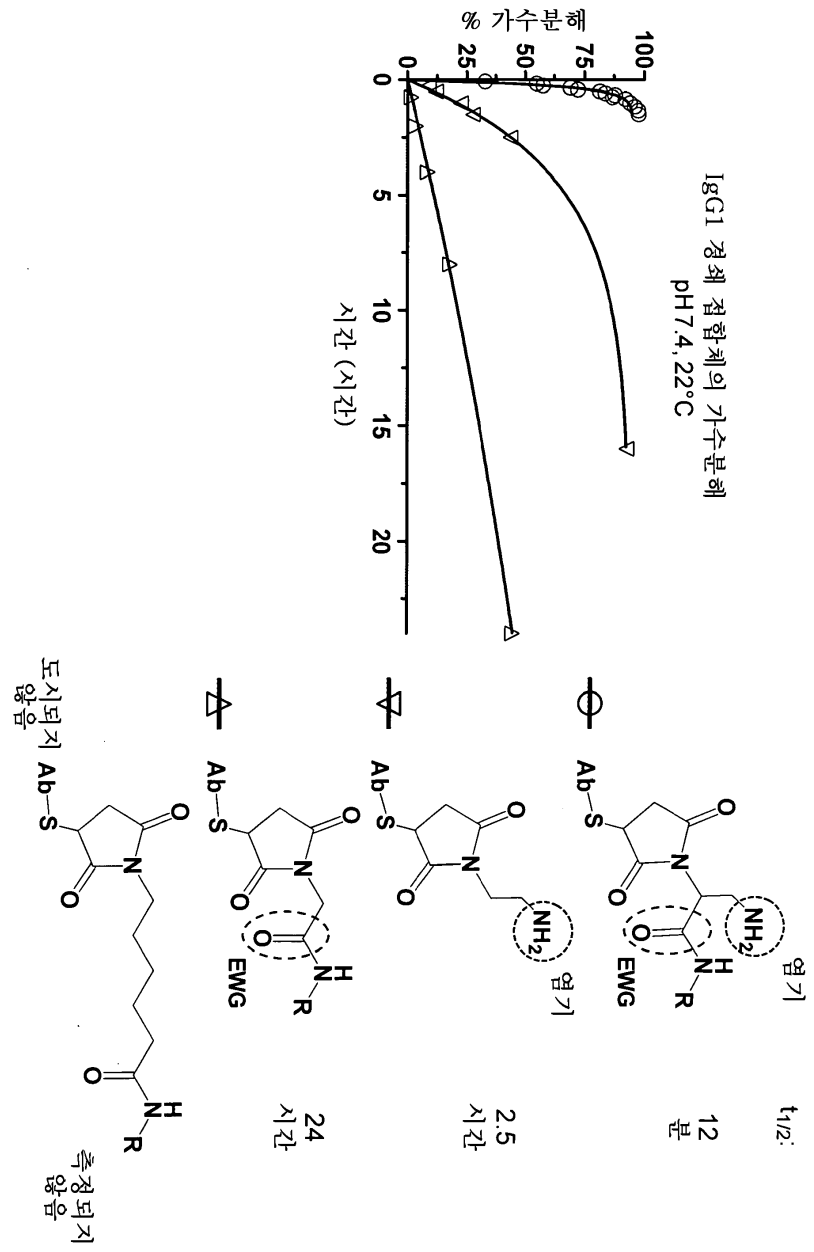
도면3


% 가수분해
0
25
50
75
100
0
2
4
6
시간 (시간)
X
반감기 (분)
1 51
2 53
3 62
4 65
IgG 경쇄
S
O
N
H
H_2N
$(CH_2)_x$
OH

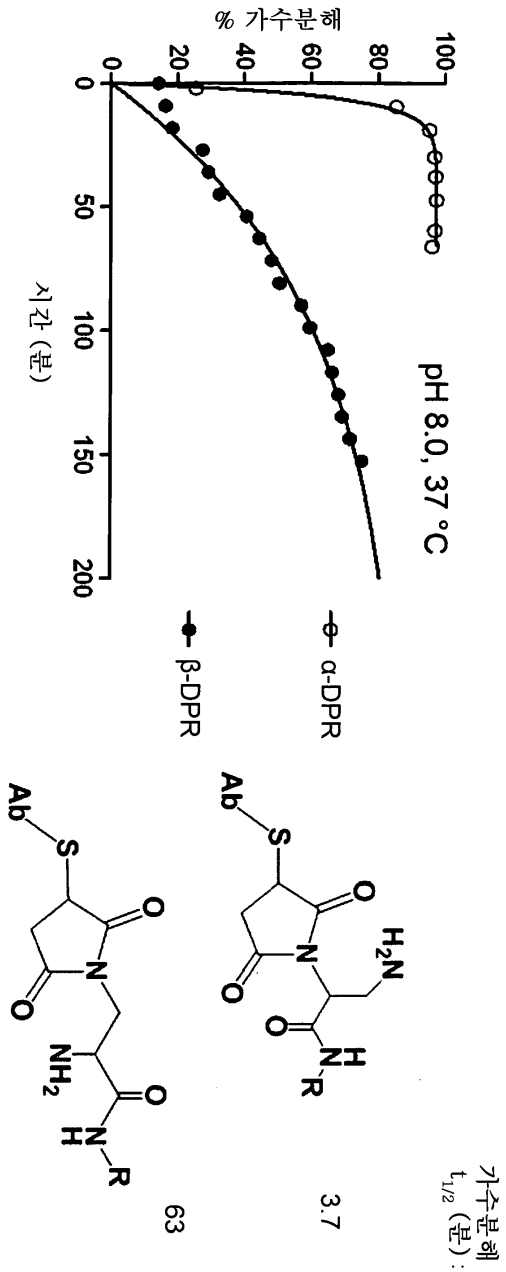
도면4


정규화된 % 가수분해
0
20
40
60
80
100
120
0
50
100
150
200
시간 (시간)
X
반감기 (분)
1
2.7
2
11.8
3
34.6
4
61.8
IgG 경쇄
S
O
N
O
O
H2N
(CH2)x
N
H
R

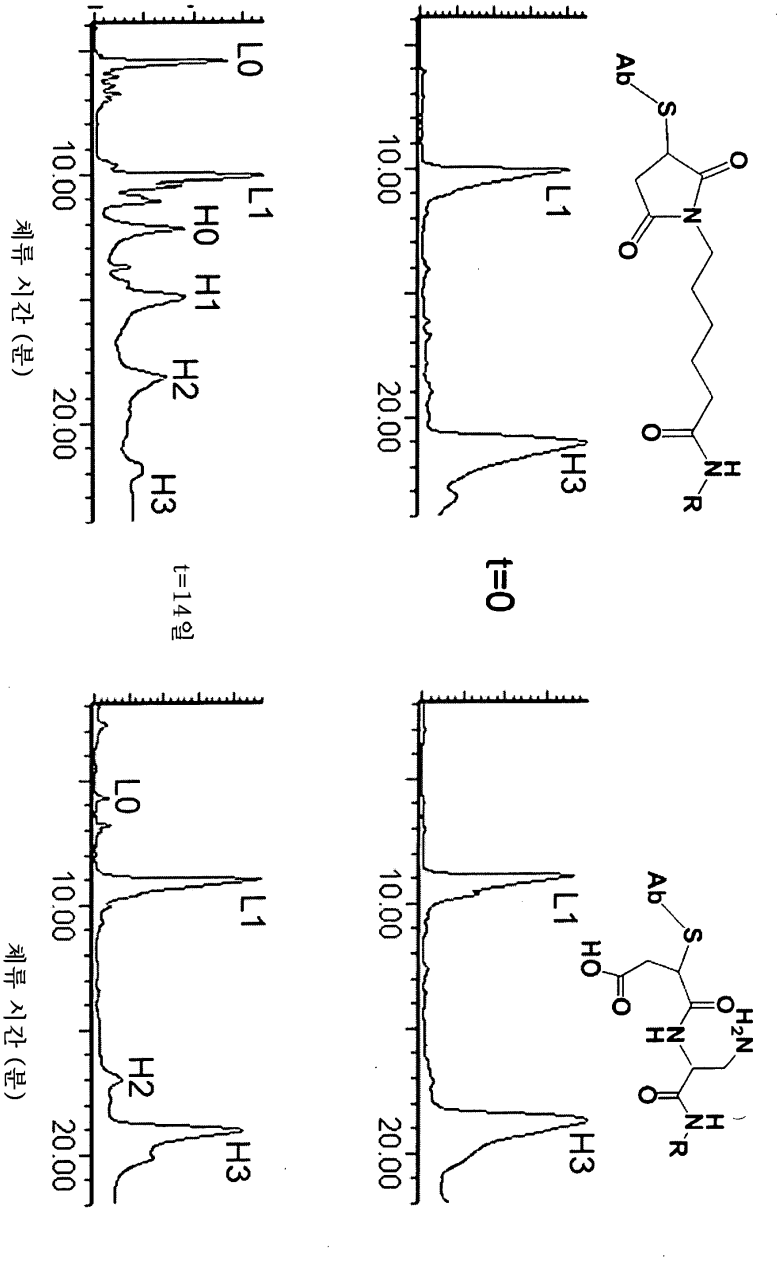
도면5


% 가수분해
0
25
50
75
100
0
5
10
15
20
시간 (시간)
IgG1 경쇄 접합체의 가수분해
pH 7.4, 22°C
Ab—S
O
N
O
NH2
H
N
R
EWG
염기
t1/2:
12
분
2.5
시간
24
시간
도시되지
않음
측정되지
않음

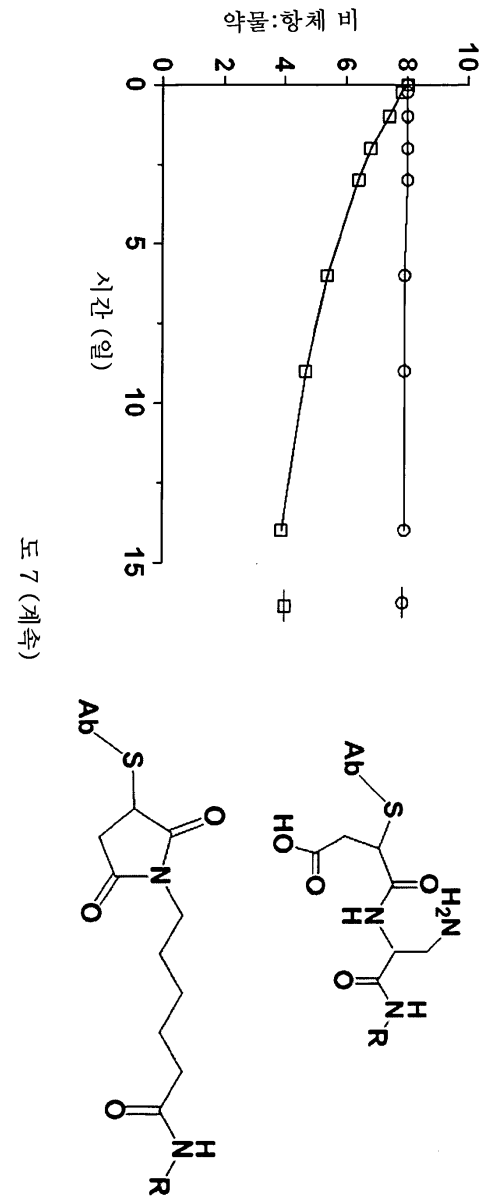
도면6


% 가수분해
0
20
40
60
80
100
0
50
100
150
200
시간 (분)
pH 8.0, 37 °C
β-DPR
α-DPR
Ab
S
O
N
O
NH2
O
N
H
R
63
Ab
S
O
N
O
H2N
O
N
H
R
3.7
가수분해 t1/2 (분) :

도면7

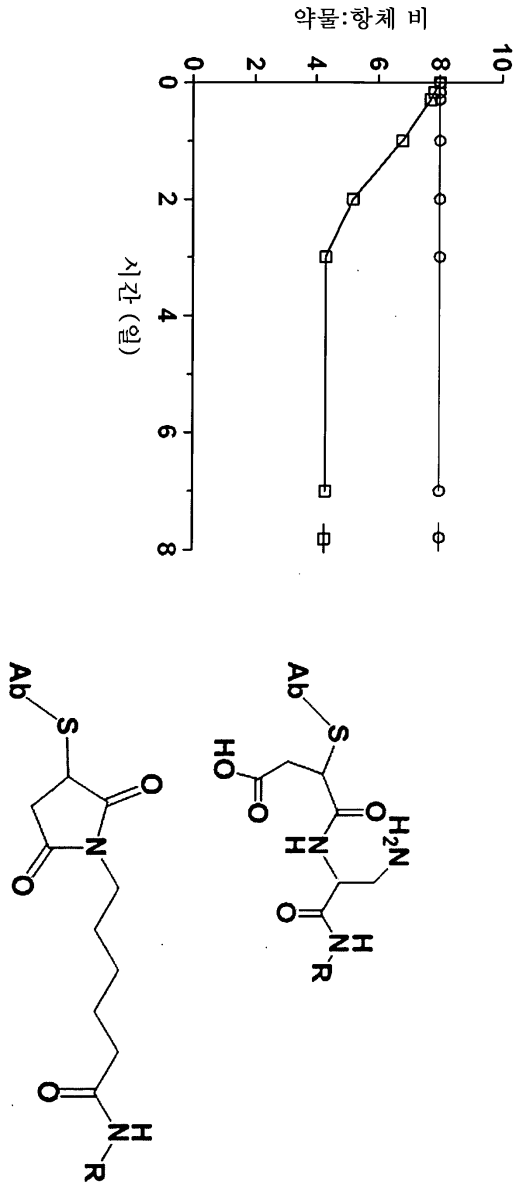


도면7a

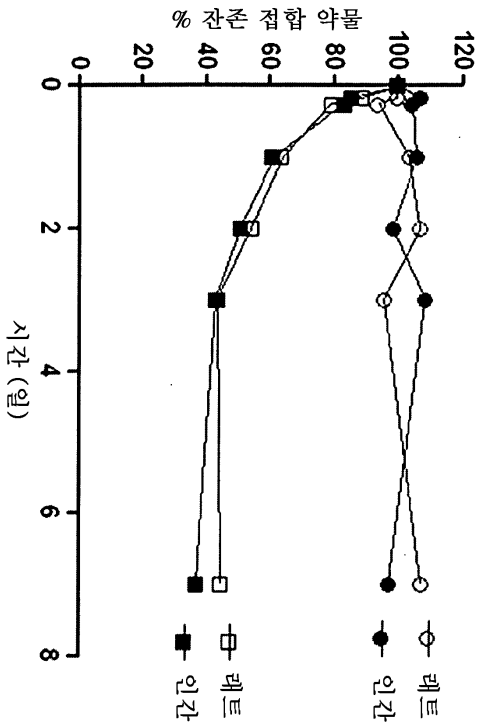


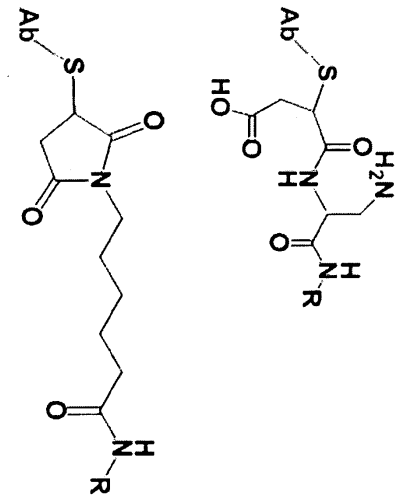
도 7 (계속)

도면8

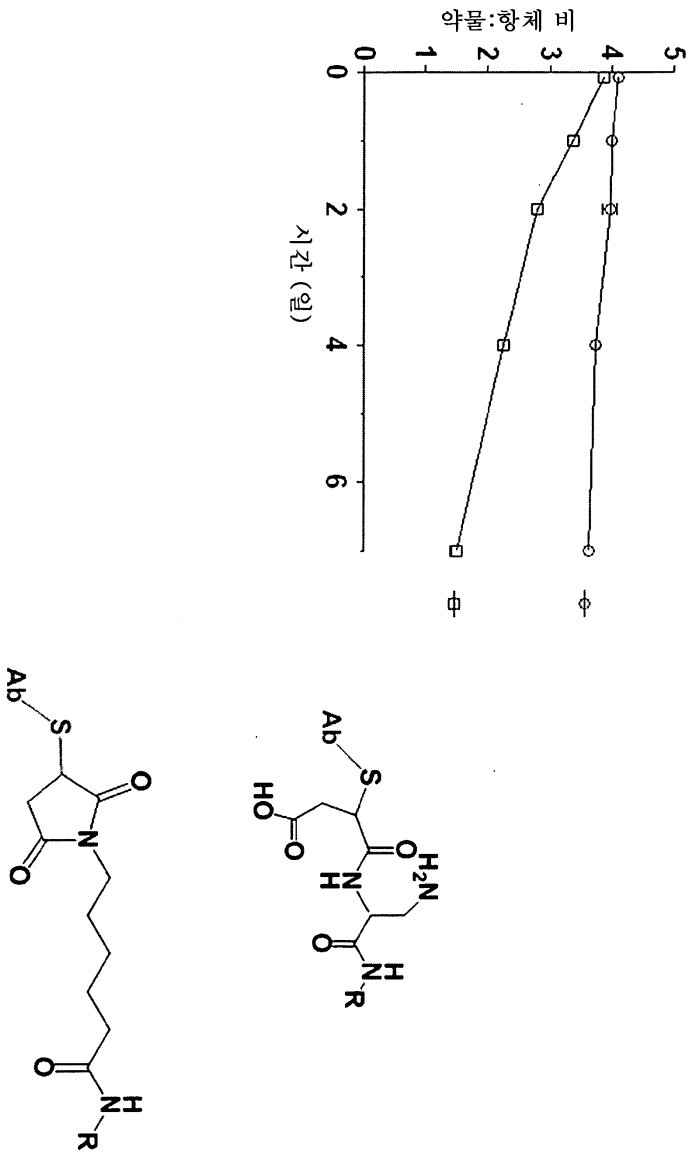


도면9

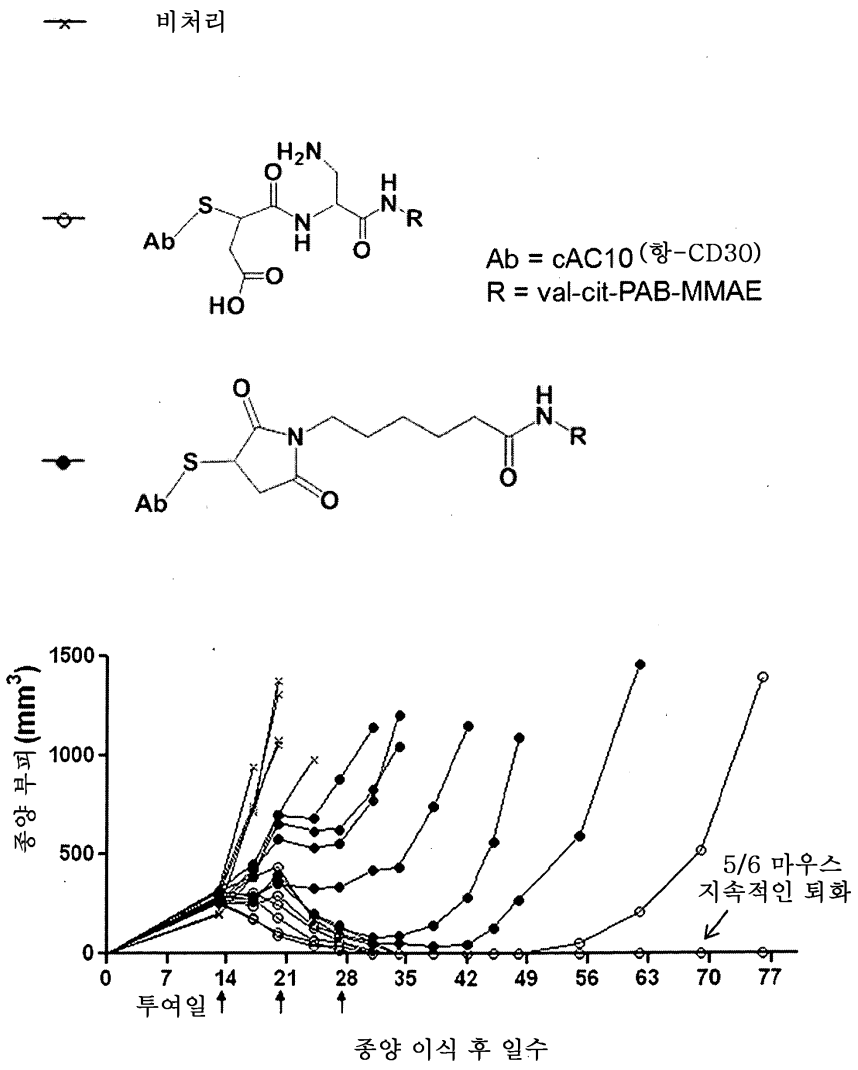

% 잔존 접합 약물
0
20
40
60
80
100
120
0
2
4
6
8
시간 (일)
인간
래트
인간
래트


Ab
S
O
N
O
O
H
N
R
Ab
S
HO
O
O
H
N
H
N
O
H
N
R

도면10



도면11


비처리
Ab = cAC10 (항-CD30)
R = val-cit-PAB-MMAE
종양 부피 (mm3)
1500
1000
500
0
0 7 14 21 28 35 42 49 56 63 70 77
투여일
5/6 마우스
지속적인 퇴화
종양 이식 후 일수