

**(19) 대한민국특허청(KR)**
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2019-0126824

(43) 공개일자 2019년11월12일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 47/68 (2017.01) **A61K 39/00** (2006.01)
A61K 9/00 (2006.01) **A61P 31/18** (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)

(52) CPC특허분류
A61K 47/6803 (2017.08)
A61K 31/4015 (2013.01)

(21) 출원번호 10-2019-7028286

(22) 출원일자(국제) 2018년03월27일
 심사청구일자 없음

(85) 번역문제출일자 2019년09월26일

(86) 국제출원번호 PCT/EP2018/057744

(87) 국제공개번호 WO 2018/178060
 국제공개일자 2018년10월04일

(30) 우선권주장
 17163065.0 2017년03월27일
 유럽특허청(EPO)(EP)

(71) 출원인
알파시그마 에스.피.에이.
 이탈리아 볼로냐 아이-40133 비아 라가찌 델 '99,
 5

(72) 발명자
베시 로레다나
 이탈리아 00125 로마 비아 피에로 게라르디 20
데 산티스 리타
 이탈리아 00040 포메지아 (로마) 비아 안키세 103
 (뒷면에 계속)

(74) 대리인
리엔목특허법인

전체 청구항 수 : 총 15 항

(54) 발명의 명칭 **HDAC 저해제-기반 항체 약물 접합체 (ADC) 및 치료 용도****(57) 요약**

본 발명은 특히 ErbB1, ErbB2 및 ErbB3 수용체에 대한 항체를 갖는, 신규한 히스톤 데아세틸라제 저해제 (HDACi)-기반 항체 약물 접합체, 상기 항체를 포함하는 약학적 조성물 및 하나 이상의 히스톤 데아세틸라제 이소형의 조절이 치료적 중재에 효과적일 수 있는 암 또는 종양 및 다른 질환의 치료에 있어서 그의 용도에 관한 것이다.

(52) CPC특허분류

A61K 47/6849 (2017.08)
A61K 47/6851 (2017.08)
A61K 9/0078 (2013.01)
A61P 31/18 (2018.01)
A61P 35/00 (2018.01)
A61K 2039/505 (2013.01)

(72) 발명자

밀라초 페르디난도 마리아

이탈리아 00139 로마 비아 키우시 11

잔니니 주세페

이탈리아 00071 포메지아 (로마) 비아 보에치오
46/브

타데이 마우리치오

이탈리아 시에나 53035 몬테리지오니 몬테리지오니
비아 우오피니 58

팔토니 발렌티나

이탈리아 52048 몬테 산 사비노 (아레초) 비아 살
보 다퀴스토 10°

페트리치 엘레나

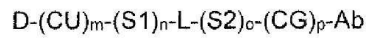
이탈리아 53100 시에나 스트라다 델 페트리초 에
벨리구아르도 82

명세서

청구범위

청구항 1

하기 화학식 (I)의 항체-약물-접합체 또는 그의 약학적으로 허용가능한 염:

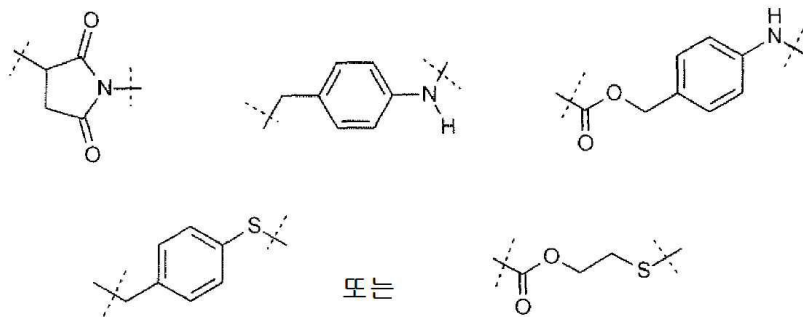


(화학식 I)

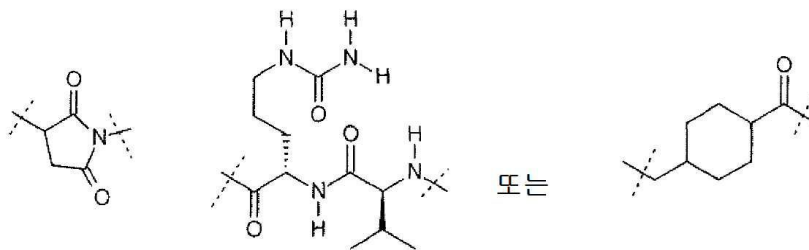
상기에서

D는 티올-기반 히스톤 데아세틸라제 저해제, 히드록삼산-기반 히스톤 데아세틸라제 저해제 또는 벤자미드-기반 히스톤 데아세틸라제 저해제로부터 선택되는 히스톤 데아세틸라제 저해제 약물이고,

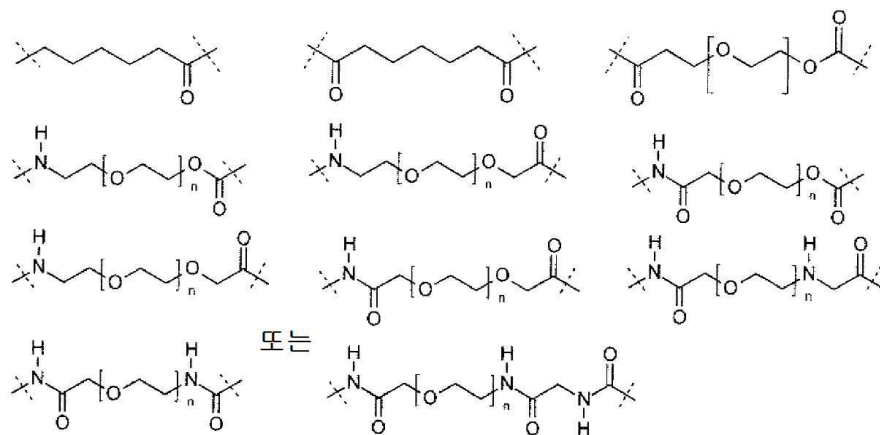
CU는 연결 유닛 (connecting unit)으로서, 이는 부재하거나 또는 하기로부터 선택될 수 있고:



S1은 스페이서 (spacer)로서, 이는 부재하거나 또는 하기로부터 선택될 수 있으며:

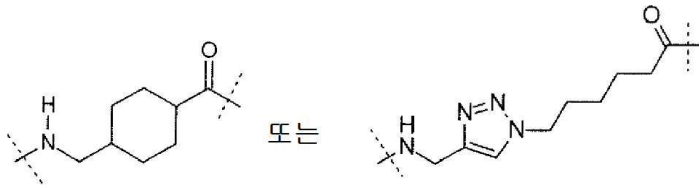


L은 링커로서, 이는 하기로부터 선택되며:

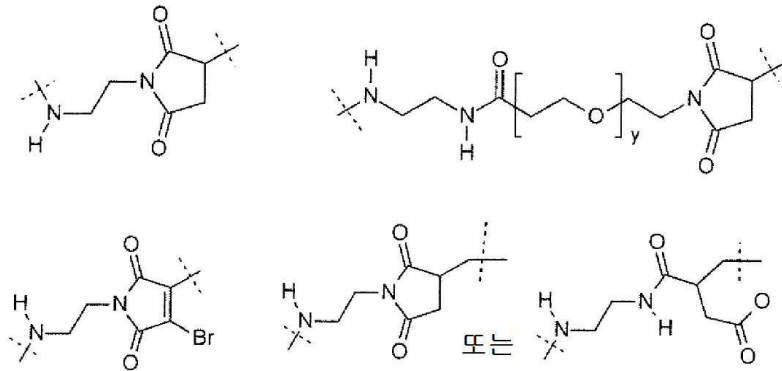


상기 n은 2 내지 5의 정수이고;

S2는 스페이서로서, 이는 부재하거나 또는 하기로부터 선택될 수 있으며:



CG는 항체의 시스테인 티올기 또는 리신 아미노기에 접합 후에 형성된 연결 기이고, 이는 부재하거나 또는 하기 모이어티 중 하나일 수 있으며:



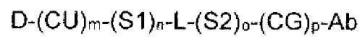
상기 y는 0 내지 8의 정수이고,

Ab는 항체 또는 그의 항원 결합 단편이며,

m, n, o 및 p는 0 또는 1의 정수를 나타낸다.

청구항 2

하기 화학식 (I)의 항체-약물-접합체 또는 그의 약학적으로 허용가능한 염:



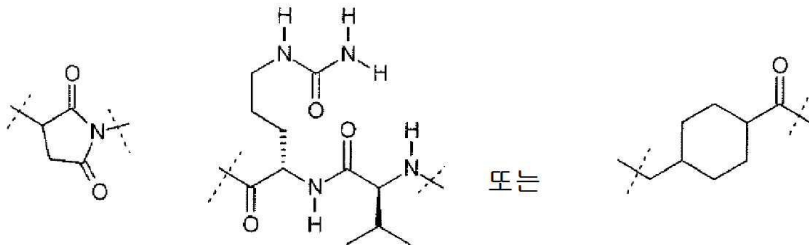
(화학식 I)

상기에서

D는 히스톤 데아세틸라제 저해제 약물이고,

CU는 연결 유닛으로서, 이는 부재할 수 있으며,

S1은 스페이서로서, 이는 부재하거나 또는 하기로부터 선택될 수 있고:



L은 링커이며,

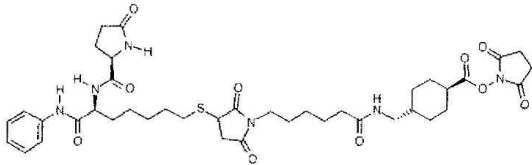
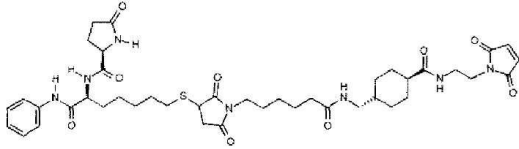
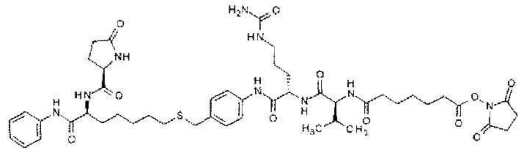
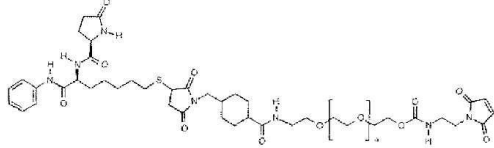
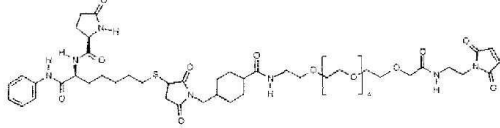
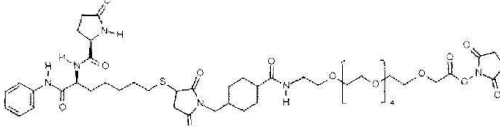
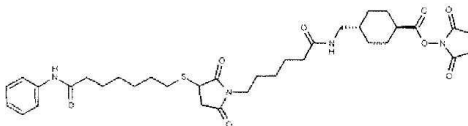
S2는 스페이서로서, 이는 부재할 수 있으며,

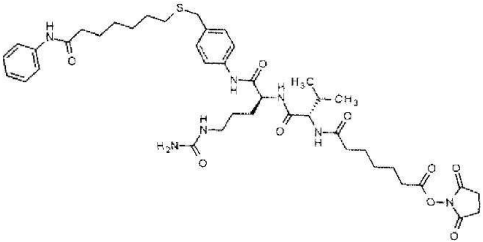
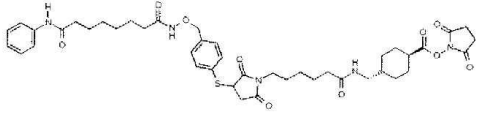
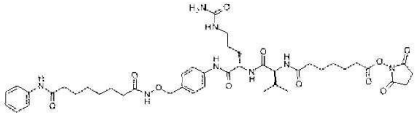
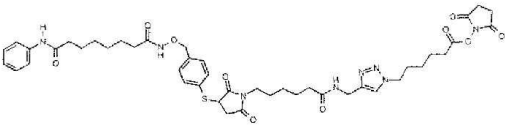
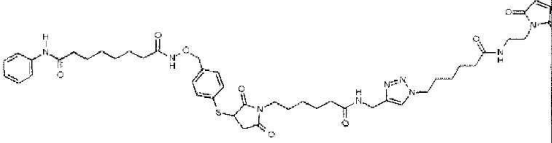
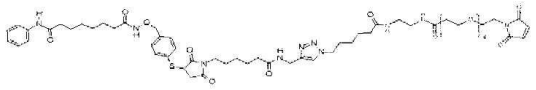
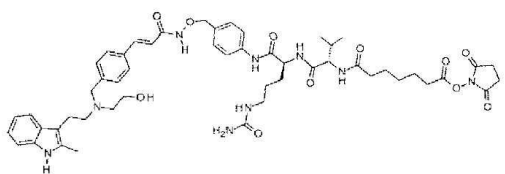
CG는 항체의 시스테인 티올기 또는 리신 아미노기로의 접합 후에 형성된 연결기이고, 이는 부재할 수 있으며,

Ab는 항체 또는 그의 항원 결합 단편이고,

m, n, o 및 p는 0 또는 1의 정수를 나타내며,

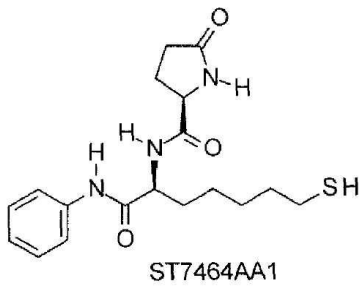
상기 화학식 I의 $D-(CU)_m-(S1)_n-L-(S2)_o-(CG)_p$ 의 구조를 포함하는 히스톤 데아세틸라제 저해제 약물 및 페이로드 (payload)는 하기로부터 선택된 화합물이다:

| I.D. | ST 코드 | 화학 구조 | M.W. | 부류 |
|------|---------|---|--------|-----------|
| (1) | 8128AA1 |  | 810.9 | NHS |
| (2) | 8152AA1 |  | 836.0 | 말레 이미드 |
| (3) | 8132AA1 |  | 964.1 | NHS |
| (4) | 8190AA1 |  | 1030.2 | 말레 이미드 |
| (5) | 8189AA1 |  | 1044.2 | 말레 이미드 |
| (6) | 8191AA1 |  | 889.0 | NHS |
| (7) | 8197AA1 |  | 684.8 | 말레 이미드 |

| | | | | |
|------|---------|---|--------|-----------|
| (8) | 8235AA1 |  | 838.0 | NHS |
| (9) | 8217AA1 |  | 834.0 | NHS |
| (10) | 8201AA1 |  | 865.0 | NHS |
| (11) | 8215AA1 |  | 889.0 | NHS |
| (12) | 8216AA1 |  | 914.1 | 말레 이미드 |
| (13) | 8236AA1 |  | 1161.4 | 말레 이미드 |
| (14) | 8232AA1 |  | 994.1 | 말레 이미드 |

청구항 3

청구항 2에 있어서, 상기 히스톤 데아세틸라제 저해제 약물은 하기 화학식을 갖는 티올-기반 저해제 ST7464AA1 이고:

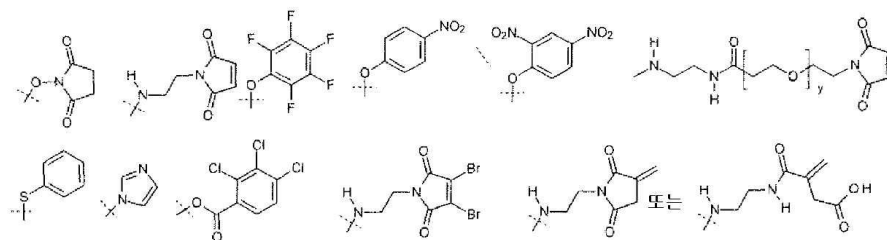


상기 페이로드르는 하기 표로부터 명백한 화합물인 것인 항체-약물 접합체:

| | | |
|---|---------|--|
| 1 | 8128AA1 | |
| 2 | 8152AA1 | |
| 3 | 8132AA1 | |
| 4 | 8190AA1 | |

청구항 4

청구항 1에 있어서, 상기 연결 유닛 (CU)은 하기로부터 선택되는 것인 항체-약물-접합체:



청구항 5

청구항 1 내지 4 중 어느 한 항에 있어서, 상기 항체는 히스톤 데아세틸라제 저해제, 또는 c-met 또는 인테그린

(integrin) 수용체와 같은 히스톤 데아세틸라제 저해제를 방출하는 종양 세포에 의해 내재화된 수용체에 대한 항체인 것인 항체-약물 접합체.

청구항 6

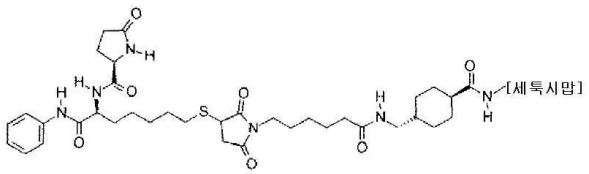
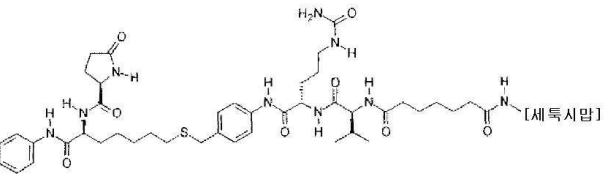
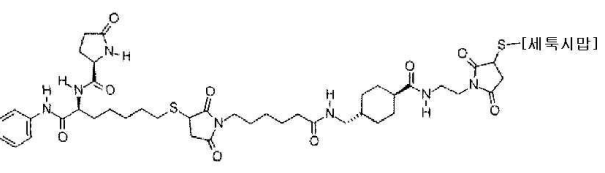
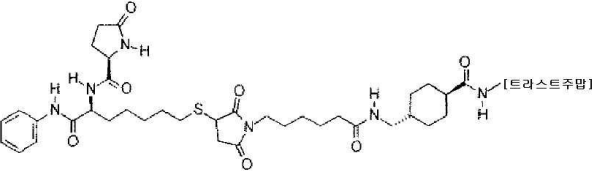
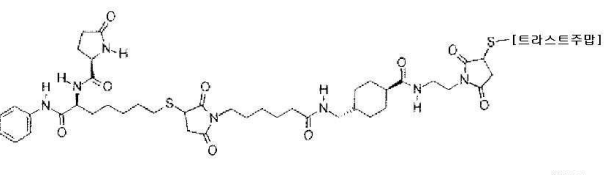
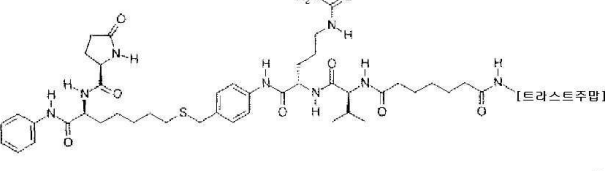
청구항 1 내지 5 중 어느 한 항에 있어서, 상기 항체는 항-EGFR 패밀리 단백질 항체인 것인 항체-약물-접합체.

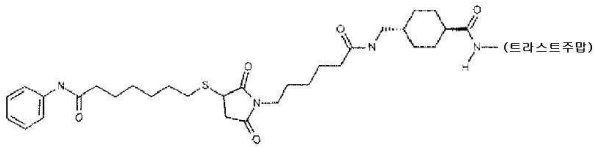
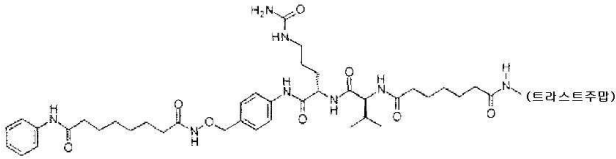
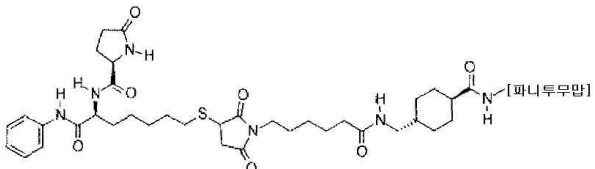
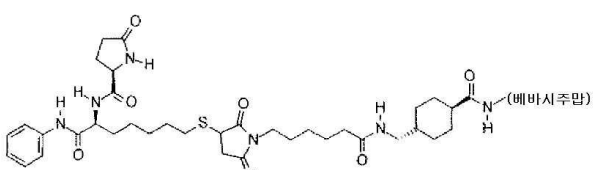
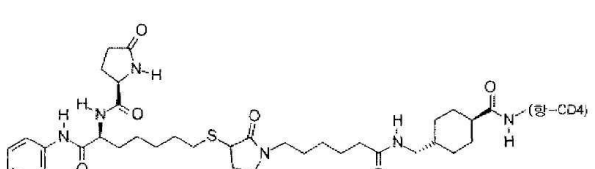
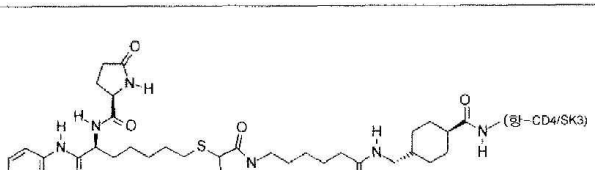
청구항 7

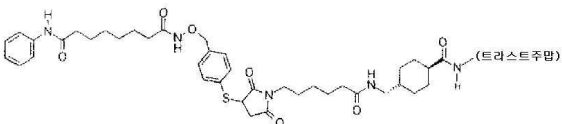
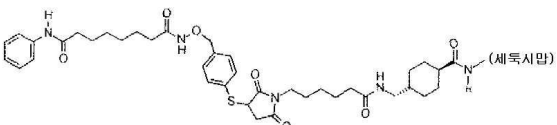
청구항 1 내지 6 중 어느 한 항에 있어서, 상기 항체는 트라스투주맙, 세특시맙, 베바시주맙, 파니투무맙 또는 관련 바이오시밀러 (biosimilars)로부터 선택되는 것인 항체-약물-접합체.

청구항 8

청구항 7에 있어서, 상기로부터 선택된 화학식을 갖는 것인 항체-약물-접합체:

| I.D. ST 코드 | 화학 구조 | SoC | DAR |
|-----------------|---|-----|-------------------|
| (24) 8154AA1 |  | Lys | 8.0 (± 1) |
| (25) 8155AA1 |  | Lys | 6.1 (± 1) |
| (26) 8177AA1 |  | Cys | 4.0 (± 0.7) |
| (27) 8178AA1 |  | Lys | 8.0 (± 0.2) |
| (28) 8176AA1 |  | Cys | 4.5 (± 0.5) |
| (29) 8179AA1 |  | Lys | 6.1 (± 0.2) |

| | | | |
|-----------------|---|-----|-------------------|
| (30) 8205AA1 |  | Lys | 6.2 (± 0.2) |
| (31) 8202AA1 |  | Lys | 5.5 (± 0.5) |
| (32) 8193AA1 |  | Lys | 9.0 (± 2) |
| (33) 8194AA1 |  | Lys | 6.5 (± 0.5) |
| (34) 8212AA1 |  | Lys | 8.0 (± 0.2) |
| (35) 8213AA1 |  | Lys | 4.0 (± 1) |

| | | | |
|-----------------|---|-----|-------------------|
| (36) 8218AA1 |  | Lys | 5.0 (± 0.5) |
| (37) 8219AA1 |  | Lys | 4.0 (± 0.5) |

청구항 9

약제로서 사용하기 위한, 청구항 1 내지 8 중 어느 한 항에 따른 항체-약물-접합체.

청구항 10

청구항 1 내지 8 중 어느 한 항에 따른 항체-약물-접합체의 유효한 양 및 약학적으로 허용가능한 부형제를 포함하는 약학적 조성물.

청구항 11

ErbB1, ErbB2 또는 ErbB3으로부터 선택된 수용체를 발현하는 암 또는 종양 치료에 사용하기 위한, 청구항 1 내지 8 중 어느 한 항에 따른 항체-약물-접합체 또는 약학적 조성물.

청구항 12

청구항 11에 있어서, 상기 암은 폐암, 복막암, 유방암, 결장암, 뇌암, 두경부암, 자궁내막암, 자궁경부-자궁내막암, 신장암, 췌장암, 위암, 결장암, 충수암, 식도암, 난소암 및 전립선암; 또는 백혈병, 복강가성점액종(pseudomyxoma peritonei), 간 전이 및 비-장 조직의 복부 육종(abdominal sarcoma of non-gut tissues)으로부터 선택되는 것인 청구항 1 내지 8 중 어느 한 항에 따른 항체-약물-접합체 또는 약학적 조성물.

청구항 13

HIV 치료에서 보조 요법(adjunctive therapeutic)으로서 사용하기 위한, 청구항 1 내지 8 중 어느 한 항에 따른 항체-약물-접합체 또는 약학적 조성물.

청구항 14

분무(nebulization)에 의한 국소 전달에 적합한 제제의 청구항 1 내지 12 중 어느 한 항에 따른 항체-약물-접합체 또는 약학적 조성물.

청구항 15

청구항 14에 있어서, 폐암, 유방암, 결장암, 뇌암, 두경부암, 자궁내막암, 신장암, 췌장암, 위암, 식도암, 난소암 및 전립선암 및 백혈병 치료에 사용하기 위한 것인 항체-약물-접합체 또는 약학적 조성물.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 증식성 질환(proliferative diseases) 치료에 유용한 신규한 히스톤 데아세틸라제 저해제(HDACi)-기반 항체 약물 접합체에 관한 것이다. 본 발명은 구체적으로 ErbB1, ErbB2, ErbB3 수용체 또는 관련 분자 표적에 대한 항체를 포함하는 항체-약물-접합체에 관한 것이다. 본 발명은 또한 항체-약물-접합체로 이루어진 신규한 HDAC 저해제 약물을 제공한다. 또한, 본 발명은 ADC 약학적 조성물 및 하나 이상의 히스톤 데아세틸라제 이소형(isoforms)의 조절이 치료적 중재에 효과적일 수 있는 암 또는 종양 및 다른 질환의 치료에 있어서 그 용도에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 암, 신경계 장애, 염증 질환 및 바이러스 감염 치료를 위한 맞춤형 의약품에 의학 연구가 중점을 두고 있다. 오늘날, 유전적 변이와 인간 질병 사이의 연관성에 대한 지식은 이들 병인을 보다 잘 이해할 수 있게 한다.

[0003] 후생적 이상(Epigenetic aberrations)으로 후생적 조절 단백질 기능을 획득 또는 손실하여 전술한 인간 질병의 발병 및 진행에 기여할 수 있고(Berdasco, 2013 Hum Genet 132: 359-83), 이는 인간 세포에서 1,750개 이상의 단백질이 리신 잔기에서 아세틸화 및 데아세틸화(deacetylation)를 통해 번역후 변형될 수 있기 때문이다(Choudhary 2009 Science 325: 834-40). 데아세틸화 효소는 암뿐만 아니라 신경계 장애, 염증, 바이러스 감염 및 심혈관 장애와 같은 다양한 기타 질환과 관련된 이상(aberrant) 데아세틸화를 처리하기 위한 귀중한 표적으로 간주된다(Minucci 2006 Nature Rev Cancer 6: 38-51; Glogak 2007 Oncogene 26: 5420-32; Zhang 2015 Med Res Rev 35: 63-84; Dinarello 2010 Mol Med 17: 333-52).

[0004] 최근까지, 몇 가지 HDACi가 FDA에 의해 승인되었다: 난치성 피부 T-세포 림프종(cutaneous T-cell lymphoma: CTCL) 치료용 보리노스타트(vorinostat)(Zolinza®; Merck)(Duvic 2007 Blood 109: 31-39); CTCL 및 말초 T-세포 림프종(PTCL) 치료용 로미덱신(romidepsin)(Istodax®; Celgene)(VanderMolen 2011 J Antibiot (Tokyo) 64: 525-531) 및 PTCL 치료용 벨리노스타트(belinostat)(Beleodaq®; Spectrum Pharmaceuticals)

(*West 2014 J Clin Invest 124: 30-39*). 2015년 초에, 경구용 파노비노스타트 (panobinostat) (Farydak®, Novartis)가 개발된 다발 골수종 환자에서 보르테조미 (bortezomib) 및 덱사메타손 (dexamethasone)과의 병용 요법으로 FDA의 승인을 받았다 (*Garnock-Jones KP (2015) Drugs. 75: 695-704*). 다시, 2015년 1월에, 경구용 소분자 벤자미드 HDAC1,2,3 및 10 저해제인, 치다마이드 (chidamide) (Epidaza® Shenzhen Chipscreen Biosciences (*originator*) licensed to HUYA Bioscience)가 결장직장암 및 폐암 치료뿐만 아니라 재발 또는 난치성 PTCL 치료용으로 중국 FDA의 승인을 받았다 (*Ruolan Gu, (2015) Journal of Chromatography B, 1000: 181-186*).

- [0005] HDAC 저해제 (HDACi)는 주로 항암제로 연구되었지만, HDAC 효소가 신경계 장애, 염증 과정 및 바이러스 감염과 같은 다른 질환에서 중요한 역할을 한다고 기재된 문헌이 점점 증가하고 있다 (*Dinarelli 2010 Cell 140: 935-950; Gray 2011 Epigenomics 3: 431-450; Giannini 2012 Future Med Chem 4: 1439-60*).
- [0006] WO2015/157595에서는 시스템인 조작된 항체 및 이중 모이어티의 접합체를 개시하였다. 이중 모이어티 중에, 언급된 약물이 있고, 약물들 중에 히스톤 데아세틸라제 저해제 (HDAC)가 있다.
- [0007] Choi S 등의 *J Control. Release 152, suppl.1, 2011, e9-e10a*에서는 PLGA 나노입자를 통한, CD7 항체와 제네릭 HDACi 접합체를 개시하였다. 상기 접합체는 난소 CD7 수용체로 HDAC 저해제를 인간 T 세포에 전달할 수 있다. 이 문헌은 임의의 특정 접합체를 보고하지 않았다.
- [0008] Battistuzzi G 등의 *Current Bioactive Compounds 12, 2016, 282-288*에서는 4 단계의 HDAC 저해제 합성을 개시하였고, 이는 티올 유도체이다. 이 문헌은 상기 화합물을 사용하여 다른 약학적 화합물을 수득하는 것에 대한 정보를 보고하지 않았다.
- [0009] Ai T. 등의 *Current Med Chem 2012, 19, 475*에서는 항암 및 그의 상승 효과를 갖는 HDACi의 용도를 보고하였다. 이는 엽산, 레티노산, 백금계 작용제, 단백질 키나제 저해제 및 이노신 모노포스페이트 데히드로게나제 저해제를 갖는 HDAC 저해제 유도체를 보고하였다.
- [0010] West A.C. 등의 *Oncoimmunology 1, 2012, 376*에서는 항종양 약물로서 면역-자극 항체와 HDAC 저해제 조합의 용도를 보고하였다.
- [0011] 구체적으로 HDACs 1, 2 및 3 주요 핵은 특히 말기 단계의 공격적인 악성 종양 세포에서 발견되었고, 이들은 불량한 생존율과 관련이 있다 (*Gryder 2012 Future Med Chem 4: 505-24*); 세포질에서 HDAC6 1차 세포 국소화는 아세틸화 상태를 조절하여, 튜불린, HSP90 및 다른 핵의 단백질의 관능성을 조절하므로, 이는 세포에서 미스폴딩된 (misfolded) 단백질의 제거, 세포 운동성 및 전이 가능성에 관여하는 것을 시사하였다 (*Clawson 2016 Ann Transl Med 4: 287*).
- [0012] HDAC 이소형 (2, 3, 6, 9, 10)은 또한 만성 장 염증에 관여하므로, HDAC 저해제는 종양 세포의 아포토시스 유도 외에 염증성 장 질환에 사용될 수 있다 (*Felice 2015 Aliment Pharmacol Ther 41: 26-38*).
- [0013] 최근에, 효능이 있는 티올-기반 pan-HDACi의 신규한 부류 (*Giannini 2014 J Med Chem 57: 8358-77*)가 보고되었고, 효능이 있는 HDAC 저해제인 ST7612AA1이 인간 고형암 및 혈액암에 대해 광범위한 활성 스펙트럼을 특징으로 하는 약물 후보체로 선택되었다.
- [0014] ST7612AA1은 환자 생존율 감소와 관련이 있는, 강하게 증식하는 탈분화된 결장암의 서브세트인 Ras-돌연변이체 결장 암증; 야생형 EGFR (및 돌연변이체 KRAS) 및 T790 EGFR 돌연변이를 갖는 비소세포 폐 종양; 낮은 수준의 PTEN 및 ErbB1 및 ErbB2의 과발현을 갖는 난소 또는 PTEN을 갖지 않는 난소암; 에스트로겐 수용체, 프로게스테론 수용체 및 ErbB2가 부재한 것으로 정의되는 삼중-음성 유방 암 (triple-negative breast cancer: TNBC); 급성 골수성 백혈병, 광범위 큰 B 세포 림프종 (diffuse large B cell lymphoma)과 같은 몇몇 종양의 성장을 저해하는 특성을 나타내었다. 더욱이, ST7612AA1은 면역 반응 및 NF- κ B 경로 및 상피-중간엽 전이 (EMT)와 같은 주요 발병 경로에 관여하는 일부 전사체를 조절하여, 암뿐만 아니라 염증 질환에도 관련이 있음을 시사하였다 (*Vesci 2015 OncoTarget 20: 5735-48*).
- [0015] ST7612AA1의 작용은 종양 세포의 핵과 세포질 HDAC 이소형 모두에 대해 발휘하여서, e-카드헤린, 케라틴 및 다른 전형적인 상피 마커의 전사를 증가시키고, 동시에 비멘틴 및 중간엽 표현형과 관련된 다른 유전자의 하향-조절을 유도하였다. 이러한 데이터는 ST7612AA1에 의한 치료로 "카드헤린 스위치" 및 세포 분화에 유익한 상피-중간엽-전이 (EMT) 과정의 복귀를 유발할 수 있다는 것을 시사하였다. 세포의 전환분화 (transdifferentiate) 및 탈분화하는 능력은 EMT 과정에 의한 침습 및 전이에서 중요한 역할을 하며, 분화는 치료적 효능의 추가적인

예후 및 예측 지표로서 사용될 수 있다. HDAC6의 저해를 통해서, ST7612AA1은 또한 예를 들어, DNA 손상 신호 전달, 전사 인자 결합, 분자 항상성 및 DNA 복구 과정에 관여하는 TP53, 알파-튜불린 또는 열충격 단백질 90 (HSP90)과 같이 비-히스톤 HDAC 기질을 표적으로 할 수 있다.

- [0016] ST7612AA1은 바이러스 은둔처 (viral reservoirs)의 박멸을 목표로 하는 신규한 요법에 잠재적으로 유용한 HIV 재활성화 (reactivation)를 유도할 수 있는 것으로 입증되었다 (*Badia 2015 Antiviral Res 123: 62-9*).
- [0017] 종양 특이성은 향상시키고 독성은 감소시키고 위해, 최근에 항체-약물 접합체는 임상적으로 유효한 암 치료 방식이 되었다. 혈액 종양 치료에 상당한 진전이 이루어졌지만, 보다 치료하기 어려운 고형암에 대한 과제가 여전히 남아있다.
- [0018] 항체-약물 접합체 (ADC)는 mAbs의 표적화 특성과 효능이 있는 세포독성 약물의 항종양 효과를 조합한 빠르게 성장하고 있는 암 약물 부류이다 (*Leal M 2014 Ann NY Acad Sci 1321: 41-54*).
- [0019] 현재, 미세관 (microtubule) 저해제는 임상적으로 유효한 ADC 페이로드 (payload)이다. 카드실라 (Kadcyla) (트라스투주맙 엠탄신 (Trastuzumab emtansine); Genentech), 아드세트리스 (Adcetris) (브렌투시맙 베도틴 (brentuximab vedotin); Seattle Genetics), 베스폰사 (Besponsa) (이노투주맙 오조가미신 (Inotuzumab ozogamicin); Pfizer) 및 밀로타그 (Mylotarg) (젬투주맙 오조가미신 (Gemtuzumab Ozogamicin); Pfizer)는 FDA-승인된 ADC 치료제이고, 40개 이상의 다른 ADC가 임상으로 진행되었다 (*Okeley 2014 Hematol Oncol Clin North Am 28: 13-25; Baron 2015 J Oncol Pharm Pract 21: 132-42*).
- [0020] 현재 ADC에 이용되는 페이로드는 매우 효능이 있는 세포독성 약물이며, 생존에 필요한 중요한 세포 과정에 영향을 주었다. 마이탄신 유도체 (DM1/DM4) 또는 아우리스타틴 (MMAE/MMAF)과 같은 매우 효능이 있는 미세관 저해제는 현재 ADC 랜드스케이프를 지배한다. 이는 전형적으로 G2/M에서 세포 주기 정지를 유발하여 유사분열을 겪는 세포에서 아포토시스를 유도한다. 보다 최근의 연구에서 미세관 저해제는 또한 간기의 비-분열 세포를 파괴할 수 있다는 것이 밝혀졌다. 이러한 발견은 미세관 저해제가 또한 천천히 복제하거나 또는 비-분열하는 종양 세포에 세포독성이 되어, 유의한 독성을 나타내는지에 대한 설명을 제공하였다. ADC에 사용되는 세포독성 약물의 다른 부류로는 엔-디인 (ene-diyne) (칼리키아미신), 듀오카르마이신 유도체, 피롤로벤조디아제핀 (pyrrolobenzodiazepines: PBDs) 및 인돌리노벤조디아제핀을 포함하고, 이들 모두는 DNA의 부홈 (minor groove), 및 퀴놀린 알칼로이드 (SN-38)를 표적으로 하고, 이는 토포이소머라제 I을 저해한다. 그러므로, ADC에 현재 이용되는 대부분의 페이로드는 매우 효능이 있고, 종종 피코몰 (picomolar) 범위에서 세포독성이 있으며, ADC 주사 용량의 매우 소량 (<1%) 만이 종양에 국한되기 때문에 ADC 전략에 필요한 것으로 사료된다 (*Bornstein 2015 AAPS Journal 17: 525-34; Cusi and Neri 2015 J Med Chem 58: 8751-61*).
- [0021] ADC 독성의 대부분은 링커 (linker) 불안정성으로 인한 페이로드 방출로부터 유래되는 것으로 사료된다. 빠르게 분열하는 정상 세포 예컨대 소화관을 라이닝하는 세포, 모낭 세포 및 골수 세포는 방출된 미세관 저해제 유래의 독성 위험이 발생되어, 위장관 증상, 탈모 및 골수억제 (myelosuppression)를 초래한다. 일부 주요 독성은 상이한 페이로드에 의해 발견되었다. 구체적으로, MMAE는 말초 신경병 및 중성구감소증 (neutropenia)을 유도하고; MMAF는 저혈소판증 (thrombocytopenia) 및 안독성 (ocular toxicity)과 관련이 있으며; DM1은 링커 및 결과 대사산물에 따라 위장관 효과뿐만 아니라 저혈소판증 및 중성구감소증을 유발하고; 안독성은 DM4-접합된 ADC에서 가장 흔한 유해 사례이며; 칼리키아미신은 저혈소판증 및 간 기능장애를 유발하고; 또한 SN-38 접합된 약물 유래의 조기 적응증은 중성구감소증을 빈번한 독성으로서 제시하였다.
- [0022] 차세대 ADC의 독성을 최소화하기 위한 가능한 전략은 저독성 페이로드를 선택하는 것이다.
- [0023] 본 발명은 놀랍게도 HDACi와 같은 저독성 약물에 접합된 항-종양 항체로 만들어진 항체-약물-접합체가 인 비보 (in vivo)에서 우수한 효능을 발휘할 수 있음을 입증하였다. 더욱이, ADC 구성을 위한 후생적 조절제 (즉 HDACi)의 사용은 당 분야에서 first in class 예를 나타낸다. HDAC 저해제와 마찬가지로, DNA 염기 서열을 변경하지 않고 유전자 발현을 조절하는 다른 후생적 조절제 예컨대 DNA 메틸트랜스퍼라제 저해제 (아자시티딘 및 데시타빈)가 사용될 수 있다 (*Pachaiyappan 2014 Bioorg and Med Chem Lett 24: 21-32*).
- [0024] 상기 항체-약물-접합체는 또한 종래 항체-약물-접합체와 비교하여 낮은 독성을 가지면서 혈액 및 체액에서 우수한 안정성 및 우수한 항암 활성을 갖는다.
- [0025] 그러므로, 본 발명의 목적은 항체에 접합된 안전한 항암 약물을 포함하는 항체-약물-접합체를 제공하는데 있다. 본 발명의 다른 목적은 상기 항체-약물-접합체 (ADC)를 제조하는 방법을 제공하는데 있다.

[0026] 본 발명의 추가적 목적은 상기 항체-약물-접합체를 포함하는 약학적 조성물을 제공하는데 있다.

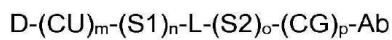
[0027] 본 발명의 또 다른 목적은 하나 이상의 히스톤 데아세틸라제 이소형의 조절이 치료적 중재에 효과적일 수 있는 암 또는 종양 및 다른 질환 치료에 사용하기 위해 상기 항체-약물-접합체를 제공하는데 있다.

[0028] 구체적으로, 이상 유전자 발현 및 그의 발생 중에 후생적 조절을 나타내는 대사 장애, 자폐증 또는 염증-관련 질환 예컨대 폐 손상, 자가면역 질환, 천식, 및 제2형 당뇨병과 같은 다른 질병이 관련될 수 있다 (*Samanta 2017 Biochim Biophys Acta 1863: 518-28; Akhtar 2013 Plos One 8:e67813; Mei 2014 Neuron 83: 27-49*). DNA 메틸화 및 히스톤 데아세틸화 효소를 표적으로 하는 후생적 변형제는 이러한 질환의 발병을 치료하는 소스가 될 수 있다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0029] 본 발명은 하기 화학식 (I)의 항체-약물-접합체 또는 그의 약학적으로 허용가능한 염에 관한 것으로서,



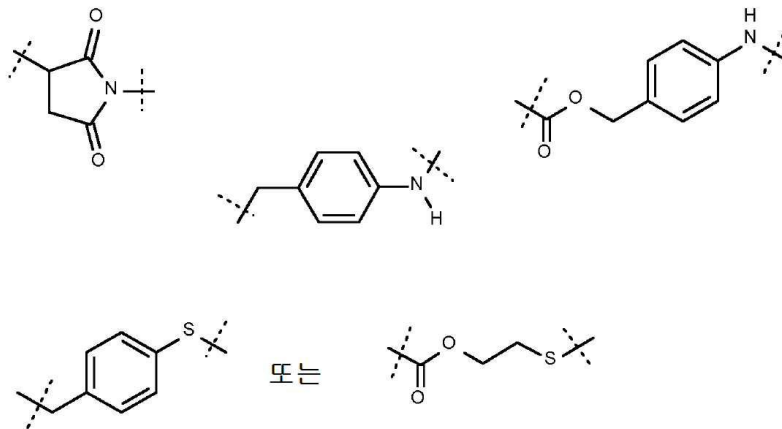
(화학식 I)

[0030]

[0031] 상기에서

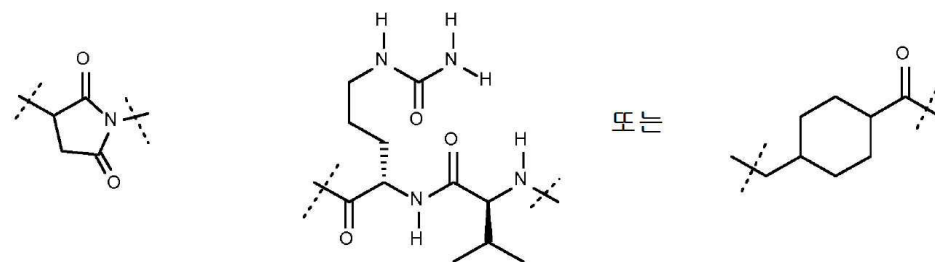
[0032] D는 세포독성 약물 (또한 워헤드 (warhead)라고 함)이고, 벤자미드, 히드록사메이트 또는 티올 기를 아연 결합기 (zinc binding group: ZBG)로서 포함하는 히스톤 데아세틸라제 저해제 약물이며,

[0033] CU는 연결 유닛 (connecting unit)으로서, 부재하거나 또는 하기로부터 선택될 수 있으며:



[0034]

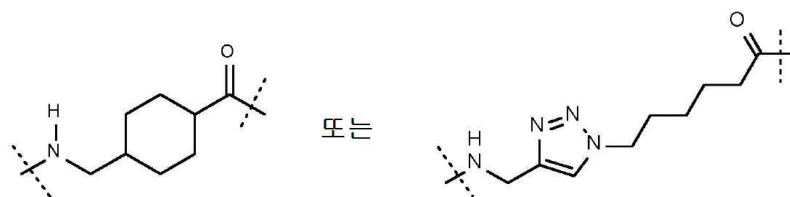
[0035] S1은 스페이서 (spacer)로서, 부재하거나 또는 하기로부터 선택될 수 있고:



[0036]

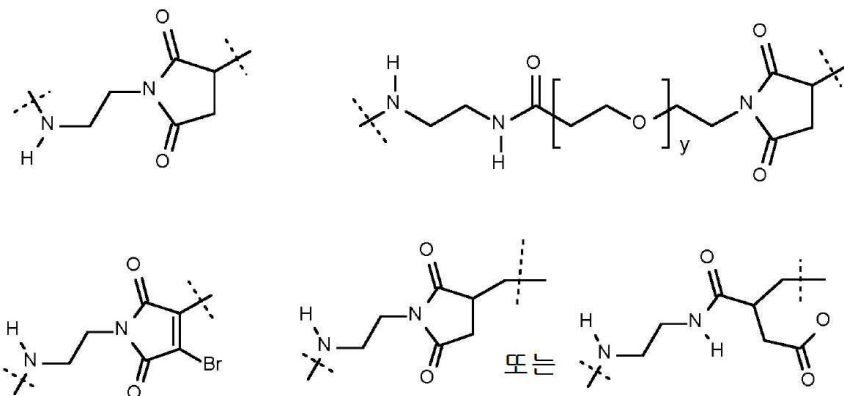
[0037] L은 링커로서, $(CH_2)_q-CO$, $NH-(CH_2)_r-(PEG)_s-(CH_2)_w-CO$, $NH-CO-(CH_2)_r-(PEG)_s-X-(CH_2)_w-CO$ 로부터 선택되며, 여기서 X는 부재하거나, 또는 NH 또는 O일 수 있고, q는 2-8의 정수이며, r은 부재하거나 또는 1-4의 정수이고, s는 부재하거나 또는 1-6의 정수이며, w는 부재하거나 또는 1-2의 정수이고,

[0038] S2는 스페이서로서, 부재하거나 또는 하기로부터 선택될 수 있으며:



[0039]

[0040] CG는 항체의 시스테인 티올기 또는 리신 아미노기로의 접합 후에 형성된 연결기로서, 부재하거나 또는 하기 모이어티 중 하나일 수 있고:



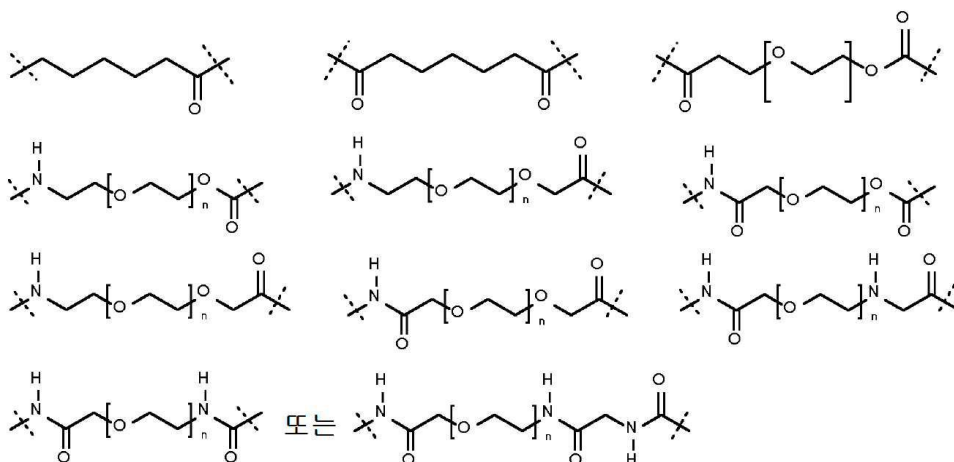
[0041]

[0042] 상기 y는 0 내지 8의 정수이며,

[0043] Ab는 항체 또는 그의 항원 결합 단편이고,

[0044] m, n, o 및 p는 0 또는 1의 정수를 나타낸다.

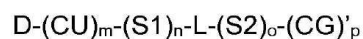
[0045] 상기 링커 (L)는 바람직하게 하기로부터 선택되고:



[0046]

[0047] 상기에서 n은 2-5의 정수이다.

[0048] 구체적으로, 페이로드는 적합한 링커 / 스페이서에 연결된 독소 (HDAC 저해제)이고, 항체로의 접합에 적합한 기 (즉, 말레이미드, NHS 에스테르)를 말단으로 가지며, 화학식 I의 하기 부분을 포함한다:

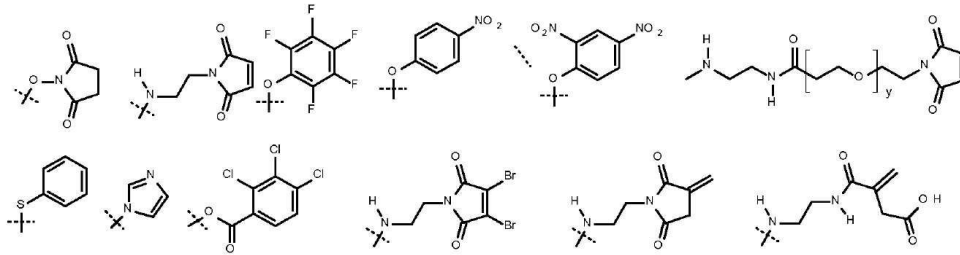


[0049]

화학식 II

[0050] 본 발명에서, 화학식 II의 페이로드에서 (CG)'는 하기 화학식의 NHS (N-히드록시숙신이미드) 또는 활성화된 아

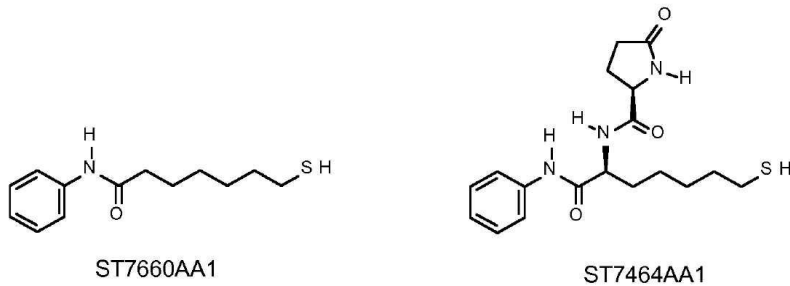
실유도체 (펜타플루로페닐 에스테르, p-니트로 및 2,4-디니트로페놀 에스테르, 티오펜올 에스테르, 아실이미다졸, 이소부틸카르보네이트, 트리클로로벤조산 무수물 포함), 또는 말레이미드- 또는 3-메틸렌숙신이미드, 3,4-디브로모 말레이미드 또는 {아미노-카르보닐}-3-부테노산일 수 있다:



[0051]

[0052]

구체적으로, 본 발명은 위헤드로서 HDAC 저해제를 갖는 ADC에 관한 것으로서, 하기 화학식을 갖는 티올-기반 히스톤 데아세틸라제 저해제, 예컨대 ST7464AA1 및 ST7660AA1 (보리노스타트의 티올 유사체):

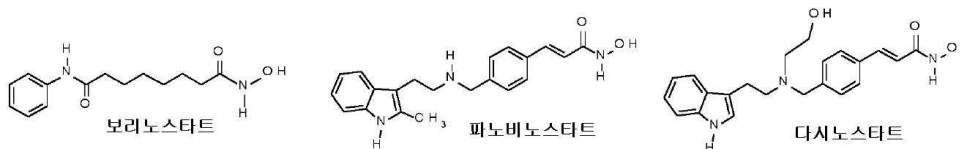


[0053]

티올-기반 SAHA (보리노스타트) 유사체 상응하는 티오아세틸 ST7612AA1 (프로드러그)의 티올 (활성 약물)

[0054]

또는 하기 화학식을 갖는 히드록삼산 기반 히스톤 데아세틸라제 저해제 (HDACs), 예컨대 보리노스타트 (SAHA), 파노비노스타트 (LBH589), 또는 다시노스타트 (dacinostat) (LAQ824):



[0055]

[0056]

또는 하기 화학식을 갖는 벤자미드 기반 히스톤 데아세틸라제 저해제 (HDACs) 예컨대 엔티노스타트 (entinostat) (MS275):

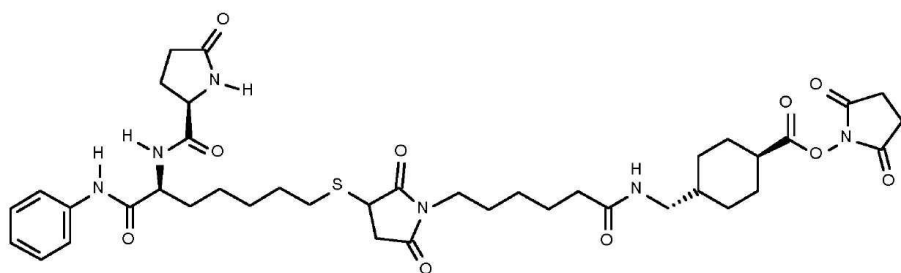


[0057]

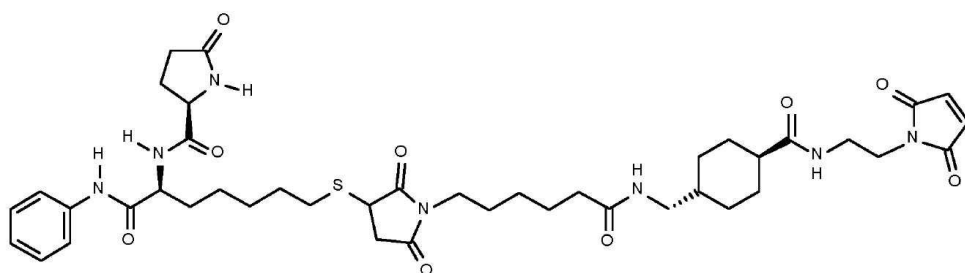
로부터 선택된다.

[0058]

상기 히스톤 데아세틸라제 저해제 및 $D-(CU)_m-(S1)_n-L-(S2)-(CG)'_p-$ (화학식 II)를 포함하는 페이로드를 하기로 부터 선택된 화합물일 수 있다:

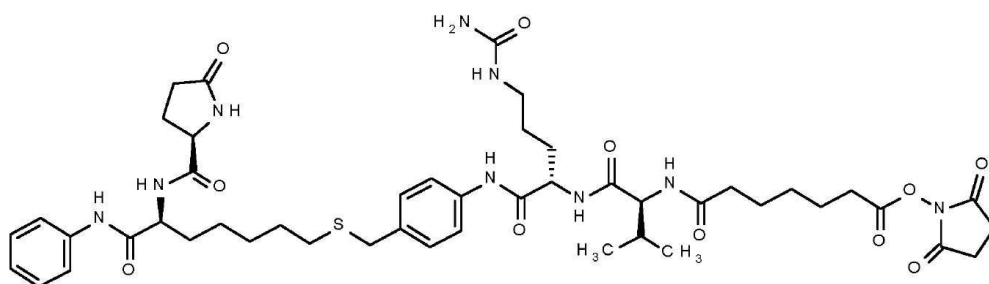


ST8128AA1 (1)

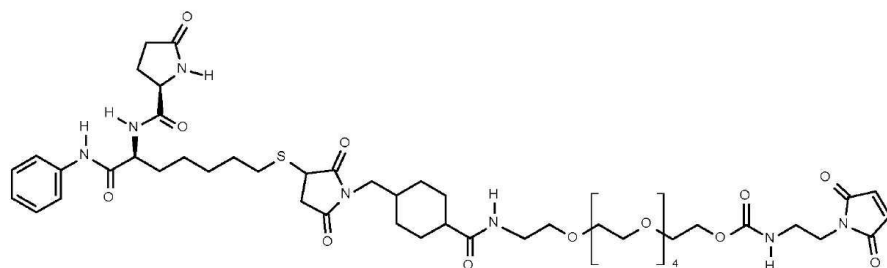


ST8152AA1 (2)

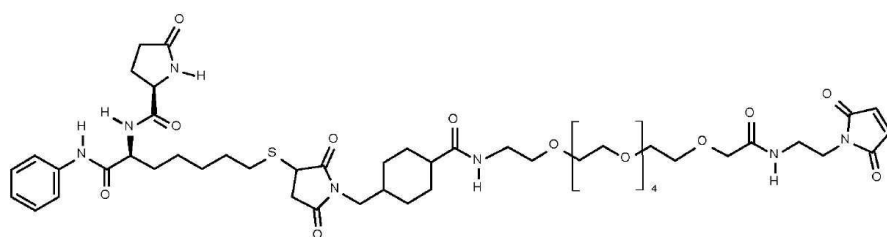
[0059]



ST8132AA1 (3)

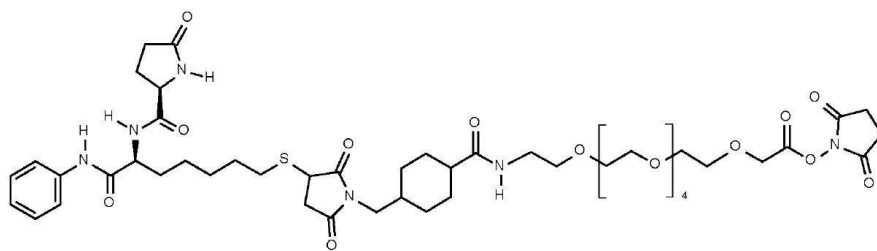


ST8190AA1 (4)

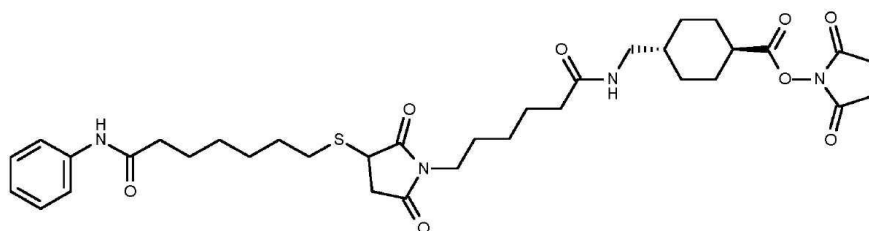


ST8189AA1 (5)

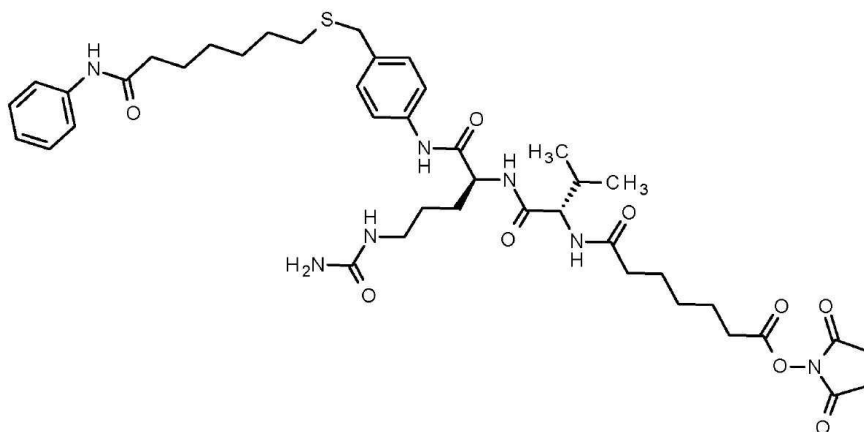
[0060]



ST8191AA1 (6)



ST8197AA1 (7)

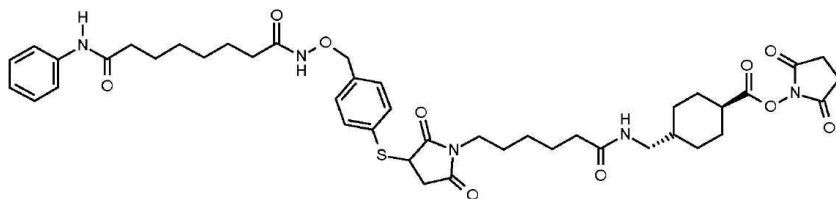


ST8235AA1 (8)

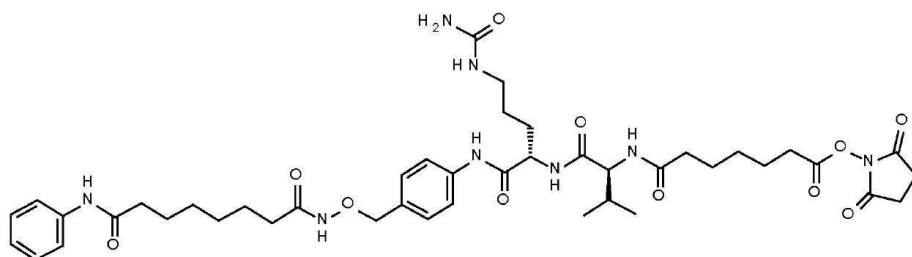
[0061]

[0062]

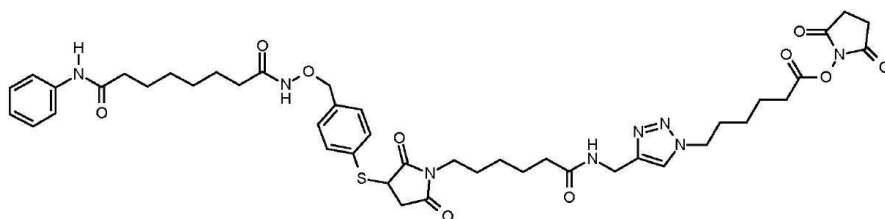
부가의 구현예에서, 본 발명은 항체-약물-접합체에 관한 것으로서, 상기 히스톤 데아세틸라제 저해제 약물 및 구조 $D-(CU)_m-(S1)_n-L-(S2)-(CG)'_p$ 를 포함하는 페이로드를 하기로부터 선택된다:



ST8217AA1 (9)

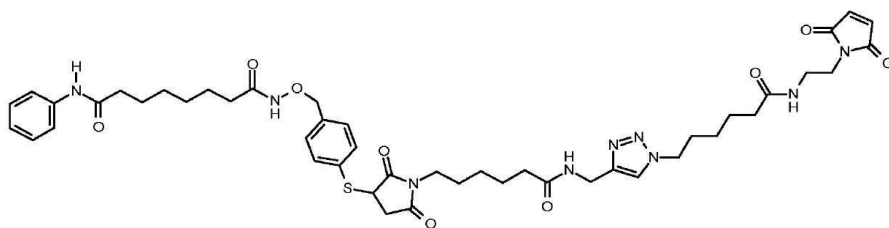


ST8201AA1 (10)

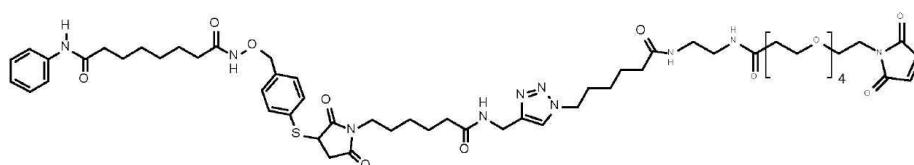


ST8215AA1 (11)

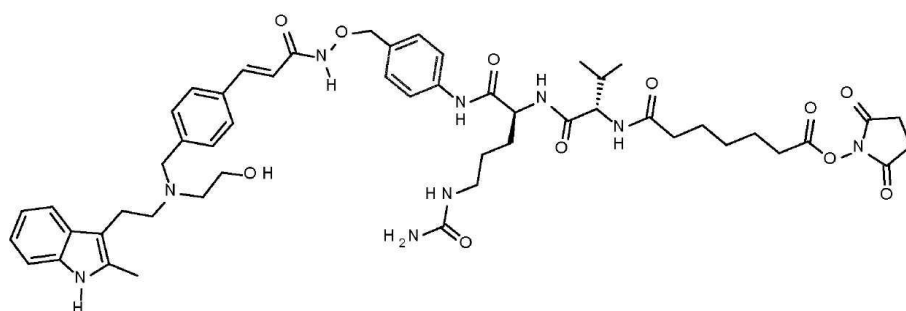
[0063]



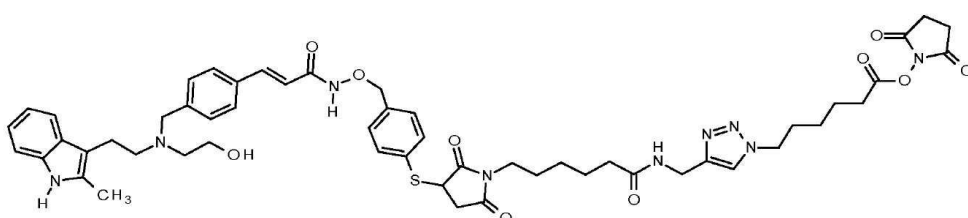
ST8216AA1 (12)



ST8236AA1 (13)

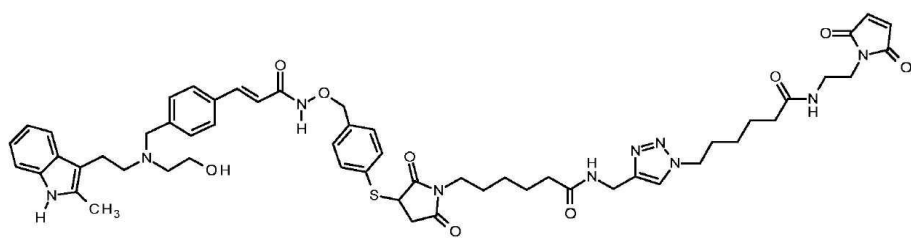


ST8232AA1 (14)

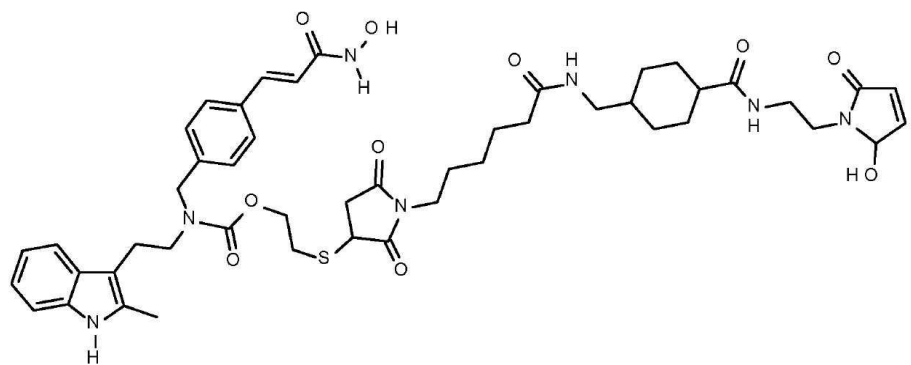


ST8233AA1 (15)

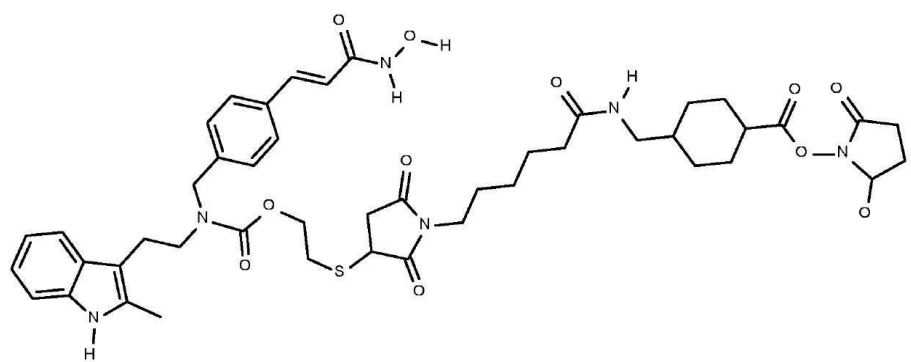
[0064]



ST8234AA1 (16)

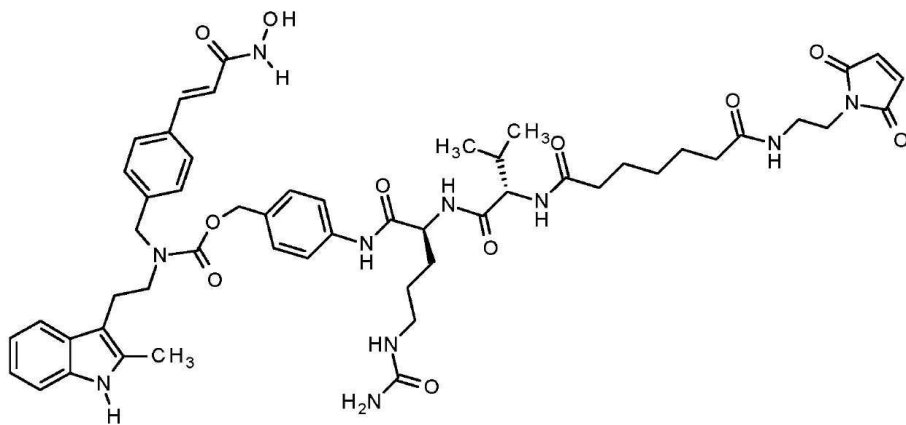


ST8229AA1 (17)



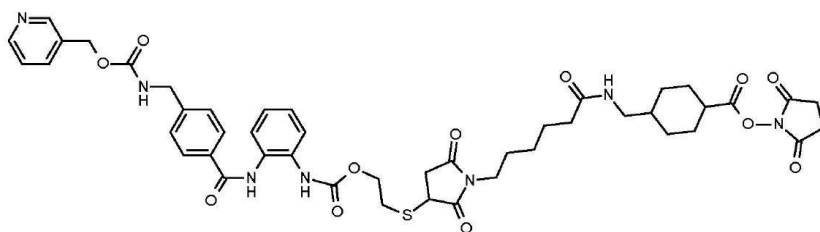
ST8230AA1 (18)

[0065]

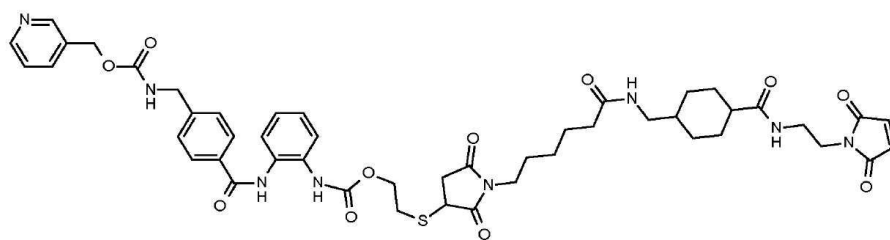


ST8231AA1 (19)

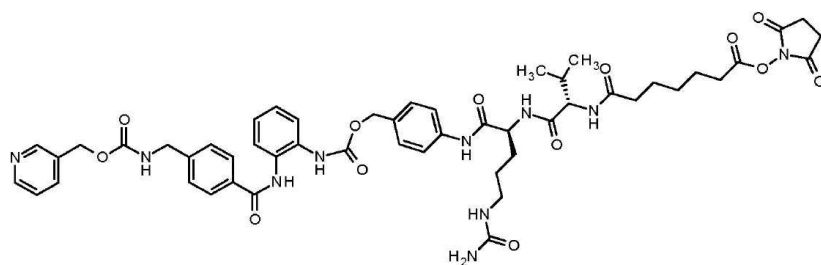
부가의 구현예에서, 본 발명은 페이로드-약물-접합체에 관한 것으로서, 상기 페이로드-약물 접합체는 하기로부터 선택된다:



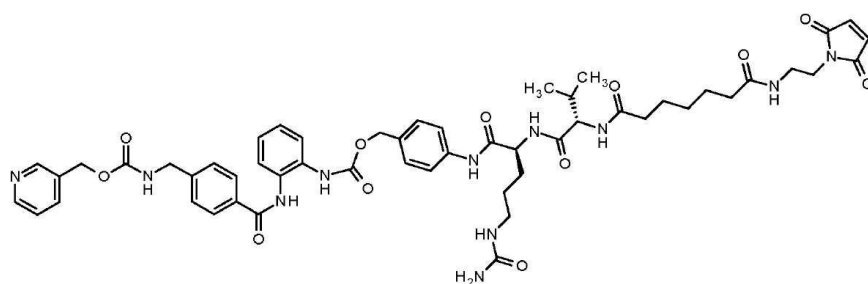
ST8225AA1 (20)



ST8226AA1 (21)



ST8227AA1 (22)



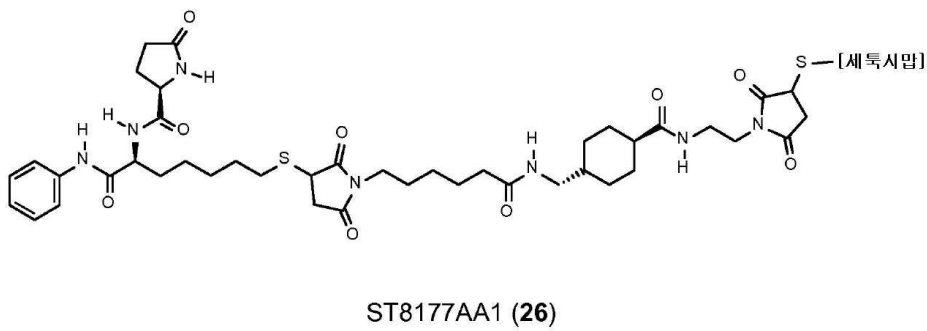
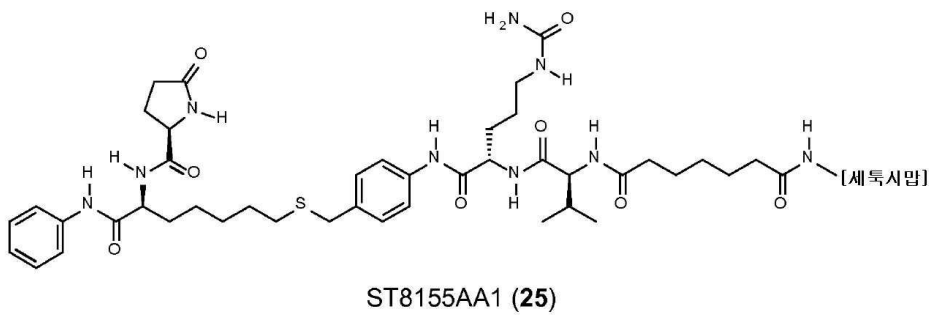
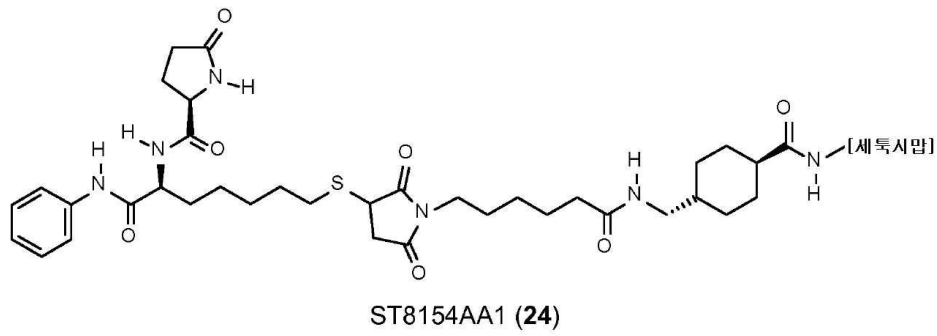
ST8228AA1 (23)

[0069]

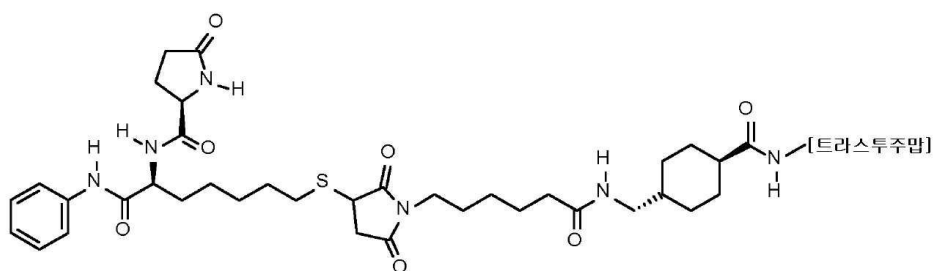
[0070]

본 발명의 부가의 구현예에서, 상기 항체-약물-접합체 (ADC)는 화합물 1-23으로부터 유래된다.

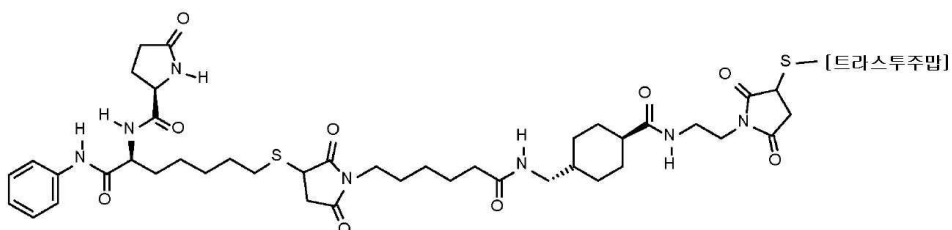
[0071] 부가의 구현예에서, 상기 ADC는 화학식 24-37로 나타내는 화합물로부터 선택된다:



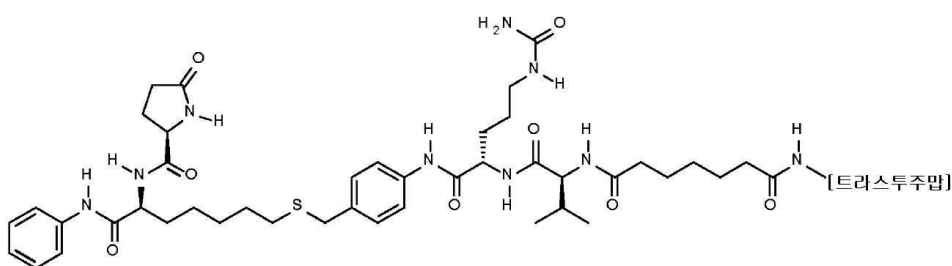
[0072]



ST8178AA1 (27)

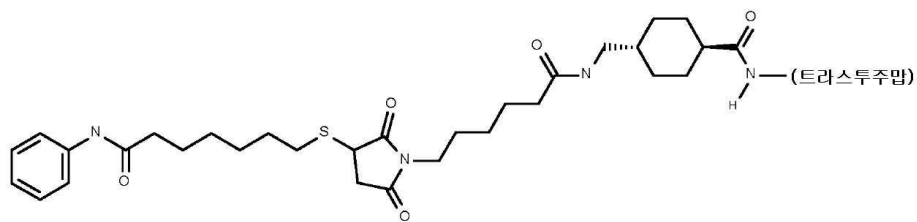


ST8176AA1 (28)

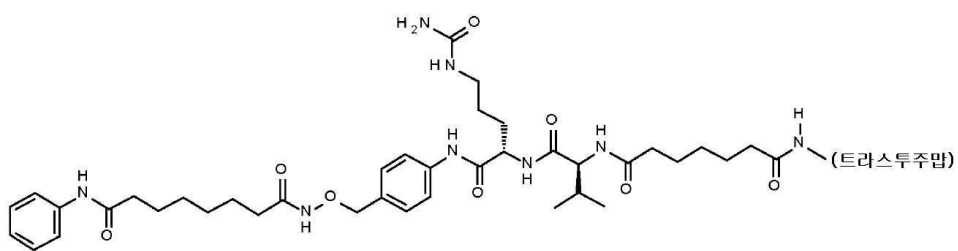


ST8179AA1 (29)

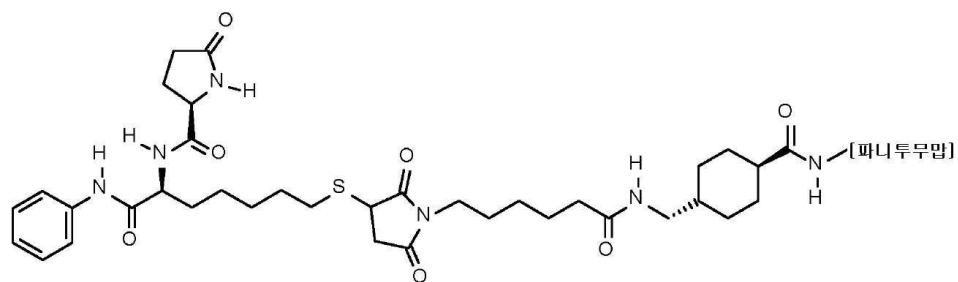
[0073]



ST8205AA1 (30)

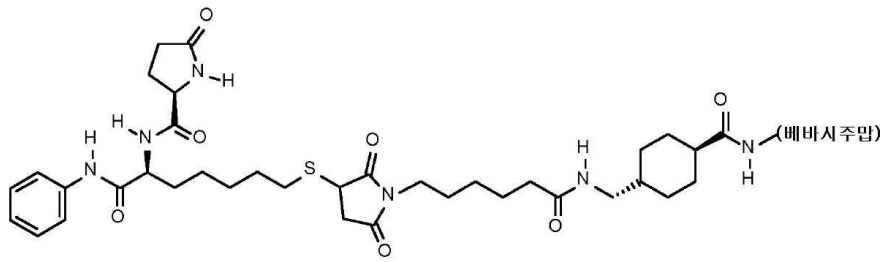


ST8202AA1 (31)

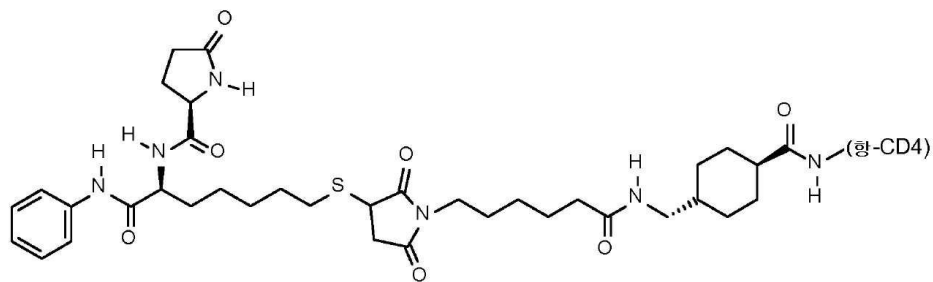


ST8193AA1 (32)

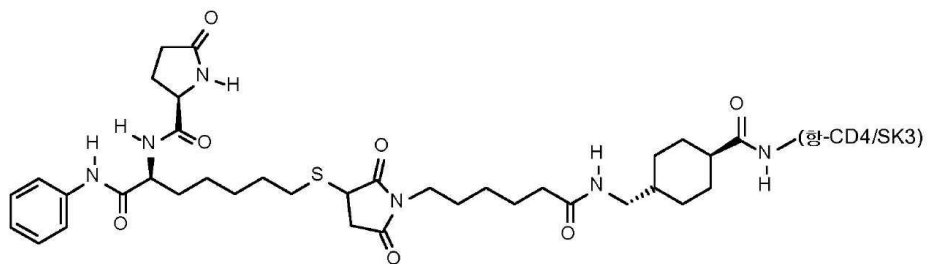
[0074]



ST8194AA1 (33)

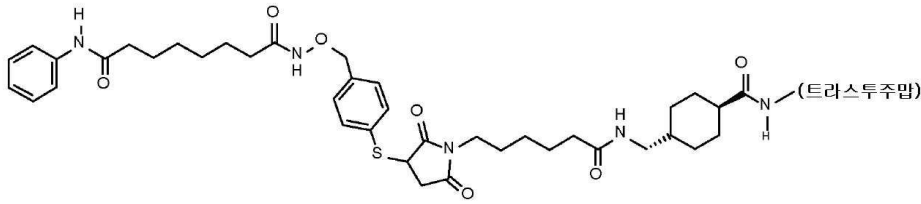


ST8212AA1 (34)

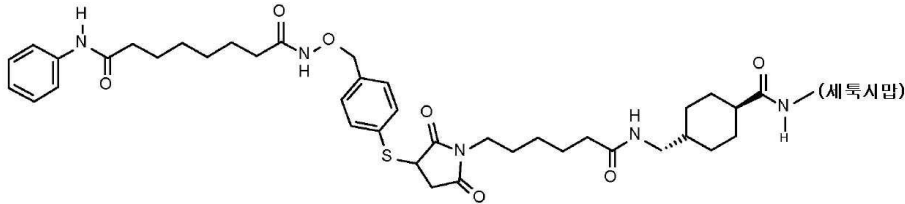


ST8213AA1 (35)

[0075]



ST8218AA1 (36)



ST8219AA1 (37)

[0076]

[0077]

화학식 24 내지 29의 ADC가 특히 바람직하다.

[0078]

본 발명의 부가의 구현예는 mAb가 본 발명에 지시된 것으로부터 선택된 것일 수 있는 다른 ADC이다.

[0079]

본 발명은 또한 치료적으로 유효한 양의 화학식 I의 유도체 및 약학적으로 허용가능한 부형제를 포함하는 약학적 조성물을 제공한다.

[0080]

약학적 조성물은 장관 (enteral) 또는 비경구 투여를 위한 것일 수 있고, 상기 장관 투여는 경구, 에어로졸, 직장 또는 볼 경로를 포함하고, 비경구 투여는 피하, 근육내 또는 정맥내, 및 진피내 경로를 포함한다.

[0081]

본 발명은 또한 알려져 있는 다른 항암 치료법, 예컨대 방사선 요법 또는 화학요법과 병용하여, 세포증식억제제 또는 세포독성제, 항생제-타입 작용제 (antibiotic-type agents), 알킬화제, 대사길항제 (antimetabolite agents), 호르몬제, 인터페론 타입 작용제 (interferon type agents), 시클로옥시게나제 저해제 (예: COX-2 저해제), 금속단백분해효소 (metalloproteinase) 저해제, 텔로머라제 (telomerase) 저해제, 티로신 키나제 저해제, 항-성장 인자 수용체 작용제 (anti-grow factor receptor agents), 항-HER2 작용제, 항-EGFR 작용제, 항-혈관형성 작용제 (예: 혈관형성 저해제), 파르네실 트랜스퍼라제 저해제 (farnesyl transferase inhibitors), ras-raf 신호 전달 경로 저해제, 세포 주기 저해제, 다른 cdk 저해제, 튜블린 결합제, 토포이소머라제 I 저해제, 토포이소머라제 II 저해제 등과 병용한, 치료적으로 유효한 양의 화학식 I의 유도체를 포함하는 약학적 조성물을 제공한다.

[0082]

또한, 본 발명은 항암 요법에서 동시에, 개별적으로 또는 순차적으로 사용하기 위한 조합 제제로서 상기에 정의된 화학식 (I)의 유도체 또는 그의 약학적으로 허용가능한 염, 및 하나 이상의 화학요법제를 포함하는 제품을 제공한다.

[0083]

또 다른 양상에서, 본 발명은 약제로서 사용하기 위한 상기에 정의된 화학식 (I)의 유도체 또는 그의 약학적으로 허용가능한 염을 제공한다.

[0084]

더욱이, 본 발명은 암 또는 종양 치료용 본 발명의 항체-약물-접합체 또는 상기 약물 항체 접합체를 포함하는 약학적 조성물에 관한 것이다. 본 발명은 특히 ErbB1, ErbB2 및/또는 ErbB3 수용체를 발현하는 암 또는 종양의 치료에 관한 것이다. 본 발명에 따라 치료될 암의 특정 예로는 방광 암종, 유방 암종, 결장 암종, 신장 암종, 간 암종, 소세포 폐암을 포함하는 폐 암종, 식도 암종, 담낭 암종, 난소 암종, 췌장 암종, 위 암종, 자궁경부 암종, 갑상선 암종, 전립선 암종, 및 편평 세포 암종을 포함하는 피부 암종을 포함하는 암종; 백혈병, 급성 림프구 백혈병, 급성 림프모구 백혈병, B-세포 림프종, T-세포 림프종, 호지킨 림프종, 비-호지킨 림프종, 털세포 림프종 (hairy cell lymphoma) 및 버킷 림프종 (Burkitt's lymphoma)을 포함하는 림프계 조혈 종양; 급성 및 만성 골수성 백혈병, 골수형성이상 증후군 및 전골수세포 백혈병을 포함하는 골수계 조혈 종양; 섬유육종 및 횡

문근육종을 포함하는 중간엽 기원 종양; 별아교세포종, 신경모세포종, 신경아교종 및 슈반세포종 (schwannoma) 을 포함하는 중추 및 말초 신경계 종양; 및 흑색종, 고환종, 기형암종 (teratocarcinoma), 골육종, 색소성 건피 증 (xeroderma pigmentosa), 각질가시세포종 (keratoxanthoma), 갑상선 소포암 (thyroid follicular cancer), 카포시 육종 (Kaposi's sarcoma) 및 중피종을 포함하는 기타 종양이 있다. 또한, 상기 HDACi-기반 ADC에 의해 유도된 HIV 재활성화는 잠재적으로 바이러스 은둔처의 박멸을 목적으로 하는 신규한 요법에 유용할 수 있다 (Badia 2015 Antiviral Res 123: 62-9). 이와 관련하여, 전술한 항체-약물-접합체는 HIV 치료용 보조 요법으로서 사용될 수 있다.

[0085]

더욱이, 본 발명은 상기 항체-약물-접합체를 포함하는 약학적 조성물뿐만 아니라 ErbB1, ErbB2 또는 ErbB3으로부터 선택된 수용체를 발현하는 암 또는 종양 치료에 사용하기 위한 상기 항체-약물-접합체 또는 상기 약학적 조성물에 관한 것이다.

발명의 효과

[0086]

본 발명의 항체-약물-접합체는 동일한 농도, 경로 및 스케줄로 제공된, 단일 항체 및 세포독성제보다 더 효능이 있었다. 더욱이, 이는 항체에 접합된 HDAC 저해제와 같은 세포독성제가 최적 이하의 투여량 (suboptimal dosages)으로 링커 또는 타입 접합 (리신 또는 시스테인)에 의존하지 않고 매우 효과적이라는 것이 놀라웠다. 그 후에, 이들 HDAC 저해제-기반 ADC는 상응하는 항체보다 더 적은 투여량으로 항종양 효능을 획득하도록 함으로써, 적은 독성을 초래한다.

도면의 간단한 설명

[0087]

도 1은 세특시맵 (상부) 및 페이로드-NHS ST8128AA1 (1)을 갖는 그의 접합된 형태 ST8154AA1 (24) (하부)의 MALDI 질량 스펙트럼을 나타낸다. 질량 차이로부터 산출된 DAR은 8.9이었다.

도 2는 트라스투주맙 (상부) 및 페이로드-NHS ST8128AA1 (1)을 갖는 그의 접합된 형태 ST8178AA1 (27) (하부)의 MALDI 질량 스펙트럼을 나타낸다. 질량 차이로부터 산출된 DAR은 6.9이었다.

도 3은 상이한 종양 세포주에 대한 네이티브 세특시맵 및 세특시맵-유래 ADC, ST8154AA1 (24) 및 ST8177AA1 (26) (A) 또는 ST8219AA1 (37) (B)의 결합 (FACS 분석)을 나타낸다. 항체 결합은 FITC-접합된 마우스 항-인간 Ig (BD)에 의해 검출되었다. 회색 피크는 1차 항체가 없는 세포를 나타낸다.

도 4는 상이한 종양 세포주에 대한 네이티브 트라스투주맙 및 트라스투주맙-유래 ADC, ST8178AA1 (27) 및 ST8176AA1 (28) (A), 또는 ST8205AA1 (30) 및 ST8218AA1 (36) (B)의 결합 (FACS 분석)을 나타낸다. 항체 결합은 FITC-접합된 마우스 항-인간 Ig (BD)에 의해 검출되었다. 회색 피크는 1차 항체가 없는 세포를 나타낸다.

도 5는 항원-특이적 ELISA에 의해 테스트된 ADC의 면역반응성을 나타낸다. A) 재조합 인간 EGF-R/Erb1 Fc 키메라, 또는 B) 재조합 인간 ErbB2/HER2 단백질에 대한 활성을 측정하였다. 항-인간 K 경쇄 호스래디시 퍼옥시다제 (horseradish peroxidase: HRP)-접합된 항체 및 TMB 기질 첨가를 통해 검출하였다. ELISA 분광광도계로 450 nm에서 광학 밀도를 측정하였다. 결과는 2개의 독립적인 반복 실험의 평균(±SD)이다.

도 6은 6일의 치료 시에 NCI-H1975 비-소세포 폐 암종 세포에서 ST8154AA1 (24)의 항증식 활성을 나타낸다. 상기 ADC의 IC50 값±SD는 세특시맵과 비교하여 250±10 nM이었고, 이는 효과적이지 않았다 (IC50 >500 nM).

도 7은 6일의 치료 시에 Calu-3 비-소세포 폐 암종 세포에서 ST8154AA1 (24)의 항증식 활성을 나타낸다. 상기 ADC의 IC50 값 ±SD는 세특시맵과 비교하여 450±10 nM이었고, 이는 효과적이지 않았다 (IC50 >500 nM).

도 8은 상이한 종양 세포주에서 아세틸화-α-튜불린의 수준에 대한 세특시맵-유래 ADC ST8154AA1 (24) 및 ST8177AA1 (26) (A), 또는 ST8219AA1 (37) (B)의 효과를 나타낸다. 세포를 항체 (5 µg/mL)와 37°C에서 3시간 배양하였다. 2회 세척한 후에, 세포를 고정하였고, 마우스 항-아세틸화-α-튜불린 IgG, 그 다음에 FITC-접합된 염소 항-마우스 IgG로 염색하였다. Draq5 염료로 핵과 세포질을 염색하였다. Insets은 아세틸화-α-튜불린에 특이적으로 결합한 형광 신호를 나타낸다. 형광 이미징화는 High Content Screening (HCS) Operetta에 의해 수행되었다. 각 이미지는 적어도 5개의 중복 웰 필드를 나타낸다. 배율 60x. 데이터는 둘 중 하나의 대표적인 실험으로부터 획득되었다.

도 9a 및 도 9b는 상이한 종양 세포주에서 아세틸화-α-튜불린의 수준에 대한 트라스투주맙-유래 ADC ST8178AA1 (27) 및 ST8176AA1 (28) (A), 또는 ST8202AA1 (31), ST8205AA1 (30) 및 ST8218AA1 (36) (B)의 효과를 나타낸다. 세포를 항체 (5 µg/mL)와 37°C에서 3시간 배양하였다. 2회 세척한 후에, 세포를 고정하였고, 마우스

스 항-아세틸화- α -튜불린 IgG, 그 다음에 FITC-접합된 염소 항-마우스 IgG로 염색하였다. Draq5 염료로 핵과 세포질을 염색하였다. Insets은 아세틸화- α -튜불린에 특이적으로 결합한 형광 신호를 나타낸다. 형광 이미지는 High Content Screening (HCS) Operetta에 의해 수행되었다. 각 이미지는 적어도 5개의 중복 웰 필드를 나타낸다. 배율 60x. 데이터는 둘 중 하나의 대표적인 실험으로부터 획득되었다.

도 10은 상이한 종양 세포주에서 아세틸화-히스톤 H3의 수준에 대한 세톡시맙-유래 ADC ST8154AA1 (**24**) 및 ST8177AA1 (**26**) (A), 또는 ST8219AA1 (**37**) (B)의 효과를 나타낸다. 세포를 항체 (5 μ g/mL)와 37°C에서 3시간 배양하였다. 2회 세척한 후에, 세포를 고정하였고, 토끼 항-아세틸화-히스톤 H3 IgG, 그 다음에 FITC-접합된 염소 항-토끼 IgG로 염색하였다. Draq5 염료로 핵과 세포질을 염색하였다. Insets은 아세틸화-히스톤 H3에 특이적으로 결합한 형광 신호를 나타낸다. 형광 이미지는 High Content Screening (HCS) Operetta에 의해 수행되었다. 각 이미지는 적어도 5개의 중복 웰 필드를 나타낸다. 배율 60x. 데이터는 둘 중 하나의 대표적인 실험으로부터 획득되었다.

도 11은 상이한 종양 세포주에서 아세틸화-히스톤 H3의 수준에 대한 트라스투주맙-유래 ADC ST8178AA1 (**27**) 및 ST8176AA1 (**28**) (A), 또는 ST8202AA1 (**31**), ST8205AA1 (**30**) 및 ST8218AA1 (**36**) (B)의 효과를 나타낸다. 세포를 항체 (5 μ g/mL)와 37°C에서 3시간 배양하였다. 2회 세척한 후에, 세포를 고정하였고, 토끼 항-아세틸화-히스톤 H3 IgG, 그 다음에 FITC-접합된 염소 항-토끼 IgG로 염색하였다. Draq5 염료로 핵과 세포질을 염색하였다. Insets은 아세틸화- α -히스톤 H3에 특이적으로 결합한 형광 신호를 나타낸다. 형광 이미지는 High Content Screening (HCS) Operetta에 의해 수행되었다. 각 이미지는 적어도 5개의 중복 웰 필드를 나타낸다. 배율 60x. 데이터는 둘 중 하나의 대표적인 실험으로부터 획득되었다.

도 12는 A549 (A) 및 SKBR3 (B) 세포주에서 α -튜불린 및 히스톤 H4의 아세틸화에 대한 ADC의 효과를 나타낸다. 세포를 항체 (20 μ g/mL)와 37°C에서 3시간 배양하였고, 그 다음에 웨스턴 블롯 (Western Blot) 분석을 총 단백질 용해물 (lysates)에서 수행하였다. 대표적인 블롯 (blots)을 나타내었다.

도 13은 sc NCI-H1975 종양 보유 마우스에서 세톡시맙과 비교하여, 스케줄 q4dx4에 따라 복강내로 제공된 ST8155AA1 (**25**), ST8154AA1 (**24**), 및 ST7612AA1의 항종양 활성을 나타낸다. 종양 세포 (5×10^6)를 마우스의 우측 옆구리에 sc 주사하였다. ADC 및 세톡시맙을 50 mg/kg의 투여량으로 제공하였고, 반면 ST7612AA1은 120 mg/kg의 투여량으로 제공하였다. 종양 병변을 디지털 캘리퍼 (digital caliper)로 평가하였다 (n=8 마우스/그룹; 평균 및 SEM, 세톡시맙 단독에 대해 ° ° ° P < 0.001 및 ° ° P < 0.01, Mann-Whitney 검정).

도 14는 5×10^6 A549 세포의 s.c. 주사 후에 Nu/Nu 마우스에서 발생한 종양에서, 세톡시맙과 비교하여, ADC ST8154AA1 (**24**)의 항종양 효과를 나타낸다. 병변 발생 및 항체 치료에 대한 반응은 디지털 캘리퍼를 사용하여 모니터링되었다. 마우스에게 (**24**) 및 세톡시맙 (4일에 한번 50 mg/kg의 4회 투여량) 또는 PBS를 i.p.로 주사하였다 (n=10 마우스/그룹; 평균 및 SEM, 세톡시맙에 대해 ° P < 0.05; 비히클에 대해 **P < 0.01 및 *P < 0.05, Mann-Whitney 검정).

도 15는 5×10^6 A549-luc-C8 (A549luc) 세포를 면역결핍 SCID/베이지 마우스 (beige mice)의 꼬리 정맥에 주사하여 생성된 인공 전이 폐암에 대해 세톡시맙 (Ctx)과 비교한 ST8154AA1 (**24**)의 항전이 활성을 나타낸다. 종양 생체발광 이미징 (bioluminescence imaging: BLI)을 루시페린 (150 μ g/마우스)의 i.p. 주사 후에, 상이한 시점 (세포 주사로부터 +35, +49 및 +56 일)에서 Xenogen IVIS Imaging System 200으로 기록하였다. 마우스를 PBS 또는 ST8154AA1 또는 Ctx (100 μ g/mL 용액의 3.5 mL) q7dx4로 에어로졸에 의해 치료하였다 (n=12 마우스/그룹; 평균 및 SEM, Ctx에 대해 ° ° P < 0.01; 비히클에 대해 *P < 0.05 및 **P < 0.01).

도 16은 정위 종양 체장에 대해 세톡시맙 (Ctx) 및 ST7612AA1과 비교한 ST8154AA1 (**24**)의 항종양 효과를 나타낸다. 종양 세포 1×10^6 을 체장에 직접 주사하였다. 종양 중량을 종양 주입하고 90일 후에 평가하였다. 마우스를 (**24**) 또는 Ctx (4일에 한번 40 mg/kg의 4회 투여량), PBS 및 ST7612AA1 (200 mg/kg, q4dx4)로 복강내 치료하였다 (n=10 마우스/그룹); 평균 및 SEM, Ctx에 대해 ° P < 0.05, 비히클에 대해 *P < 0.05 및 **P < 0.01.

도 17은 누드 마우스에 sc로 이식된 환자-유래 종양 이종이식편 (patient-derived tumor xenograft: PDX) 체장 암종에 대해 복강내로 전달된 세톡시맙 (q4dx5)과 비교한 ST8154AA1 (**24**)의 항종양 활성을 나타낸다. NOD SCID 마우스에게 환자 PA5363 유래의 종양 세포 (51000 세포)를 sc로 제공하였다. 종양 보유 마우스의 치료는 40 mg/kg 투여량의 ADC로 ip로 수행하였다. 종양 성장은 디지털 캘리퍼로 평가되었다 (n=10 마우스/그룹). 평균

및 SEM, 세특시삽에 대해 ° P<0.05, 비히클에 대해 *** P<0.001.

도 18은 SKOV-3 난소 암종에 대해 스케줄 q4dx4에 따라 복강내로 전달된 트라스투주맙과 비교한 ST8178AA1 (27)의 항종양 활성을 나타낸다. 5×10^6 SKOV-3 난소 세포의 s.c. 주사 후에 Nu/Nu 마우스에서 종양이 발생하도록 하였다. 치료는 15 mg/kg의 ADC 및 트라스투주맙으로 ip로 수행하였다 (n=11 마우스/그룹; 평균 및 SEM, 비히클에 대해 * P<0.05, 트라스투주맙에 대해 ° P<0.05, Mann-Whitney 검정).

도 19는 SKOV-3 난소 암종에 대해 스케줄 q4dx4에 따라 복강내로 전달된 트라스투주맙과 비교한 ST8176AA1 (28)의 항종양 활성을 나타낸다. 5×10^6 SKOV-3 난소 세포의 s.c. 주사 후에 Nu/Nu 마우스에서 종양이 발생하도록 하였다. 치료는 30 및 15 mg/kg의 ADC 및 트라스투주맙으로 ip로 수행하였다 (n=12 마우스/그룹; 평균 및 SEM, 비히클에 대해 * P<0.05, 트라스투주맙에 대해 ° P<0.05, Mann-Whitney 검정).

도 20은 SKOV-3 난소 암종에 대해 스케줄 q4dx4에 따라 복강내로 전달된 트라스투주맙과 비교한 ST8176AA1 (28)의 항종양 활성을 나타낸다. 10×10^6 SKOV-3 난소 세포의 i.p. 주사 후에 Nu/Nu 마우스에서 종양이 발생하도록 하였다. 치료는 15 mg/kg의 ADC 및 트라스투주맙으로 ip로 수행하였다 (n=9 마우스/그룹). 생존 곡선은 Kaplan-Meier 분석에 의해 플로팅하였다. 비히클에 대해 * P<0.05 및 ** P<0.01, 트라스투주맙에 대해 ° P<0.05.

도 21은 LS174-T 결장 암종에 대해 스케줄 q4dx4에 따라 복강내로 전달된 트라스투주맙과 비교한 ST8176AA1 (28)의 항종양 활성을 나타낸다. 10×10^6 LS174T 결장암 세포의 i.p. 주사 후에 Nu/Nu 마우스에서 종양이 발생하도록 하였다. 치료는 15 mg/kg의 ADC 및 트라스투주맙으로 ip로 수행하였다 (n=10 마우스/그룹). 생존 곡선은 Kaplan-Meier 분석에 의해 플로팅하였다. P 값은 양면 로그 순위-검정 (two-sides log rank-test)을 사용하여 산출하였다. 비히클에 대해 * P<0.05 및 트라스투주맙에 대해 ° P<0.05.

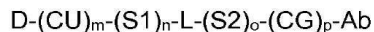
도 22는 LS-174T 결장 암종에 대해 스케줄 q4dx4에 따라 복강내로 전달된 트라스투주맙과 비교한 ST8176AA1 (28)의 항종양 활성을 나타낸다. 5×10^6 LS174-T 결장암 세포의 s.c. 주사 후에 Nu/Nu 마우스에서 종양이 발생하도록 하였다. 치료는 15 mg/kg의 ADC 및 트라스투주맙으로 ip로 수행하였다 (n=10 마우스/그룹; 평균 및 SEM, 비히클에 대해 * p<0.05, 트라스투주맙에 대해 ° P<0.05, Mann-Whitney 검정).

도 23은 PDX (patient-derived xenograft) 췌장암에 대해 스케줄 q4dx4에 따라 복강내로 전달된 트라스투주맙과 비교한 ST8176AA1 (28)의 항종양 활성을 나타낸다. 환자 PA5363 유래의 인간 췌장 종양 세포 (77×10^3)를 NOD-SCID 마우스에 sc로 주사하였다. 치료는 15 mg/kg의 ST8176AA1 또는 트라스투주맙으로 수행하였다. (n=10 마우스/그룹; 평균 및 SEM, 비히클에 대해 * P<0.05 및 트라스투주맙에 대해 ° P<0.05, Mann-Whitney 검정).

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0088] 본 발명은 HDACi-기반 페이로드에 접합된 항암 항체로 이루어진 신규한 ADC에 관한 것이다. 이러한 ADC는 종양 수용체에 특이적으로 결합하고, 내재화되어, 리소솜으로 전달되는 것으로 나타났다. 이러한 특성은 놀랍게도 HDAC 페이로드의 낮은 효능에도 불구하고 인 비트로 세포독성 및 인 비보 항종양 활성과 상관 관계가 있다. 본 발명의 항체-약물-접합체는 하나 이상의 히스톤 데아세틸라제 이소형의 조절 및 ErbB 수용체의 발현이 치료적 중재에 효과적인 종양 또는 임의의 다른 질환 치료에 특히 유용하다.
- [0089] 본 발명은 암 치료에 사용되는 항체, 구체적으로 면역글로불린에 링커에 의해 접합된 안전한 HDACi를 포함하는 안전하고 효능이 있는 ADC를 개시하였다. 후생적인 조절제인, HDAC 저해제는 음성 및 독성 효과가 감소된 ADC 구성을 가능하게 한다.
- [0090] 본 발명의 바람직한 구현예로는 예로서 폐암, 유방암, 결장암, 뇌암, 두경부암, 자궁내막암, 신장암, 췌장암, 위암, 식도암, 난소암 및 전립선암 및 백혈병을 포함하는, ErbB1, ErbB2 또는 ErbB3과 같은 수용체를 발현하는 암 치료를 위한 HDACi-기반 ADC의 용도가 있다.

[0091] 본 발명은 하기 화학식 (I)의 항체-약물-접합체 또는 그의 약학적으로 허용가능한 염에 관한 것으로서,



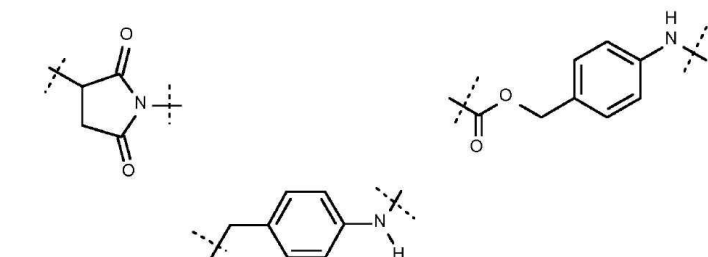
(화학식 I)

[0092]

[0093] 상기에서

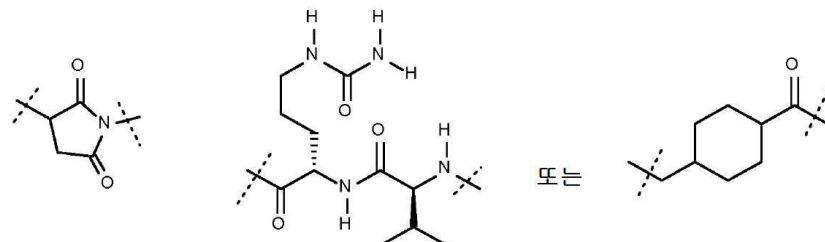
[0094] D는 세포독성 약물 (또한 워헤드라고 함)이고, 벤자미드, 히드록사메이트 또는 티올 기를 아연 결합기 (ZBG)로서 포함하는 히스톤 데아세틸라제 저해제 약물이며,

[0095] CU는 연결 유닛으로서, 부재하거나 또는 하기로부터 선택될 수 있으며:



[0096]

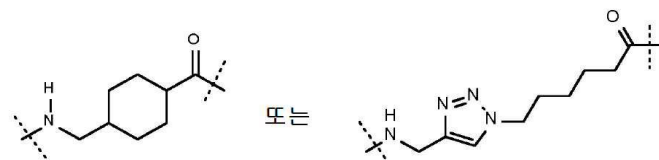
[0097] S1은 스페이서로서, 부재하거나 또는 하기로부터 선택될 수 있고:



[0098]

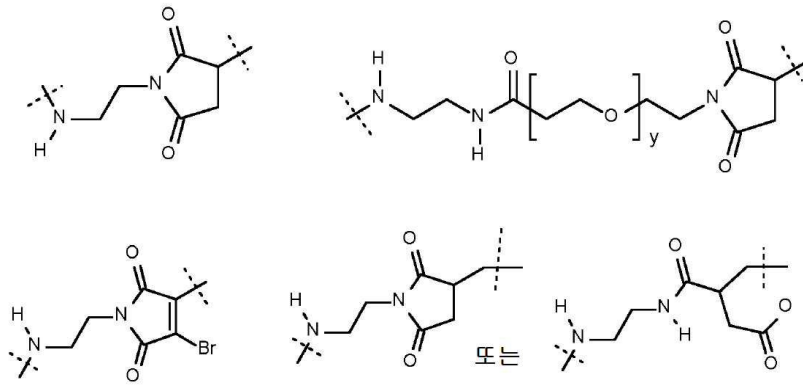
[0099] L은 링커로서, $(CH_2)_q-CO$, $NH-(CH_2)_r-(PEG)_s-(CH_2)_w-CO$, $NH-CO-(CH_2)_r-(PEG)_s-X-(CH_2)_w-CO$ 로부터 선택되며, 여기서 X는 부재하거나, 또는 NH 또는 O일 수 있고, q는 2 내지 8의 정수이며, r은 부재하거나 또는 1 내지 4의 정수이고, s는 부재하거나 또는 1 내지 6의 정수이며, w는 부재하거나 또는 1 내지 2의 정수이고,

[0100] S2는 스페이서로서, 부재하거나 또는 하기로부터 선택될 수 있으며:



[0101]

[0102] CG는 항체의 시스테인 티올기 또는 리신 아미노기의 접합 후에 형성된 연결기로서, 부재하거나 또는 하기 모이어티 중 하나일 수 있고:



[0103]

[0104]

[0105]

[0106]

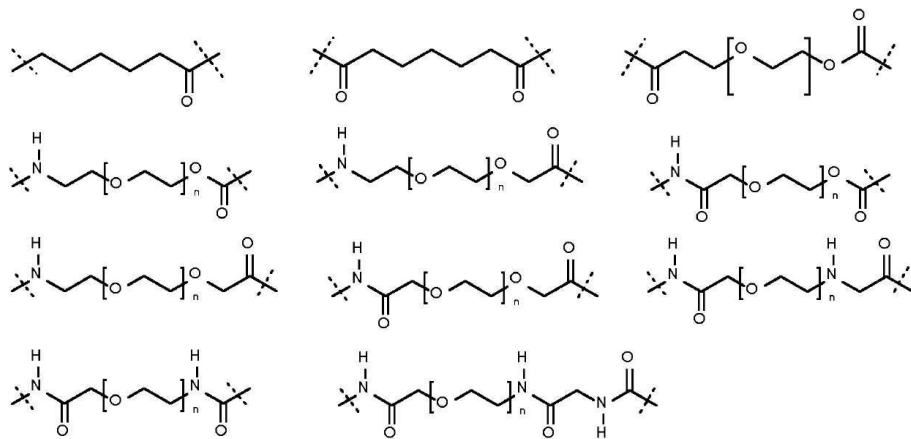
[0107]

상기 y는 0 내지 8의 정수이며,

Ab는 항체 또는 그의 항원 결합 단편이고,

m, n, o 및 p는 0 또는 1의 정수를 나타낸다.

상기 링커 (L)는 바람직하게 하기로부터 선택되고:



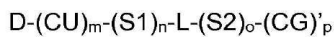
[0108]

[0109]

상기에서 n은 2 내지 5의 정수이다.

[0110]

구체적으로, 페이로드는 적합한 링커 / 스페이서에 연결된 독소 (HDAC 저해제)이고, 항체로의 접합에 적합한 기 (즉, 말레이미드, NHS 에스테르)를 말단으로 가지며, 화학식 I의 하기 부분을 포함한다:

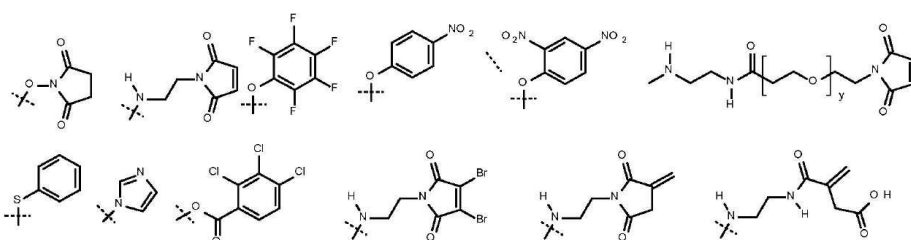


화학식 II

[0111]

[0112]

본 발명에서, 화학식 II의 페이로드에서 (CG)는 하기 화학식의 NHS (N-히드록시숙신이미드) 또는 활성화된 아실 유도체 (펜타플루로페닐 에스테르, p-니트로 및 2,4-디니트로페놀 에스테르, 티오펜올 에스테르, 아실이미다졸, 이소부틸카르보네이트, 트리클로로벤조산 무수물 포함), 또는 말레이미드- 또는 3-메틸렌숙신이미드, 3,4-디브로모 말레이미드 또는 {아미노-카르보닐}-3-부테노산일 수 있다:



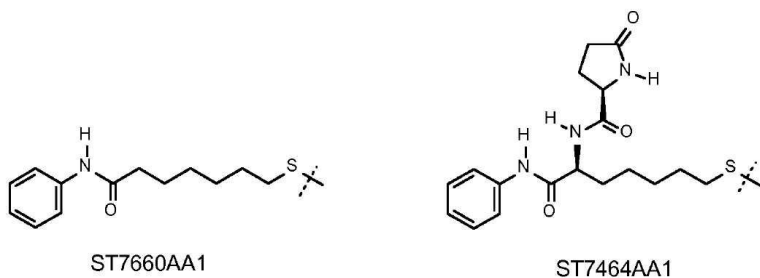
[0113]

[0114]

페이로드 D-(CU)_m-(S1)_n-L-(S2)_o-(CG)_p-에 사용된 히스톤 데아세틸라제 저해제 (HDAC)는 당 분야에 알려져 있는

히스톤 데아세틸라제 저해제일 수 있고, 하기 카테고리를 갖는다:

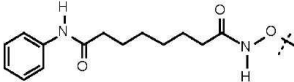
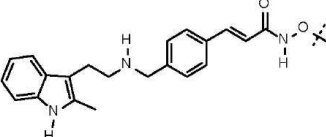
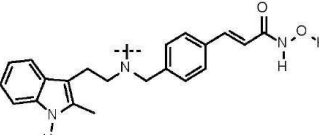
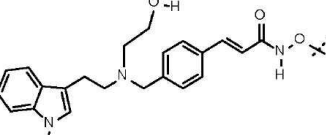
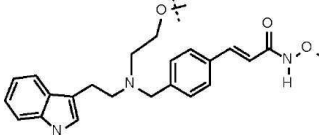
- [0115] - 하기 화학식을 갖는 티올-기반 히스톤 데아세틸라제 저해제, 예컨대 ST7464AA1 및 ST7660AA1 (보리노스타트의 티올 유사체):



티올-기반 SAHA (보리노스타트) 유사체 상응하는 티오아세틸 ST7612AA1 (프로드러그)의 티올 (활성 약물)

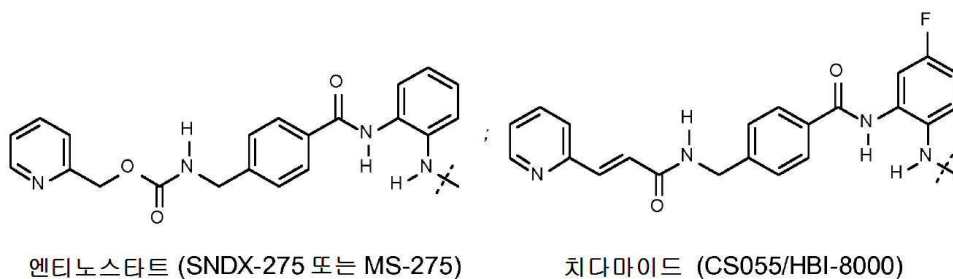
[0116]

- [0117] - 하기 화학식을 갖는 히드록삼산 기반 히스톤 데아세틸라제 저해제 (HDACs), 예컨대 보리노스타트 (SAHA), 파노비노스타트 (LBH589), 또는 다시노스타트 (LAQ824):

| HDAC 저해제 | ZBG (아연 결합기) 접합-기반 ADC | 다른 촉 접합-기반 ADC |
|------------------|---|--|
| 보리노스타트 (SAHA) |  | |
| 파노비노스타트 (LBH589) |  |  |
| 다시노스타트 (LAQ824) |  |  |

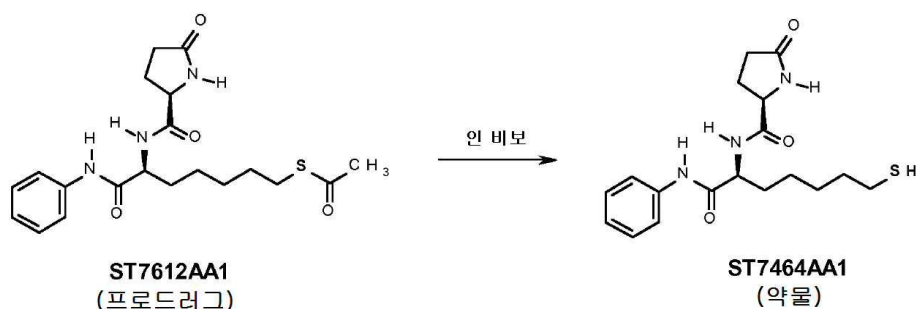
[0118]

- [0119] - 하기 화학식을 갖는 벤자미드 기반 히스톤 데아세틸라제 저해제 (HDACs), 예컨대 엔티노스타트 (MS275) 및 치다마이드 (CS055):



[0120]

- [0121] 특정 구현예에서, 상기 히스톤 데아세틸라제 저해제는 경구용 티올-기반 히스톤 데아세틸라제 저해제인, 상응하는 프로드러그 ST7612AA1의 약물인 ST7464AA1이다.



[0122]

[0123]

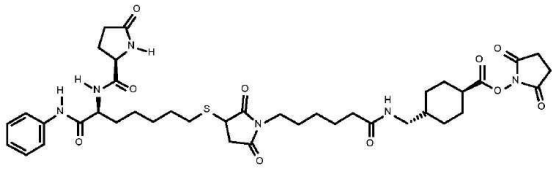
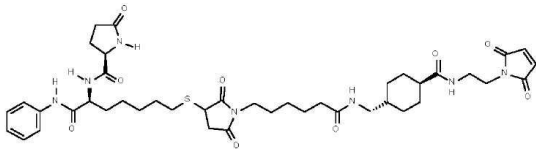
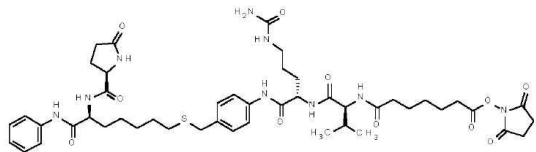
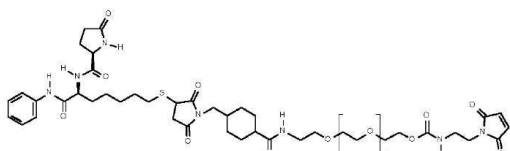
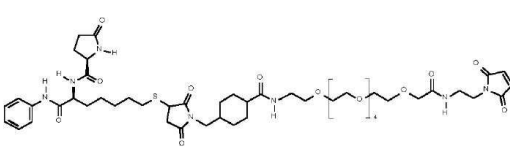
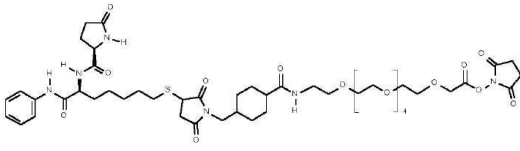
상기 페이로드를 "이탈기"를 포함하고, 이는 치환 반응에서 다른 기로 치환될 수 있는 기를 나타낸다. 이러한 이탈기는 당 분야에 잘 알려져 있고, 예로는 이에 한정되는 것은 아니지만, 할라이드 (플루오리드, 클로리드, 브로미드 및 요오디드), 아지드, 술포네이트 (예: 선택적으로 치환된 C1-C6 알칸술포네이트, 예컨대 에탄술포네이트 및 트리플루오로메탄술포네이트, 또는 선택적으로 치환된 C7-C12 알킬벤젠술포네이트, 예컨대 -톨루엔술포네이트), 숙신이미드-N-옥시드, p-니트로페녹시드, 펜타플루오로페녹시드, 테트라플루오로페녹시드, 카르복실레이트, 아미노카르복실레이트 (카르바메이트) 및 알콕시카르복실레이트 (카르보네이트)를 포함한다. 포화된 탄소에서 치환을 위해, 할라이드 및 술포네이트가 바람직한 이탈기이다. 카르보닐 탄소에서 치환을 위해, 할라이드, 숙신이미드-N-옥시드, p-니트로페녹시드, 펜타플루오로페녹시드, 테트라플루오로페녹시드, 카르복실레이트 또는 알콕시카르복실레이트 (카르보네이트)가 예를 들어 이탈기로 사용될 수 있다. 용어 "이탈기"는 또한 전자 캐스케이드 반응 (electronic cascade reaction) 또는 피로사이클화 반응 (pirocyclization reaction)과 같은 제거 반응의 결과로 제거되는 기를 나타낸다. 이러한 예에서, 할라이드, 술포네이트, 아지드, 아미노카르복실레이트 (카르바메이트) 또는 알콕시카르복실레이트 (카르보네이트)가 예를 들어 이탈기로서 사용될 수 있다.

[0124]

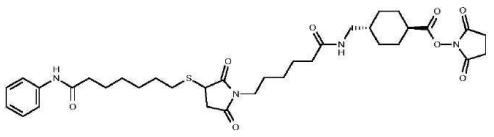
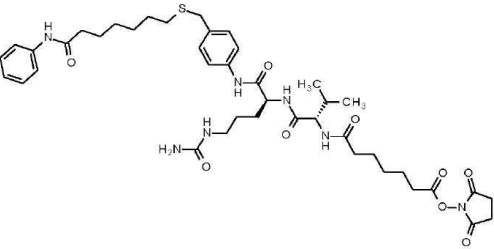
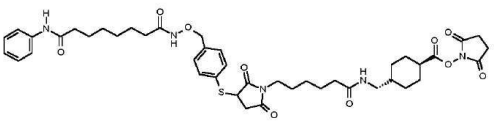
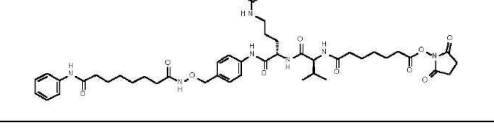
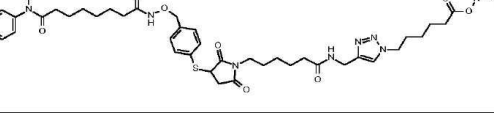
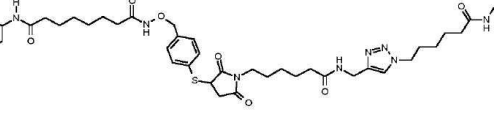
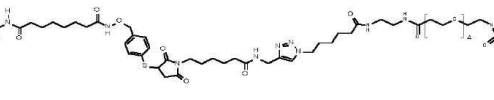
화학적 관능기를 다른 기로 변환하는데 이러한 관능기를 포함하는 화합물에서 하나 이상의 반응 중심을 보호하여 원하지 않는 부반응을 피하는 것이 필요하다는 것이 당업자에게 알려져 있다. 이러한 반응 중심의 보호, 후속하여 합성 변환 마지막에 탈보호하는 것은 문헌에 개시되어 있는 표준 절차에 따라 수행될 수 있다 (예를 들어, Green, Theodora W. and Wuts, Peter G.M. - Protective Groups in Organic Synthesis, Third Edition, John Wiley & Sons Inc., New York (NY), 1999 참조).

표 1

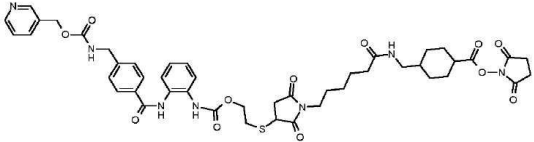
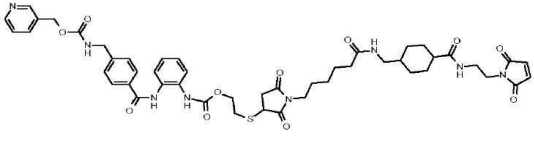
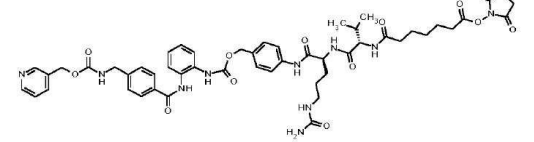
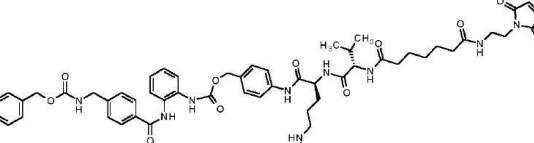
페이로드

| I.D. | ST 코드 | 화학 구조 | M.W. | 부류 |
|------|---------|--|--------|--------|
| (1) | 8128AA1 |  | 810.9 | NHS |
| (2) | 8152AA1 |  | 836.0 | 말레 이미드 |
| (3) | 8132AA1 |  | 964.1 | NHS |
| (4) | 8190AA1 |  | 1030.2 | 말레 이미드 |
| (5) | 8189AA1 |  | 1044.2 | 말레 이미드 |
| (6) | 8191AA1 |  | 889.0 | NHS |

[0125]

| | | | | |
|------|---------|---|--------|-----------|
| (7) | 8197AA1 |  | 684.8 | 말레 이미드 |
| (8) | 8235AA1 |  | 838.0 | NHS |
| (9) | 8217AA1 |  | 834.0 | NHS |
| (10) | 8201AA1 |  | 865.0 | NHS |
| (11) | 8215AA1 |  | 889.0 | NHS |
| (12) | 8216AA1 |  | 914.1 | 말레 이미드 |
| (13) | 8236AA1 |  | 1161.4 | 말레 이미드 |

[0126]

| | | | | |
|------|---------|---|--------|-------|
| (20) | 8225AA1 |  | 928.0 | NHS |
| (21) | 8226AA1 |  | 953.1 | 말레이미드 |
| (22) | 8227AA1 |  | 1021.1 | NHS |
| (23) | 8228AA1 |  | 1046.1 | 말레이미드 |

[0128]

[0129]

특히 바람직한 구현예에서, 상기 히스톤 데아세틸라제 저해제는 전술한 바와 같이 화합물 ST7464AA1의 프로드러그인 화합물 ST7612AA1이다.

[0130]

본 발명에 유용한 페이로드의 부가의 예로는 상기 표 1의 화합물이다. N-히드록시숙신이미드 (NHS) 모이어티를 포함하는 특정 링커를 갖는 페이로드 (즉 ST8128AA1, ST8132AA1)는 항체 리신과 반응할 수 있는 아미노-특이적 NHS 에스테르를 포함하는 mAb의 Lys 잔기의 결사슬에 아미드 결합을 통해 공유적으로 결합할 수 있다. 말레이미드 모이어티를 포함하는 특정 링커를 갖는 페이로드 (즉 ST8152AA1, ST8189AA1)는 그의 환원 후에 mAb 상의 Cys에 대한 말레이미드-티올 접합 반응을 통해 공유적으로 결합할 수 있다.

[0131]

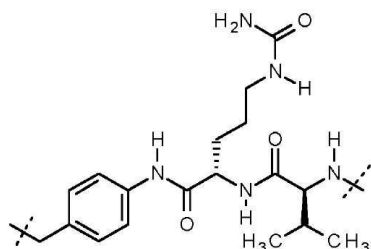
상기 항체-약물-접합체 (ADCs)는 연결기 (connective group: CG)에 대한 페이로드와 상이하고, 상기 페이로드 (CG)'에서 이는 NHS 또는 말레이미드이었고, 항체 접합체에서, (CG)는 NHS 페이로드-기반 ADC에서 부재하며, 이는 말레이미드 페이로드-기반 ADC에서 숙신이미딜 모이어티이다.

[0132]

더욱이, 상기 스페이서 (S1)는 존재하는 경우, 절단가능하거나 또는 절단가능하지 않을 수 있다. 전형적인 프로테아제-절단가능한 스페이서는 표적 세포에서 약물의 빠른 효소적 방출을 특징으로 하는 모이어티, 예컨대 발린-시트룰린 (Val-Cit) 디펩티드를 포함한다.

[0133]

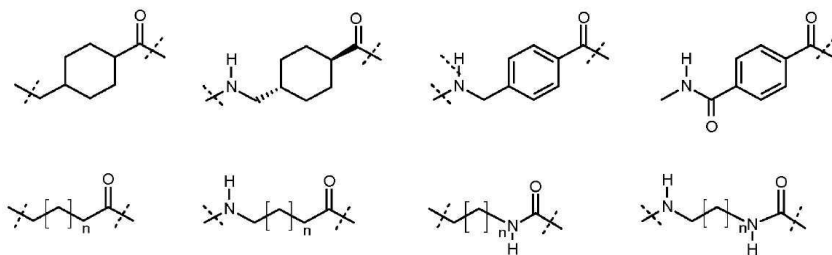
절단가능한 스페이서의 예는 하기이다:



[0134]

[0135]

절단가능하지 않은 스페이서의 예는 하기이다:



$n = 0-4$

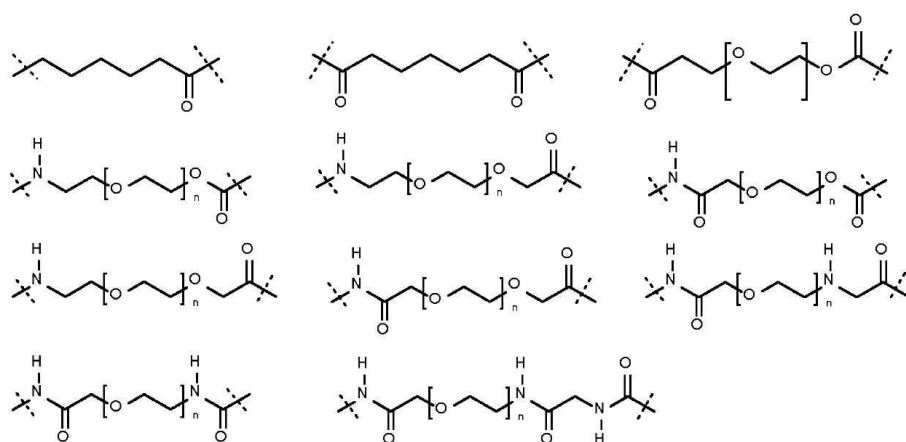
[0136]

[0137]

청구된 항체 약물 접합체는 링커 (L)를 더 포함할 수 있고, 이는 $(CH_2)_q-CO$, $NH-(CH_2)_r-(PEG)_s-(CH_2)_w-CO$, $NH-CO-(CH_2)_r-(PEG)_s-X-(CH_2)_w-CO$ 일 수 있으며, 여기서 X는 부재하거나, NH, O일 수 있고, q는 2-8이며, r은 부재하거나 또는 1-4이고, s는 부재하거나 또는 1-6이며, w는 부재하거나 또는 1-2이다

[0138]

링커 (L)의 예:

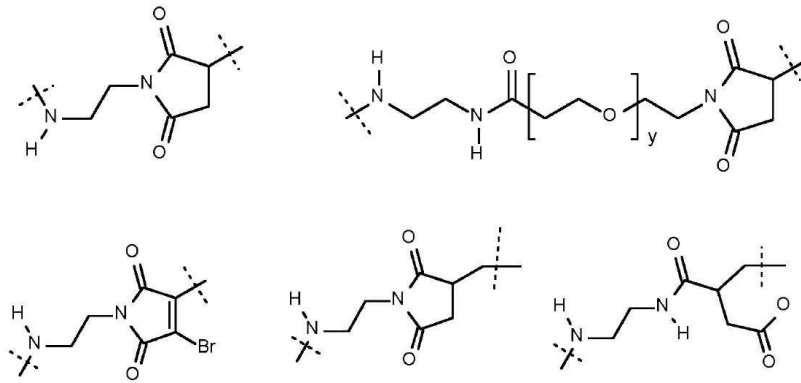


$n = 2-5$

[0139]

[0140]

청구된 항체-약물-접합체는 항체의 시스테인 티올기 또는 리신 아미노기에 접합 후에 형성된 연결기 (CG)를 더 포함할 수 있고, 이는 부재하거나 또는 하기 모이어티 중 하나일 수 있다: 하기 화학식의 NHS 또는 활성화된 아실유도체 (1-히드록시벤조트리아졸 에스테르, 에틸 2-시아노-2-(히드록시미노) 아세테이트 에스테르, N-에톡시 카르보닐-2-에톡시-1,2-디히드로-퀴놀론 에스테르, 펜타플루로페닐 에스테르, p-니트로 및 2,4-디니트로페놀 에스테르, 티오펜올 에스테르, 아실이미다졸, 이소부틸카르보네이트, 트리클로로벤조산 무수물, 피발산 무수물, 3,5-디메톡시트리아진 포함) 또는 말레이미드- 또는 3-메틸렌숙신이미드, 3,4-디브로모 말레이미드 또는 {아미노-카르보닐}-3-부테노산:



여기서 y 는 0-8임

- [0141]
- [0142] 본원에 개시된 면역글로불린 벡터는 티로신 키나제 수용체 (RTK) 패밀리에 관한 것이다. 이는 세포 증식, 생존, 분화 또는 이동에 관여하는 기질 단백질을 인산화하여 세포내 신호전달을 매개하는 막횡단 단백질의 상과 (superfamily)이다.
- [0143] 구체적으로, 인간 표피 성장 인자 수용체 (HER) 패밀리는 RTK 상과에 속하고, 4개의 구성원을 포함한다: ErbB1/EGFR (표피 성장 인자 수용체), ErbB2, ErbB3 및 ErbB4. 생리학적으로, 이러한 수용체는 EGF 패밀리의 리간드에 의해 활성화된다.
- [0144] EGFR은 다수의 종양 타입에서 관찰되는 돌연변이 및 과발현을 갖는 많은 인간 암종의 발생 및 유지에서 중요한 역할을 한다 (*Burgess AW 2008 Growth Factors 26: 263-74*).
- [0145] EGFR은 폐암, 두경부암, 결장암 및 췌장암에서 널리 사용되는 티로신 키나제 저해제에 대해서뿐만 아니라 항체에 대해 임상적으로 유효한 표적이 되었다 (*Mendelsohn J 2006 Semin Oncol 33: 369-85; Feiner 2016 Exp Rev Proteomics, Sep 13: 817-32; Enrique AA 2012 Front Biosci 4: 12-22; Landi L 2014 Expert Opin Pharmacol Ther 15: 2293-305*).
- [0146] 이들 저해제의 성공에도 불구하고, EGFR-양성 종양 환자의 상당수는 돌연변이 범위 (예: EGFR, KRAS, BRAF, PI3K, 및 PTEN)가 고유 또는 획득 내성에 기여할 수 있기 때문에 현재 EGFR-표적 치료제에 반응하지 않는다 (*Chong CR 2013 Nat Med 19: 1389-400*).
- [0147] EGFR을 표적으로 하는 미세관 저해제-기반 ADC는 하류 신호전달 돌연변이에 의해 매개되는 내성을 우회하여 항-EGFR 항체의 활성을 향상시킬 수 있지만, 이들 항체의 알려져 있는 독성 (즉 피부 발진, 설사, 변비, 구내염, 피로 및 전해질 장애) 때문에 의심스러운 치료 전략이다 (*Li T 2009 Target Oncol 4: 107-19*) 이는 적용가능성이 제한될 수 있다. 놀랍게도, 낮은 독성의 HDACi에 접합된 항-EGFR 패밀리 단백질 항체로 제조된 ADC는 효과적인 항암제인 것으로 밝혀졌다.
- [0148] 청구된 항체-약물-접합체에 사용된 항체는 특히 EGFR 패밀리 단백질에 대한 항체이다. 구체적으로, 상기 항체는 ErbB1, ErbB2 또는 ErbB3 수용체에 대한 것일 수 있다. 다른 항체에 접합된 동일한 페이로드는 HDACi를 방출하기 위해 종양 세포에 의해 내재된 다른 수용체에 대한 것일 수 있다.
- [0149] 예를 들어, EGFR과 유사하게, 다양한 인간 암의 성장, 생존 및 확산에 관련되고, 상이한 고형 종양에서 발현되는 c-Met는 HGF (hepatocyte growth factor) 결합에 반응하여 내재화되어 c-Met 유비퀴틴화 (ubiquitination) 및 분해를 유도한다 (*Mellman 2013 Cold Spring Harb Perspect Biol 5:a016949*).
- [0150] 또한, 인테그린 (integrins)은 종양-스트로마 상호작용에서 주요한 역할을 하며, 25개의 상이한 인테그린 이중 이량체의 비정상적인 리사이클링 (recycling)이 종양 성장, 침습, 전이 및 아포토시스의 회피에 관여한다 (*Mosesson 2008 Nat Rev Cancer 8: 835-50*).
- [0151] 일 구현예에서, 상기 항체는 트라스투주맙, 세톡시맙, 베바시주맙, 파니투무맙, 항-CD4, 또는 항-CD30 항체 및 관련 바이오시밀러 항체 (biosimilar antibodies)로부터 선택된다.
- [0152] 용어 항체 또는 면역글로불린은 넓은 의미에서 상호교환 가능하게 사용될 수 있고, 이들이 원하는 생물학적 활

성을 나타내는 한, 모노클로날 항체, 폴리클로날 항체, 단리된, 조작된 또는 재조합 항체, 전장 또는 온전한 항체, 다가 또는 다중특이적 항체 예컨대 이중특이적 항체 또는 그의 항체 단편을 포함한다. 살아있는 세포내에서 재조합 DNA 발현의 결과인 재조합 항체의 경우에, 상기 항체는 임의의 종으로부터 유래될 수 있고, 바람직하게는 인간, 래트 (rats), 마우스 및 토끼로부터 유래될 수 있다. 상기 항체가 인간 종 이외의 종으로부터 유래되는 경우, 이는 바람직하게 당 분야에 잘 알려져 있는 기술에 따라 제조된 키메라 또는 인간화 항체이다.

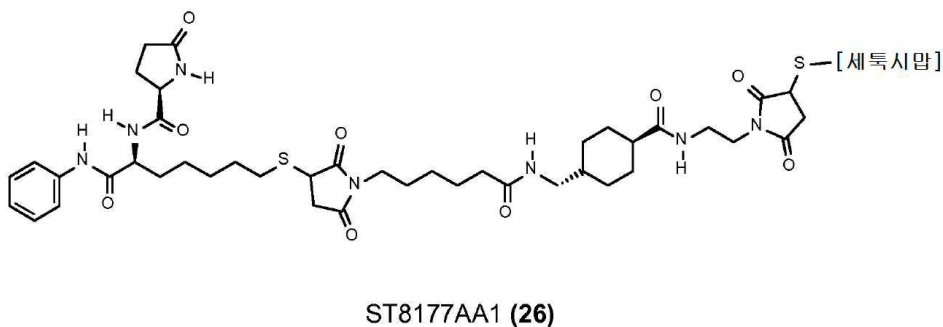
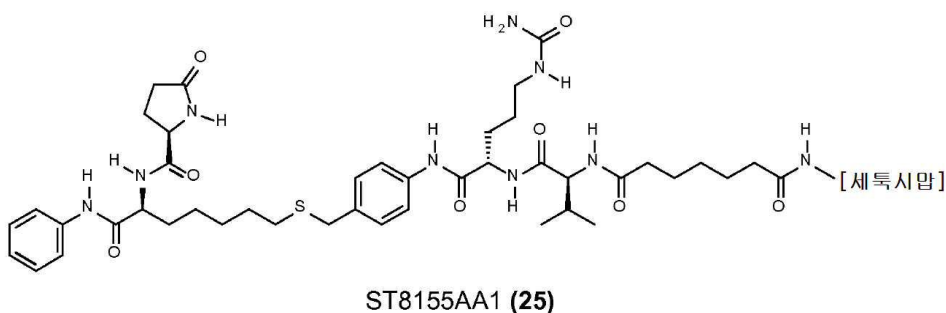
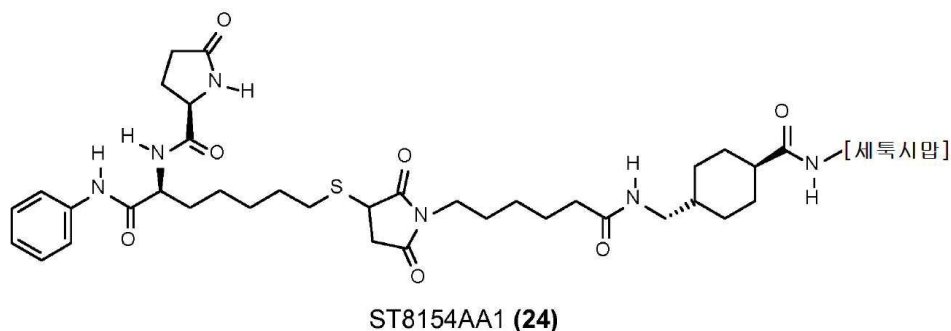
[0153] 상기 항체는 또한 화학적으로 합성된 항체일 수 있다.

[0154] 상기 항체는 문제의 암 또는 종양 세포, 구체적으로 ErbB1, ErbB2 및/또는 ErbB3 수용체를 발현하는 암 또는 종양 세포를 표적으로 할 수 있다. 구체적으로, 상기 항체는 상기 암 또는 종양 세포를 인식하는 특성, 상기 암 또는 종양 세포에 결합하는 특성 및 종양 또는 암 세포로 내재화되는 특성을 갖는다.

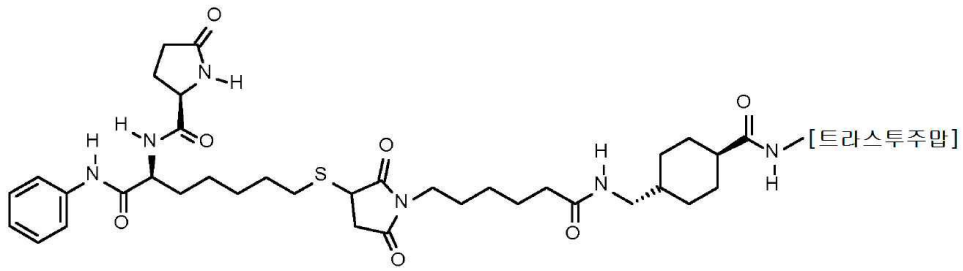
[0155] 상기 항체를 제조하는 방법은 당 분야에 잘 알려져 있다 [즉, Chem. Soc. Rev., 2016, 45, 1691-1719; Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters 26 (2016) 1542-1545].

[0156] 항체 대신에, 항체의 표적 (항원)에 결합하는 능력을 보유하는 임의의 펩티드, 폴리펩티드 또는 단백질을 나타내는 항원-결합 단편이 또한 사용될 수 있다. 항원-결합 단편의 예로는 Fv, ScFv (Sc는 단일-사슬을 의미함), Fab, F(ab')₂, Fab', ScFv', Fc 단편 또는 디아바디 (Diabodies) 또는 예를 들어 페길화 (pegylation)와 같은 화학적 변형 또는 리포솜으로의 혼입에 의해 반감기가 증가된 단편이 있다.

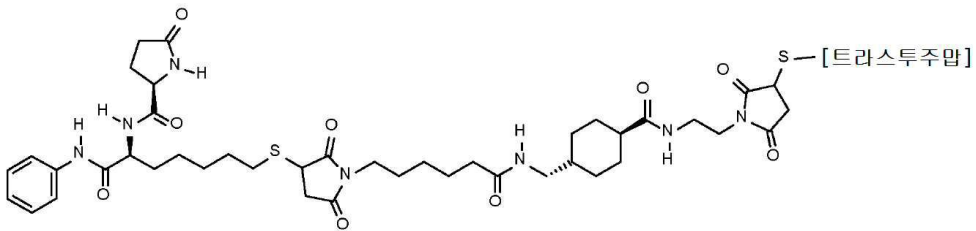
[0157] 일 구현예에서, 항체 약물 접합체 (ADC) 또는 그의 약학적으로 허용가능한 염은 하기 화학식을 갖는 화합물에 의해 선택된다:



[0158]



ST8178AA1 (27)

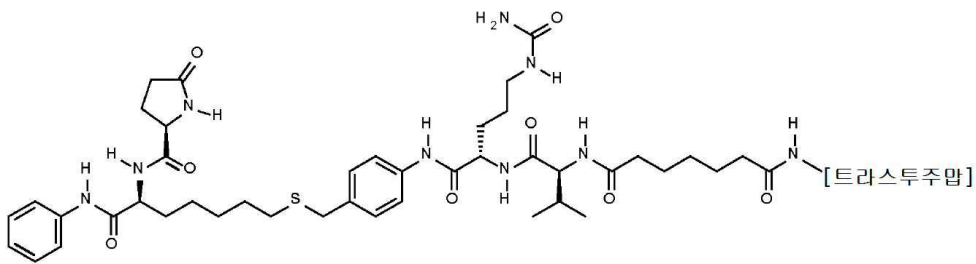


ST8176AA1 (28)

[0159]

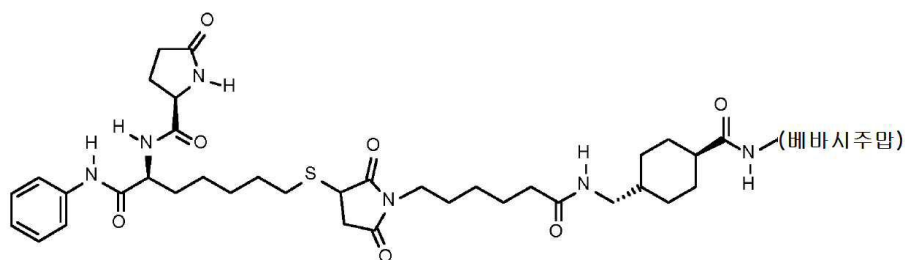
[0160]

화학식 I의 다른 구현예에서, 화학식 (If)의 항체 약물 접합체 (ADC)와 같은 화합물 또는 그의 약학적으로 허용 가능한 염이 제공된다:

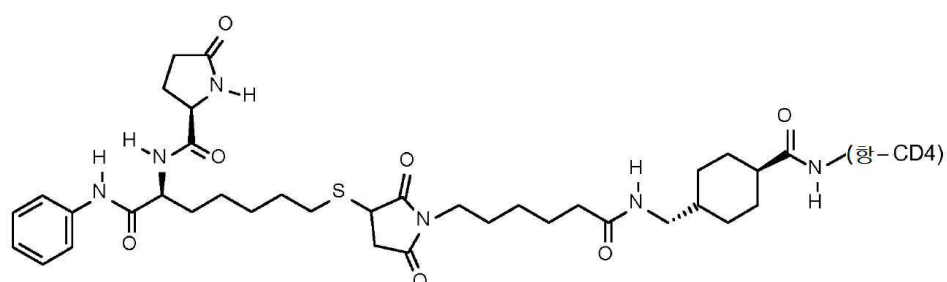


ST8179AA1 (29)

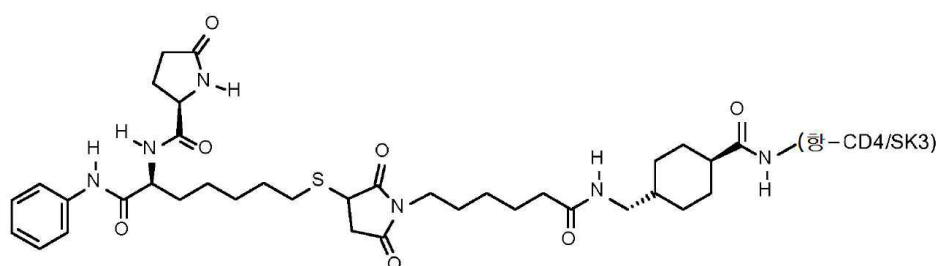
[0161]



ST8194AA1 (33)

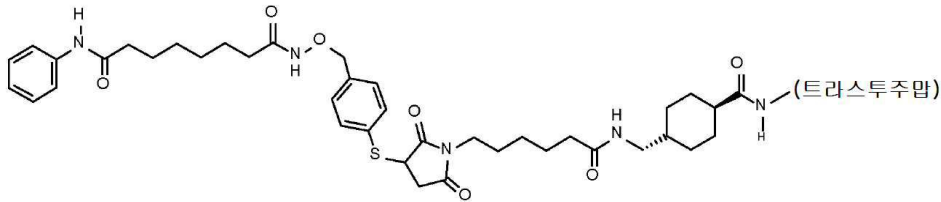


ST8212AA1 (34)

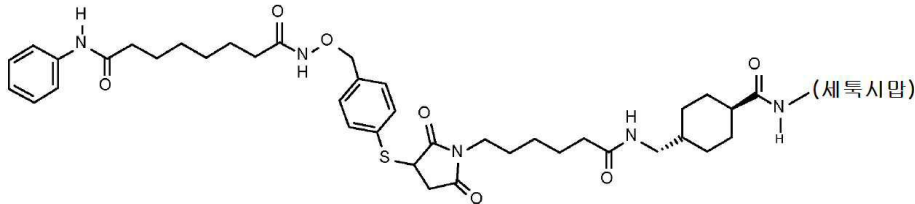


ST8213AA1 (35)

[0163]



ST8218AA1 (36)

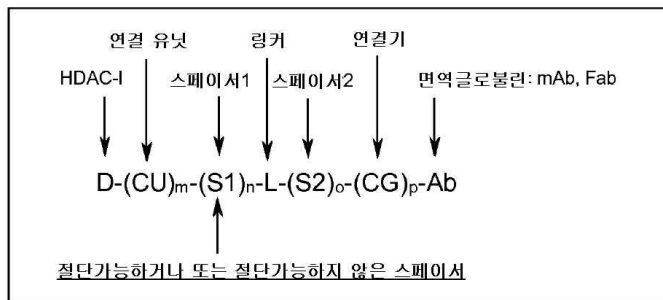


ST8219AA1 (37)

[0164]

[0165]

하기예, HDACi-기반 ADC의 일반식이 도시되어 있다. 활성 약물 (D)은 ST7612AA1의 활성 약물에 해당하는 ST7464AA1로 표시된다. ST7464AA1은 본 발명에 개시되어 있는 ADC (화학식 I) 및 페이로드 (화학식 II)의 가능한 약물 (D) 중 하나이다.



[0166]

[0167]

상기는 대표적인 HDAC 저해제-기반 항체 약물 접합체 (ADCs)의 일반식이다.

[0168]

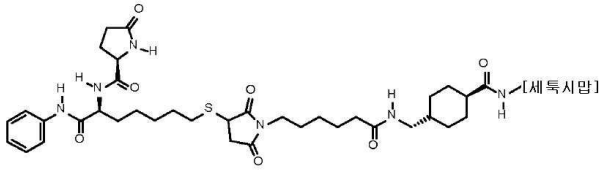
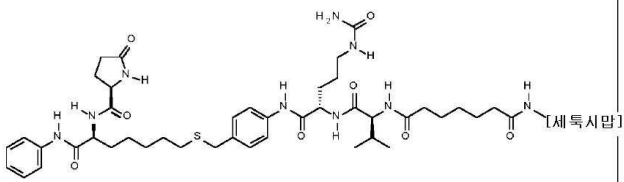
다른 구현예는 페이로드의 제조 방법이고, 이는 HDAC 저해제의 티올, 히드록사믹 또는 벤자미드 잔기에, 상기 페이로드의 다른 성분을 연결하는 적절한 연결 유닛 (C.U.)을 도입하는 단계를 포함한다. 절단가능하거나 (통상 효소 카텡신 (cathepsin)의 기질인 발린-시트룰린 디펩티드 (Val-Cit)), 또는 절단가능하지 않은 스페이서 (S1), 링커 (L), 제2 스페이서 (S2) 및 말단기 (CG)'는 리신 또는 시스테인 항체로의 접합에 적합하다.

[0169]

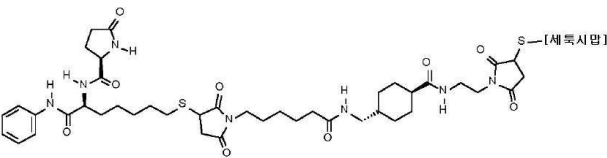
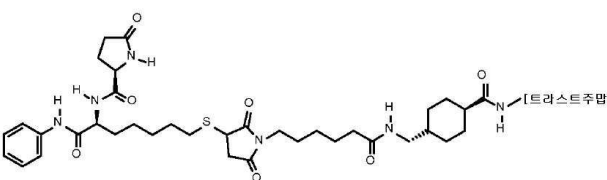
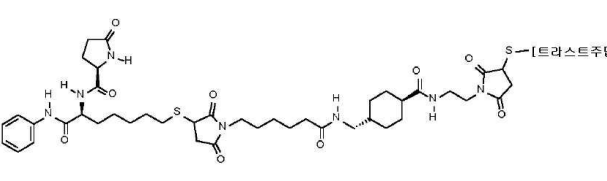
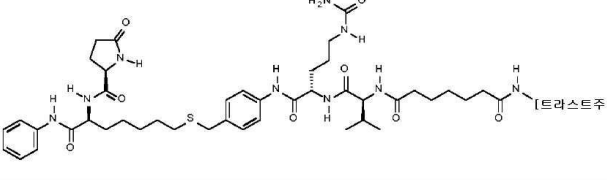
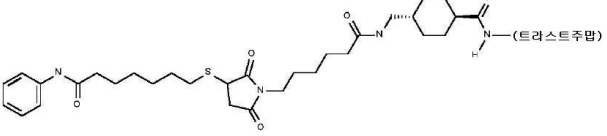
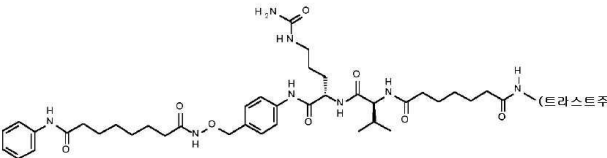
다른 구현예는 HDAC 저해제-기반 항체 약물 접합체 (ADCs)의 제조 방법이고, 이는 통상 상기 분자의 페이로드 부분의 잔기 (CG)'와 면역글로불린 (Ab)의 리신 잔기의 아미노기 사이의 접합 반응으로 구성된다. 시스테인으로의 접합을 위해, 면역글로불린의 S-S 시스테인 결합은 적절한 환원제에 의해 예비적으로 환원되어야 한다. 유리 시스테인 잔기의 술폰히드릴기 (-SH)에서 적절한 기(CG)'를 갖는 페이로드와의 후속 접합 반응을 진행한다.

표 2

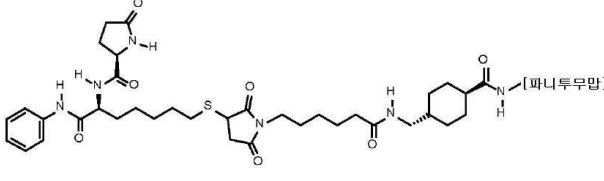
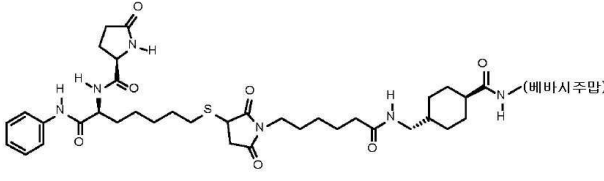
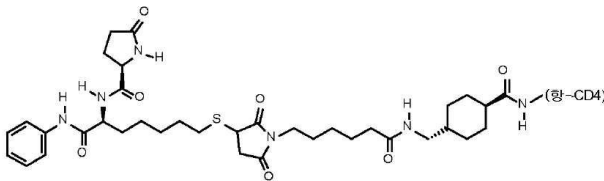
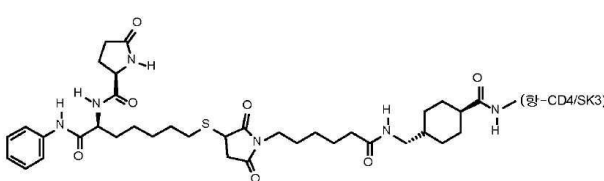
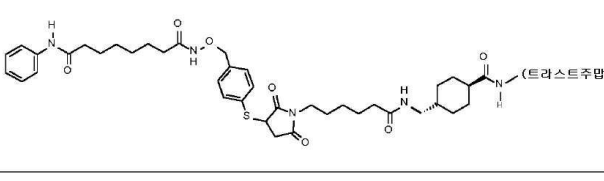
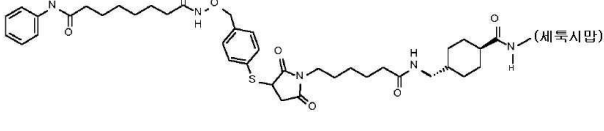
ADC

| I.D. ST 코드 | 화학 구조 | SoC | DAR |
|-----------------|--|-----|-----------|
| (24) 8154AA1 |  | Lys | 8.0 (± 1) |
| (25) 8155AA1 |  | Lys | 6.1 (± 1) |

[0170]

| | | | |
|-----------------|---|-----|-------------------|
| (26) 8177AA1 |  | Cys | 4.0 (± 0.7) |
| (27) 8178AA1 |  | Lys | 8.0 (± 0.2) |
| (28) 8176AA1 |  | Cys | 4.5 (± 0.5) |
| (29) 8179AA1 |  | Lys | 6.1 (± 0.2) |
| (30) 8205AA1 |  | Lys | 6.2 (± 0.2) |
| (31) 8202AA1 |  | Lys | 5.5 (± 0.5) |

[0171]

| | | | |
|-----------------|---|-----|-------------|
| (32) 8193AA1 |  | Lys | 9.0 (± 2) |
| (33) 8194AA1 |  | Lys | 6.5 (± 0.5) |
| (34) 8212AA1 |  | Lys | 8.0 (± 0.2) |
| (35) 8213AA1 |  | Lys | 4.0 (± 1) |
| (36) 8218AA1 |  | Lys | 5.0 (± 0.5) |
| (37) 8219AA1 |  | Lys | 4.0 (± 0.5) |

SoC: 집합 부위

[0172]

[0173]

본 발명은 또한 상기 항체-약물 집합체를 포함하는 약학적 조성물에 관한 것이다. 상기 약학적 조성물은 적어도 하나의 부형제 및/또는 약학적으로 허용가능한 비히클을 포함한다. 상기 활성 성분은 동물 또는 인간용의 통상적인 약학적 담체와 혼합하여 단위 투여 형태로 투여될 수 있다. 적절한 단위 투여 형태는 장관 또는 비경구 투여 형태를 포함하고, 상기 장관 투여는 경구, 에어로졸, 직장 또는 볼 경로를 포함하고, 비경구 투여는 피하, 근육내 또는 정맥내, 및 진피내 경로를 포함한다.

[0174]

약학적 조성물은 장관 또는 비경구 투여를 위한 것일 수 있고, 상기 장관 투여는 경구, 에어로졸, 직장 또는 볼 경로를 포함하고, 비경구 투여는 정맥내 (endovenous), 근육내 및 진피내 경로를 포함한다.

[0175]

경구 투여를 위한 고형 조성물은 정제, 환제, 분체, 캡슐 또는 과립체일 수 있다. 이러한 조성물에서, 본 발명의 항체-약물-접합체는 하나 이상의 불활성 희석제 예컨대 전분, 셀룰로스, 수크로스, 락토스 또는 실리카와 혼합된다. 이러한 조성물은 또한 추가의 물질, 예컨대 마그네슘 스테아레이트 또는 탈크와 같은 윤활제 또는 착색제 또는 코팅제를 더 포함할 수 있다.

[0176]

비경구 투여를 위한 멸균 조성물은 바람직하게 수성 또는 비수성 용액, 현탁액 또는 에멀전일 수 있다. 사용된 용매 또는 비히클은 물, 프로필렌 글리콜 또는 폴리에틸렌 글리콜, 식물성 오일, 주사용 유기 에스테르 또는 다

른 적합한 유기 용매로 이루어질 수 있다. 상기 조성물은 또한 아췌반트, 구체적으로 습윤제, 등장제, 유화제, 분산제 및 안정화제를 포함할 수 있다.

[0177] 본 발명은 신규한 ADC에 의해 제공된 효능을 입증할 때 인 비트로 세포 증식 분석을 보고하였다.

[0178] 본 발명의 특정 구현에는 분무 (nebulization)에 의해 국소 전달하기에 적합한 제제이다. 이와 관련하여, 본 발명의 항체-약물-접합체는 특히 폐 또는 복막과 관련된 질환, 예컨대 폐암 또는 복막암 또는 난소암, 자궁경부-자궁내막암, 위암, 결장암, 충수암, 복강가성점액종 (pseudomyxoma peritonei), 췌장암, 간 전이, 희귀 신생물 (장 조직이 아닌 복부 육종)의 치료에 적합한다.

[0179] 본 발명은 또한 암, 세포 증식 장애 및 바이러스 감염을 치료하는 방법에 사용하기 위한, 상기에 정의된 화학식 (I)의 화합물을 제공한다.

[0180] 바람직하게, 상기에 정의된 화학식 (I)의 화합물은 예컨대 이에 한정되는 것은 아니지만 하기와 같은 특정 유형의 암을 치료하는 방법에 사용하기 위한 것이다: 방광 암종, 유방 암종, 결장 암종, 신장 암종, 간 암종, 소세포 폐암을 포함하는 폐 암종, 식도 암종, 담낭 암종, 난소 암종, 췌장 암종, 위 암종, 자궁경부 암종, 갑상선 암종, 전립선 암종, 및 편평 세포 암종을 포함하는 피부 암종을 포함하는 암종; 백혈병, 급성 림프구 백혈병, 급성 림프모구 백혈병, B-세포 림프종, T-세포 림프종, 호지킨 림프종, 비-호지킨 림프종, 털세포 림프종 및 버킷 림프종을 포함하는 림프계 조혈 종양; 급성 및 만성 골수성 백혈병, 골수형성이상 증후군 및 전골수세포 백혈병을 포함하는 골수계 조혈 종양; 섬유육종 및 횡문근육종을 포함하는 중간엽 기원의 종양; 별아교세포종, 신경모세포종, 신경아교종 및 슈반세포종을 포함하는 중추 및 말초 신경계 종양; 및 흑색종, 고환종, 기형암종, 골육종, 색소성 건피증, 각질가시세포종, 갑상선 소포암, 카포시 육종 및 증피종을 포함하는 기타 종양.

[0181] 본 발명은 신규한 ADC에 의해 제공된 효능을 입증할 때 인 비트로 세포 증식 분석을 보고하였다.

[0182] 본 발명의 화합물은 유리 항체의 결합과 유사한 방식으로 수용체에 결합하고, ADC의 ErbB1- 및 ErbB2-발현 종양 세포로의 결합은 FACS 분석에 의해 확인되었다.

[0183] 형광 분석을 통해, 본 발명의 화합물은 결합 속도에 어떠한 감소도 없이 그의 네이티브 대응 항체와 유사한 방식으로 종양 세포로 내재화될 수 있다는 것이 입증되었다. 더욱이, 본 발명의 모든 ADC는 예를 들어 세특시맵 또는 트라스투주맵과 같이 ADC에 결합된 네이티브 항체의 효능에 필적하는 효능으로 그의 특정 수용체와 반응한다.

[0184] 본 발명의 ADC는 분무될 때 이들의 무결성을 유지하며, 이들은 분무용 조성물 내에 포함될 수 있고, 이는 호흡기 질환에서 mAb를 전달하는 강력한 방법을 나타낸다. 이러한 방법은 약물이 폐를 표적으로 하는데 적합한 비침습적 방법으로, 2차 장기에 대한 노출을 제한한다.

[0185] 본 발명의 화합물이 폐 선암종 세포에서 평가될 때, 세특시맵 단독인 경우보다 낮은 IC₅₀ 값으로 종양 세포 증식을 저해하므로, 이의 항종양 효능을 확인하였다.

[0186] 모든 시험된 ADC는 각각 HDAC6 및 클래스 I HDAC의 직접 효소적 저해로 인해, 모든 시험된 종양 세포주에서 α-튜불린 및 히스톤 H3의 아세틸화 수준의 관련 증가를 유도하였다.

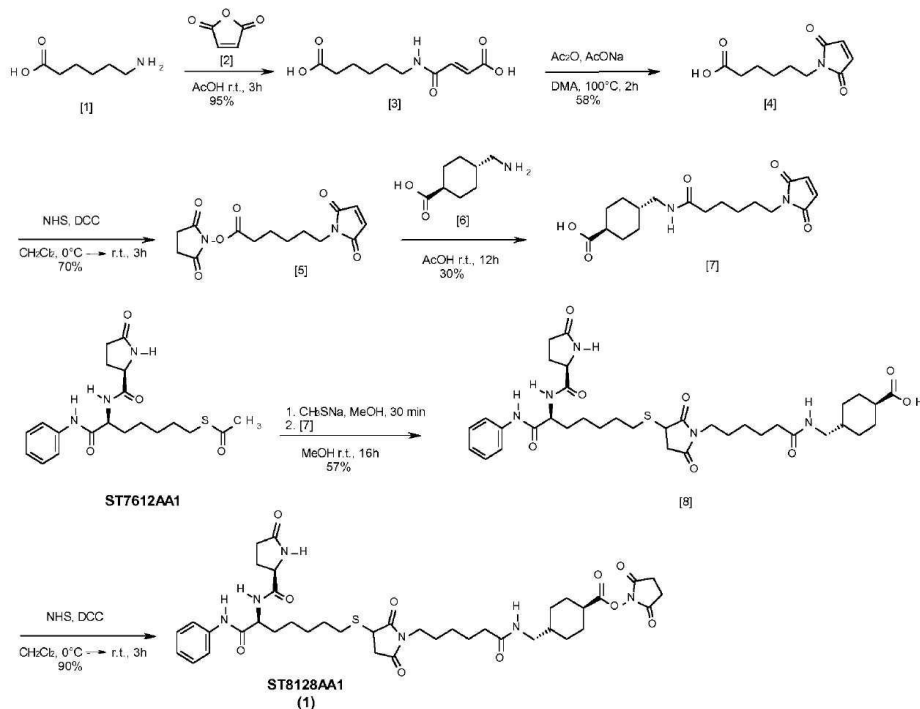
[0187] 인 비보 실험으로 본 발명의 화합물은 세특시맵 및 트라스투주맵 단독과 비교하여 폐, 결장, 췌장, 난소 종양의 성장을 저해하는데 보다 효과적이라는 것을 입증하였다.

[0188] 신규한 ADC는 국소 종양에서 에어로졸 전달 및 복강내 경로에 의해 항종양 활성을 나타내었고, 이는 가압된 복강내 에어로졸 화학요법 (pressurized intraperitoneal aerosol chemotherapy: PIPAC)에 유용하다.

[0189] 실시예

[0190] 본 발명은 하기 예를 참고로 추가로 개시될 것이다. 당업자라면 이들 예가 단지 예시 목적을 위한 것이며, 본 발명의 범위를 제한하는 것으로 해석되서는 안된다는 것을 이해할 것이다.

[0191] 실시예 1: 페이로드 (1), ST8128AA1의 합성 및 특성 규명



[0192]

[0193] (E)-6-(3-카르복시아크릴아미도)헥사노산 [3]

[0194] 빙초산 (10 mL) 중 말레인산 무수물 [2] (1.95 g, 19.9 mmol)의 용액을 빙초산 (10 mL) 중 6-아미노카프로산 [1] (2.6 g, 19.9 mmol)의 교반 용액에 적가하였다. 상기 혼합물을 실온에서 3시간 동안 유지하였다. 그 다음에 상기 반응 중에 형성된 침전물을 여과하였고, 디에틸 에테르로 세척하여 화합물 [3]을 백색 고형물로 수득하였다, 4.3 g (95% 수득율). 상기 고형물의 임의의 추가 정제는 필요로 하지 않는다.

[0195] ¹H NMR (400 MHz, DMSO) δ 9.10 (s, 1H), 6.35 (d, *J* = 12.6 Hz, 1H), 6.18 (d, *J* = 12.6 Hz, 1H), 3.12 (m, 2H), 2.15 (t, *J* = 7.4 Hz, 2H), 1.44 (m, 4H), 1.33 - 1.12 (m, 2H).

[0196] ¹³C NMR (100 MHz, DMSO) δ 174.8, 172.4, 165.8, 133.5, 132.2, 33.9, 28.5, 26.3, 24.5, 21.4.

[0197] 6-(2,5-디옥소-2,5-디히드로-1H-피롤-1-일)헥사노산 [4]

[0198] 아세트산 무수물 (3.8 mL, 40.75 mmol) 및 소듐 아세테이트 (418 mg, 5.09 mmol)를 실온에서 디메틸아세트아미드 (20 mL) 중 화합물 [3] (4.3 g, 20.37 mmol)의 용액에 거칠게 교반하면서 첨가하였고, 그 다음에 2시간 동안 100°C로 가열하였다. 그 다음에 상기 혼합물을 실온으로 냉각시켰고, 디클로로메탄 (35 mL)으로 희석하고, HCl 0.5 M으로 5-6회 세척하여 (각 10 mL 6부분), 디메틸아세트아미드를 제거하였다. 유기층을 무수 소듐 술페이트 상에서 건조하였고, 여과하고, 용매를 진공하에 제거하여 산물 [4]을 무색 오일로 수득하였다, 2.5 g (58% 수득율).

[0199] ¹H NMR (400 MHz, MeOD) δ 9.87 (bs, 1H), 6.76 (d, *J* = 1.6 Hz, 2H), 3.54 - 3.38 (m, 2H), 2.52 - 2.39 (m, 1H), 2.30 - 2.26 (m, 1H), 1.70 - 1.46 (m, 4H), 1.39 - 1.19 (m, 2H).

[0200] ¹³C NMR (100 MHz, MeOD) δ 179.4, 171.1, 133.9, 36.9, 33.2, 29.2, 24.1, 23.3.

[0201] 2,5-디옥소피롤리딘-1-일 6-(2,5-디옥소-2,5-디히드로-1H-피롤-1-일)헥사노에이트 [5]

[0202] 디시클로헥실-카르보디이미드 (2.68 g, 13.02 mmol) 및 N-히드록시숙신이미드 (1.36 g, 11.84 mmol)를 실온에서 무수 디클로로메탄 (15 mL) 중 화합물 [4] (2.5 g, 11.84 mmol)의 교반 용액에 첨가하였고, 상기 혼합물을 실온에서 3시간 동안 교반하였다. 백색 고형물을 디클로로메탄으로 여과하여 디시클로헥실우레아를 제거하였고, 유기상을 HCl 0.1N 및 물로 세척하였고, 그 다음에 무수 소듐 술페이트 상에서 건조하였고, 상기 용매를 회전 증발로 제거하였다. 결과의 잔류물을 증압 시스템 Sepacore® Buchi (실리카겔; 구매 A: 석유 에

테르/B: 에틸 아세테이트; 15분 내에 B% 0-80)를 구비한 플래시 컬럼 크로마토그래피로 처리하여 활성화된 산 [5]을 백색 고형물로 수득하였다, 2.4 g (70%). MS: m/z 309 [M+H]⁺.

[0203] ¹H NMR (400 MHz, MeOD) δ 6.78 (s, 2H), 3.49 - 3.46 (m, 2H), 2.82 (s, 4H), 2.62 - 2.59 (m, 2H), 1.78 - 1.65 (m, 2H), 1.64 - 1.50 (m, 2H), 1.46 - 1.26 (m, 2H).

[0204] ¹³C NMR (100 MHz, MeOD) δ 169.8, 169.0, 167.3, 132.5, 35.4, 28.6, 26.1, 23.8, 23.6, 22.3.

[0205] 4-((6-(2,5-디옥소-2,5-디히드로-1H-피롤-1-일)헥산아미도)메틸)시클로헥산카르복실산 [7]

[0206] 트랜스-4-(아미노메틸)-시클로헥산 카르복실산 [6] (2.38g, 15.17 mmol)을 실온에서 빙초산 (20 mL) 중 화합물 [5] (2.46 g, 7.98 mmol)의 교반 용액에 첨가하였고, 반응 혼합물을 실온에서 16시간 동안 교반하였다. 아세트산을 감압하에 제거하였고, 잔류물을 디클로로메탄으로 희석하였고, 물로 세척하여 N-히드록시숙신아미드를 제거하였다. 유기층을 무수 소듐 술페이트 상에서 건조하였고, 여과하고, 용매를 진공하에 제거하였다. 잔류물을 구배 7분 내 석유 에테르 중 에틸 아세테이트 0-100 % 및 5분 내 에틸 아세테이트 100%로, 중압 시스템 Sepacore® Buchi, 실리카겔을 구비한 플래시 크로마토그래피로 처리하여 화합물 [7]을 백색 고형물로 수득하였다, 807 mg (30% 수득율). MS: m/z 349 [M-H]⁺.

[0207] ¹H NMR (400 MHz, MeOD) δ 10.47 (bs, 1H), 7.81 (s, 1H), 6.66 (d, J = 2.3 Hz, 2H), 3.35 (s, 2H), 2.88 (s, 2H), 2.04 (s, 2H), 1.86 (d, J = 10.5 Hz, 2H), 1.68 (d, J = 10.1 Hz, 2H), 1.47 (s, 2H), 1.36 - 1.03 (m, 8H), 0.85 (d, J = 11.7 Hz, 2H).

[0208] ¹³C NMR (100 MHz, MeOD) δ 176.8, 173.0, 169.5, 132.4, 43.4, 41.5, 35.9, 35.5, 33.8, 27.9, 26.6, 25.9, 24.4, 23.6.

[0209] 4-((6-(2,5-디옥소-3-((7-옥소-6-(5-옥소피롤리딘-2-카르복사미도)-7-(페닐아미노)헵틸)티오)피롤리딘-1-일)헥산아미도)메틸)시클로헥산카르복실산 (8)

[0210] 탈기된 메탄올 중 소듐 티오메틸레이트 1M의 용액 (17 mg, 0.25 mmol, 0.250 mL)을 실온에서 탈기된 메탄올 중 ST7612AA1 (100 mg, 0.25 mmol)의 용액에 첨가하였다. 상기 교반 혼합물을 실온에서 30분 동안 유지하였다. 반응 혼합물을 N₂로 5-10분 동안 플러시하여 (flushed) MeSH를 제거하였고, 화합물 7 (88 mg, 0.25 mmol)을 첨가하였다. 상기 혼합물을 실온에서 16시간 동안 유지하였다. 그 다음에 상기 용매를 회전 증발로 제거하였고, 미정제물 (crude)을 디클로로메탄 중 2-20% 메탄올 구배로 컬럼 크로마토그래피에 의해 정제하였다. 화합물 (8)을 백색 고형물로 수득하였다, 102 mg (57%). MS: m/z 737 [M+Na]⁺.

[0211] ¹H NMR (400 MHz, MeOD) δ 9.97 (bs, s), 7.92 (m 2H), 7.60 (m, 2H), 7.34 (m, 2H), 7.14 (m, 1H), 4.57 (m, 1H), 4.31 (m, 1H), 3.54 (m, 2H), 3.06 (d, J = 4.7 Hz, 2H), 2.49-2.14 (m, 4 H), 2.10-2.02 (m, 7 H), 1.87-1.62 (m, 12 H), 1.76 - 1.23 (m, 12H), 1.01 (d, J = 12.4 Hz, 2H).

[0212] ¹³C NMR (100 MHz, MeOD) δ 179.6, 178.4, 177.0, 175.3, 174.7, 173.0, 170.7, 128.0 (2C), 123.7, 119.5 (2C), 77.6, 56.2, 53.5, 44.6 (2C), 42.7, 38.6, 37.7, 35.5, 35.0, 31.4, 30.3, 29.1 (2C), 28.9, 28.0 (3C), 27.4, 26.4, 25.5, 25.0, 24.6, 24.4.

[0213] 2,5-디옥소피롤리딘-1-일 4-((6-(2,5-디옥소-3-((7-옥소-6-(5-옥소피롤리딘-2-카르복사미도)-7-(페닐아미노)헵틸)티오)피롤리딘-1-일)헥산아미도)메틸)시클로헥산카르복실레이트 (1), ST8128AA1.

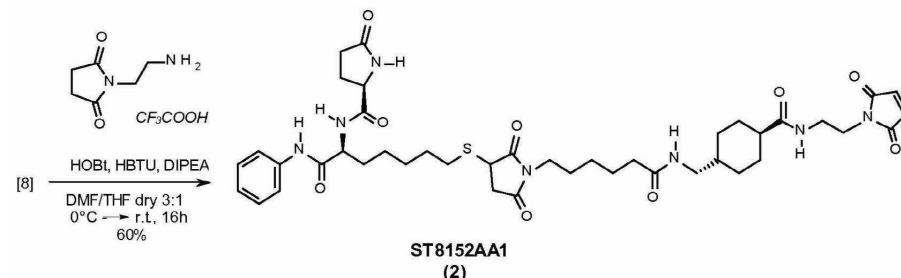
[0214] N₂ 하에 50 mL 플라스크에서, 화합물 [8] (102 mg, 0.14 mmol)을 0.1 mL의 건조 디메틸포름아미드를 포함하는 무수 디클로로메탄 (5 mL)에 용해시켰다. N-히드록시숙신아미드 (24 mg, 0.21 mmol) 및 디시클로카르보디이미드 (50 mg, 0.24 mmol)를 실온에서 첨가하였고, 반응 혼합물을 실온에서 16시간 동안 교반하였다. 상기 용매를 제거하였고, 잔류물을 디클로로메탄 중 2-6% 메탄올로 플래시 크로마토그래피에 의해 정제하였다. 산물 ST8128AA1을 무색 점성 액체로 수득하였다; 101 mg (90% 수득율). MS: m/z 811 [M+H]⁺; 833 [M+Na]⁺.

[0215] ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 9.43 (s, 1H), 7.78 (d, J = 7.0 Hz, 1H), 7.54 (d, J = 7.6 Hz, 2H), 7.35 - 7.14 (m, 2H), 7.08 (t, J = 7.0 Hz, 1H), 6.12 (s, 1H), 4.67 (d, J = 6.4 Hz, 1H), 4.23 (s, 1H), 3.69 (s,

¹H), 3.48 (s, 2H), 3.17 - 2.93 (m, 3H), 2.83 (s, 5H), 2.26 - 2.03 (m, 9H), 1.97 - 1.71 (m, 8H), 1.71 - 1.18 (m, 16H), 1.02 (dd, *J* = 24.0, 11.7 Hz, 2H).

[0216] ¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃) δ 178.9, 176.7, 176.4, 174.4, 173.2, 172.7, 170.5, 170.3, 168.9, 137.4, 128.48 (2C), 124.06, 119.58 (2C), 53.9, 45.4, 45.1, 42.1, 39.2, 38.7, 38.3, 37.6, 37.3, 36.3, 32.1, 31.3 (4C), 29.9, 28.8, 28.2, 27.2, 26.2, 25.3, 18.6, 17.3, 12.0.

[0217] 실시예 2: 페이로드 (2), ST8152AA1의 합성 및 특성 규명



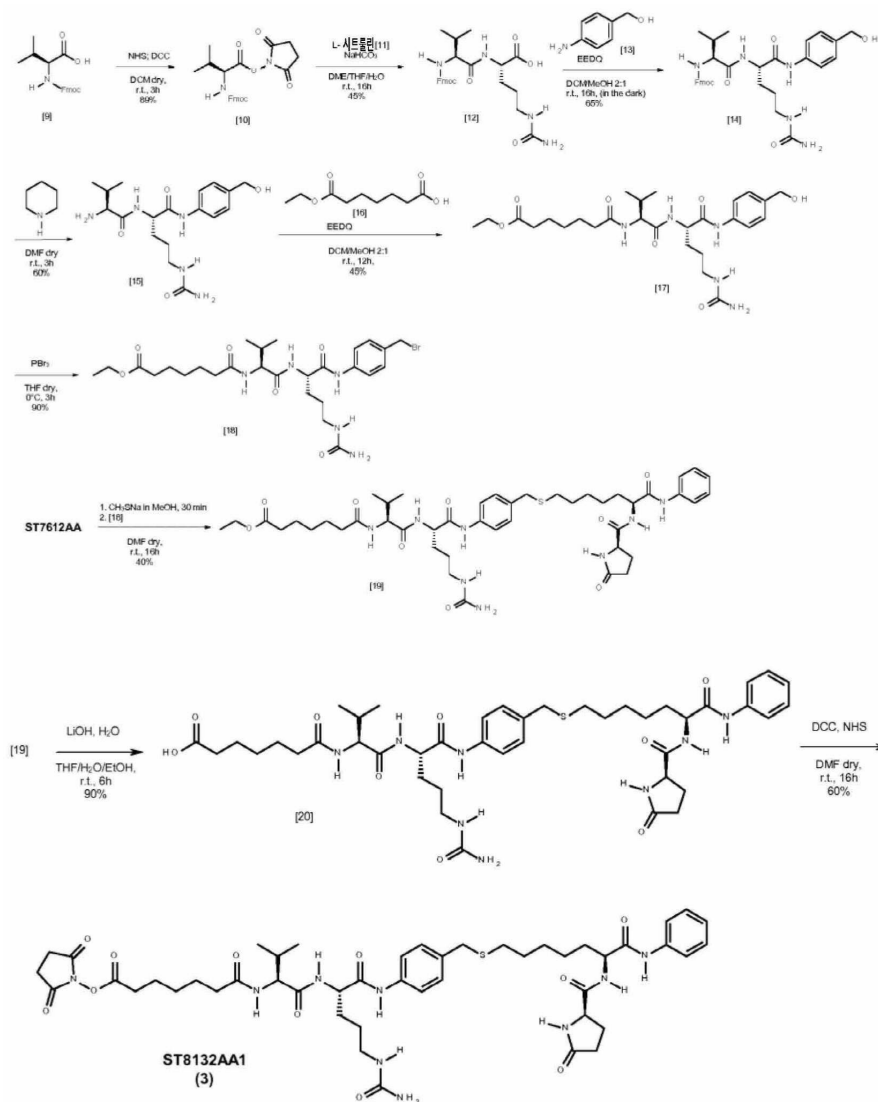
[0218]

[0219] N-(7-((1-(6-(((4-((2-(2,5-디옥소-2,5-디히드로-1H-피롤-1-일)에틸)카르바모일)시클로헥실)메틸)아미노)-6-옥소헥실)-2,5-디옥소피롤리딘-3-일)티오)-1-옥소-1-(페닐아미노)헵탄-2-일)-5-옥소피롤리딘-2-카르복사미드 (2), ST8152AA1.

[0220] N₂ 하에 50 mL 플라스크에서, 화합물 [8] (87 mg, 0.11 mmol)을 0°C에서 테트라히드로푸란 / 디메틸포름아미드 3:1 (4 mL)의 혼합물에 용해시켰다. 그 다음에 N-(2-아미노에틸)말레이미드 트리플루오로아세트레이트 염 (33 mg, 0.13 mmol), 1-히드록시벤조트리아졸 수화물 (22 mg, 0.16 mmol), HBTU (61 mg, 0.16 mmol) 및 N,N-디이소프로필에틸아민 (0.048 mL, 0.27 mmol)을 첨가하였고, 혼합물을 0°C에서 30분 동안 유지하였고, 그 다음에 실온에서 16시간 동안 유지하였다. 반응 혼합물을 디클로로메탄으로 희석하였고, 물로 2회 및 브라인 (brine)으로 2회 세척하였고, 무수 소듐 술페이트 상에서 건조하였고, 상기 용매를 회전 증발로 제거하였다. 잔류물을 디클로로메탄 중 2-20% 메탄올로 플래시 컬럼 크로마토그래피에 의해 정제하였다. 산물 ST8152AA1을 무색 점성 액체로 수득하였다, 55 mg (60% 수득율). MS: m/z 859 [M+Na]⁺.

[0221] ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 9.46 (bs, 1H), 7.60 (d, *J* = 7.9 Hz, 2H), 7.36 - 7.23 (m, 2H), 7.09 (t, *J* = 7.4 Hz, 1H), 6.72 (s, 2H), 6.49 (t, *J* = 5.6 Hz, 1H), 6.32 (t, *J* = 5.7 Hz, 1H), 4.65 (d, *J* = 6.1 Hz, 1H), 4.37 - 4.24 (m, 1H), 3.83 - 3.60 (m, 2H), 3.60 - 3.37 (m, 5H), 3.25 - 2.97 (m, 4H), 2.89 - 2.61 (m, 2H), 2.60 - 2.11 (m, 4H), 2.00 (m, 5H), 1.90 - 1.72 (m, 13H), 1.72 - 1.15 (m, 8H), 0.94 (dd, *J* = 24.3, 11.4 Hz, 2H).

[0222] 실시예 3: 페이로드 (3), ST8132AA1의 합성 및 특성 규명



[0223]

[0224] (S)-2,5-디옥소피롤리딘-1-일 2-((((9H-플루오렌-9-일)메톡시)카르보닐)아미노)-3-메틸부타노에이트 [10]

[0225]

디시클로카르보다이미드 (1.55 g, 7.52 mmol) 및 N-히드록시숙신이미드 (762 mg, 6.63 mmol)를 실온에서 무수 디클로로메탄 (25 mL) 중 Fmoc-Val-OH [9] (1.5 g, 4.42 mmol)의 교반 용액에 첨가하였다. 혼합물을 실온에서 3시간 동안 유지하였다. 상기 반응에서 형성된 백색 고형물을 디클로로메탄으로 여과하여 디시클로헥실우레아를 제거하였고, 유기상을 HCl 0.1N 및 물로 세척하였고, 그 다음에 무수 소듐 술페이트 상에서 건조하였고, 상기 용매를 회전 증발로 제거하였다. 잔류물을 디클로로메탄 중 1% 메탄올로 플래시 컬럼 크로마토그래피로 처리하여 산물 [10]을 백색 고형물로 제공하였다, 1.7 g (89% 수득율). MS: m/z 459 [M+Na]⁺.

[0226]

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 7.80 (d, J = 7.5 Hz, 2H), 7.68 - 7.55 (m, 2H), 7.43 (t, J = 7.4 Hz, 2H), 7.34 (dd, J = 15.9, 8.5 Hz, 2H), 4.70 (d, J = 4.6 Hz, 1H), 4.56 - 4.40 (m, 3H), 4.28 (t, J = 6.6 Hz, 1H), 2.85 (s, 4H), 2.37 (dd, J = 12.3, 6.5 Hz, 1H), 1.08 (dd, J = 11.0, 6.9 Hz, 6H).

[0227]

(S)-2-((S)-2-((((9H-플루오렌-9-일)메톡시)카르보닐)아미노)-3-메틸부탄아미도)-5-우레이도펜타노산 [12]

[0228]

디메톡시에탄 (10 mL) 중 화합물 [10] (1.7 g, 3.9 mmol)을 테트라히드로푸란 및 수성 소듐 비카르보네이트의 혼합물 (344 mg, 10 mL의 물 중 4 mmol)에 용해된 L-시트룰린 [11] (700 mg, 4 mmol)의 용액에 첨가하였다. 상기 반응을 실온에서 16시간 동안 교반하였다. 수 (50 mL) 중 시트르산 15%의 용액을 첨가하였고, 혼합물을 에틸 아세테이트 중 10% 이소프로필 알콜로 추출하였다 (2x75 mL). 상기 용매를 회전 증발로 제거하였다. 디에틸 에테르를 첨가하고 초음파 조사한 후에, 고형물이 형성되었다. 여과 후에 디에틸 에테르로 세척하여 [1

2]를 백색 고형물로 수득하였다, 870 mg (45%). **MS**: m/z 495 $[M-H]^-$.

[0229] $^1\text{H NMR}$ (400 MHz, DMSO) δ 8.19 (bm 3H), 7.87 (t, $J = 25.1$ Hz, 2H), 7.77 (t, $J = 6.8$ Hz, 2H), 7.49 - 7.23 (m, 4H), 5.99 (s, 1H), 5.43 (s, 2H), 4.45 - 4.08 (m, 4H), 3.97 (t, $J = 7.5$ Hz, 1H), 2.99 (d, $J = 5.1$ Hz, 2H), 2.02 (d, $J = 6.1$ Hz, 1H), 1.74 (s, 1H), 1.61 (d, $J = 7.5$ Hz, 1H), 1.44 (s, 2H), 0.91 (dd, $J = 12.5, 6.3$ Hz, 6H).

[0230] $^{13}\text{C NMR}$ (101 MHz, DMSO) δ 173.4, 171.3, 169.8, 167.8, 158.8, 156.0, 143.8, 140.7, 127.6, 127.0, 65.7, 59.8, 51.9, 46.7, 30.5, 26.6, 19.18 (2C).

[0231] (9H-플루오렌-9-일)메틸 ((S)-1-(((S)-1-((4-(히드록시메틸)페닐)아미노)-1-옥소-5-우레이도펜탄-2-일)아미노)-3-메틸-1-옥소부탄-2-일)카르바메이트 [14]

[0232] EEDQ (840 mg, 3.4 mmol)를 디클로로메탄/메탄올 2:1 (15 mL) 중 화합물 [12] (870 mg, 1.7 mmol) 및 *p*-아미노벤질 알콜 (227 mg, 1.8 mmol)을 포함하는 용액에 첨가하였다. 상기 반응을 실온에서 16시간 동안 암실에 두었다. 용매를 제거하였고, 결과의 고형 잔류물을 디에틸 에테르를 사용하여 여과하여 산물 [14]을 백색 고형물로 수득하였다, 660 mg (65% 수득율). **MS**: m/z 624 $[M+Na]^+$.

[0233] $^1\text{H NMR}$ (400 MHz, DMSO) δ 10.00 (bs, 1H), 8.13 (m, 4H), 7.92 (d, $J = 7.3$ Hz, 2H), 7.76 (d, $J = 7.6$ Hz, 2H), 7.58 (d, $J = 8.1$ Hz, 2H), 7.51 - 7.10 (m, 2H), 6.02 (s, 1H), 5.43 (m, 4H), 5.13 (s, 1H), 4.47 (s, 3H), 4.31 (m 4H), 3.13 - 2.74 (m, 2H), 2.03 (s, 1H), 1.83 - 1.55 (m, 2H), 1.43 (s, 2H), 0.90 (d, $J = 6.7$ Hz, 6H).

[0234] $^{13}\text{C NMR}$ (101 MHz, DMSO) δ 171.2, 170.4, 158.93, 156.15, 144.6, 143.8, 140.7, 137.5, 127.6, 127.2 (2C) 125.3, 120.1 (2C), 118.9, 65.7, 62.6, 60.1, 53.0, 46.7, 31.0, 30.5, 26.7, 19.6, 18.7.

[0235] (S)-2-((S)-2-아미노-3-메틸부탄아미도)-N-(4-(히드록시메틸)페닐)-5-우레이도펜탄아미드 [15]

[0236] 피페리딘 (2.2 mL)을 무수 디메틸포름아미드 (5 mL) 중 화합물 [14] (660 mg, 1.09 mmol)의 용액에 첨가하였고, 반응을 실온에서 3시간 동안 두었다. 상기 용매를 진공하에 제거하였고, 잔류물을 디클로로메탄으로 처리하여 고형물을 수득하였고, 여과하여 산물 [15]을 수득하였다, 240 mg (60% mg). **MS**: m/z 380 $[M+H]^+$.

[0237] $^1\text{H NMR}$ (400 MHz, DMSO) δ 10.11 (s, 1H), 8.25 (s, 1H), 7.58 (d, $J = 8.2$ Hz, 2H), 7.27 (d, $J = 8.2$ Hz, 2H), 6.10 (s, 1H), 5.46 (s, 2H), 4.48 (m, 3H), 3.23 - 3.09 (m, 2H), 3.11 - 2.88 (m, 2H), 1.99 (dd, $J = 12.2, 6.4$ Hz, 2H), 1.99 (dd, $J = 12.2, 6.4$ Hz, 1H), 1.81 - 1.55 (m, 2H), 1.55 - 1.28 (m, 2H), 1.04 - 0.68 (m, 6H).

[0238] $^{13}\text{C NMR}$ (101 MHz, DMSO) δ 173.3, 170.4, 158.9, 137.5, 126.9 (2C), 125.3, 119.9 (2C), 62.6, 59.3, 52.6, 31.1, 29.9, 26.6, 19.3, 17.0 (2C).

[0239] 에틸 7-(((S)-1-(((S)-1-((4-(히드록시메틸)페닐)아미노)-1-옥소-5-우레이도펜탄-2-일)아미노)-3-메틸-1-옥소부탄-2-일)아미노)-7-옥소헵타노에이트 [17]

[0240] EEDQ (311 mg, 1.26 mmol)를 디클로로메탄/메탄올 2:1의 혼합물 (20 mL) 중 화합물 [15] (240 mg, 0.63 mmol) 및 모노에틸 피멜레이트 [16] (0.123 mL, 0.69 mmol)의 용액에 첨가하였다. 상기 반응을 실온에서 12시간 동안 암실에 두었다. 상기 용매를 제거하였고, 잔류물을 디클로로메탄 중 2-20% 메탄올로 컬럼 크로마토그래피에 의해 정제하여 산물 [17]을 점성 고형물로 수득하였다, 170 mg (45% 수득율). **MS**: m/z 572 $[M+Na]^+$.

[0241] $^1\text{H NMR}$ (400 MHz, MeOD) δ 7.59 (d, $J = 8.3$ Hz, 2H), 7.34 (d, $J = 8.3$ Hz, 2H), 4.65 - 4.44 (m, 4H), 4.25 (d, $J = 7.4$ Hz, 1H), 4.15 (dd, $J = 14.2, 7.1$ Hz, 2H), 3.30 - 3.06 (m, 2H), 2.34 (dd, $J = 13.9, 6.7$ Hz, 2H), 2.13 (d, $J = 6.9$ Hz, 1H), 1.92 (dd, $J = 14.1, 6.2$ Hz, 2H), 1.89 - 1.74 (m, 2H), 1.74 - 1.34 (m, 12H), 1.30 (dd, $J = 18.0, 10.9$ Hz, 3H), 1.06 - 0.84 (m, 8H).

[0242] $^{13}\text{C NMR}$ (101 MHz, MeOD) δ 174.5, 172.1, 171.7, 170.4, 158.9, 136.5, 126.8 (2C), 124.1, 120.9 (2C),

62.9, 59.5, 58.6, 53.0, 38.4, 34.7, 33.0, 29.8, 29.2, 27.9, 27.2, 25.0, 23.6, 17.5, 16.9, 12.7.

[0243] 에틸 7-(((S)-1-(((S)-1-((4-(브로모메틸)페닐)아미노)-1-옥소-5-우레이도펜탄-2-일)아미노)-3-메틸-1-옥소부탄-2-일)아미노)-7-옥소헵타노에이트 [18]

[0244] 포스포러스 트리브로미드 (0.043 mL, 0.46 mmol)를 0℃에서 무수 테트라히드로푸란 (5 mL) 중 화합물 [17] (170 mg, 0.31 mmol)의 용액에 첨가하였다. 혼합물을 0℃에서 3시간 동안 유지하였다. 반응 혼합물을 디클로로메탄 중 1-6% 메탄올로 플래시 크로마토그래피에 의한 정제를 위해 실리카 컬럼으로 직접 처리하여 산물 [18]을 백색 고형물로 수득하였다, 170 mg (90% 수득율). MS: m/z 613 [M+H]⁺; 635 [M+Na]⁺.

[0245] ¹H NMR (400 MHz, 아세톤-d₆) δ 9.85 (d, J = 6.1 Hz, 1H), 7.85 (dd, J = 25.2, 8.1 Hz, 2H), 7.39 (dt, J = 44.7, 22.3 Hz, 2H), 4.90 - 4.54 (m, 5H), 4.19 - 3.97 (m, 2H), 3.58 (t, J = 6.6 Hz, 1H), 3.36 (d, J = 20.6 Hz, 2H), 2.41 (dd, J = 21.3, 6.3 Hz, 2H), 2.33 - 2.16 (m, 3H), 2.14 - 2.02 (m, 2H), 2.04 - 1.93 (m, 2H), 1.93 - 1.73 (m, 2H), 1.71 - 1.46 (m, 2H), 1.48 - 1.13 (m, 6H), 1.11 - 0.77 (m, 8H).

[0246] 에틸 7-(((S)-3-메틸-1-옥소-1-(((S)-1-옥소-1-((4-(((S)-7-옥소-6-((R)-5-옥소피롤리딘-2-카르복사미도)-7-(페닐아미노)헵틸)티오)메틸)페닐)아미노)-5-우레이도펜탄-2-일)아미노)부탄-2-일)아미노)-7-옥소헵타노에이트 [19]

[0247] ST7612AA1 (125 mg, 0.31 mmol)을 N₂ 대기하에 50 mL 플라스크에서 탈기된 메탄올 (8mL)에 용해시켰다. 탈기된 메탄올 중 소듐 티오메틸레이트 1M의 용액 (22 mg, 0.31 mmol)을 실온에서 제1 용액에 첨가하였다. 혼합물의 교반을 실온에서 30분 동안 유지하였다. 상기 용액을 N₂로 5-10분 동안 플러시하여 MeSH를 제거하였고, 그 다음에 상기 용매를 회전 증발로 제거하였다. 소량의 무수 디메틸포름아미드에 용해시킨 화합물 [18] (170 mg, 0.31 mmol)을 상기 잔류물에 첨가하였고, 혼합물을 실온에서 16시간 동안 유지하였다. 상기 용매를 회전 증발로 제거하였고, 미정제물을 디클로로메탄 중 1-40% 메탄올로 컬럼 크로마토그래피에 의해 정제하여 [19]를 비정질 고형물로 수득하였다; 106 mg (40% 수득율). MS: m/z 896 [M+H]⁺; 918 [M+Na]⁺.

[0248] ¹H NMR (400 MHz, MeOD) δ 7.60 (s, 4H), 7.43 - 7.18 (m, 4H), 7.13 (s, 1H), 4.55 (m, 4H), 4.40 (m, 2H), 4.13 (m, 2H), 3.66 (m, 6H), 3.19 (s, 4H), 2.75 (s, 2H), 2.37 (m, 6H), 2.11 (s, 2H), 1.97 (s, 1H), 1.82 (s, 2H), 1.64 (s, 7H), 1.42 (s, 4H), 1.27 (s, 4H), 1.01 (s, 6H).

[0249] 7-(((S)-3-메틸-1-옥소-1-(((S)-1-옥소-1-((4-(((S)-7-옥소-6-((R)-5-옥소피롤리딘-2-카르복사미도)-7-(페닐아미노)헵틸)티오)메틸)페닐)아미노)-5-우레이도펜탄-2-일)아미노)부탄-2-일)아미노)-7-옥소헵타노산 [20]

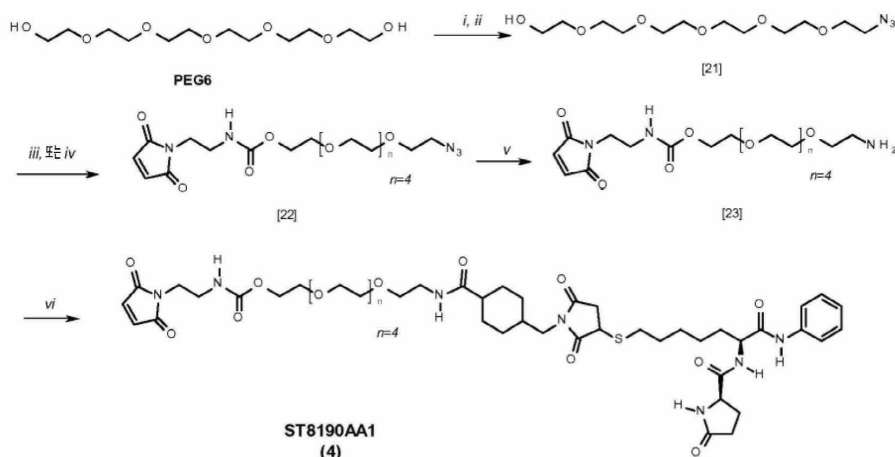
[0250] 리튬 히드록시드 일수화물 (42 mg, 1 mmol)을 테트라히드로푸란/물/에탄올 1:1:1 (12 mL)의 혼합물 중 [19] (300 mg, 0.33 mmol)의 용액에 첨가하였다. 상기 반응을 실온에서 6시간 동안 유지하였고, 그 다음에 이를 에틸 아세테이트로 희석하였고, HCl 1N로 세척하였다. 미정제물 (180 mg)은 다음 단계를 위해 임의의 정제 없이 직접 사용되었다. MS: m/z 874 [M+Li]⁺; 890 [M+Na]⁺.

[0251] 2,5-디옥소피롤리딘-1-일 7-(((S)-3-메틸-1-옥소-1-(((S)-1-옥소-1-((4-(((S)-7-옥소-6-((R)-5-옥소피롤리딘-2-카르복사미도)-7-(페닐아미노)헵틸)티오)메틸)페닐)아미노)-5-우레이도펜탄-2-일)아미노)부탄-2-일)아미노)-7-옥소헵타노에이트 (3), ST8132AA1.

[0252] 디시클로헥실카르보디이미드 (70 mg, 0.35 mmol) 및 N-히드록시숙신이미드 (34 mg, 0.3 mmol)를 실온에서 무수 디메틸포름아미드 (3 mL) 중 화합물 [20] (180 mg, 0.20 mmol)의 교반 용액에 첨가하였다. 상기 혼합물을 실온에서 16시간 동안 유지하였다. 상기 반응에서 형성된 백색 고형물을 여과하여 디시클로헥실우레아를 제거하였고, 유기상을 HCl 0.1N 및 물로 세척하였고, 그 다음에 무수 소듐 술페이트 상에서 건조하였고, 상기 용매를 진공하에 제거하였다. 결과의 잔류물을 디클로로메탄 중 2-20% 메탄올로 플래시 컬럼 크로마토그래피로 처리하여 활성화된 산 (3)을 백색 점성 고형물로 수득하였다, 109 mg (60% 수득율). MS: m/z 987 [M+Na]⁺.

[0253] ¹H NMR (400 MHz, DMSO) δ 10.10 (s, 4H), 9.95 (s, 1H), 7.59 (m, 4H), 7.33 (t, J = 7.5 Hz, 2H), 7.24 (d, J = 7.8 Hz, 2H), 7.08 (t, J = 7.2 Hz, 1H), 6.00 (s, 1H), 5.42 (s, 2H), 4.43 (d, J = 14.3 Hz, 2H), 3.67 (s, 1H), 3.12 - 2.90 (m, 2H), 2.84 (s, 4H), 2.65 (m, 5H), 2.53 (s, 6H), 2.17 (m, 2H), 1.63 (m, 10H), 1.36 (s, 4H), 0.94 - 0.75 (m, 8H).

[0254] 실시예 4: 페이로드 (4), ST8190AA1의 합성 및 특성 규명



[0255]

[0256] i. 토실-Cl, TEA, THF; ii. NaN_3 , DMF; iii. *p*-니트로페닐클로로포르메이트, DMAP, DCM; iv. *N*-(2-아미노에틸)말레이미드 트리플루오로아세테이트, DBU, DCM; v. PPh_3 , THF; vi. 4-((2,5-디옥소-3-(((6S)-7-옥소-6-(5-옥소피롤리딘-2-카르복사미도)-7-(페닐아미노)헵틸)티오)피롤리딘-1-일)메틸)시클로헥산-1-카르복실산 HOBt, HBTU, DIPEA, THF.

[0257] 2-[-2-(2-[2-(2-히드록시에톡시)-에톡시]-에톡시)-에톡시]-에틸아지드 [21]

[0258] THF (250 mL) 중 헥사에틸렌글리콜 (50 g, 177 mmol) 및 트리에틸아민 (14 mL, 100 mmol)의 용액에, THF (250 mL) 중 *para*-톨루엔술포닐-클로리드 (13 g, 70 mmol)를 첨가하였고, 상기 용액을 밤새 교반하였다. 그 다음에 상기 용액을 CH_2Cl_2 (200 mL)으로 희석하였고, 1N HCl (3 x 150 mL) 및 브라인 (150 mL)으로 세척하였고, Na_2SO_4 상에서 건조하였다. 진공에서 용매의 여과 및 증발 후에, 잔류물을 컬럼 크로마토그래피 (실리카, CH_2Cl_2 중 2% 메탄올)에 의해 정제하여 모노토실 유도체 (24.4 g, 56 mmol, *p*-TsCl과 비교하여 80%)를 무색 오일로 수득하였다: TLC (CH_2Cl_2 :MeOH 95:5): R_f = 0.32.

[0259] $^1\text{H NMR}$ (400 MHz, CDCl_3) δ = 7.79 (d, J = 8.0 Hz, 2H), 7.33 (d, J = 8.0 Hz, 2H), 4.09-4.07 (m, 2H), 3.74-3.56 (m, 22H), 2.97 (br, 1H, OH), 2.44 (s, 3H); $^{13}\text{C NMR}$ (100 MHz, CDCl_3) δ = 145.0, 133.3, 130.0, 128.2, 72.7, 70.9-70.5, 69.5, 68.9, 61.9, 21.8; MS: m/z 437 $[\text{M}+\text{H}]^+$.

[0260] 그 다음에 DMF (150 mL) 중 토실유도체 (20.4 g, 56 mmol) 및 NaN_3 (3.7 g, 57 mmol)의 혼합물을 실온에서 밤새 교반하였다. DMF를 진공에서 증발시켰고, 잔류물을 AcOEt에 용해시켰고, Celite[®] 상에서 여과하였다. AcOEt를 감압하에 증발시켜서 순수한 [21] (14.6 g, 48 mmol, 85%)을 수득하였다: TLC (CH_2Cl_2 :MeOH 94:6): R_f = 0.38; $^1\text{H NMR}$ (400 MHz, CDCl_3) δ = 3.72-3.57 (m, 22H), 3.38-3.36 (m, 2H), 2.80 (bs, 1H); $^{13}\text{C NMR}$ (100 MHz, CDCl_3) δ = 72.8, 70.7-70.1, 61.8, 50.7.

[0261] 17-아지도-3,6,9,12,15-펜타옥사헵타데실(2-(2,5-디옥소-2,5-디히드로-1*H*-피롤-1-일)에틸)카르바메이트 [22]

[0262] CH_2Cl_2 (50 mL) 중 [21] (500 mg, 1.63 mmol) 및 DMAP (1 g, 9 mmol)의 용액에, 4-니트로페닐클로로포르미에이트 (1.15 g, 5.7 mmol)를 0 °C에서 첨가하였다. 혼합물을 실온에서 2시간 동안 교반하였다. 그 다음에 상기 용액을 CH_2Cl_2 (50 mL)로 희석하였고, 1N HCl (3 x 25 mL) 및 브라인 (50 mL)으로 세척하였고, Na_2SO_4 드라이 상에서 건조하였다. 진공에서 상기 용매의 여과 및 증발 후에, 잔류물을 컬럼 크로마토그래피 (CH_2Cl_2 :MeOH 95:5)로 정제하였다. 황색 고형물을 분리하였다 (501 mg, 61%): R_f = 0.75; $^1\text{H NMR}$ (400 MHz, CDCl_3) δ = 8.23 (dd, J = 9.6, 2.8 Hz, 2H), 7.35 (dd, J = 9.5, 2.9 Hz, 2H), 4.43 - 4.35 (m, 2H), 3.81 - 3.74 (m, 2H), 3.74 - 3.52 (m, 24H), 3.34 (dd, J = 6.6, 3.5 Hz, 2H); MS: m/z 471 $[\text{M}-\text{H}]^-$. *para*-니트로 유도체 (501 mg,

1 mmol) 및 DBU (1.5 ml, 10 mmol)를 CH₂Cl₂에 용해시켰고, *N*-(2-아미노에틸)말레이미드 트리플루오로아세테이트 (254 mg, 1 mmol)를 첨가하였다. 반응 혼합물을 실온에서 밤새 교반하였다. 그 다음에 상기 용액을 CH₂Cl₂ (25 mL)로 희석하였고, 1N HCl (3 x 10 mL) 및 브라인 (20 mL)으로 세척하였고, Na₂SO₄ 드라이 상에서 건조하였다. 진공에서 상기 용매의 여과 및 증발 후에, 잔류물을 컬럼 크로마토그래피 (CH₂Cl₂:MeOH 95:5)로 정제하여 백색 고형물 (47 mg, 0.1 mmol, 10%)을 수득하였다. ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ: 7.80 (s, 1H), 3.92-3.50 (m, 24H), 3.38-3.36 (m, 4H); ¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃) δ = 171.2, 157.2, 135.6, 72.8, 70.7-70.1, 61.8, 50.7. MS: *m/z* 474 [M+H]⁺.

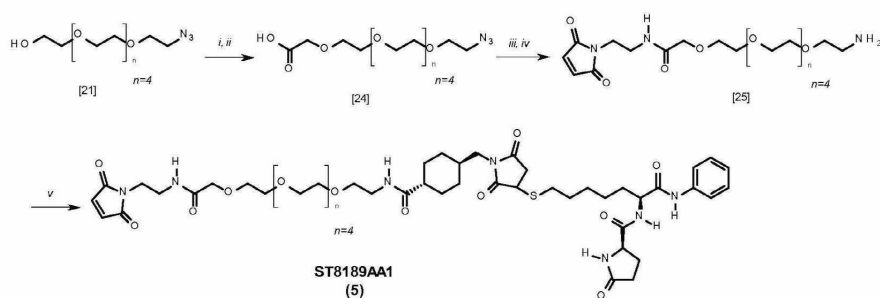
[0263] 17-아미노-3,6,9,12,15-펜타옥사헵타데실 (2-(2,5-디옥소-2,5-디히드로-1*H*-피롤-1-일)에틸)카르바메이트 [23]

[0264] 건조 THF (10 mL) 중 [22] (47 mg, 0.1 mmol)의 용액을 0 °C로 냉각시켰다. 트리페닐 포스핀 (53 g, 0.2 mmol)을 첨가하였고, 혼합물을 24시간 동안 실온에서 교반하였다. 그 다음에 H₂O (5 mL)를 첨가하여 중간체 인 부가물을 가수분해하였고, 상기 용액을 또 다른 24시간 동안 실온에서 교반하였다. THF를 증발시켰고, 고형 잔류물을 물 (10 mL)에 현탁시켰다. 불용성 염을 여과하였고, 여과물을 톨루엔 (5 x 5 mL)으로 세척하였고, 증발 시켜서 [23] (44 mg, 0.1 mmol, 99%)을 연황색 오일로 수득하였고, 이는 다음 단계에서 추가의 정제 없이 사용되었다. ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ = 7.80 (s, 1H), 3.92-3.50 (m, 22H), 3.38-3.36 (m, 4H) 3.01-3.11 (m, 2H), 1.81 (bs, 2H); MS: *m/z* 448 [M+H]⁺.

[0265] 1-((1*S*,4*R*)-4-((2,5-디옥소-3-(((6*S*)-7-옥소-6-(5-옥소피롤리딘-2-카르복사미도)-7-(페닐아미노)헵틸)티오)피롤리딘-1-일)메틸)시클로헥실)-1-옥소-5,8,11,14,17-펜타옥사-2-아자노나데칸-19-일 (2-(2,5-디옥소-2,5-디히드로-1*H*-피롤-1-일)에틸)카르바메이트 (4), ST8190AA1

[0266] 4-((2,5-디옥소-3-(((6*S*)-7-옥소-6-(5-옥소피롤리딘-2-카르복사미도)-7-(페닐아미노)헵틸)티오)피롤리딘-1-일)메틸)시클로헥산-1-카르복실산 (60 mg, 0.1 mmol)을 건조 THF (15 mL)에 용해시켰고, 반응 혼합물을 0 °C로 냉각시켰다. HOBt (20 mg, 0.15 mmol), HBTU (57 mg, 0.15 mmol), [23] (44 mg, 0.1 mmol) 및 DIPEA (48 μL, 0.25 mmol)를 첨가하였고, 반응 혼합물을 실온에서 밤새 교반하였다. 그 다음에 상기 용액을 AcOEt (15 mL)로 희석하였고, H₂O (3 x 10 mL)로 추출하였다. 유기상을 Na₂SO₄ 드라이 상에서 건조하였고, 진공에서 상기 용매의 여과 및 증발 후에, 잔류물을 컬럼 크로마토그래피 (CH₂Cl₂:MeOH 98:2)에 의해 정제하여 ST8190AA1을 무색 오일로 수득하였다 (31 mg, 0.03 mmol, 10%). MS: *m/z* 1031 [M+H]⁺.

[0267] 실시예 5: 페이로드 (5), ST8189AA1의 합성 및 특성 규명



[0268]

[0269] i. EtOCOCH₂Br, NaH, THF; ii. LiOH, THF, H₂O, EtOH; iii. *N*-(2-아미노에틸)말레이미드 트리플루오로아세테이트, DBU, DCM; iv. PPh₃, THF; v. 4-((2,5-디옥소-3-(((6*S*)-7-옥소-6-(5-옥소피롤리딘-2-카르복사미도)-7-(페닐아미노)헵틸)티오)-피롤리딘-1-일)메틸)시클로헥산-1-카르복실산, HOBt, HBTU, DIPEA, THF.

[0270] 20-아지도-3,6,9,12,15,18-헥사옥사이코사노산 [24]

[0271] 미네랄 오일 중 NaH 60%wt (29 mg, 0.39 mmol)를 건조 THF (5 mL)에 현탁시켰고, 건조 THF (3 mL) 중 [21] (100 mg, 0.32 mmol)의 용액을 0 °C에서 천천히 첨가하였다. 20분 동안 0 °C에서 교반한 후에, 건조 THF (3 mL) 중 에틸-브로모아세테이트 (53 μL, 0.48 mmol)의 용액을 첨가하였고, 상기 혼합물을 실온에서 밤새 교반하

였다. H₂O (1 mL)를 천천히 첨가하였고, 용매를 감압하에 증발시켰다. 수득된 고형물을 플래시 크로마토그래피 (CH₂Cl₂:MeOH 95:5)로 정제하여 정량적 수득율로 연장미색 오일을 제공하였다 (51 mg, 0.13 mmol). ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ = 4.28 (s, 2H); 4.21 (q, 2H); 3.92-3.50 (m, 22H), 3.38-3.36 (m, 4H), 2.05-1.98 (m, 2H); 1.23 (t, 3H); **MS**: *m/z* 394 [M+H]⁺. 에틸 에스테르 (51 mg, 0.13 mmol)를 H₂O, THF 및 EtOH의 1:1:1 혼합물 (15 mL)에 용해시켰고, LiOH 일수화물을 첨가하였다 (16 mg, 0.39 mmol). 상기 혼합물을 2시간 동안 교반 환류시켰고, 그 다음에 HCl을 pH 7이 될 때까지 첨가하였다. 상기 용매를 감압하에 증발시켰고, 수득된 고형물을 EtOH (2 x 10 mL)으로 세척하였다. 상기 용액을 증발시켜서 [24]의 무색 오일 (47 mg, 0.13 mmol)을 제공하였고, 다음 단계를 위해 직접 사용되었다. **MS**: *m/z* 364 [M+H]⁺.

[0272] **20-아미노-N-(2-(2,5-디옥소-2,5-디히드로-1H-피롤-1-일)에틸)-3,6,9,12,15,18-헥사옥사이코산아미드** [25]

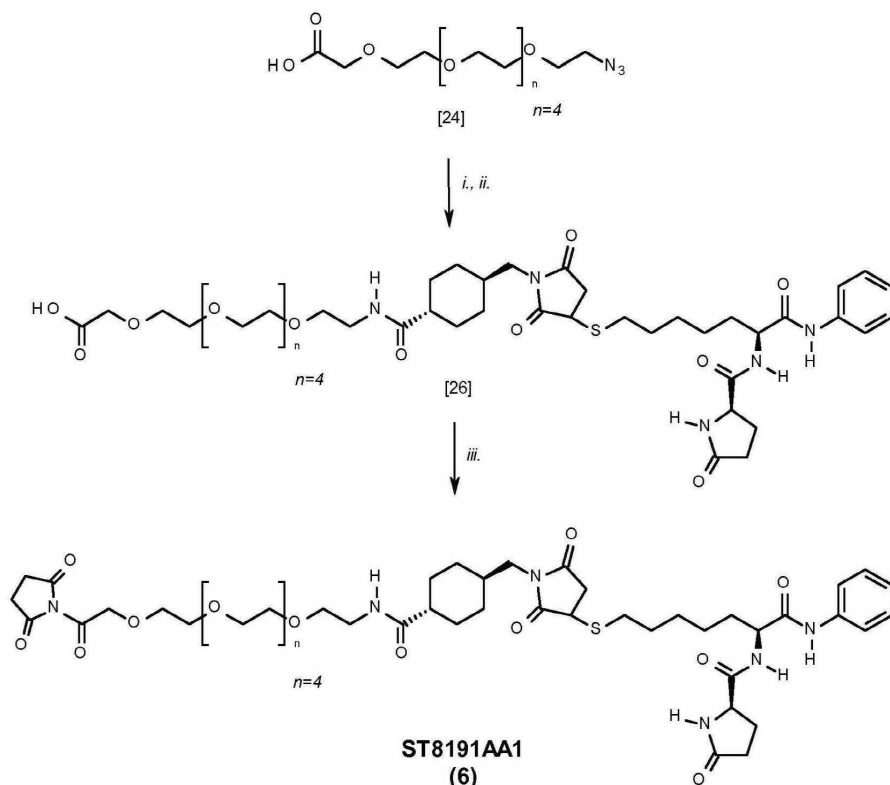
[0273] [24] (47 mg, 0.13 mmol)의 용액을 건조 THF (15 mL)에 용해시켰고, 반응 혼합물을 0 °C로 냉각시켰다. HOBt (26 mg, 0.2 mmol), HBtU (76 mg, 0.2 mmol), *N*-(2-아미노에틸)말레이미드 트리플루오로아세테이트 (33 mg, 0.13 mmol) 및 DIPEA (63 μL, 0.33 mmol)를 첨가하였고, 반응 혼합물을 실온에서 밤새 교반하였다. 그 다음에 상기 용액을 AcOEt (15 mL)로 희석하였고, H₂O (3 x 10 mL)로 추출하였다. 유기상을 Na₂SO₄ 드라이 상에서 건조하였고, 진공에서 상기 용매의 여과 및 증발 후에, 잔류물을 컬럼 크로마토그래피 (CH₂Cl₂:MeOH 98:2)로 정제하여 무색 오일을 수득하였다 (49 mg, 0.10 mmol). **MS**: *m/z* 488 [M+H]⁺.

[0274] 수득된 아지도 유도체 (49 mg, 0.10 mmol)를 0 °C에서 건조 THF (10 mL)에 용해시켰다. 트리페닐 포스핀 (53 g, 0.2 mmol)을 첨가하였고, 상기 혼합물을 24시간 동안 실온에서 교반하였다. 그 다음에 H₂O (5 mL)를 첨가하여 중간체 인 부가물을 가수분해하였고, 상기 용액을 또 다른 24시간 동안 실온에서 교반하였다. THF를 증발시켰고, 고형 잔류물을 물 (10 mL)에 현탁시켰다. 불용성 염을 여과하였고, 여과물을 톨루엔 (5 x 5 mL)으로 세척하였고, 증발시켜서 [25] (46 mg, 0.1 mmol, 99%)를 연황색 오일로 수득하였고, 다음 단계에서 추가의 정제 없이 사용되었다. ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ = 8.03 (bs, 1H); 7.80 (s, 1H), 4.26 (s, 2H); 3.92-3.50 (m, 26H), 3.03-3.07 (m, 2H), 1.81 (bs, 2H); **MS**: *m/z* 462 [M+H]⁺.

[0275] **N-((2S)-7-((1-((4-((1-(2,5-디옥소-2,5-디히드로-1H-피롤-1-일)-4-옥소-6,9,12,15,18,21-헥사옥사-3-아자트리코산-23-일)카르바모일)시클로헥실)메틸)-2,5-디옥소피롤리딘-3-일)티오)-1-옥소-1-(페닐아미노)헵탄-2-일)-5-옥소피롤리딘-2-카르복사미드 (5), ST8189AA1**

[0276] 4-((2,5-디옥소-3-(((6S)-7-옥소-6-(5-옥소피롤리딘-2-카르복사미도)-7-(페닐아미노) 헵틸)티오)피롤리딘-1-일)메틸)시클로헥산-1-카르복실산 (60 mg, 0.1 mmol)을 건조 THF (15 mL)에 용해시켰고, 반응 혼합물을 0 °C로 냉각시켰다. HOBt (20 mg, 0.15 mmol), HBtU (57 mg, 0.15 mmol), **[25]** (46 mg, 0.1 mmol) 및 DIPEA (48 μL, 0.25 mmol)를 첨가하였고, 반응 혼합물을 실온에서 밤새 교반하였다. 그 다음에 상기 용액을 AcOEt (15 mL)로 희석하였고, H₂O (3 x 10 mL)로 추출하였다. 유기상을 Na₂SO₄ 드라이 상에서 건조하였고, 진공에서 상기 용매를 여과 및 증발 후에, 잔류물을 컬럼 크로마토그래피 (CH₂Cl₂:MeOH 98:2)로 정제하여 페이로드 ST8189AA1을 무색 오일로 수득하였다 (21 mg, 0.02 mmol, 20%). **MS**: *m/z* 1045 [M+H]⁺.

[0277] 실시예 6: 페이로드 (6), ST8191AA1의 합성 및 특성 규명



[0278]

[0279]

i. PPh₃, THF; ii. 4-((2,5-디옥소-3-(((6S)-7-옥소-6-(5-옥소피롤리딘-2-카르복사미도)-7-(페닐아미노)헵틸)티오)-피롤리딘-1-일)메틸)시클로헥산-1-카르복실산, DCC, NHS, DCM; iii. DCC, NHS, DCM.

[0280]

1-(4-((2,5-디옥소-3-(((6S)-7-옥소-6-(5-옥소피롤리딘-2-카르복사미도)-7-(페닐아미노)헵틸)티오)피롤리딘-1-일)메틸)시클로헥실)-1-옥소-5,8,11,14,17,20-헥사옥사-2-아자도코사노-22-산 [26]

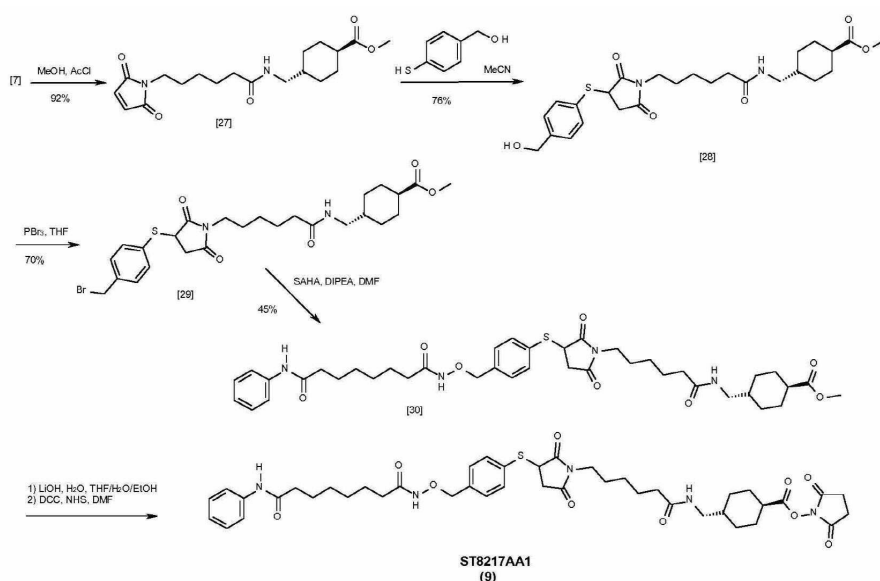
[0281]

아지드 [24] (49 mg, 0.10 mmol)를 0 °C에서 건조 THF (10 mL)에 용해시켰다. 트리페닐 포스핀 (53 mg, 0.2 mmol)을 첨가하였고, 혼합물을 24시간 동안 실온에서 교반하였다. 그 다음에 H₂O (5 mL)를 첨가하여 중간체 인 부가물을 가수분해하였고, 상기 용액을 또 다른 24시간 동안 실온에서 교반하였다. THF를 증발시켰고, 고형 잔류물을 물 (10 mL) 중에 현탁시켰다. 불용성 염을 여과하였고, 여과물을 톨루엔 (5 x 5 mL)으로 세척하였고, 증발시켜서 20-아미노-3,6,9,12,15,18-헥사옥사이코사노산 (46 mg, 0.1 mmol, 99%)을 연황색 오일로 수득하였고, 이는 다음 단계에서 추가의 정제 없이 사용되었다. ¹H NMR (400 MHz, CD₃OD) δ = 12.0 (bs, 1H); 4.26 (s, 2H); 3.92-3.50 (m, 22H), 3.03-3.07 (m, 2H), 1.81 (bs, 2H); MS: m/z 340 [M+H]⁺. 건조 CH₂Cl₂ (5 mL) 중 4-((2,5-디옥소-3-(((6S)-7-옥소-6-(5-옥소피롤리딘-2-카르복사미도)-7-(페닐아미노)헵틸)티오)-피롤리딘-1-일)메틸)시클로헥산-1-카르복실산 (80 mg, 0.11 mmol)을 실온에서 건조 CH₂Cl₂ 중 디시클로헥실-카르보디이미드 (0.11 mmol) 및 N-히드록시숙신이미드 (0.1 mmol)를 포함하는 용액에 첨가하였고, 혼합물을 실온에서 3시간 동안 교반하였다. 백색 고형물을 디클로로메탄으로 여과하여 디시클로헥실우레아를 제거하였고, 유기상을 HCl 0.1N 및 H₂O로 세척하였고, 그 다음에 건조 소듐 술페이트 상에서 건조하였고, 상기 용매를 감압하에 제거하였다. 결과의 잔류물을 플래시 컬럼 크로마토그래피로 정제하여 활성화된 산을 백색 왁스형 물질로 수득하였고 (수득율 90%) 이를 디메톡시에탄 (5 mL)으로 용해시켰고, 테트라히드로푸란 및 수성 소듐 비카르보네이트 (15 mg, 2 mL의 물 중 0.15 mmol)의 혼합물에 용해된 20-아미노-3,6,9,12,15,18-헥사옥사이코사노산 (46 mg, 0.1 mmol)으로 처리하였다. 상기 반응을 실온에서 16시간 동안 교반하였다. 수 (2.5 mL) 중 시트르산 15%의 용액을 첨가하였고, 혼합물을 에틸 아세테이트 중 10% 이소프로필 알콜 (2 x 5 mL)로 추출하였다. 상기 용매를 회전 증발로 제거하였다. 디에틸 에테르를 첨가하고 초음파로 조사한 후에, 고형물이 형성되었다. 여과 후에 디에틸 에테르로 세척하여 [26]을 백색 고형물로 수득하였다, 65 mg (70%). MS: m/z 918 [M-H]⁻.

[0282] 2,5-디옥소피롤리딘-1-일 1-(4-((2,5-디옥소-3-(((6S)-7-옥소-6-(5-옥소피롤리딘-2-카르복사미도)-7-(페닐아미노)헵틸)티오)피롤리딘-1-일)메틸)시클로헥실)-1-옥소-5,8,11,14,17,20-헥사옥사-2-아자도코사노-22-에이트 (6), ST8191AA1.

[0283] 건조 CH_2Cl_2 (5 mL) 중 화합물 [26] (65 mg, 0.07 mmol)을 실온에서 디시클로헥실-카르보다이미드 (0.1 mmol) 및 N-히드록시숙신이미드 (0.07 mmol)의 용액에 첨가하였고, 상기 혼합물을 실온에서 3시간 동안 교반하였다. 백색 고형물을 디클로로메탄으로 여과하여 디시클로헥실우레아를 제거하였고, 유기상을 HCl 0.1N 및 H_2O 로 세척하였고, 그 다음에 건조 소듐 술페이트 상에서 건조하였고, 상기 용매를 감압하에 제거하였다. 결과의 잔류물을 플래시 컬럼 크로마토그래피로 정제하여 활성화된 산을 백색 고형물로 수득하였다 61 mg (85%). MS: m/z 1020 $[\text{M}+\text{H}]^+$.

[0284] 실시예 7: 페이로드 (9), ST8217AA1의 합성 및 특성 규명



[0285]

[0286] 메틸 (1R,4R)-4-((6-(2,5-디옥소-2,5-디히드로-1H-피롤-1-일)헥산아미도)메틸)시클로헥산-1-카르복실레이트 [27]

[0287] 아세틸 클로리드 (1.01 mL, 14.26 mmol)를 N_2 하에 둥근 바닥 플라스크에서 MeOH (50 mL) 중 산 [7] (1.00 g, 2.85 mmol)의 용액에 첨가하였다. 결과의 용액을 실온에서 3시간 동안 교반하였고, 그 다음에 상기 용액을 진공에서 농축시켰다. 잔류물을 CH_2Cl_2 (30 mL)에 용해시켰고, 수성 소듐 비카르보네이트 (3 x 15 mL) 및 브라인 (2 x 15 mL)의 포화 용액으로 세척하였다. 유기상을 소듐 술페이트 상에서 건조하였고, 여과하였고, 진공에서 농축하여 950 mg (2.61 mmol)의 화합물 [27]을 백색 고형물로 제공하였다 (수득율 92%). ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3 , δ ppm, J Hz): δ 6.65 (s, 2H), 3.62 (s, 3H), 3.50-3.46 (m, 2H), 3.07 (t, J = 6.4, 2H), 2.23-2.11 (m, 3H), 1.97 (dd, J = 13.6, 2.8, 2H), 1.78 (dd, J = 12.8, 2.0, 2H), 1.66-1.55 (m, 4H), 1.44-1.26 (m, 5H), 0.99-0.92 (m, 2H). MS: m/z 365 $[\text{M} + 1]^+$; 387 $[\text{M} + 23]^+$. TLC R_f : 0.75 (CH_2Cl_2 :MeOH 9:1).

[0288] 메틸 (1R,4R)-4-((6-(3-(((4-(히드록시메틸)페닐)티오)-2,5-디옥소피롤리딘-1-일)헥산아미도)메틸)시클로헥산-1-카르복실레이트 [28]

[0289] (4-머캅토펜일)메탄올 [36] (548 mg, 3.91 mmol)을 N_2 대기하에 둥근 바닥 플라스크에서 CH_3CN (20 mL) 중 화합물 [27] (950 mg, 2.61 mmol)의 용액에 첨가하였다. 결과의 용액을 실온에서 3시간 동안 교반하였고, 그 다음에 상기 용액을 진공에서 농축하였다. 미정제의 반응 혼합물을 실리카겔 플래시 크로마토그래피 (석유 에테르:EtOAc 1:4)로 정제하여 1024 mg (2.03 mmol)의 화합물 [28]을 연황색의 점성 오일을 제공하였다 (수득율 78%). ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3 , δ ppm, J Hz): δ 7.46 (d, J = 7.6, 2H), 7.31 (d, J = 8.0, 2H), 5.81 (bs, 1H), 4.67 (s, 2H), 3.91-3.89 (m, 1H), 3.63 (s, 3H), 3.38-3.32 (m, 2H), 3.16-3.03 (m, 4H), 2.82 (bs,

1H), 2.21-1.96 (m, 5H), 1.77 (d, $J = 12.8$, 2H), 1.50-1.23 (m, 9H), 1.02-0.92 (m, 2H). **MS**: m/z 527 $[M + 23]^+$; 543 $[M + 39]^+$. **TLC** R_f : 0.3 (EtOAc).

[0290] 메틸 (1R,4R)-4-((6-(3-((4-(브로모메틸)페닐)티오)-2,5-디옥소피롤리딘-1-일)헥산아미도)메틸)시클로헥산-1-카르복실레이트 [29]

[0291] PBr_3 (28 μ L, 0.30 mmol)을 0 $^{\circ}C$ 에서 N_2 대기하에 둥근 바닥 플라스크에서 THF 드라이 (5 mL) 중 알콜 [28] (100 mg, 0.20 mmol)의 용액에 첨가하였다. 결과의 용액을 0 $^{\circ}C$ 에서 2시간 동안 교반하였고, 그 다음에 실온으로 가온하였고; CH_2Cl_2 (1 mL)의 첨가 후에, 상기 용액은 오렌지색으로 변하였고, 진공에서 농축하였다. 미정제의 반응 혼합물을 실리카겔 플래시 크로마토그래피 (EtOAc 100%)로 정제하여 78 mg (0.14 mmol)의 화합물 [29]을 밝은 오렌지색 오일로 제공하였다 (수득율 70%). 1H NMR (400 MHz, $CDCl_3$, δ ppm, J Hz): δ 7.56 (d, $J = 8$, 2H), 7.31 (d, $J = 8.0$, 2H), 4.66 (s, 2H), 3.92-3.89 (m, 1H), 3.60 (s, 3H), 3.37-3.32 (m, 2H), 3.16-3.05 (m, 4H), 2.21-1.99 (m, 5H), 1.77 (d, $J = 12.4$, 2H), 1.50-1.28 (m, 9H), 1.01-0.92 (m, 2H). **MS**: m/z 589, 591 $[M+23]^+$. **TLC** R_f : 0.6 (EtOAc).

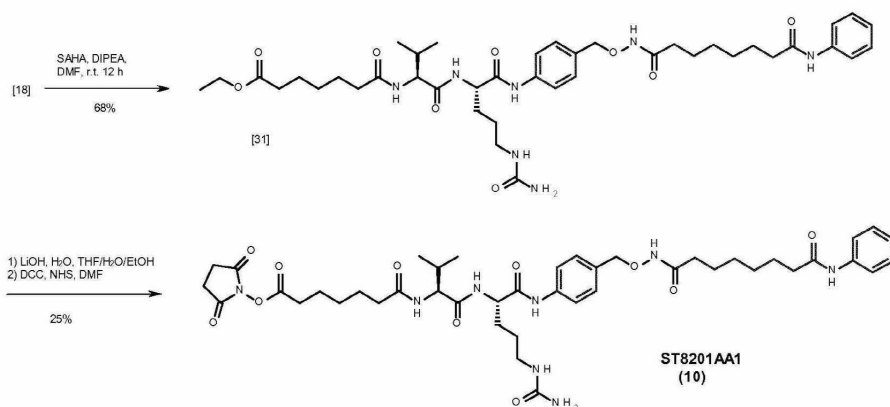
[0292] *p*-{[N-8-아닐리노-8-옥소옥타노일(아미노옥시)]메틸}페닐티오)-2,5-디옥소-1-피롤리딘]헥사노일아미노}메틸 시클로헥산카르복실레이트 [30]

[0293] N_2 대기하에 바이알에서, 브로미드 [29] (78 mg, 0.14 mmol), SAHA (50 mg, 0.18 mmol) 및 1 mL의 DMF 드라이를 실온에서 혼합하였다. 새롭게 증류된 DIPEA (45 mg, 0.36 mmol)를 첨가하였고, 상기 용액을 실온에서 12시간 동안 교반하였다. 상기 용액을 그 다음에 회전 증발 및 고 진공을 통해 제거하였다. 잔류물을 디클로로메탄 중 메탄올 0-20%의 구배로 플래시 컬럼 크로마토그래피에 의해 정제하여 산물 [30]을 백색 고형물로 제공하였다, 48 mg, 45%의 수득율. **MS**: m/z 751.4 $[M+H]^+$.

[0294] 2,5-디옥소-1-피롤리딘 4-({6-[3-(*p*-{[N-8-아닐리노-8-옥소옥타노일(아미노옥시)]메틸}페닐티오)-2,5-디옥소-1-피롤리딘]헥사노일아미노}메틸)시클로헥산카르복실레이트 (9), ST8217AA1

[0295] 리튬 히드록시드 일수화물 (8 mg, 0.18 mmol)을 테트라히드로푸란/물/에탄올 1:1:1의 혼합물 (6 mL) 중 [30] (48 mg, 0.063 mmol)의 용액에 첨가하였다. 상기 반응을 실온에서 2시간 동안 유지하였고, 그 다음에 이를 에틸 아세테이트로 희석하였고, HCl 1N으로 세척하였다. 미정제물 (25 mg)은 다음 단계를 위해 임의의 정제 없이 직접 사용되었다. 디시클로카르보디이미드 (11 mg, 0.05 mmol) 및 N-히드록시숙신이미드 (6 mg, 0.045 mmol)를 실온에서 DMF 드라이 (0.80 mL) 중에 이전에 수득된 미정제 산물 (25 mg, 0.034 mmol)의 교반 용액에 첨가하였다. 혼합물을 실온에서 16시간 동안 유지하였다. 상기 반응에서 형성된 백색 고형물을 디클로로메탄으로 여과하여 디시클로헥실우레아를 제거하였고, 유기상을 HCl 0.1N 및 물로 세척하였고, 그 다음에 무수 소듐 술페이트 상에서 건조하였고, 상기 용매를 회전 증발로 제거하였다. 결과의 잔류물을 디클로로메탄 중 메탄올 0-2% 구배로 플래시 컬럼 크로마토그래피로 처리하여 활성화된 산 ST8217AA1을 백색 점성 고형물로 제공하였다; **MS**: m/z 856.4 $[M+Na]^+$.

[0296] 실시예 8: 페이로드 (10), ST8201AA1의 합성 및 특성 규명



[0297]

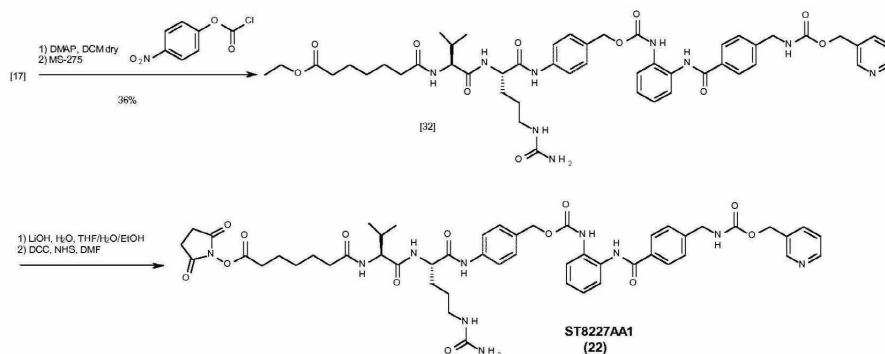
[0298] 에틸 7-(((S)-3-메틸-1-옥소-1-(((S)-1-옥소-1-((4-((8-옥소-8-(페닐아미노)옥탄아미도)옥시)페틸)페닐)아미노)-5-우레이도펜탄-2-일)아미노)부탄-2-일)아미노)-7-옥소헥타노에이트 [31]

[0299] N₂ 대기하에 바이알에서, 브로미드 [18] (60 mg, 0.09 mmol), SAHA (28 mg, 0.10 mmol) 및 1 mL의 DMF 드라이를 실온에서 혼합하였다. 새롭게 증류된 DIPEA (25 mg, 0.20 mmol)를 적가하였고, 상기 용액을 실온에서 12시간 동안 교반하였다. 그 다음에 상기 용매를 회전 증발 및 높은 진공을 통해 제거하였다. 잔류물을 디클로로메탄 중 메탄올 0-20% 구배로 플래시 컬럼 크로마토그래피로 정제하여 산물 [31]을 백색 고형물로 제공하였다, 48 mg, 68%의 수득율. **MS**: *m/z* 795.9 [M+H]⁺, 818.0 [M+Na]⁺. ¹H NMR (400 MHz, DMSO) δ 7.63-7.598 (m, 2H), 7.57 (d, J= 8 Hz, 2H), 7.39 (d, J= 8.4 Hz, 2H), 7.313 (t, J= 8 Hz, 2H), 7.09 (t, J= 8; 1H), 4.89 (s, 2H), 4.58 (s, 2H), 4.20 (d, J= 7.2, 1H), 4.14 (t, J= 7.2 Hz, 2H), 4.10 (t, J= 7.4 Hz, 1H), 3.56-3.45(m, 1H), 3.34 (d, J= 7.8 Hz, 2H), 2.41-2.37 (m, 1H), 2.34-2.30 (m, 2H), 2.13-2.06 (m, 2H), 1.79-1.60 (m, 4H), 1.42-1.36 (m, 4H), 1.28-1.24 (m, 3H), 1.01-0.97 (m, 6H).

[0300] 2,5-디옥소피롤리딘-1-일 7-(((S)-3-메틸-1-옥소-1-((S)-1-옥소-1-((4-(((S)-7-옥소-6-((R)-5-옥소피롤리딘-2-카르복사미도)-7-(페닐아미노)헵틸)티오)메틸)페닐)아미노)-5-우레이도펜탄-2-일)아미노)부탄-2-일)아미노)-7-옥소헥타노에이트 (10). ST8201AA1

[0301] 리튬 히드록시드 일수화물 (8 mg, 0.18 mmol)을 테트라히드로푸란/물/에탄올 1:1:1의 혼합물 (6 mL) 중 **40** (48 mg, 0.06 mmol)의 용액에 첨가하였다. 상기 반응을 실온에서 6시간 동안 유지하였고, 그 다음에 에틸 아세테이트로 희석하였고, HCl 1N로 세척하였다. 미정제물 (25 mg)은 다음 단계를 위해 임의의 정제 없이 사용되었다. MS: m/z 765.7 $[M-H]^-$. 디시클로카르보다이미드 (11 mg, 0.05 mmol) 및 N-히드록시숙신이미드 (6 mg, 0.045 mmol)를 실온에서 DMF 드라이 (0.80 mL) 중 이전에 수득된 미정제 산물 (25 mg, 0.03 mmol)의 교반 용액에 첨가하였다. 혼합물을 실온에서 16시간 동안 유지하였다. 상기 반응에서 형성된 백색 고형물을 디클로로메탄으로 여과하여 디시클로헥실우레아를 제거하였고, 유기상을 HCl 0.1N 및 물로 세척하였고, 그 다음에 무수 소듐 술페이트 상에서 건조하였고, 상기 용매를 회전 증발로 제거하였다. 결과의 잔류물을 디클로로메탄 중 메탄올 0-2% 구배로 플래시 컬럼 크로마토그래피로 처리하여 활성화된 산 **ST8201AA1**을 백색 점성 고형물로 제공하였다; MS: m/z 887.2 $[M+Na]^+$.

[0302] 실시예 9: 페이로드 (22), ST8227AA1의 합성 및 특성 규명

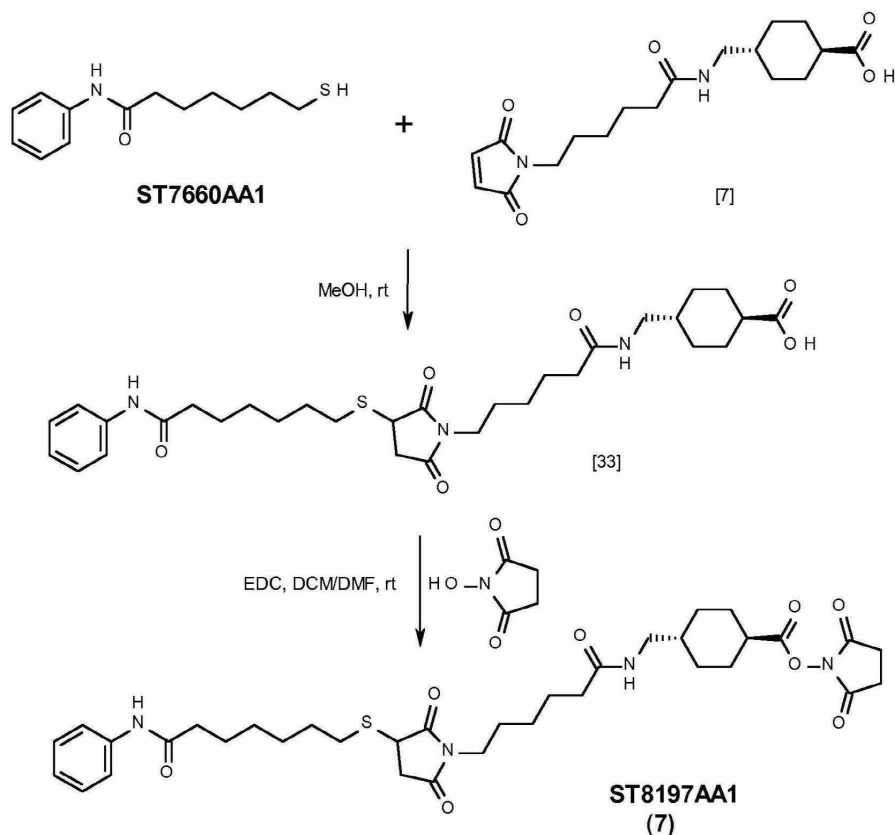


[0303]

[0304] 페이로드 (22), ST8227AA1의 합성 및 특성 규명: N₂ 대기하에 0℃로 냉각시킨 바이알에서, 화합물 [17] (50 mg, 0.09 mmol) 및 4-니트로페닐클로로포르메이트 (62 mg, 0.3 mmol), 3 mL의 DCM 드라이 (DMF 드라이 1 방울과 함께) 및 4-디메틸아미노피리딘 (60 mg, 0.49 mmol)을 함께 혼합하였다. 그 다음에 상기 혼합물을 실온에서 교반하였고, TLC로 모니터 하였다. [17]의 반응 전환이 완료될 때, MS275 (40 mg, 0.10 mmol)를 첨가하였고, 상기 반응을 추가의 12시간 동안 실온에서 교반하였다. 그 다음에 혼합물을 디클로로메탄으로 희석하였고, HCl 1N으로 세척하였고, 무수 소듐 술페이트 상에서 건조하였고, 상기 용매를 회전 증발로 제거하였다. 미정제의 에스테르를 H₂O, THF 및 EtOH의 1:1:1 혼합물 (5 mL)에 용해시켰고, LiOH 일수화물을 첨가하였다 (8.2 mg, 0.2 mmol). 상기 혼합물을 2시간 동안 교반 환류하였고, 그 다음에 HCl을 pH 7이 될 때까지 첨가하였다. 상기 용매를 감압하에 증발시켰고, 수득된 고형물을 EtOH (2 x 10 mL)로 세척하였다. 상기 용액을 증발시켜서 무색의 오일을 제공하였다. 미정제의 에스테르를 H₂O, THF 및 EtOH의 1:1:1 혼합물 (5 mL)에 용해시켰고, LiOH 일수화물을 첨가하였다 (8.2 mg, 0.2 mmol). 상기 혼합물을 2시간 동안 교반 환류하였고, 그 다음에 HCl을 pH 7이 될

때까지 첨가하였다. 상기 용매를 감압하에 증발시켰고, 수득된 고형물을 EtOH (2 x 2 mL)로 세척하였다. 잔류물을 디클로로메탄 중 메탄올 0-20% 구배로 플래시 컬럼 크로마토그래피로 정제하여 산물 **ST8227AA1**을 고형물로 제공하였다 (12 mg, 13% 수득율). **MS**: m/z 1044.3 $[M+Na]^+$.

[0305] 실시예 10. 페이로드 (7), **ST8197AA1**의 합성 및 특성 규명



[0306]

[0307] N-페닐-7-술폰닐-헵탄아미드 (**ST7660AA1**) (60 mg, 0.25 mmol)를 탈기된 메탄올 (1 mL)에 현탁시켰고; 화합물 [7] (84 mg, 0.24 mmol)을 실온에서 상기 교반된 혼합물에 첨가하였고, 몇 분 후에, 이는 맑은 용액이 되었다. 상기 용액을 실온에서 20시간 동안 TLC 모니터링으로 [7]이 완전히 전환되었음을 나타낼 때까지 교반을 유지하였다. 그 다음에 상기 용매를 회전 증발로 제거하였고, 원료 물질을 디클로로메탄 중 메탄올 2-10% 구배로 컬럼 크로마토그래피에 의해 정제하였다. 화합물 [33]을 백색 고형물로 수득하였다, 115 mg (81% 수득율). **MS**: m/z 610 $[M+Na]^+$.

[0308] $^1\text{H NMR}$ (500 Mhz, dmsO-d_6) δ 11.97 (bs, 1H), 9.85 (s, 1H), 7.72 (t, $J = 5.6$ Hz, 1H), 7.59 (d, $J = 7.8$ Hz, 2H), 7.28 (t, $J = 7.8$ Hz, 2H), 7.02 (t, $J = 7.3$ Hz, 1H), 3.93 (dd, $J = 9.0, 3.7$ Hz, 1H), 3.35 (t, $J = 6.8$ Hz, 2H), 3.18 (dd, $J = 18.3, 9.0$, 1H), 2.88 (t, $J = 6.3$ Hz, 2H), 2.79 - 2.63 (m, 2H), 2.30 (t, $J = 7.3$ Hz, 2H), 2.14 - 2.05 (m, 1H), 2.04 (t, $J = 7.5$ Hz, 2H), 1.92 - 1.84 (m, 2H), 1.74 - 1.67 (m, 2H), 1.63 - 1.15 (m, 18H), 0.94 - 0.83 (m, 2H).

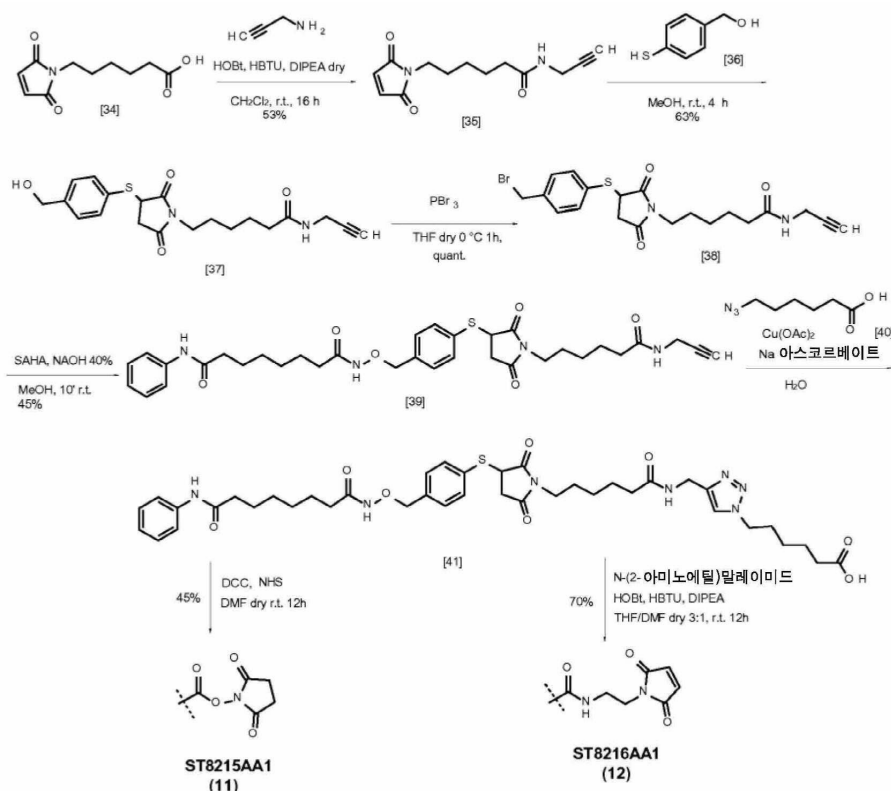
[0309] 화합물 [33] (110 mg, 0.19 mmol)을 0.12 mL의 건조 디메틸포름아미드를 포함하는 무수 디클로로메탄 (5.5 mL)에 현탁시켰다. N-히드록시숙신이미드 (33 mg, 0.28 mmol) 및 N-(3-디메틸아미노프로필)-N'-에틸-카르보디이미드 히드록로리드 (61 mg, 0.32 mmol)를 실온에서 첨가하였고, 반응 혼합물을 실온에서 24시간 동안 교반하였다. 혼합물을 디클로로메탄 (70 mL)으로 희석하였고, 물 (40 mL) 및 브라인 (30 mL)으로 세척하였다. 유기상을 Na_2SO_4 상에서 건조하였고, 여과하고, 회전 증발에 의해 농축하였다. 미정제물을 디클로로메탄 중 2-6% 메탄올로 플래시 크로마토그래피에 의해 정제하였다. 산물 **ST8197AA1**을 백색 고형물로 수득하였다, 97 mg (76% 수득율). **MS**: m/z 707 $[M+Na]^+$.

[0310] $^1\text{H NMR}$ (500 Mhz, dmsO-d_6) δ 9.83 (s, 1H), 7.73 (t, $J = 5.4$ Hz, 1H), 7.59 (d, $J = 7.8$ Hz, 2H), 7.28

(t, $J = 7.3$ Hz, 2H), 7.02 (t, $J = 7.3$ Hz, 1H), 3.94 (dd, $J = 8.8, 3.4$ Hz, 1H), 3.36 (t, $J = 6.8$ Hz, 2H), 3.18 (dd, $J = 18.3, 8.8$, 1H), 2.91 (t, $J = 6.0$ Hz, 2H), 2.81 (s, 4H), 2.80 - 2.62 (m, 3H), 2.30 (t, $J = 7.3$ Hz, 2H), 2.18 - 1.97 (m, 4H), 1.80 - 1.72 (m, 2H), 1.64 - 1.27 (m, 16H), 1.27 - 1.15 (m, 2H), 1.06 - 0.94 (m, 2H).

¹³C NMR (500 Mhz, dmsO-d₆) δ 177.2, 175.6, 172.3, 171.6, 171.4, 170.7, 139.8, 129.1, 123.4, 119.5, 44.8, 39.6, 38.5, 37.1, 36.8, 36.3, 35.6, 30.8, 29.3 (4C), 29.0, 28.7, 28.6, 28.4, 27.3, 26.3, 25.9, 25.4, 25.3.

실시예 11: 페이로드 (11) 및 12, ST8215AA1 및 ST8216AA1 각각의 합성 및 특성 규명



6-(2,5-디옥소-2,5-디히드로-1H-피롤-1-일)-N-(프로프-2-인-1-일)헥산아미드 [35]: N₂ 대기하에 건조 CH₂Cl₂ (25 mL) 중 화합물 [34] (500 mg, 2.37 mmol)의 용액을 포함하는 플라스크에서, 프로파르길아민 (162 μL, 2.37 mmol), HOBt H₂O (435 mg, 2.84 mmol), HBTU (1077 mg, 2.84 mmol) 및 DIPEA (1.24 mL, 7.10 mmol)를 0 °C에서 첨가하였고, 상기 혼합물을 실온에서 16시간 동안 교반하였다. 반응을 완료한 후에, 상기 혼합물을 디클로로메탄으로 희석하였고, 물, HCl 1N 및 브라인으로 세척하였다. 유기층을 수집하였고, 무수 소듐 술페이트 상에서 건조하였고, 상기 용매를 회전 증발로 제거하였다. 결과의 잔류물을 중압 시스템 Sepacore® Buchi (실리카겔; 구매 석유 에테르/에틸 아세테이트 B% 0-65 4분, 65-65 7분, 65-100 2분)를 구비한 플래시 컬럼 크로마토그래피로 정제하여 화합물 [35] (312 mg, 수득율 53%)를 백색 고형물로 제공하였다. MS: m/z 270.8 [M+Na]⁺ ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 6.64 (s, 2H), 5.95 (s, 1H), 3.98 (dd, $J = 4, 4$ Hz, 2H), 3.45 (t, $J = 7.2$ Hz, 2H), 2.16 ((dt, $J = 15.0, 4.9$ Hz, 2H), 1.68 - 1.47 (m, 4H), 1.31 - 1.19 (m, 2H).

(4-머캅토펜일)메탄올 [36]: N₂ 대기하에 가지 3개 달린 플라스크에서 THF 드라이 (25 mL) 중 4-머캅토펜조산 (2.0 g, 13 mmol)의 교반 용액에, THF 중 LiAlH₄ 1M (39 mL, 39 mmol)을 0 °C에서 30분 내에 첨가하였다. 상기 혼합물을 rt에서 12시간 동안 교반하였다. 그 다음에, 상기 반응을 0 °C로 냉각시켰고, 3 mL의 물로 쿼칭하였고, HCl 1 M로 pH 2로 산성화시켰다. 에틸 아세테이트를 첨가하였고, 유기층을 H₂O 및 브라인으로 세척하였고, 무수 소듐 술페이트 상에서 건조하였고, 여과하였고, 상기 용매를 회전 증발로 제거하였다. 결과의 잔류물을 중압 시스템 Sepacore® Buchi (실리카겔; 구매 석유 에테르/에틸 아세테이트 B% 0-25 3분, 25-25 6분, 25-

100 3분)를 구비한 플래시 컬럼 크로마토그래피에 의해 정제하여 알콜 [36] (1.2 mg, 수득율 66%)을 황색 고형물로 수득하였다. **MS**: m/z 141.2 $[M+H]^+$ **1H NMR** (400 MHz, $CDCl_3$) δ 7.25 - 7.06(m, 4H), 4.43 (s, 2H), 3.72 (s, 1H), 3.48 (s, 1H).

[0316] **6-(3-((4-(히드록시메틸)페닐)티오)-2,5-디옥소피롤리딘-1-일)-N-(프로프-2-인-1-일)헥산아미드** [37]: 건조 MeCN (8 mL) 중 말레이미드 [35] (200 mg, 0.8 mmol)의 교반 용액에, 티올 [36] (135 mg, 0.96 mmol)을 첨가하였고, 반응 혼합물을 N_2 하에 실온에서 4시간 동안 교반하였다. 반응 완료 후에, 상기 용매를 회전 증발로 제거하였고, 잔류물을 중압 시스템 Sepacore® Buchi (실리카겔; 구배 석유 에테르/에틸 아세테이트 B% 0-80 5분, 80-90 8분, 90-100 1분)를 구비한 플래시 컬럼 크로마토그래피로 정제하여 [37](134 mg, 수득율 43%)을 황색 오일로 제공하였다. **MS**: m/z 410.8 $[M+Na]^+$, 426.9 $[M+K]^+$; **1H NMR** (400 MHz, MeOD) δ 7.58 (dd, J = 16.5, 8.1 Hz, 2H), 7.44 (dd, J = 14.6, 8.1 Hz, 2H), 4.68 (s, 2H), 4.24 (dd, J = 9.1, 3.7 Hz, 1H), 4.01 (d, J = 4 Hz, 2H), 3.42 (dd, J = 15.1, 7.9 Hz, 2H), 3.29 (dd, J = 18.7, 9.1 Hz, 1H), 2.72 (dd, J = 18.7, 3.7 Hz, 1H), 2.23 (t, J = 7.5 Hz, 3H), 1.68 - 1.60 (m, 3H), 1.53 - 1.44 (m, 3H), 1.31 - 1.16 (m, 2H).

[0317] **6-(3-((4-(브로모메틸)페닐)티오)-2,5-디옥소피롤리딘-1-일)-N-(프로프-2-인-1-일)헥산아미드** [38]: PBr_3 (76 μ L, 0.81 mmol)을 0 °C에서 건조 THF (3 mL) 중 화합물 [37] (210 mg, 0.54 mmol)의 용액에 첨가하였고, 상기 혼합물을 0 °C에서 3시간 동안 유지하였다. 상기 용매의 증발 후에, 미정제물을 석유 에테르 중 0-60% 에틸 아세테이트 구배로 플래시 크로마토그래피에 의해 정제하여 산물 [38] (245 mg, 수득율 >99%)을 옐로우색 고형물로 제공하였다. **MS**: m/z 472.8 $[M+Na]^+$; 488.9 $[M+K]^+$; **1H NMR** (400 MHz, $CDCl_3$) δ 7.49 (d, J = 8.1 Hz, 2H), 7.36 (d, J = 8.1 Hz, 2H), 4.46 (s, 2H), 4.04 (s, 2H), 3.58 - 3.34 (m, 4H), 3.16 (dd, J = 18.7, 9.2 Hz, 1H), 2.69 (dd, J = 18.8, 4.0 Hz, 1H), 2.30 - 2.12 (m, 3H), 1.74 - 1.58 (m, 3H), 1.56 - 1.43 (m, 3H), 1.27 (dd, J = 16.0, 8 Hz, 2H).

[0318] **N1-((4-((2,5-디옥소-1-(6-옥소-6-(프로프-2-인-1-일아미노)헥실)피롤리딘-3-일)티오)벤질)옥시)-N8-페닐옥탄디아미드** [39]: SAHA (96 mg, 0.36 mmol)를 6 mL의 MeOH에 용해시켰고, NaOH 40% 용액 (76 μ L, 0.76 mmol)을 첨가하였다. 10분 후에, 상기 용액을 N_2 대기 하에 브로미드 [38] (245 mg, 0.54 mmol)를 포함하는 플라스크에 혼합하였다. 즉시 상기 용액은 자주색으로 변했고, 5-10분 후에, TLC로 산물 [39]의 형성을 나타내었다. 메탄올을 빠르게 농축하였고, 상기 반응 미정제물을 디클로로메탄으로 희석하였고, HCl 1N으로 세척하여 염기를 중화시켰다. 유기층을 무수 소듐 술페이트 상에서 건조하였고, 여과하였고, 상기 용매를 회전 증발로 제거하였다. 잔류물을 석유 에테르 중 0-80% 에틸 아세테이트 구배로 플래시 컬럼 크로마토그래피에 의해 정제하여 산물 [39] (90 mg, 수득율 40%)를 백색 고형물로 제공하였다. **MS**: m/z 656.8 $[M+Na]^+$. **1H NMR** (400 MHz, $CDCl_3$) δ 8.16 (s, 2H), 7.50 (d, J = 4 Hz, 2H), 7.41 (d, J = 4 Hz, 2H), 7.33 - 7.23 (m, 3H), 7.03 (d, J = 4 Hz, 2H), 4.84 (s, 2H), 3.95 (s, 2H), 3.40 - 3.31 (m, 2H), 3.10 (dd, J = 20, 8 Hz, 1H), 2.64 (dd, J = 18.8, 4.0 Hz, 1H), 2.29 (s, 2H), 2.19 (s, 2H), 2.11 (s, 2H), 1.64 - 1.57 (m, 6H), 1.29 - 1.22 (m, 8H), 1.10 (s, 2H), 0.83 (d, J = 8.4 Hz, 1H). **^{13}C NMR** (100 MHz, $CDCl_3$) δ 175.02 (s), 174.58 (d, J = 89.2 Hz), 172.58 (s), 171.55 (s), 137.86 (s), 137.84 (s), 134.37 - 127.29 (m), 127.98 - 127.29 (m), 123.66 (s), 119.52 (s), 79.30 (s), 71.03 (s), 43.28 (s), 36.62 (dd, J = 207.0, 92.0 Hz), 35.71 (s), 35.59 (d, J = 25.1 Hz), 35.46 (s), 29.24 (s), 28.20 (dd, J = 148.7, 99.9 Hz), 26.74 - 26.34 (m), 26.34 - 24.48 (m), 24.49 (s), 24.49 (s).

[0319] **6-아지도헥사노산** [40]: 5 mL의 디메틸포름아미드 중 6-브로모헥사노산 (200 mg, 1.02 mmol) 및 소듐 아지드 (333 mg, 5.12 mmol)를 밀봉된 바이알에서 100 °C에서 16시간 동안 가열하였다. 냉각 후에, 상기 반응을 에틸 아세테이트로 희석하였고, $KHSO_4$ 1M, H_2O 및 브라인으로 세척하였다. 유기층을 수집하였고, 무수 소듐 술페이트 상에서 건조하였고, 상기 용매를 회전 증발로 제거하였다. 산물 [40] (158 mg, 99%)을 갈색 오일로 순수하게 수득하였다. **MS**: m/z 155.8 $[M-H]^-$; **1H NMR** (400 MHz, $CDCl_3$) δ 10.49 (s, 1H), 3.21 - 3.18 (m, 2H), 2.28 (t, J = 7.4 Hz, 2H), 1.84 - 1.45 (m, 4H), 1.38 - 1.31 (m, 2H).

[0320] **6-(4-((6-(2,5-디옥소-3-((4-((8-옥소-8-(페닐아미노)옥탄아미도)옥시)메틸)페닐)티오)피롤리딘-1-일)헥산아미도)메틸)-1H-1,2,3-트리아졸-1-일)헥사노산** [41]: 건조 DMF (11 mL) 중 화합물 [40] (17 mg, 0.11 mmol) 및

화합물 [39] (90 mg, 0.14 mmol)의 교반 용액을 실온에서 아르곤/진공 사이클 (3x)로 탈기하였다. 상기 용액에, 아르곤/진공 사이클로 이전에 탈기된, $\text{Cu}(\text{OAc})_2$ (7 mg, 0.03 mmol) 및 소듐 아스코르베이트 (13 mg, 0.07 mmol)의 새롭게 제조된 수성 혼합물 (5.5 mL)을 첨가하였다. 상기 반응 혼합물을 다시 탈기하였고, 실온에서 72시간 동안 아르곤하에 교반하였다. 반응 완료 후에, 미정제물을 농축하였고, 상기 용매를 회전 증발로 제거하였다. 결과의 잔류물을 디클로로메탄 중 0-16% 메탄올 구배로 플래시 컬럼 크로마토그래피로 처리하여 트리아졸 [441] (55 mg, 수득율 62%)을 오렌지색 고형물로 제공하였다; **MS**: m/z 813.8 $[\text{M}+\text{Na}]^+$; $^1\text{H NMR}$ (400 MHz, MeOD) δ 7.86 (s, 2H), 7.59 - 7.46 (m, 4H), 7.37 (d, $J = 7.2$ Hz, 2H), 7.26 (d, $J = 7.2$ Hz, 3H), 7.04 (d, $J = 7.1$ Hz, 1H), 4.37 (s, 2H), 4.21 (s, 2H), 3.33 (dd, $J = 12.9, 4.9$ Hz, 4H), 3.18 (dd, $J = 20, 8$ Hz, 1H), 2.60 (dd, $J = 18.8, 4.0$ Hz, 1H), 2.42 - 2.12 (m, 5H), 2.02 (s, 2H), 1.88 (s, 2H), 1.76 - 1.47 (m, 8H), 1.49 - 1.23 (m, 10H), 1.17 (s, 2H), 0.86 (s, 1H). $^{13}\text{C NMR}$ (100 MHz, MeOD) δ 140.29 - 139.14 (m), 139.14 - 134.26 (m), 132.86 (s), 139.14 - 108.94 (m), 107.34 (s), 76.31 (s), 35.28 (s), 28.04 (s), 25.16 (d, $J = 61.4$ Hz), 24.57 (s).

[0321]

2,5-디옥소피롤리딘-1-일 6-(4-((6-(2,5-디옥소-3-((4-((8-옥소-8-(페닐아미노) 옥탄아미도)옥시)메틸)페닐)티오)피롤리딘-1-일)헥산아미도)메틸)-1H-1,2,3-트리아졸-1-일)헥사노에이트 (11), **ST8215AA1**: 디시클로헥실카르보디이미드 (21 mg, 0.10 mmol) 및 N-히드록시숙신이미드 (10 mg, 0.09 mmol)를 실온에서 무수 디메틸포름아미드 (0.80 mL) 중 화합물 [41] (55 mg, 0.06 mmol)의 교반 용액에 첨가하였다. 상기 혼합물을 실온에서 16시간 동안 유지하였다. 상기 반응에서 형성된 백색 고형물을 디클로로메탄으로 여과하였고, 유기상을 물로 세척하였고, 그 다음에 무수 소듐 술페이트 상에서 건조하였고, 여과하였고, 상기 용매를 회전 증발로 제거하였다. 결과의 잔류물을 디클로로메탄 중 0-8% 메탄올 구배로 플래시 컬럼 크로마토그래피로 처리하여 활성화된 산 **ST8215AA1**을 백색 점성 고형물 (24 mg, 45%)로 제공하였다; **MS**: m/z 910.8 $[\text{M}+\text{Na}]^+$; $^1\text{H NMR}$ (400 MHz, CDCl_3) δ 8.07 (s, 2H), 7.52 (s, 2H), 7.44 (s, 2H), 7.32 (s, 2H), 7.23 (s, 3H), 7.04 (s, 1H), 4.87 (s, 2H), 4.45 (s, 2H), 4.31 (s, 2H), 3.32 (s, 2H), 3.13 (s, 1H), 2.79 (s, 4H), 2.65 (s, 2H), 2.55 (s, 2H), 2.29 (s, 2H), 2.12 (s, 2H), 1.89 (s, 2H), 1.78 - 1.48 (m, 8H), 1.47 - 1.12 (m, 10H), 1.07 (s, 2H), 0.83 (s, 1H). $^{13}\text{C NMR}$ (100 MHz, CDCl_3) δ 134.50 (s), 129.24 (s), 128.49 (s), 124.47 - 123.71 (m), 121.49 (d, $J = 420.4$ Hz), 49.89 (s), 43.30 (s), 38.48 (s), 36.87 (s), 35.65 (s), 34.39 (s), 32.54 (s), 30.25 (s), 29.25 (s), 28.04 (s), 26.23 (d, $J = 107.2$ Hz), 24.84 (s), 25.38 - 23.33 (m), 24.55 (s), 24.96 - 23.33 (m), 23.47 (s).

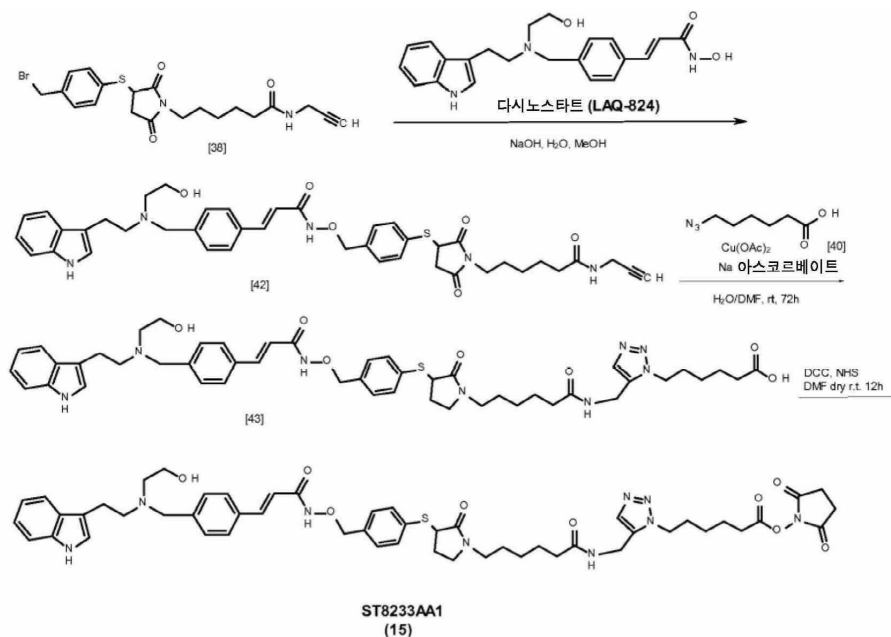
[0322]

N1-((4-((1-(6-((1-(6-((2-(2,5-디옥소-2,5-디히드로-1H-피롤-1-일)에틸)아미노)-6-옥소헥실)-1H-1,2,3-트리아졸-4-일)메틸)아미노)-6-옥소헥실)-2,5-디옥소피롤리딘-3-일)티오)벤질)옥시)-N8-페닐옥탄디아미드 (12), **ST8216AA1**: N_2 대기하에 건조 THF/DMF 3:1 (1.33 mL)의 혼합물 중 [41] (15 mg, 0.02 mmol)의 교반 용액에, N-(2-아미노에틸)말레이미드 (3.3 mg, 0.02 mmol), HOBt H_2O (4 mg, 0.03 mmol), HBTU (11 mg, 0.03 mmol) 및 DIPEA (7 μL , 0.05 mmol)를 0 $^\circ\text{C}$ 에서 첨가하였다. 첨가한 후에, 상기 혼합물을 실온에서 12시간 동안 유지하였고, 그 다음에 디클로로메탄으로 희석하였고, 물로 세척하였다. 유기상을 무수 소듐 술페이트 상에서 건조하였고, 여과하였고, 상기 용매를 회전 증발로 제거하였다. 결과의 잔류물을 디클로로메탄 중 0-8% 메탄올 구배로 플래시 컬럼 크로마토그래피로 처리하여 산물 **ST8216AA1** (13 mg, 수득율 72%)을 백색 점성 고형물로 제공하였다. **MS**: m/z 936.6 $[\text{M}+\text{Na}]^+$; $^1\text{H NMR}$ (400 MHz, MeOD) δ 7.86 (s, 3H), 7.60 - 7.42 (m, 5H), 7.38 - 7.35 (m, 2H), 7.25 (t, $J = 7.9$ Hz, 2H), 7.03 (t, $J = 7.4$ Hz, 1H), 6.77 (s, 2H), 4.86 (s, 2H), 4.35 (dd, $J = 15.7, 8.7$ Hz, 4H), 3.69 (t, $J = 4$ Hz, 2H), 3.56 (t, $J = 4$ Hz, 2H), 3.43 - 3.28 (m, 5H), 3.24 - 3.13 (m, 2H), 2.32 (t, $J = 8$ Hz, 2H), 2.15 (dd, $J = 14.9, 7.5$ Hz, 2H), 2.04 (dd, $J = 13.3, 6.0$ Hz, 2H), 1.92 - 1.77 (m, 2H), 1.77 - 1.50 (m, 8H), 1.50 - 1.12 (m, 10H), 0.86 (s, 1H).

[0323]

실시예 12: 파노비노스타트- 및 다시노스타트-기반 페이로드에 대한 일반 합성 절차.

[0324] 다시노스타트-기반 페이로드 (15), ST8233AA1의 합성 및 특성 규명



[0325]

[0326]

3-(*p*-{[*N*-(*E*)-3-[*p*-{(2-히드록시에틸)[2-(1*H*-인돌-3-일)에틸]아미노}메틸]페닐]아크릴로일(아미노옥시)]메틸]페닐티오)-1-[6-옥소-6-(2-프로피닐아미노)헥실]-2,5-피롤리딘온 [42]: 다시노스타트 (100 mg, 0.29 mmol)를 NaOH를 포함하는 6 mL의 MeOH (수중 40%, 40 μ L, 0.4 mmol)에 용해시켰다. rt에서 15분 교반한 후에, 상기 용액을 브로미드 [38] (181 mg, 0.40 mmol)를 포함하는 바이알에 첨가하였다. rt에서 5-10분 교반한 후에, TLC 분석으로 산물 형성을 나타내었다. 메탄올을 빠르게 증발시켰고, 반응 미정제물을 디클로로메탄으로 희석하였고, HCl 1*N*로 세척하여 염기를 중화시켰고, 무수 소듐 술페이트 상에서 건조하였고, 여과하였고, 상기 용매를 회전 증발로 제거하였다. 잔류물을 석유 에테르 중 0-80% 에틸 아세테이트 구배로 플래시 컬럼 크로마토그래피에 의해 정제하여 산물 [42] (95 mg, 수득율 44%)를 백색 고형물로 제공하였다. **MS**: m/z 772.6 $[M+Na]^+$. 1H NMR (400 MHz, $CDCl_3$) δ , 7.83 - 7.72 (m, 2H), 7.65 - 7.30 (m, 10H), 7.25 - 7.07 (m, 2H), 7.13 - 7.05 (m, 1H), 6.81 (m, 1H), 6.64 (t-like, 1H), 4.80 (m, 1H), 4.69 - 4.54 (m, 2H), 4.34 - 4.18 (m, 2H), 4.05 (m, 1H), 3.91 - 3.45 (m, 7H), 3.32 - 2.77 (m, 8H), 2.66 (m, 1H), 2.36 - 2.12 (m, 4H), 1.76 - 1.26 (m, 8H).

[0327]

6-[4-((6-[3-(*p*-{[*N*-(*E*)-3-[*p*-{(2-히드록시에틸)[2-(1*H*-인돌-3-일)에틸]아미노}메틸]페닐]아크릴로일(아미노옥시)]메틸]페닐티오)-2,5-디옥소-1-피롤리딘-1-일]헥사노일아미노)메틸]-1*H*-1,2,3-트리아졸-1-일]헥사노산 [43]:

[0328]

건조 DMF (10 mL) 중 화합물 [42] (40 mg, 0.05 mmol) 및 6-아지도헥사노산 (16 mg, 0.10 mmol)의 교반 용액을 실온에서 아르곤/진공 사이클 (3x)로 탈기하였다. 상기 용액에, 아르곤/진공 사이클 (3x)로 미리 탈기시킨, $Cu(OAc)_2$ (7 mg, 0.03 mmol) 및 소듐 아스코르베이트 (13 mg, 0.07 mmol)의 새롭게 제조된 수성 혼합물 (5.5 mL)을 첨가하였다. 반응 혼합물을 다시 탈기하였고, 실온에서 72시간 동안 아르곤하에 교반하였다. 반응 완료 후에, 미정제물을 농축하였고, 상기 용매를 회전 증발로 제거하였다. 결과의 잔류물을 디클로로메탄 중 0-16% 메탄올 구배로 플래시 컬럼 크로마토그래피에 의해 정제하여 트리아졸 [43] (35 mg, 수득율 77%)을 고형물로 제공하였다. **MS**: m/z 930.7 $[M+Na]^+$.

[0329]

페이로드 (15), ST8233AA1의 합성: 디시클로헥실카르보디이미드 (16 mg, 0.08 mmol) 및 *N*-히드록시숙신이미드 (7.7 mg, 0.07 mmol)를 실온에서 무수 DMF (0.80 mL) 중 화합물 [43] (35 mg, 0.04 mmol)의 교반 용액에 첨가하였다. 혼합물을 실온에서 16시간 동안 유지하였다. 상기 반응에서 형성된 백색 고형물을 디클로로메탄으로 여과하였고, 유기상을 물로 세척하였고, 그 다음에 무수 소듐 술페이트 상에서 건조하였고, 여과하였고, 상기 용매를 회전 증발로 제거하였다. 결과의 잔류물을 디클로로메탄 중 0-8% 메탄올 구배로 플래시 컬럼 크로마토그래피로 처리하여 활성화된 산 **ST8233AA1**을 백색 점성 고형물 (14 mg, 35%)로 제공하였다; **MS**: m/z 1026.4 $[M+Na]^+$.

- [0330] ^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ 9.94 (bs, 1H), 8.92 (bs, 1H), 7.90 (bs, 1H), 7.61 - 7.47 (m, 1H), 7.50 - 7.37 (m, 1H), 7.33 (m, 2H), 7.20 (m, 1H), 7.15 - 6.86 (m, 1H), 6.69 (m, 1H), 4.80 (m, 1H), 4.69 - 4.54 (m, 1H), 4.49 - 4.12 (m, 2H), 3.84 (m, 1H), 3.69 - 3.52 (m, 1H), 3.43 - 2.87 (m, 3H), 2.88 - 2.35 (m, 3H), 2.35 - 2.08 (m, 1H), 2.02 - 1.23 (m, 5H).
- [0331] **실시예 13: 리신 잔기의 ϵ -아미노기의 N-히드록시숙신이미드 (NHS)로의 접합에 의한 ADC의 합성 및 특성 규명.**
- [0332] 여기서, 예로서, HDAC로 제조된 ADC를 4개의 상이한 항체 (트라스투주맵 Herceptin® Roche; 세톡시맵 Erbitux® Merck; 베바시주맵 Avastin® Genentech/Roche; 파니투무맵 Vectibix® Amgen) 및 상업적으로 입수가능한 2개의 마우스 항-인간 CD4 항체로, 클론 SK3 (또한 Leu3a로 알려져 있음) 및 클론 RPA-T4에 접합시켰다. 구체적으로, 승인된 항체는 ErbB2를 인식하는 트라스투주맵, ErbB1을 인식하는 세톡시맵 및 파니투무맵, VEGFR을 인식하는 베바시주맵이다.
- [0333] 항체는 10 kDa 커트-오프 투석막을 사용하여 버퍼 교환되어 PBS pH 7.4 중에 항체 용액을 수득하고 간접 보존제 (interfering preservative)를 제거하였다. 투석 후 농도는 OD₂₈₀을 측정하여 결정하고, - 시료의 흡광도 측정값 -을 1.36으로 나눴다.
- [0334] 10 mM의 원료 용액은 DMSO에서 제조된 아민-반응성 N-히드록시숙신이미드 (NHS 에스테르) 페이로드를 포함하고, 20-배 물 과량의 페이로드를 각 항체 용액에 첨가하였다.
- [0335] 반응은 실온에서 부드럽게 연속 혼합하면서 인큐베이트하였고, 1시간 후에, 이들에 20 mM 글리신 수성 용액을 첨가하여 퀀칭하였다.
- [0336] 그 다음에 최종 산물을 10 kDa 커트-오프 막을 사용하여 4°C에서 밤새 PBS에서 투석하여 과량의 반응하지 않은 페이로드를 제거하였다.
- [0337] DAR (약물-항체 비율)은 포지티브 선형 모드로 작동하는 Ultraflex III 질량 분광계 (Bruker, GmbH)를 사용하는 MALDI 질량 분광분석법에 의해 결정되었다.
- [0338] 간단하게, 100 μ l의 접합되지 않은 항체 및 수득된 ADC를 수 중에서 용출되는 PD 스핀 트랩 G25 (GE Healthcare)를 사용하여 탈염시켰다.
- [0339] 10 mg/ml s-DHB MALDI 매트릭스 용액을 H₂O:ACN (50:50, v/v)에 용해된 0.1% TFA에서 제조하였다. 2 μ l의 시료 용액 (항체 또는 ADC)을 이중층 시료 부착 방법을 사용하여 MALDI 표적에 부착시켰다. 질량 스펙트럼은 50 kDa에서 시작하여 180 kDa까지의 질량 대 전하 범위로 획득되었다.
- [0340] 비접합된 항체와 접합된 항체 사이의 질량 차이를 사용하여 DAR를 결정하였다.
- [0341] 항체인 트라스투주맵, 세톡시맵, 파니투무맵, 베바시주맵뿐만 아니라 2개의 항-인간 CD4 항체를 전술한 실험 조건 하에 접합 반응에 사용하였다. DAR 범위가 3 내지 9인 ADC가 수득되었다.
- [0342] 모든 합성된 ADC는 MALDI 질량 스펙트럼을 통해 특성 규명되었다. 리신-기반 ADC의 예 및 시스테인-기반 ADC의 예를 도 1-2에 보고하였다.
- [0343] 여기서, 예로서, ADC - (24), ST8154AA1 -의 MALDI 질량 스펙트럼이 보고되었다 (도 1).
- [0344] **실시예 14: 시스테인 잔기에서 말레이미드-함유 페이로드와 접합에 의해 제조된 ADC의 합성 및 특성 규명.**
- [0345] 항체는 10 kDa 커트-오프 투석막을 사용하여 버퍼 교환되어 PBS pH 7.4 중에서 항체 용액을 수득하였고, 간접 보존제를 제거하였다. 투석 후에 농도는 OD₂₈₀을 측정하여 결정하고, 시료의 흡광도 측정값을 1.36으로 나눴다.
- [0346] 항체에서 사슬간 디설피드의 온화한 환원으로 기존의 말레이미드 링커와의 접합에 적합한 환원된 형태의 비대 (unpaired) 시스테인을 수득하여 항체 당 2-6개의 약물을 갖는 균일한 ADC를 제공하였다.
- [0347] 이를 위해, 1 mM TCEP-HCl 원료 용액을 수 중에서 제조하였고, 5-배 물 과량을 항체 용액에 첨가하였다. 반응을 부드럽게 연속 혼합하면서 2시간 동안 37°C에서 유지하였다. 상기 반응을 냉각시켰다.
- [0348] TCEP는 티올이 없는 화합물이기 때문에, 과량의 환원제를 제거할 필요가 없으며, DMSO에서 제조된 20-배 물 과량의 10 mM 말레이미드-기반 페이로드 원료 용액을 각 환원된 항체 용액에 첨가하였다.

- [0349] 반응을 부드럽게 연속 혼합하면서 실온에서 인큐베이트하였고, 1시간 후에 이들에 20mM 시스테인 수성 용액을 첨가하여 퀀칭시켰다.
- [0350] 그 다음에 최종 산물을 10 kDa 커트-오프 막을 사용하여 4℃에서 밤새 PBS에서 광범위하게 투석하여 반응하지 않은 과량의 페이로드를 제거하였다.
- [0351] DAR (약물-항체 비율)은 MabPac HIC-부틸 컬럼 100mmx 4.6mm, 5 μm (Thermo Fisher Scientific)을 사용하는 소수성 크로마토그래피로 결정되었다. 이동상 A는 1.5 암모늄 술페이트, 50mM 소듐 포스페이트, pH 7 및 이소프로판올 (95:5; v/v)이었고, 이동상 B는 50mM 소듐 포스페이트, pH 7 및 이소프로판올 (80:20; v/v)이었다.
- [0352] 상기 이동상 A를 주입 후에 1분 동안 100%로 유지하였고, 그 다음에 이동상 B를 30분 내에 100%로 증가시키고 5분 동안 유지하였다.
- [0353] UV 프로파일은 220 및 280 nm에서 등록되었다. 본 발명에 따른 모든 항체, 예컨대 트라스투주맙 및 세특시맙은 전술한 실험 조건하에 접합 반응을 수반하는 방법에 의해 제조되었다. 평균 DAR가 3.5 내지 4.6 범위를 갖는 ADC가 수득되었다.
- [0354] 여기서, 예로서, ADC - (28), ST8176AA1 -의 HIC 크로마토그램이 보고되었다 (도 2). DAR은 피크 면적을 고려하고 하기 식에 적용하여 산출하였다:

$$DAR = \frac{\sum_{i=1}^n m_{i,ADC} \cdot DAR_i}{\sum_{i=1}^n m_{i,ADC}}$$

- [0355]
- [0356] 실시예 15: 종양 세포에서 ErbB1 및 ErbB2 수용체로의 ADC 결합의 결정

- [0357] ADC의 ErbB1- 및 ErbB2-발현 종양 세포로의 결합은 FACS 분석으로 확인되었다. 폐 (A549, H1975), 유방 (SKBR3), 결장 (LS174T), 난소 (SKOV3), 췌장 (CAPAN1 및 MIA-PACA-2) 및 위 (N87) 암종 세포주를 포함하는, 상이한 수준의 EGFR 및 ErbB2 발현을 갖는 다양한 종양 세포주를 본 실험에 사용하였다. 세포 펠렛을 PBS 중 10 μg/mL 항체 또는 ADC와 4℃에서 1시간 동안 인큐베이트하였고, 그 다음에 PBS로 2회 세척한 후에, 4℃에서 마우스 항-인간 FITC-접합된 IgG (BD Pharmingen)로 1시간 염색하였다. 2회 더 세척한 후에, 프로피디움 요오드이드 (propidium iodide: PI)를 첨가하였고, 세포-결합 형광 분석을 FACScalibur (Becton Dickinson)로 수행하였다. 모든 화합물은 유리 항체, 세특시맙 및 트라스투주맙과 유사한 방식으로 수용체에 결합하는 것으로 나타났다 (표 3 및 도 3 및 4 참조).

표 3

- [0358] ErbB1 및 ErbB2 수용체로의 ADC 결합 및 내재화

| I.D. | 코드 번호 | 약물 | 페이로드 | mAb | DAR | 결합 (FACS 분석) | 내재화 (HCS 이미지화) |
|------|-----------|-----------|-----------|------|---------|--------------|----------------|
| (24) | ST8154AA1 | ST7464AA1 | ST8128AA1 | Cet | 5.0-9.0 | ++ | ++ |
| (25) | ST8155AA1 | ST7464AA1 | ST8132AA1 | Cet | 6.1-6.2 | ++ | ++ |
| (26) | ST8177AA1 | ST7464AA1 | ST8152AA1 | Cet | 3.2-4.6 | ++ | ++ |
| (27) | ST8178AA1 | ST7464AA1 | ST8128AA1 | Tras | 7.9 | ++ | ++ |
| (28) | ST8176AA1 | ST7464AA1 | ST8152AA1 | Tras | 4.1-4.5 | ++ | ++ |
| (29) | ST8179AA1 | ST7464AA1 | ST8132AA1 | Tras | 6.3 | ++ | ++ |
| (30) | ST8205AA1 | ST7660AA1 | ST8197AA1 | Tras | 6.2 | ++ | ++ |
| (36) | ST8218AA1 | 보리노스타트 | ST8217AA1 | Tras | 5.0 | ++ | ++ |
| (37) | ST8219AA1 | 보리노스타트 | ST8217AA1 | Cet | 4.0 | ++ | ++ |
| | | | | Cet | | ++ | ++ |
| | | | | Tras | | ++ | ++ |

- [0359] ++는 높은 정도의 결합 또는 내재화를 나타내는 점수이다.

- [0360] Cet = 세특시맙; Tras = 트라스투주맙

[0361] 실시예 16: 종양 세포에 의한 내재화 결정.

[0362] 동족 수용체로의 결합 후에, 종양 세포 내에 내재화하는 ADC의 능력은 Operetta 시스템 (Perkin Elmer)을 통한 HCS 형광 이미지화에 의해 평가되었다. 폐 (A549, H1975), 유방 (SKBR3), 결장 (LS174T), 난소 (SKOV3), 췌장 (CAPAN1) 및 위 (N87) 암종 세포주를 포함하는 몇가지 종양 세포 타입을 테스트하였다. 세포를 96-웰 마이크로 타이터 플레이트에 시딩하였고 ($0.5-1 \times 10^4$ /웰), 그 다음에 배양 배지 중에 $5 \mu\text{g/mL}$ 항체와 37°C 에서 3시간 동안 인큐베이트하였다. 2회 세척 후에, 세포를 PBS 중 4% 포름알데히드로 고정하였고, PBS 0.2% Tween-20 (PBS-T)으로 투과시키고, PBS-T 중 2% BSA로 차단하였고, 최종적으로 FITC-접합된 마우스 항-인간 IgG (BD Pharmingen)로 염색하였다. 형광은 High Content Screening (HCS) 시스템 Operetta (Perkin Elmer)로 획득 및 분석하였다. 세포를 DraQ5 염료 (Cell Signaling)로 대조 염색하였다.

[0363] 모든 ADC는 그의 네이티브 대응 항체인, 세특시맵 및 트라스투주맵과 유사한 방식으로 그들의 동족 수용체에 결합하고, 표적 세포에 의해 내재화되었다 (표 3 참조).

[0364] 실시예 17: ELISA 및 Biacore에 의한 수용체 상에 ADC의 결합 결정

[0365] ADC의 면역반응성을 항원-특이적 ELISA에 의해 테스트하였다. 간단하게, Immuno MAXISORP 96-웰 플레이트 (Nunc)를 50 ng/웰 의 재조합 인간 EGF-R/ErbB1 Fc 키메라 (R&D) 또는 재조합 인간 ErbB2/HER2 단백질 (Sino Biological Inc.)로 4°C 에서 밤새 코팅하였다. PBS/0.1% Tween (PT) 용액으로 세척한 후에, 플레이트를 1% BSA를 포함하는 PT 용액 (PTB)으로 실온 (RT)에서 2시간 동안 차단하였고, 그 다음에 실온에서 1시간 동안 항체의 일련의 희석물과 인큐베이트하였다. 추가 세척 후에, 차단 용액에서 1:1,000으로 희석시킨 항-인간 K 경쇄 호스래디시 퍼옥시다제 (HRP)-접합된 항체 (Sigma Aldrich)를 실온에서 1시간 첨가하였다. PT 용액으로 4회 세척 후에, $200 \mu\text{L/웰}$ TMB 기질 (Sigma Aldrich)을 첨가하였고, 플레이트를 37°C 에서 30분 동안 인큐베이트하였다. 상기 반응은 $0.5\text{M H}_2\text{SO}_4$ 용액의 $100 \mu\text{L/웰}$ 을 첨가하여 차단하였고, 450 nm 에서 광학 밀도는 ELISA 분광광도계로 측정되었다.

[0366] 모든 테스트된 ADC는 네이티브 항체인 세특시맵 및 트라스투주맵의 효능과 유사한 효능으로 그의 특정 수용체와 반응하는 것으로 나타났다 (도 5A 및 5B).

[0367] 세특시맵 및 그의 상응하는 ADC인, ST8155AA1 및 ST8154AA1의 EGFR/ErbB1 Fc 키메라 단백질로의 결합 친화도는 Biacore T200 biosensor (GE)에서 표면 플라스몬 공명 (SPR) 분석에 의해 측정하였다. 간단하게, EGFR/ErbB1 Fc 키메라 단백질은 제조자에 의해 공급된 아민 커플링 키트를 사용하여 연구-등급의 카르복시메틸화 텍스트란 센서 칩 (CM5, Biacore)에 결합되었다. 키네틱 분석은 단일 사이클 키네틱 분석 (single cycle kinetics assay)을 사용하여 수행하여 리간드에 유해한 재생 절차의 광범위한 사용을 피하였다 (항체가 각 사이클 마지막에 해리되지 않기 때문에 재생이 필요한 것으로 밝혀졌다). 항체 및 ADC를 pH 7.2에서 PBS 러닝 버퍼 중 $6.25-100 \text{ nM}$ 의 농도 범위로 주입하였다. 화합물은 180초의 접촉 시간과 600초의 해리 시간 사이에서 저농도에서 고농도로 주입하였다. 주입은 $30 \mu\text{L/분}$ 의 유속으로 25°C 에서 수행하였다. 센서 칩 표면을 10 mM 글리신/HCl pH 2.5로 12-20초 동안 재생시켰다. 모든 실험은 이중으로 수행되었다. 보고된 kon 및 koff 값은 두 실험에서 발생하는 값의 평균이다. $KD = koff/kon$ (표 4 참조).

표 4

ST8154AA1 (24) 및 ST8155AA1 (25) 에 대한 Biacore 분석.

| | Kon (1/Ms) | Koff (1/s) | KD (M) |
|-----------|--------------------|-----------------------|-----------------------|
| 세특시맵 | 1.59×10^5 | 4.54×10^{-4} | 2.85×10^{-9} |
| ST8154AA1 | 1.77×10^5 | 4.24×10^{-4} | 2.40×10^{-9} |
| ST8155AA1 | 6.82×10^4 | 3.51×10^{-4} | 5.15×10^{-9} |

[0368]

[0369] 실시예 18: 분무 공정 후에 ADC의 무결성 결정 (integrity determination)

[0370] 분무는 최근에 호흡기 질환에서 mAb의 유망한 전달 방법인 것으로 밝혀졌고, 이는 폐에 표적 약물을 직접 전달 하는데 적합한 비-침습적 방법을 나타내고, 2차 장기의 노출을 제한한다.

[0371] 이러한 전제에 따라, 본 발명자는 분무 후 ADC의 회수 및 무결성을 HPLC 분석에 의해 평가하고자 하였다. 간단 하게, ADC 및 그의 모체 항체인 세특시맵 및 트라스투주맵의 300 µg/mL 용액 (PBS 중)을 기존의 제트 네블라이 저 (AirFamily system, Pic indolor)를 통해 5분 동안 분무하였다. 그 다음에 팔콘 튜브 (falcon tubes)에 미 스트를 전달하여 분무된 약물을 수집하였고, 100 µL의 응축된 용액을 사전-분무된 시료와 비교하여 SEC-HPLC (TSKgel G3000 SWXL 컬럼, TOSOH Bioscience)로 분석하였다.

[0372] 분무후 회수 퍼센트는 사전-분무된 시료에 대해 각각의 상대 피크 면적을 측정하여 산출되었고, 세특시맵-기반 및 트라스투주맵-기반 ADC의 경우에 각각 ADC에 대해 50% 내지 30% 및 40% 내지 20% 범위였다. 각 크로마토그 램의 프로파일에 따라 분무된 ADC 각각에 대해 무결성 및 응집 발생율을 또한 평가하였고, 분무되지 않은 시료 의 것과 비교하였다 (표 5 참조).

표 5

분무 후에 HPLC에 의한 ADC의 특성 규명

| 코드 번호 | | 무결성 (%) | 응집체 (%) | 분해 (%) | 주요 피크의 회수 (%) |
|----------------|---------|---------|---------|--------|---------------|
| 세특시맵 | Pre neb | 100 | 0 | 0 | 72 |
| | neb | 100 | 0 | 0 | |
| ST8154AA1 (24) | Pre neb | 98 | 2 | 0 | 47 |
| | neb | 76 | 24 | 0 | |
| ST8155AA1 (25) | Pre neb | 95 | 4 | 1 | 33 |
| | neb | 69 | 30 | 1 | |
| ST8177AA1 (26) | Pre neb | 84 | 1 | 15 | 30 |
| | neb | 82 | 5 | 13 | |
| 트라스투주맵 | Pre neb | 100 | 0 | 0 | 58 |
| | neb | 100 | 0 | 0 | |
| ST8178AA1 (27) | Pre neb | 98 | 2 | 0 | 20 |
| | neb | 85 | 15 | 0 | |
| ST8176AA1 (28) | Pre neb | 83 | 5 | 12 | 21 |
| | neb | 76 | 11 | 13 | |

| | | | | | |
|-------------------|---------|----|----|---|----|
| ST8179AA1 (29) | Pre neb | 97 | 3 | 0 | 27 |
| | neb | 76 | 24 | 0 | |

[0374] 실시예 19: 종양 세포 증식을 저해하는 ADC 능력의 결정

[0375] 세포 증식에 대한 ADC의 효과를 2개의 폐 선암종 세포주 (NCI-H1975 및 Calu-3)에서 평가하였다. 보다 상세하게, NCI-H1975 종양 세포는 이중-돌연변이체 (L858R, T790M) *ErbB1* 유전자의 과발현에 의해 특성 규명되었고, 반면에 Calu-3은 야생형 형태의 EGFR을 발현하지만, 돌연변이체 K-Ras (G13D) 유전자뿐만 아니라 돌연변이체 TP53 및 CDKN2A 유전자를 발현한다.

[0376] 세포를 완전 배양 배지 중 96-웰 플레이트로 시딩하였고 (3,000-5,000 세포/웰), 그 다음에 500 내지 6.25 nM 범위의 ADC의 스칼라 농도 (scalar concentrations)로 4중 (quadruplicate)으로 6일 동안 인큐베이트하였다. 세포 증식 저해는 Veritas luminometer (Promega)를 통해, CellTiter-Glo 발광 세포 생존력 분석 (Promega)에 의해 측정되었다. 데이터는 2회의 독립적 실험의 저해 퍼센트의 평균 (\pm SD)으로 표시하였다. IC₅₀ 값은 GraphPad Prism 5.0 소프트웨어를 사용하여 최종적으로 산출되었다. 결과는 세특시삽 단독이 효과적이지 않다 (IC₅₀>500 nM)는 것과 비교하여, ADC ST8154AA1은 두 세포주의 종양 세포 증식을 유의하게 저해함을 보여주었다 (각 NCI-H1975 및 Calu-3 세포에서 IC₅₀ 값은 250 nM 및 450 nM임) (도 6-7).

[0377] 실시예 20: 종양 세포에서 히스톤 H3 및 α -튜불린의 아세틸화에 대한 ADC 활성의 결정

[0378] 전형적인 HDAC 기질인, 즉 히스톤 H3 및 α -튜불린 단백질의 아세틸화에 대한 ADC의 효과를 상이한 종양 세포에서 HCS 형광 이미징화에 의해 평가하였다. 폐 (A549, H1975), 유방 (SKBR3), 결장 (LS174T), 난소 (SKOV3), 췌장 (CAPAN1 및 MIAPACA-2) 및 위 (N87) 암종 세포주를 포함하는, 다양한 수준의 EGFR 및 HER2 수용체를 발현하는 여러 종양 세포주를 테스트하였다. 세포를 완전 배양 배지에서 96-웰 마이크로타이터 플레이트에 시딩하였고 (0.5-1x10⁴ /웰), 다음 날, 5 μ g/mL 항체 또는 ADC와 37°C에서 3 또는 24시간 동안 인큐베이트하였다. PBS로 2회 세척한 후에, 세포를 PBS 중 4% 포름알데히드로 고정하였고, PBS 0.2% Tween-20 (PBS-T)으로 투과하여, PBS-T 중 2% BSA로 차단하였다. 그 다음에 마우스 항-아세틸화- α -튜불린 IgG (클론 6-11B-1, Sigma Aldrich제) 또는 토끼 항-아세틸화-히스톤 H3 IgG (Active Motif제)를 PBS-T에 첨가하였고, 세포를 실온에서 1시간 동안 인큐베이트하였다. PBS로 2회 세척한 후에, 세포를 사용된 1차 항체에 따라 FITC-접합된 염소 항-마우스 또는 항-토끼 IgG (BD Pharmingen)로 1시간 더 최종적으로 염색하였다. 형광은 High Content Screening (HCS) 시스템 Operetta (Perkin Elmer)에 의해 획득 및 분석되었다. 세포를 Draq5 염료 (Cell Signaling)로 대조 염색하였다.

[0379] 모든 테스트된 ADC는 모든 테스트된 종양 세포주에서 α -튜불린 및 히스톤 H3 모두의 아세틸화 수준의 관련 증가를 유도하였고, 이는 각각 HDAC6 및 클래스 I HDAC의 직접 효소적 저해의 결과이다 (도 8-11). 이러한 결과는 ADC가 내재화되고 분해되어 ST7464AA1 모이어티를 방출하는 능력과 일치했다.

[0380] α -튜불린 및 히스톤 H4의 증가된 아세틸화가 또한 상이한 종양 세포의 단백질 용해물에서 웨스턴 블롯 분석에 의해 관찰되었다. 간략하게, 실험 전날, 종양 세포를 완전 배양 배지 중에 6-웰 디쉬로 시딩하였다. 그 다음에 세포를 20 μ g/mL 시험 항체로 37°C에서 3시간 동안 처리하였다. 처리 후에, 세포를 빙냉 PBS로 2회 세척하였고, 그 다음에 전체 세포 용해물은 프로테아제 저해제가 보충된 1X 용해 버퍼 (Cell Signaling)와 빙상에서 10분 동안 인큐베이트로 제조되었다. 세포 용해물을 초음파 처리하고 4°C에서 10분 동안 14,000 x g로 원심분리하여 세포 조직파편 (debris)을 제거하였다. 단백질 함량은 제조자의 지침에 따라, 고전적인 비색 Bradford 방법 (Coomassie Bradford 단백질 분석 키트; Pierce)으로 결정되었다. 아세틸화 정도를 평가하기 위해, 각 시료에 대해 동일한 양의 단백질을 SDS-PAGE로 분해하고, 니트로셀룰로스 막 (Hybond-C extra, Amersham-GE Healthcare)에 전달하였다. 분자량은 분자량 단백질 마커 (Prestained Kaleidoscope Standards; Bio-Rad)로 상대적 이동에 기반하여 추정하였다. 그 다음에 비특이적 결합 부위를 4°C에서 밤새 TBS 중 5% 탈지분유를 갖는 막을 인큐베이트하여 차단하였다. 특정 1차 항체 (토끼 항-아세틸-히스톤 H4 항체, Santa Cruz제; 마우스 항-히스톤 H4 모노클로날 항체, Cell Signaling제; 마우스 항-아세틸화 α -튜불린 모노클로날 항체, Sigma Aldrich제, 토끼 항- α -튜불린 항체, abcam제)를 4°C에서 밤새 5% 탈지분유/TBST 중 최적 희석으로 막에 첨가하였다. TBST로 4회 세척한 후에, 막을 5% 탈지분유/TBST 중 HRP-접합된 2차 항체와 1시간 동안 인큐베이트하였다. 면역반응성 밴드는 최종적으로 ECLplus 웨스턴 블로팅 검출 시약 (GE Healthcare)으로 증강된 화학발광에 의해 시각화되었고, 포토이미징 시스템 (STORM, Molecular Dynamics)으로 분석되었다. 대표적인 블롯은 도

12에 도시되어 있다.

[0381] 실시예 21: NCI-H1975 비-소세포 폐암에 대해 ip로 제공된 ST8154AA1 및 ST8155AA1의 인 비보 항종양 효과의 결정

[0382] 누드 Nu/Nu 암컷 마우스 (Charles River제, Italy)에게 10% FBS가 보충된 100 μ L 세포 배양 배지 RPMI에 현탁된 5×10^6 NCI-H1975 비-소세포 폐 암종 세포를 단회 피하 주사로 제공하였다. 세특시맵 및 ST8154AA1 및 ST8155AA1은 4일 동안 매 4일마다 (q4dx4) 복강내로 50 mg/kg의 용량으로 제공되었고, 반면에 ST7612AA1은 q4dx4 스케줄에 따라 120 mg/kg으로 복강내로 투여되었다. 비히클 그룹은 PBS로 처리되었다. 종양 성장은 캘리퍼로 측정되었고, 종양 부피는 식 길이 (mm) x 너비² (mm)/2를 사용하여 산출되었다. 종양 저해는 하기 식에 따라 산출되었다: %TVI=100-(치료된 그룹의 평균 종양 부피 / 대조 그룹의 평균 종양 부피) x 100. 독성은 체중 감소에 기반하여 평가되었다.

[0383] 종양이 약 1200 mm³ 부피에 도달하면 동물에게 CO2를 흡입시켜서 안락사시켰다.

[0384] 동물을 수용 및 취급에 채택된 모든 절차는 실험 동물 복지에 대한 이탈리아 및 유럽 지침을 엄격히 준수하였다.

[0385] 결과는 ADC가 세특시맵보다 유의하게 더 효과적임을 보여주었다 (P<0.001 및 P<0.01). 특히, ST8155AA1은 세특시맵과 비교하여 77%의 종양 부피를 저해할 수 있었지만 (도 13, 표 6), 반면에 ST8154AA1은 세특시맵에 대해 95%의 종양 성장을 감소시킬 수 있었다 (도 13, 표 7). 로딩된 독소 ST7464의 프로드러그인 ST7612AA1은 단독으로 120 mg/kg으로, ip, q4dx4로 투여될 때, 완전히 비활성이었고, 이는 HDAC 저해제의 최적 스케줄이 매일 (qdx5/w)이기 때문이다. (도 13).

[0386] 흥미롭게도, mAb 세특시맵의 mAb 상에 약물 ST8154AA1 및 ST8155AA1의 로딩된 용량은 약 0.1 mg/kg이었다.

표 6

[0387] NCI-H1975 NSCLC에 대한 ST8155AA1 대 세특시맵의 항종양 효능.

| 종양 조직타입 | 종양 이식 | 약물 전달 | 47일에 ST8155AA1 대 세특시맵의 종양 또는 전이 저해 (%) 세특시맵에 대한 P 값 |
|-----------------|-------|-----------|--|
| NCI-H1975 NSCLC | s.c. | ip, q4dx4 | 77, P<0.01 |

표 7

[0388] 상이한 종양 모델에 대한 ST8154AA1 대 세특시맵의 항종양 및 항전이 효능

| 종양 조직타입 | 종양 이식 | 약물 전달 | ST8154AA1 및 세특시맵 대 비히클의 종양 또는 전이 저해 (%) 세특시맵에 대한 P 값 |
|-----------------|---------|-------------|---|
| NCI-H1975 NSCLC | s.c. | i.p., q4dx4 | 95 (90일에 세특시맵에 대해), P<0.001 |
| A549 NSCLC | s.c. | i.p., q4dx4 | 60 대 34, P<0.05 |
| A549 NSCLC | i.v. | 에어로졸 q7dx4 | 90 대 50, P<0.01 |
| CAPAN-1 췌장암 | 췌장에서 정위 | i.p., q4dx4 | 84 대 49 및 CR 6/10 대 2/10, P<0.05 |
| PDX 췌장암 PA5363 | s.c. | i.p., q4dx5 | 50 대 25, P<0.05 |

[0389] 실시예 22: A549 비-소세포 폐암에 대해 ip로 제공된 ST8154AA1의 인 비보 항종양 효과의 결정.

[0390] 누드 마우스에게 10% FBS가 보충된 100 μ L 세포 배양 배지 RPMI에 현탁된 5×10^6 A549 비-소세포 폐 암종 세포를 피하 주사로 제공하였다. 세특시맵 및 ST8154AA1을 4일 동안 매 4일마다 (q4dx4) 50 mg/kg의 용량으로 복강내로 투여하였다. 종양 측정 및 데이터는 실시예 21에서와 같다.

[0391] 치료는 ST8154AA1은 세특시맵보다 유의하게 더 효과적임을 보여주었다 (P<0.05) (도 14, 표 7).

[0392] 실시예 23: 전이 A549 비-소세포 폐암에 대해 에어로졸로 전달된 ST8154AA1의 인 비보 항종양 효과의 결정

[0393] 5×10^6 A549-luc-C8 (A549luc) 세포를 면역결핍 SCID/베이지 마우스의 꼬리 정맥으로 주사하여 전이 폐암을 수립하였다. 1주일 후에, 상기 마우스를 무작위화하고, ADC 또는 세톡시맵 (100 μ g/mL 용액의 3.5 mL)으로 전신 에어로졸 (AirFamily system에 의함, Pic indolor)로 치료하였다. 스케줄 q7dx4에 따라 치료를 반복하였다. 종양 생체발광 이미지화 (BLI)는 루시페린 (150 μ g/마우스)의 i.p. 주사하고 15분 후에 Xenogen IVIS Imaging System 200 (Perkin Elmer)에 의해 상이한 시점에서 기록되었다. 생체발광의 평가로 ADC는 종양 수집의 상이한 시간에서 세톡시맵과 비교하여 보다 높은 효능으로 종양 전이를 유의하게 저해할 수 있음을 보여주었다 ($P < 0.01$ 및 $P < 0.05$) (도 15, 표 7).

[0394] 실시예 24: CAPAN-1 췌장암에 대해 ip로 전달된 ST8154AA1의 인 비보 항종양 효과의 결정

[0395] ST8154AA1 (40 mg/kg, ip, q4dx4), ST7612AA1 (200 mg/kg, ip, q4dx4) 및 세톡시맵 (40 mg/kg, ip, q4dx4) 사이의 비교가 CAPAN-1 정위 췌장 종양 마우스 모델에서 평가되었다. Capan-1 (1×10^6) 세포를 실험 그룹의 췌장으로 직접 주입하였다. 종양을 접종하고 6일 후에 ST8154AA1, ST7612AA1 및 세톡시맵으로 치료를 시작하여, 종양을 주입하고 90일 후에, 마우스를 희생시켜서 췌장 종양 중량을 분석하였다. ST8154AA1은 완전한 반응을 보이는 10마리의 마우스 중 6마리에서 84%의 종양 성장 저해를 보였고, 세톡시맵은 완전한 반응을 보이는 10마리의 마우스 중 2마리에서 49%의 종양 성장 저해를 제공하는 것으로 나타났다. ST7612AA1 단독은 종양 성장에 있어서 보다 낮은 활성을 보였고 (32%), 이는 q4dx4가 HDAC 저해제에 대한 최적의 스케줄이 아니기 때문이다. 종양 중량은 종양을 주입하고 90일 후에 평가되었고, 평균 및 SEM으로 표시되었다, $P < 0.05$ vs Ctx) (도 16, 표 7).

[0396] 실시예 25: PDX (환자-유래 이종이식편) 췌장암에 대해 ip로 전달된 ST8154AA1의 인 비보 항종양 효과의 결정

[0397] NOD-SCID 마우스 (Jackson Laboratories제)에게 동일 부피의 Cultrex 10x spheroid phormation ECM에 재-현탁된 51000 세포/100 μ L의 환자 PA5363 P2의 세포를 단회 피하 주사로 제공하였다.

[0398] 세톡시맵 및 ST8154AA1을 5일 동안 매 4일마다 (q4dx5) 40 mg/10 mL/kg의 용량으로 복강내로 투여하였다. 종양 성장 측정 및 데이터는 실시예 20에서와 같다.

[0399] 치료로 ST8154AA1은 세톡시맵보다 유의하게 더 효과적임을 보여주었다 ($P < 0.05$) (도 17, 표 7).

[0400] 실시예 26. SKOV-3 난소암에 대해 ip로 제공된 ST8178AA1 및 ST8176AA1의 인 비보 항종양 효과의 결정

[0401] 누드 Nu/Nu 암컷 마우스 (Charles River, Italy)에게 10% FBS가 보충된 100 μ L 세포 배양 배지 RPMI에 현탁된 5×10^6 SKOV-3 난소 암종 세포를 단회 피하 주사로 제공하였다.

[0402] 각 실험 그룹에 대한 마우스를 4회 치료 동안 매 4일 마다 (q4dx4), 15 mg/10 mL/kg의 용량으로 ip로 치료하였다. 결과는 ST8178AA1 및 ST8176AA1이 트라스투주맵보다 유의하게 더 효과적임을 보여주었다 ($P < 0.05$) (도 18-19, 표 8 및 9). 종양 측정 및 데이터는 실시예 20에서와 같다. 이들 데이터는 종양 성장에 있어서 트라스투주맵과 비교하여 ADC의 2배 효과를 시사하였다.

표 8

[0403] SKOV-3 난소 암종에 대해 ST8178AA1 대 트라스투주맵의 항종양 효능

| 종양 조직타입 | 종양 이식 | 약물 전달 | ST8176 및 트라스투주맵 대 비히클의 종양 저해 (%) 트라스투주맵에 대한 P 값 |
|------------|-------|-------------|--|
| SKOV-3 난소암 | s.c. | i.p., q4dx4 | 65 대 40, $P < 0.05$ |

[0404] 실시예 27. 정위로 이식된 (orthotopically implanted) SKOV-3 난소암에 대해 ip로 제공된 ST8176AA1의 인 비보 항종양 효과의 결정

[0405] 누드 Nu/Nu 암컷 마우스 (Charles River, Italy)를 10% FBS가 보충된 200 μ L 세포 배양 배지 RPMI에 현탁된 10×10^6 SKOV-3 난소 암종 세포를 단회 복강내 주사로 제공하였다.

[0406] 마우스에게 종양을 주입하고 3일 후부터 시작하여 ST8176AA1, 트라스투주맵 (매 4일마다 한번씩 15 mg/kg의 4회 용량) 또는 비히클 (PBS)을 i.p.로 주사하였다. 트라스투주맵 또는 ST8176AA1은 효과적이었지만 ADC는 또한 종

양 이식으로부터 90일 후에 9마리의 마우스 중 4마리가 치료된 것을 보여주었다 (도 20, 표 9).

표 9

[0407] 상이한 종양 모델에 대한 ST8176AA1 대 트라스투주맙의 항종양 및 항전이 효능

| 종양 조직타입 | 종양 이식 | 약물 전달 | ST8176 및 트라스투주맙 대 비히클의 종양 저해 (%) 트라스투주맙에 대한 P 값 |
|----------------|-------|-------------|---|
| SKOV-3 난소암 | s.c. | i.p., q4dx4 | 65 대 40, P<0.05 |
| SKOV-3 난소암 | 정위 | i.p., q4dx4 | 수명 증가 95 대 72, P<0.05 |
| LS174-T 결장암 | s.c. | i.p., q4dx4 | 25 대 0, P<0.05 |
| LS174-T 결장암 | 정위 | i.p., q4dx4 | 수명 증가 35 대 0, P<0.05 |
| PDX 췌장암 PA5363 | s.c. | i.p., q4dx5 | 35 대 0, P<0.05 |

[0408] 실시예 28: 복강내 LS174-T 결장암에 대해 ip로 제공된 ST8176AA1의 인 비보 항-종양 효과의 결정

[0409] ADC는 또한 공격적인 종양 이종이식편 모델인 결장 암종과 같은 복강내 종양에 대해 평가되었다.

[0410] 본 연구의 목적은 ADC가 복막 암종증 (carcinomatosis)과 같은 질환을 치료하기 위해 국소 투여로 사용될 수 있음을 입증하는 것이었다. 이러한 활성을 입증하기 위해서, LS-174T 결장암 세포를 ip로 주사하였다. 세포를 수집하였고, PBS로 2회 세척하였다. 천만 개의 세포를 20%의 Matrigel™을 포함하는 EMEM 배지의 0.2 mL에 현탁시켰고, 각 마우스의 복막에 주사하였다. ADC에 의한 모든 치료는 스케줄 q4dx4에 따라 종양을 주입하고 3일 후에 200 µL의 부피로 i.p. 주사에 의해 수행되었다.

[0411] 마우스는 1주일에 2회 체중을 기록하면서 매일의 사망률을 모니터링하였다. 불편함, 고통 또는 죽어가는 상태의 증후를 보이는 동물은 수의사 또는 공인된 개인이 검사하였고, 필요하다면 과도한 통증이나 고통을 최소화하도록 인도적으로 희생시켰다.

[0412] 사망률 데이터는 가장 적합한 통계적 분석에 따라 처리되어 치료들 중 수명 증가를 결정하고, Kaplan-Mayer 플롯을 생성하였다. 모든 통계적 분석은 소프트웨어 GraphPad-Prism6를 사용하여 수행되었다.

[0413] 결과는 비히클- 및 트라스투주맙-치료된 그룹 모두에서 37일의 중간 생존 시간 (median survival time: MST)을 보여주었다. 대조적으로, ADC ST8176AA1은 중간 생존 시간이 50일까지 유의하게 증가되는 것으로 밝혀졌다 (P<0.05) (도 21, 표 9).

[0414] 현재, 완화 수술 (palliative surgery)을 포함하거나 또는 포함하지 않는, 전신 화학요법으로 구성된 복막암의 전통적인 치료법은 결과의 측면에서 효과가 떨어지고, 복강에서 약물 분포 및 복막 결절로의 침투가 떨어진다는 관점에서 약리학적 제약을 나타내었다 (Oyais A 2014 Zentralbl Chir. 2014 141: 421-4).

[0415] 대조적으로, 국소 전달 중 PIPAC (pressurized intraperitoneal aerosol chemotherapy)라는 최근 혁신적인 방법은 복강내 화학요법의 효능을 증강시키는 것으로 밝혀졌고 (Solass W 2014 Ann Surg Oncol 21:553-9), 이러한 절차는 안전하고, 치료 후 신장이나 간 독성이 없었다 (Blanco 2014 20:2311-6; Solass 2013 Ann Surg Oncol 20: 3504-11).

[0416] 신규한 ADC는 국소 종양에서 에어로졸 및 복강내로 항종양 활성을 나타내기 때문에, 이러한 데이터는 표준 비경구 투여 외에 본원에 기재된 ADC의 PIPAC 사용을 권장한다.

[0417] PIPAC (pressurized intraperitoneal aerosol chemotherapy)는 복강내 화학요법의 효능을 증강시키는 국소 전달의 혁신적인 방법이다 (Solass W 2014 Ann Surg Oncol 21:553-9).

[0418] 이러한 절차는 안전하고, 치료 후 신장이나 간 독성이 없었다 (Blanco 2014 20:2311-6; Solass et al 2013 Ann Surg Oncol 20: 3504-11).

[0419] 상이하게, 복막암의 전통적인 치료법은 완화 수술을 포함하거나 또는 포함하지 않는, 전신 화학요법으로 구성되고, 결과 측면에서 효과가 좋지 않았다. 다른 문제점은 복강에서 약물 분포 및 복막 결절로의 침투가 떨어진다는 측면에서 약리학적 제약이 있다 (Oyais A et al 2014 Zentralbl Chir. 2014 141: 421-4). 복강내 전달에 있어서 효능 데이터 및 분무시에 본원에 기재된 ADC의 안정성을 확인하는 생화학적 분석에 기반하여, ADC의 PIPAC 사용이 또한 정당화된다.

- [0420] 실시예 29: LS-174T 결장암에 대해 ip로 제공된 ST8176AA1의 인 비보 항종양 효과의 결정
- [0421] 5×10^6 LS174T 결장 암종 세포를 s.c. 주사하고 6일 동안 Nu/Nu 마우스에서 종양이 발생되도록 하였다. 병변 발생 및 항체 치료에 대한 반응은 디지털 캘리퍼를 사용하여 모니터링하였다. 마우스에게 ST8176AA1, 트라스투주맙 (매 4일마다 1회 15 mg/kg의 4회 용량) 또는 비히클 (PBS)을 i.p.로 주사하였다. ADC ST8176AA1은 결장암의 종양 성장을 유의하게 저해하는 것으로 밝혀졌다 (트라스투주맙에 대해 $P < 0.05$) (도 22, 표 9).
- [0422] 실시예 30: PDX 췌장암에 대해 ip로 전달된 ST8176AA1의 인 비보 항종양 활성의 결정
- [0423] NOD-SCID 마우스 (Jackson Laboratories)를 동일한 부피의 Cultrex 10x spheroid phormation ECM에 재현탁된 77000 세포/100 μ L로 환자 PA5363 P2의 세포를 단회 피하 주사로 제공하였다.
- [0424] 트라스투주맙 및 ST8176AA1은 각 그룹에 대해 10마리 마우스의 실험 그룹에서 15 mg/kg의 용량으로 5일 동안 매 4일마다 (q4dx5) 복강내로 투여하였다. 종양 측정 및 데이터는 실시예 20에서와 같다.
- [0425] 치료로 ST8176AA1은 트라스투주맙 ($P < 0.05$) 및 비히클-치료된 그룹 ($P < 0.05$)보다 유의하게 더 효과적임을 보여 주었다 (도 23, 표 9).
- [0426] 실시예 31: A549 폐암에 대해, mAb에 대한 로딩된 용량에 상응하는, 저용량의 ST7612AA1과 세특시맙 조합의 인 비보 항종양 효과의 결정
- [0427] 동일한 물의 조합 또는 세특시맙 및 ST7612AA1과 비교하여 ADC ST8154AA1의 항-종양 효과가 또한 A549 비-소세포 폐 암종 모델에 대해 평가되었다. ST7612AA1 또는 세특시맙의 최적의 용량이 또한 조사되었다.
- [0428] 인간 A549 폐 암종 세포를 그의 적합한 완전 배지에서 배양하였다. 종양 주입 당일에, 세포를 트립신화에 의해 하위융합성 (subconfluent) 배양물로부터 수확하였고, PBS로 세척하였고, PBS에 현탁시켜서, 면역결핍 마우스의 우측 옆구리에 피하로 주사하였다 ($5 \times 10^6 / 100 \mu$ L). 종양 크기가 약 80 mm³이면 치료를 시작하였고, 마우스를 실험 그룹으로 무작위로 배정하였다 (10 마우스/그룹):
- [0429] ST8154AA1 q4dx4, ip의 투여로 종양 성장 저해를 유도하고, 연구 중에 및 사후 종양 중량 검정에 의해 평가하고, ADC 성분인, 세특시맙 (40 mg/kg, ip, q4dx4) 및 HDACi (0.1 mg/kg, ip, q4dx4)의 동일한 물의 혼합물은 효과적이지 않았다 (표 10).
- [0430] 본 실험에서, 세특시맙 단독 (40 mg/kg, ip, q4dx4)은 어떠한 항종양 활성도 보이지 않았다.
- [0431] 최적의 용량의 세특시맙 (40 mg/kg, ip, q4dx4)과 ST7612AA1 (40 mg/kg, po, qdx5/wx3w)의 결합은 ST7612AA1 단독 (40 mg/kg, po qdx5/wx3w)과 유사한 항종양 효과를 보였다.
- [0432] 40 mg/kg의 ST7612AA1, po qdx5/wx3w는 ADC ST8154AA1과 유사한 항종양 활성을 나타내었고, 반면에 0.1 mg/kg의 ST7612AA1, ip q4dx4는 효과적이지 않았다 (표 10).

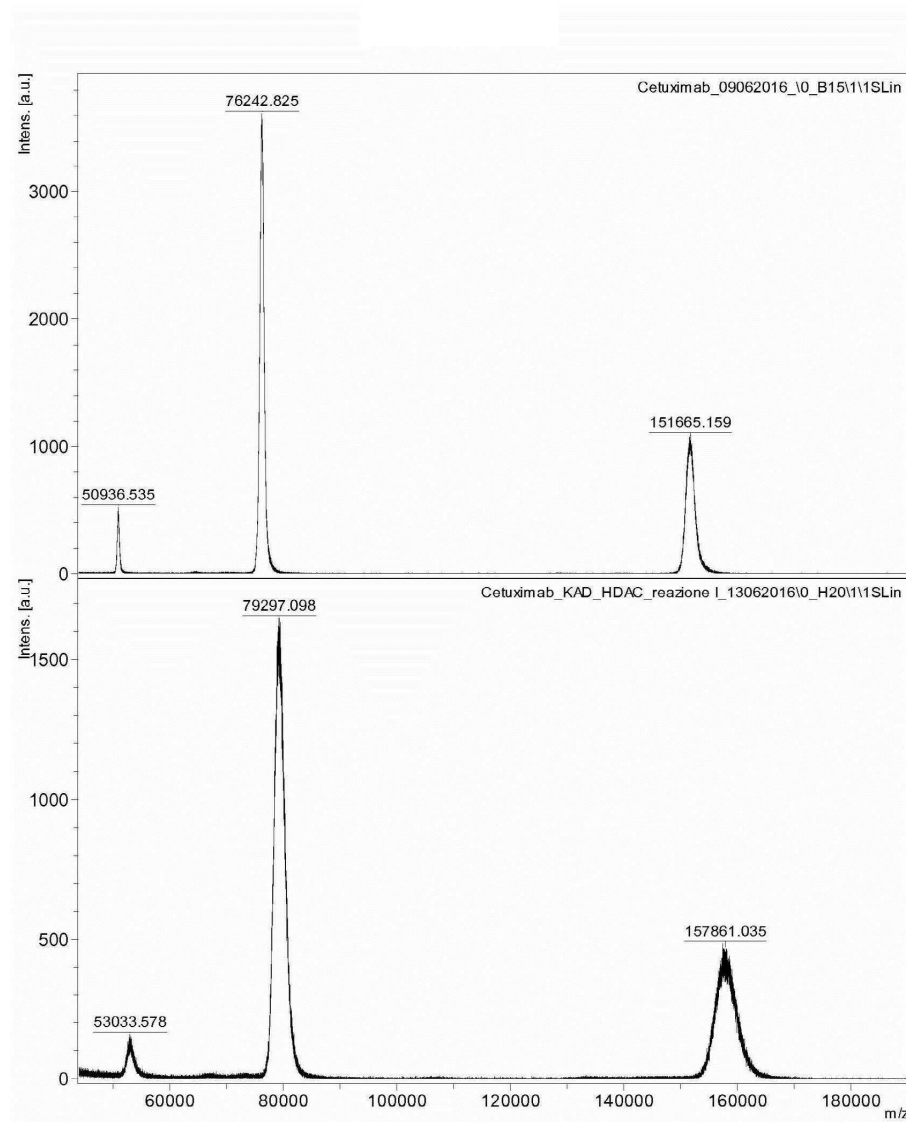
표 10

- [0433] A549 NSCLC에 대해 ST7612AA1과 세특시맙의 조합의 항종양 활성.

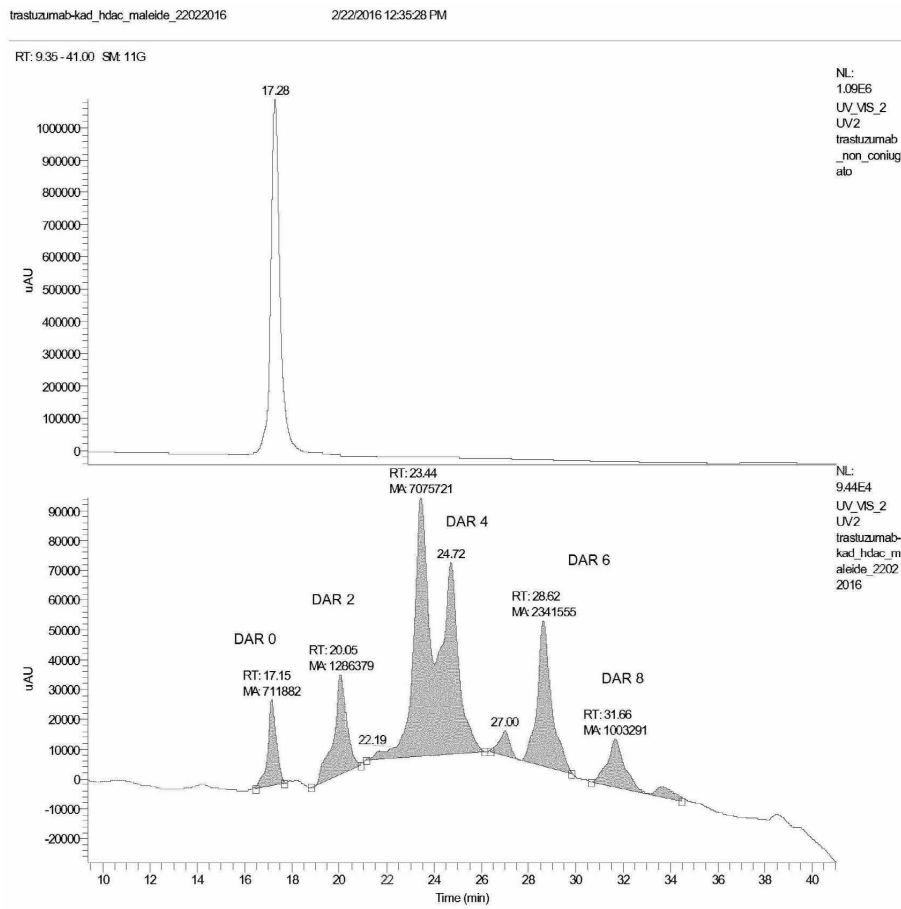
| 그룹 | 용량 (mg/kg), 경로, 스케줄 | 50일에 TVI, 비히클에 대한 P 값 | 56일에 TVI, 비히클에 대한 P 값 |
|---------------|---------------------|-----------------------|-----------------------|
| 비히클 | 0 | - | - |
| 세특시맙 | 40, ip, q4dx4 | 0, $P=0.91$ | 0, $P=0.79$ |
| ST7612AA1 | 40, po, qdx5/wx3w | 33, $P=0.007$ | 35, $P=0.0009$ |
| Cet+ST7612AA1 | 40 ip+40 po | 20, $P=0.11$ | 27, $P=0.07$ |
| ST7612AA1 | 0.1, ip, q4dx4 | 0, $P=0.95$ | 0, $P=0.88$ |
| Cet+ST7612AA1 | 40 ip+0.1 ip | 9, $P=0.22$ | 8, $P=0.55$ |
| ST8154AA1 | 40, q4dx4 | 21, $P=0.05$ | 20, $P=0.04$ |

도면

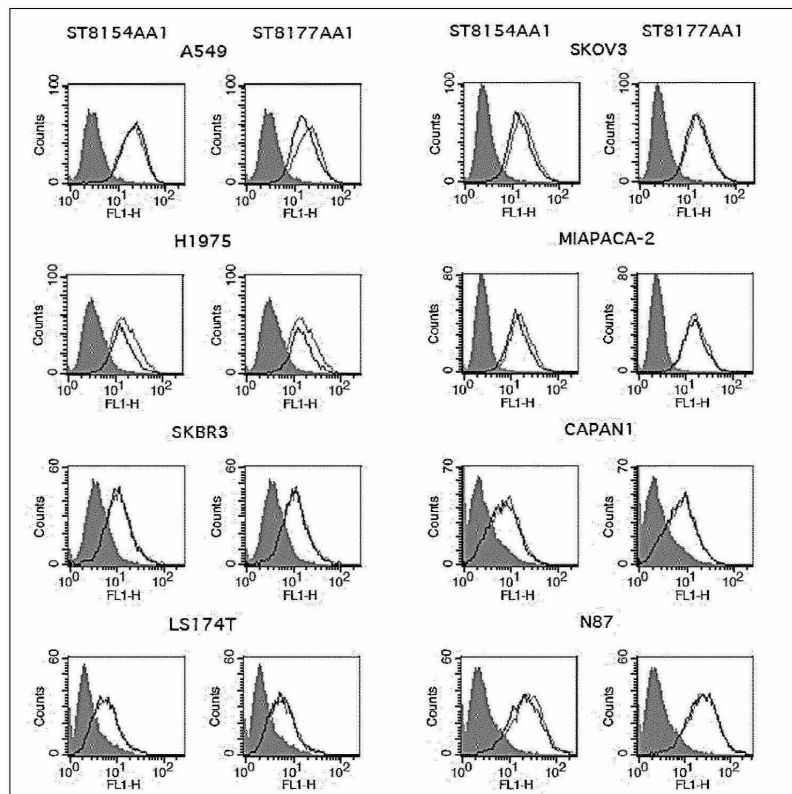
도면1



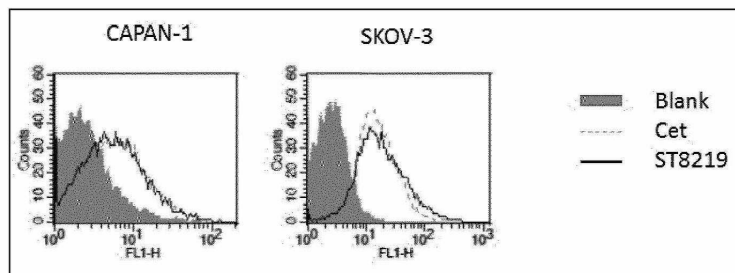
도면2



도면3

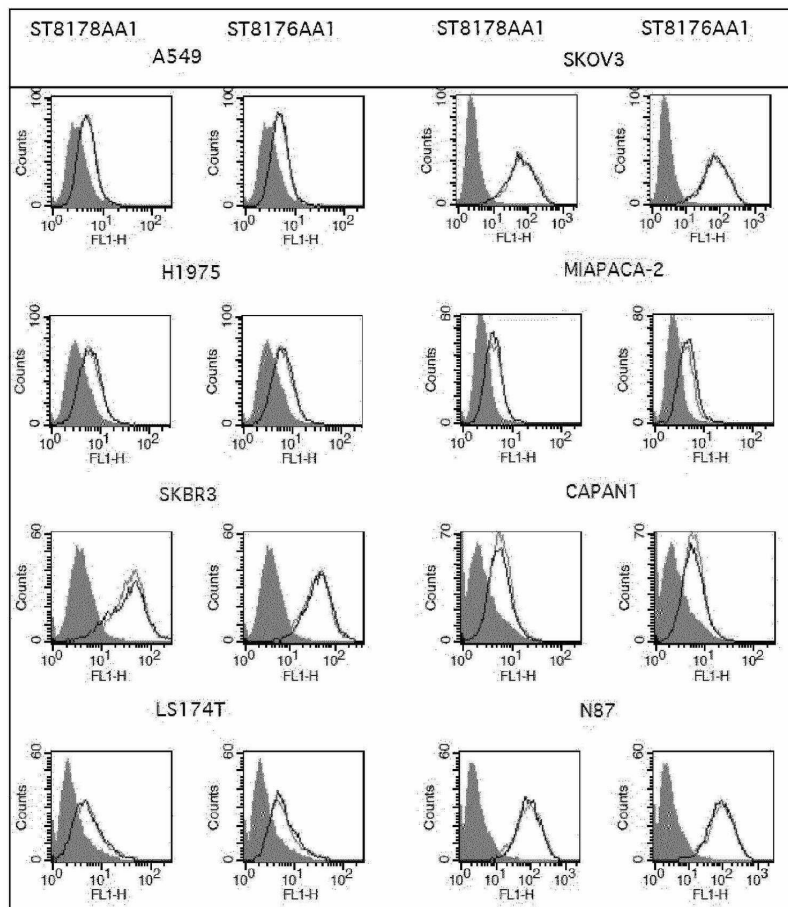


(A)

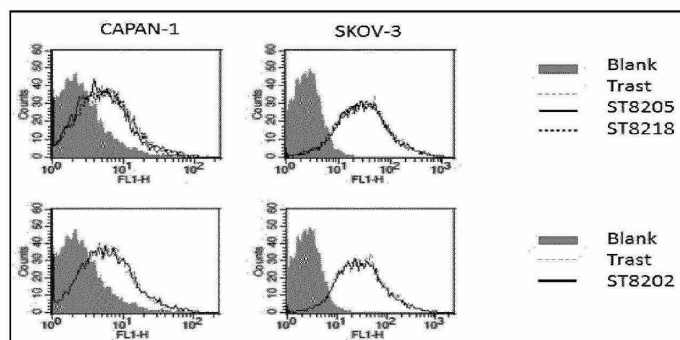


(B)

도면4

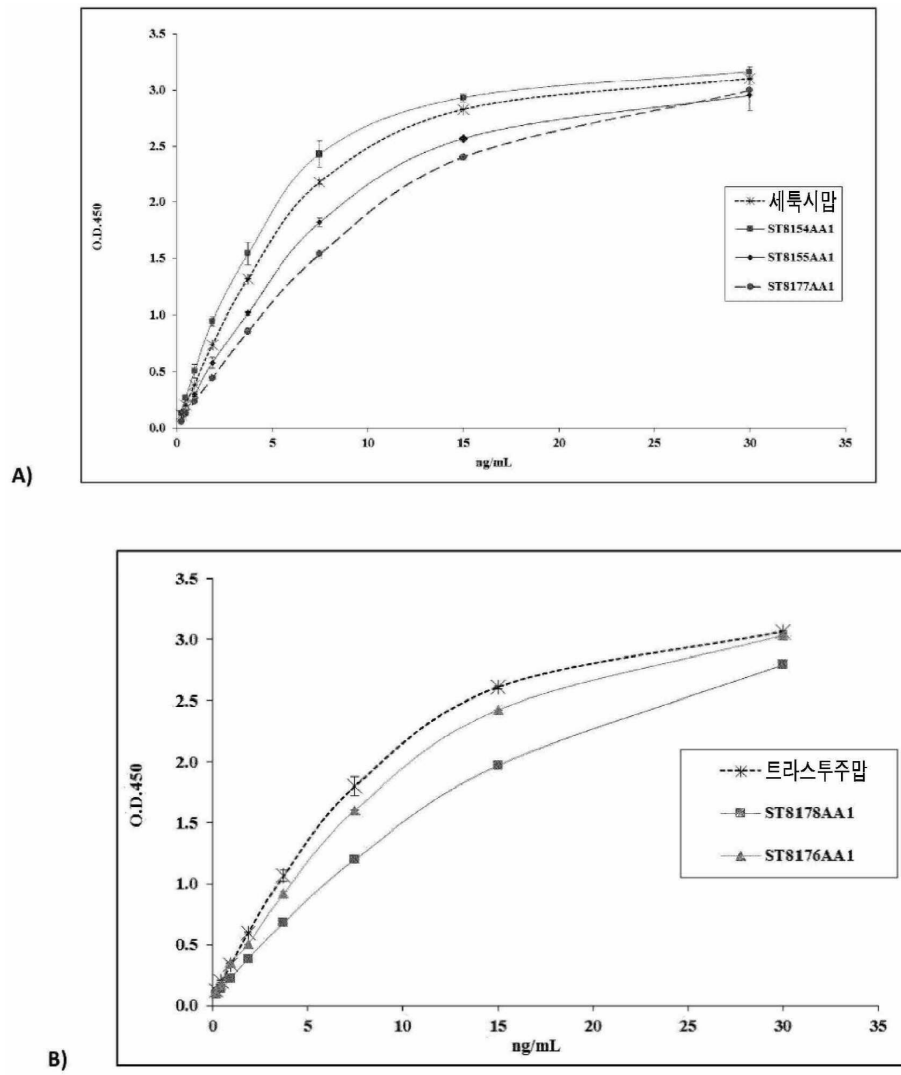


(A)

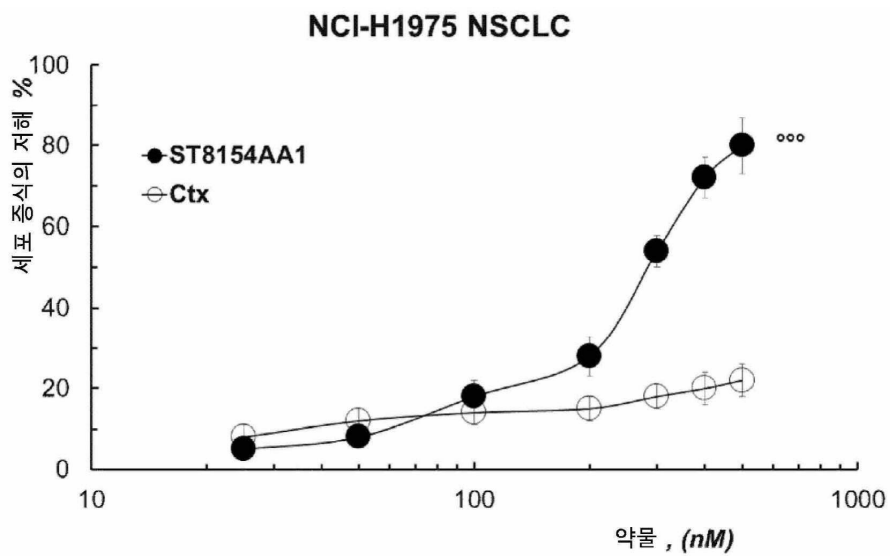


(B)

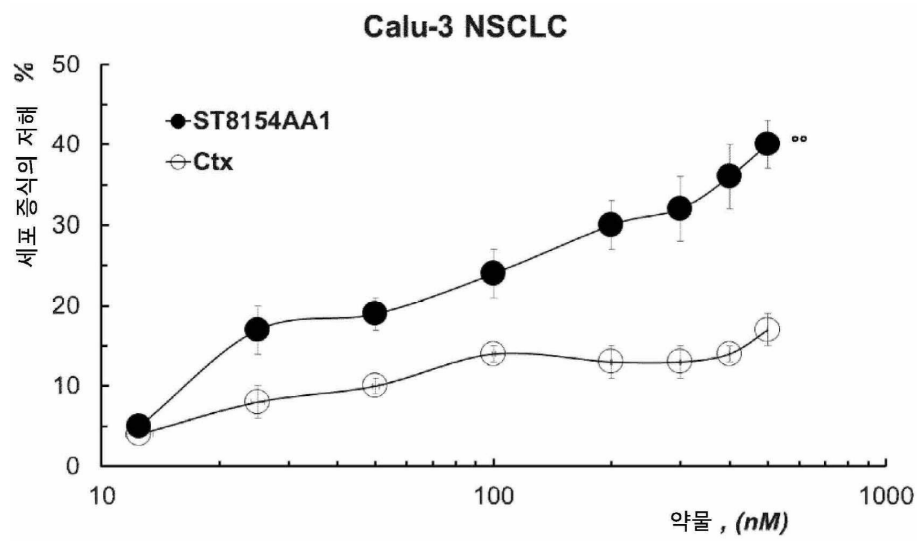
도면5



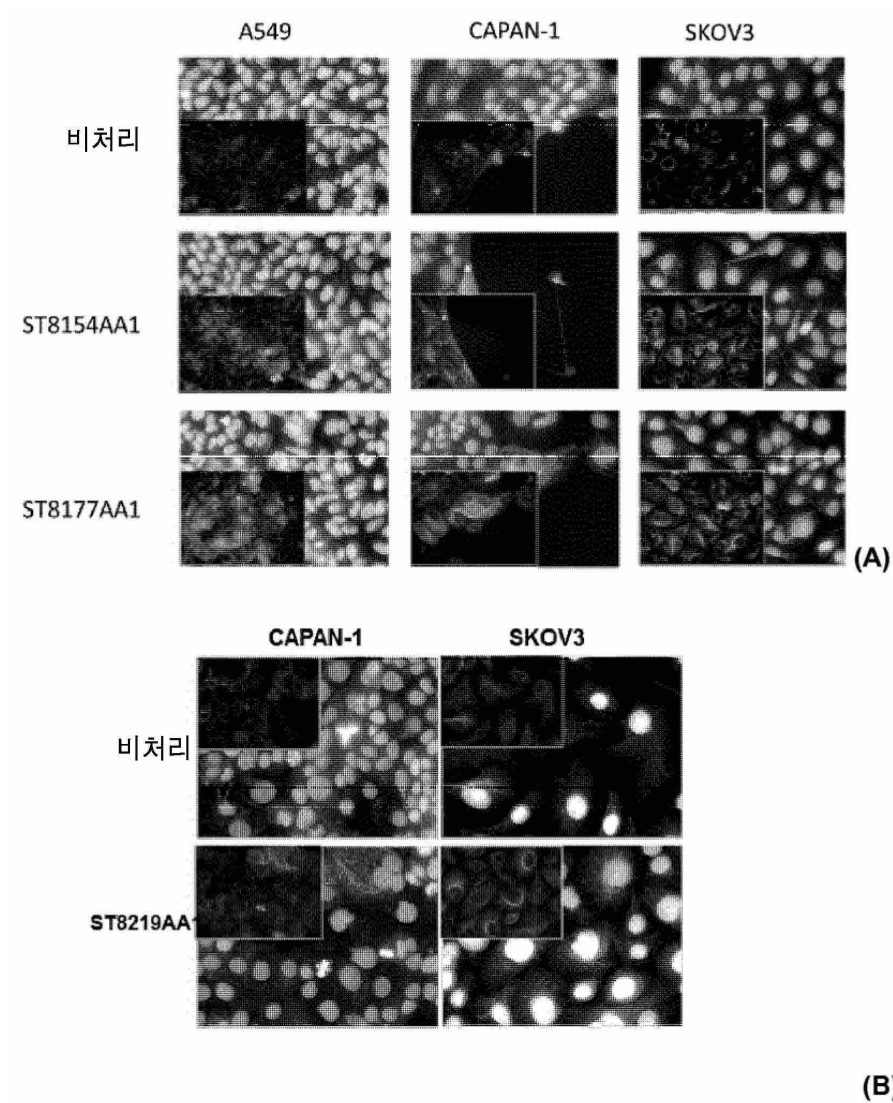
도면6



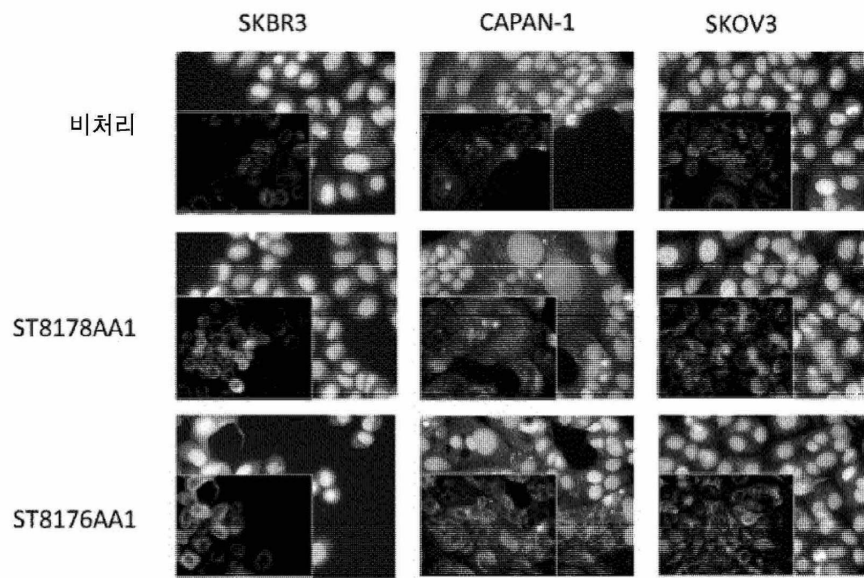
도면7



도면8

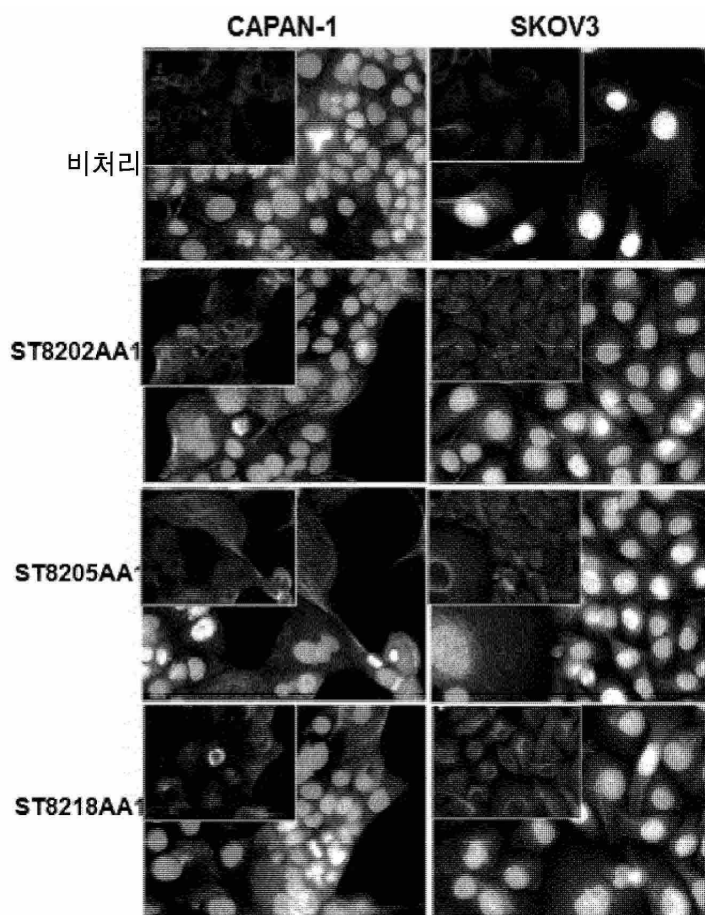


도면9a



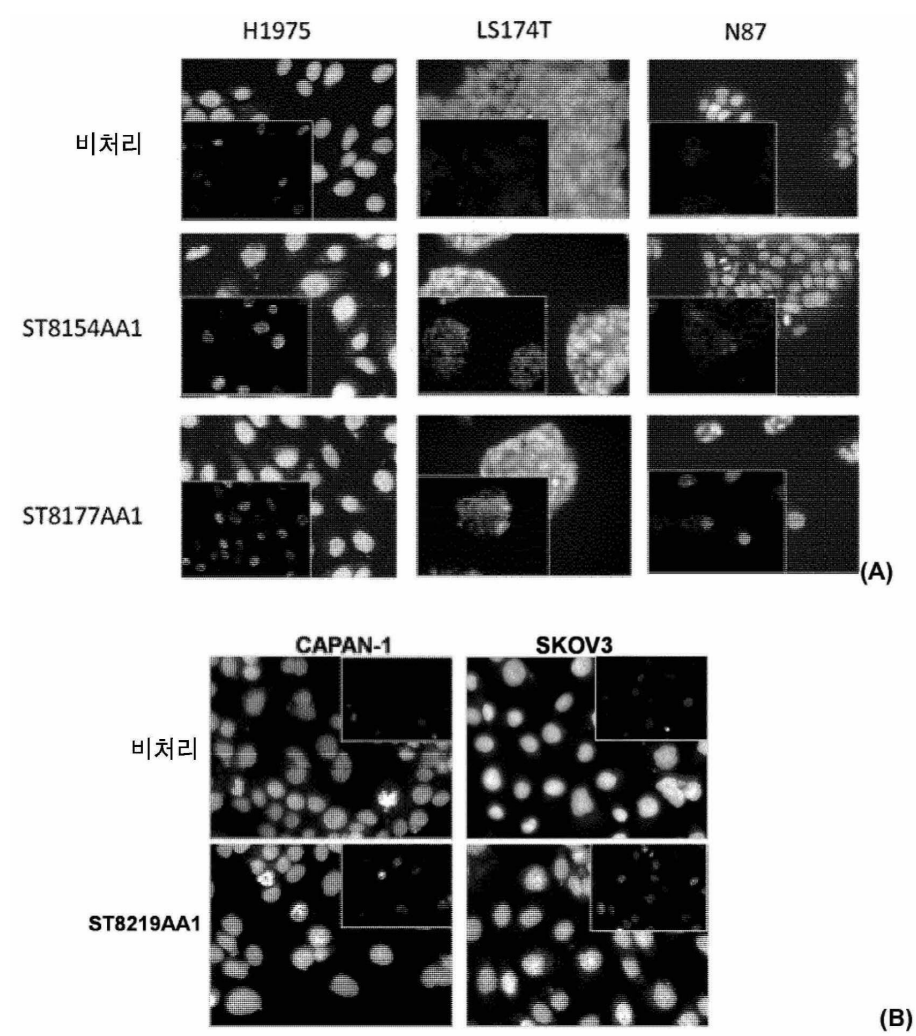
(A)

도면9b

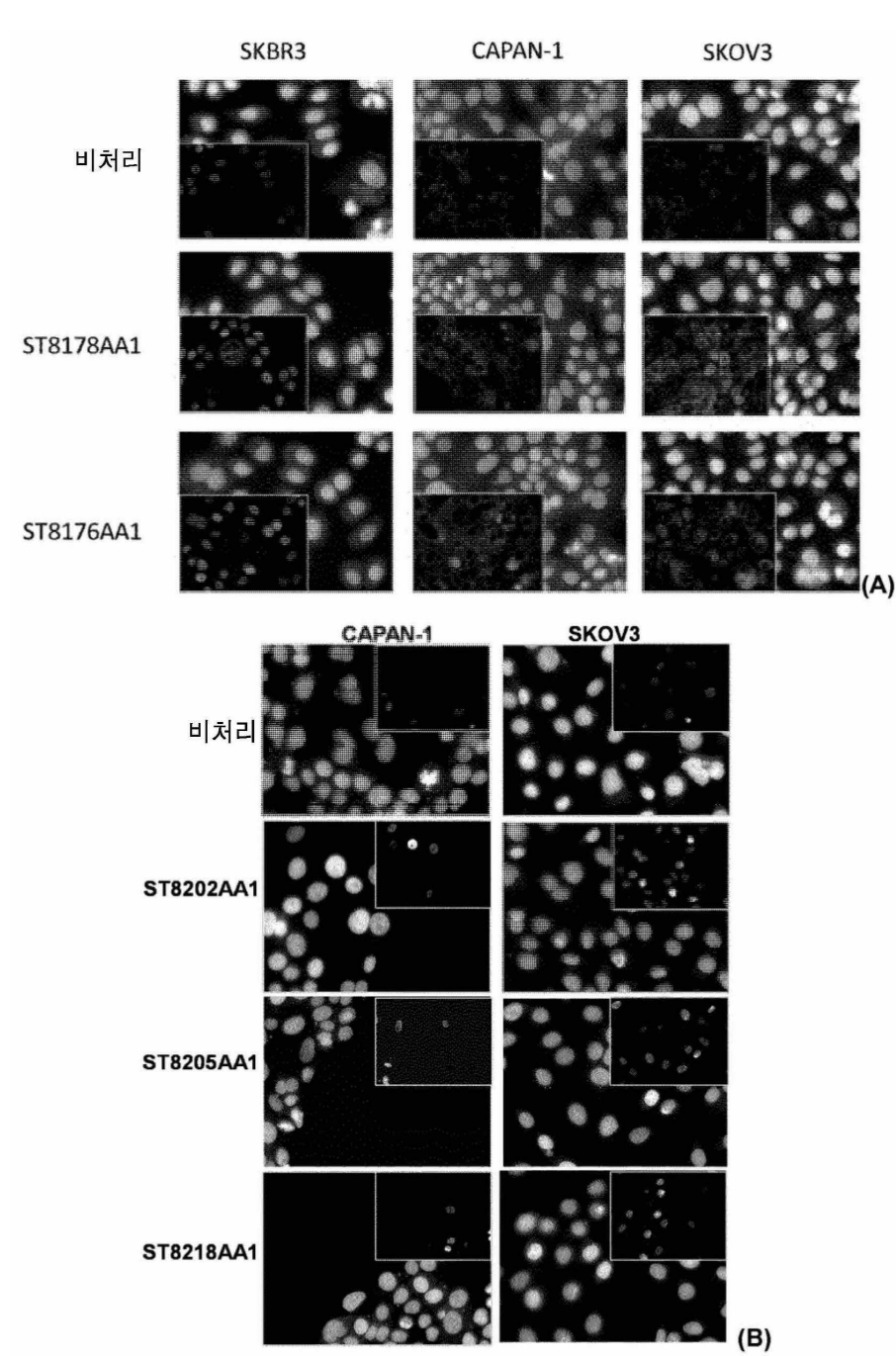


(B)

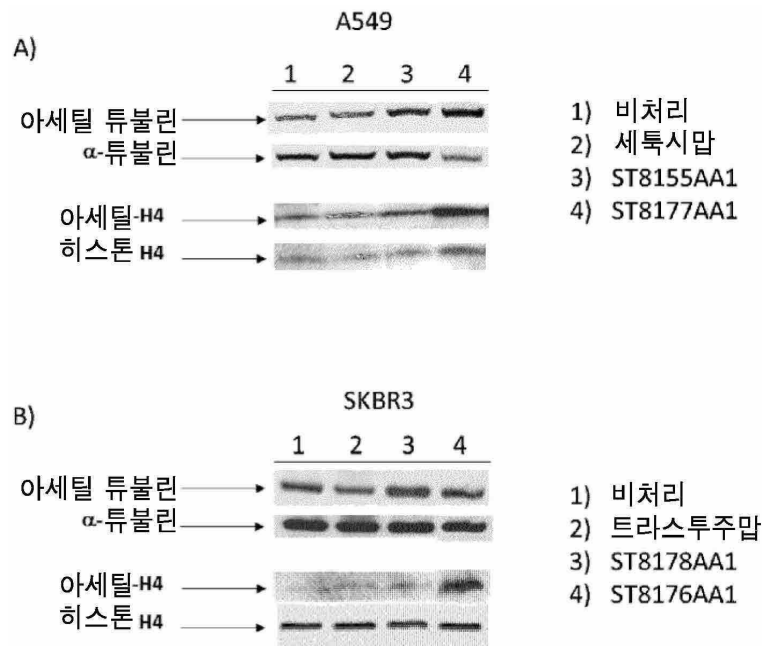
도면10



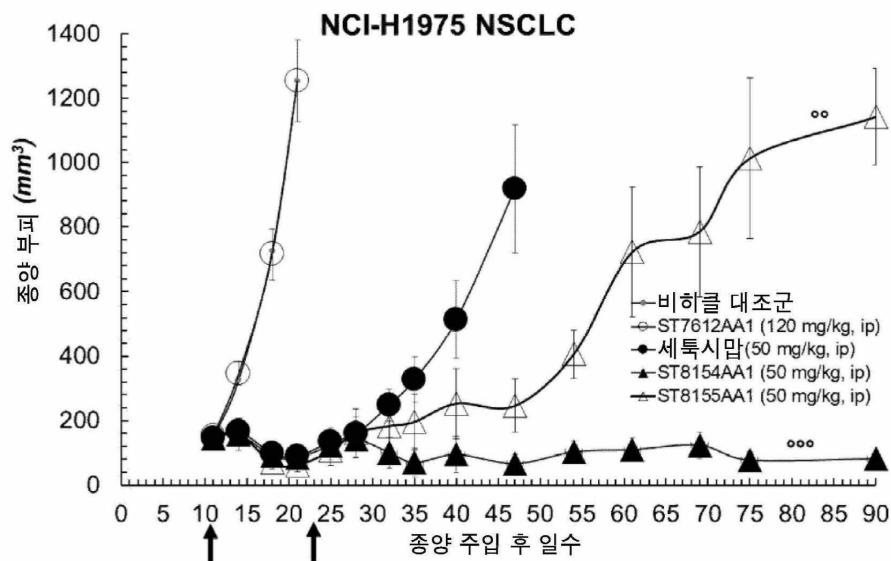
도면11



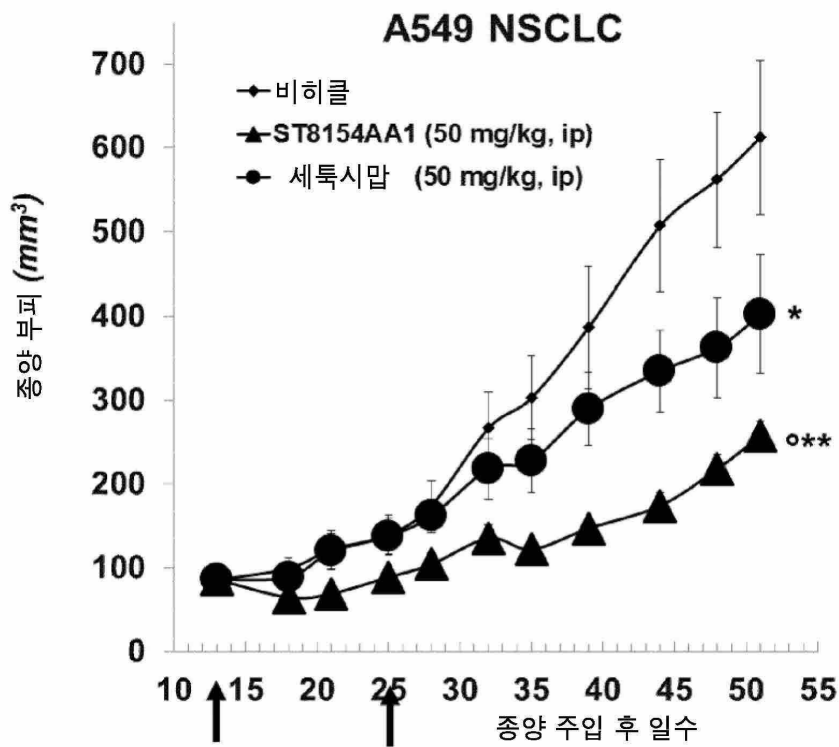
도면12



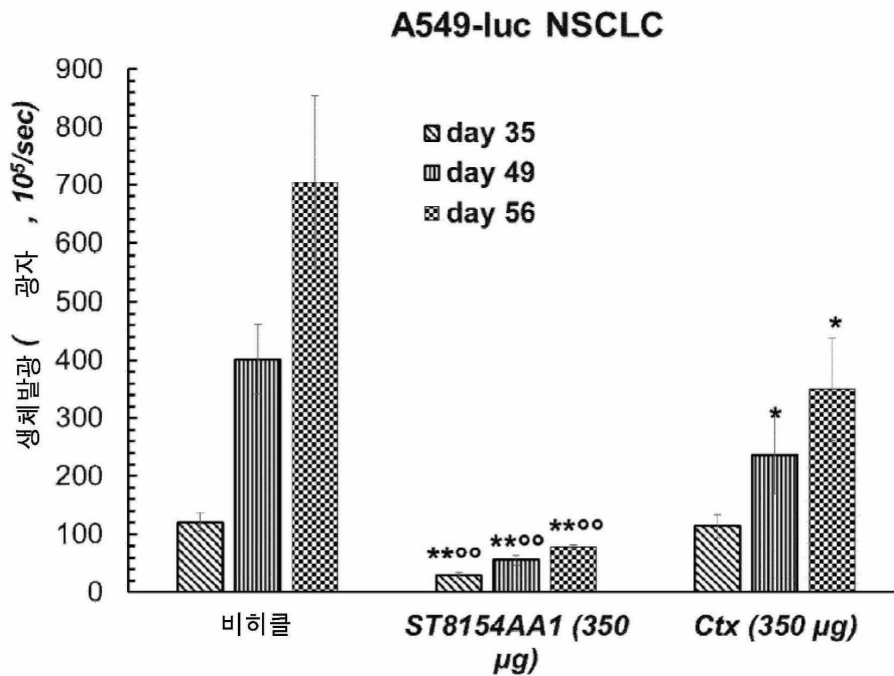
도면13



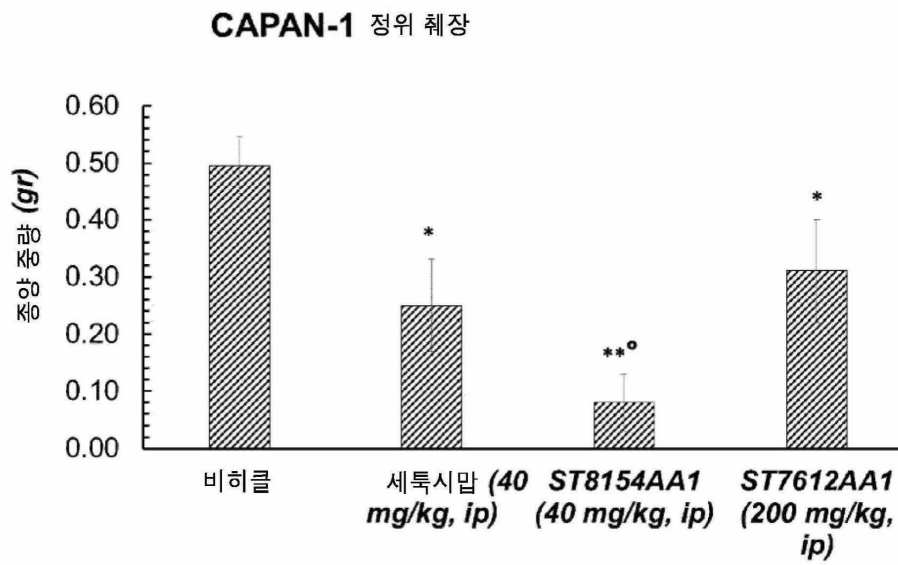
도면14



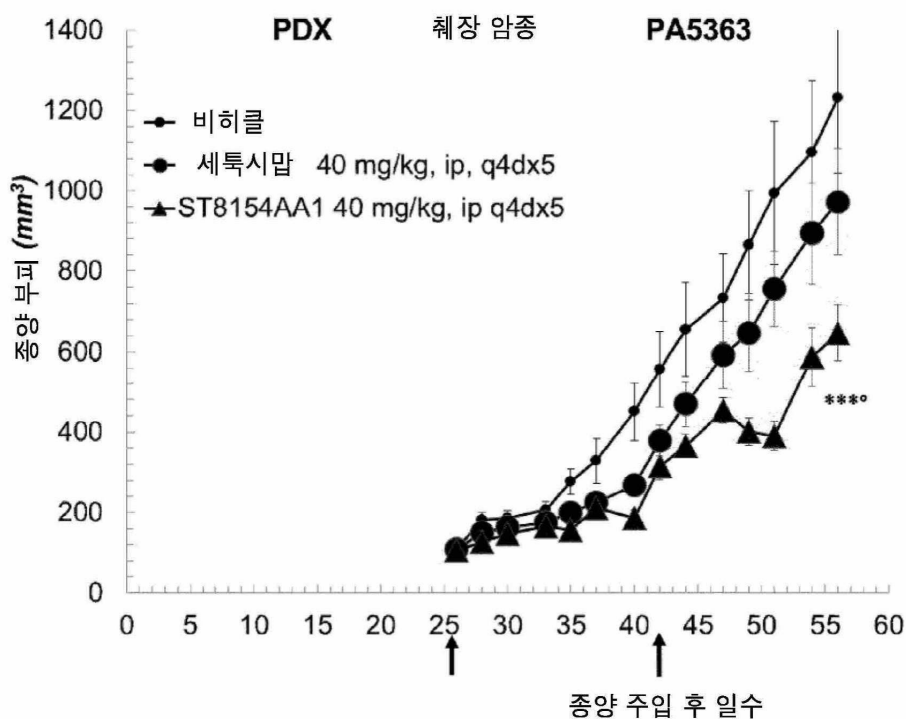
도면15



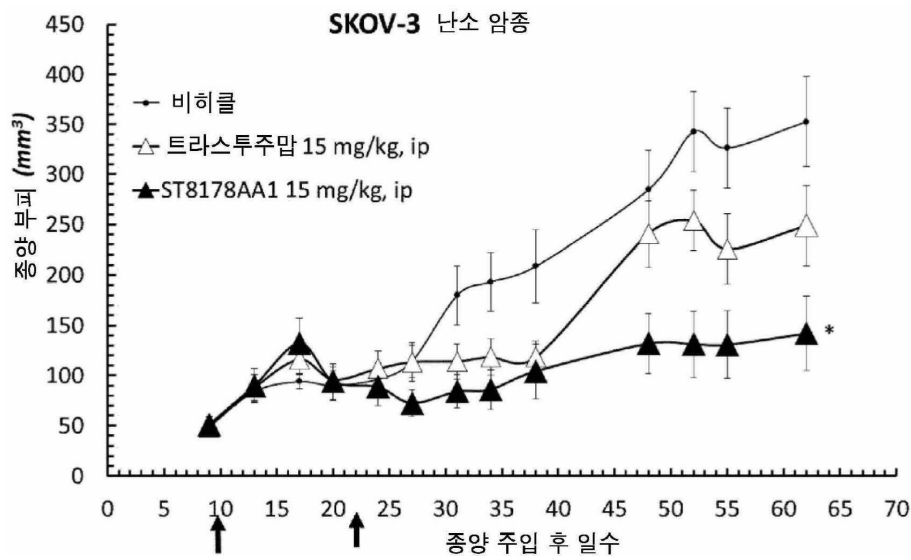
도면16



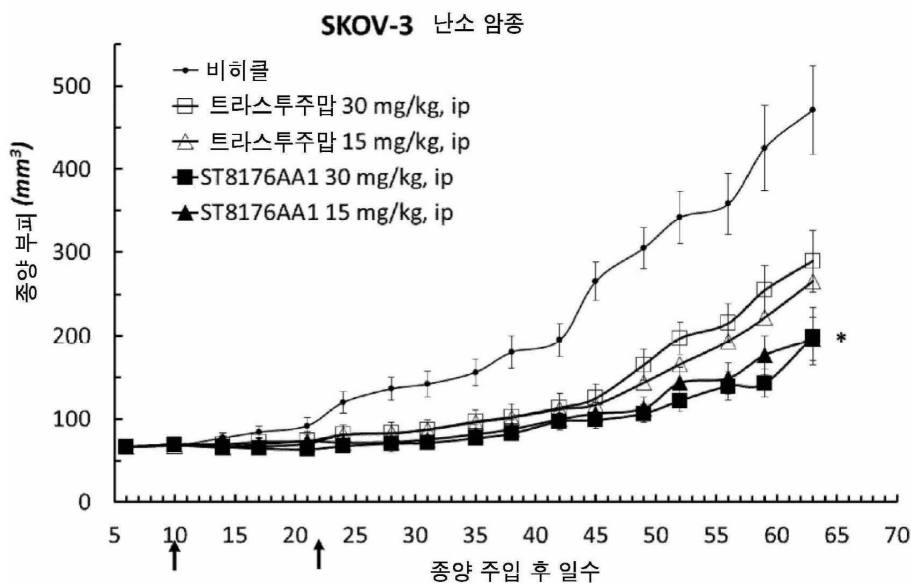
도면17



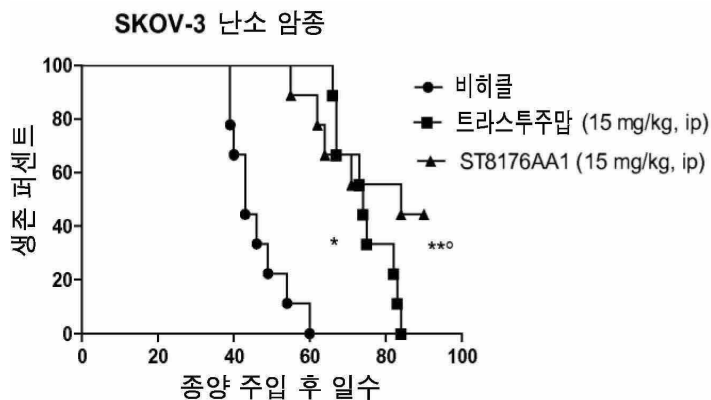
도면18



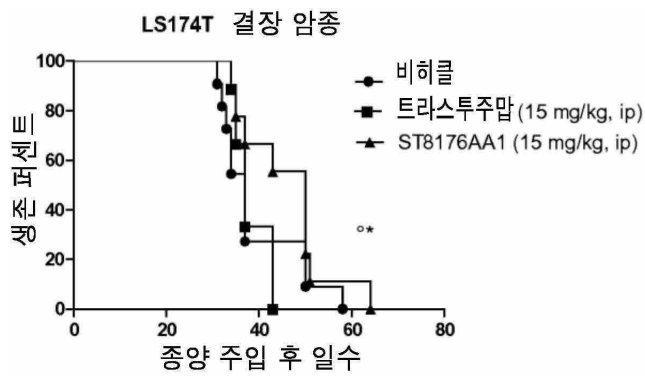
도면19



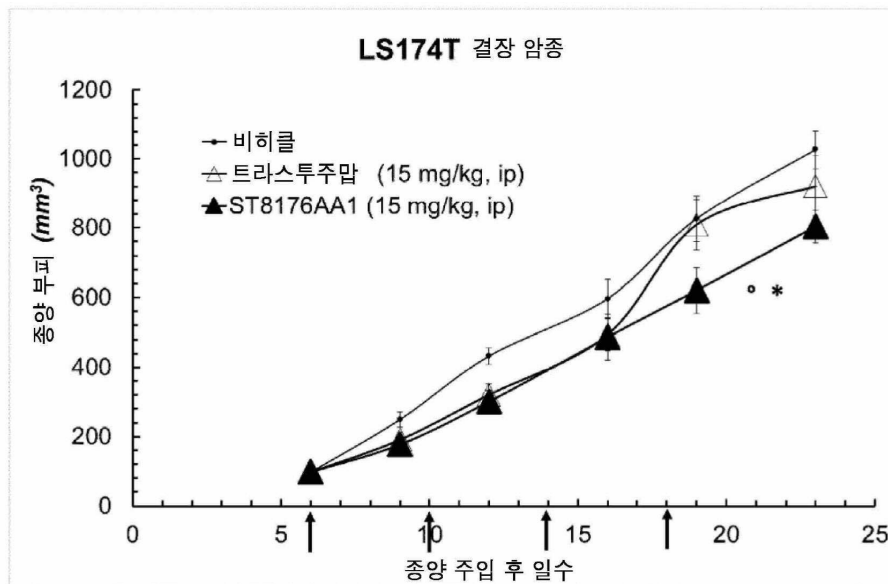
도면20



도면21



도면22



도면23

