



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2018년11월22일
(11) 등록번호 10-1921068
(24) 등록일자 2018년11월16일

- (51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 47/48 (2006.01) A61K 31/70 (2006.01)
A61K 39/395 (2006.01) A61K 48/00 (2006.01)
- (21) 출원번호 10-2013-7032628
(22) 출원일자(국제) 2012년05월08일
심사청구일자 2017년05월08일
(85) 번역문제출일자 2013년12월09일
(65) 공개번호 10-2014-0035393
(43) 공개일자 2014년03월21일
(86) 국제출원번호 PCT/IB2012/001065
(87) 국제공개번호 WO 2012/153193
국제공개일자 2012년11월15일
- (30) 우선권주장
61/483,698 2011년05월08일 미국(US)
- (56) 선행기술조사문헌
ChemBioChem., 8(1), 98-105, 2007.
ChemBioChem., 10(18), 2934-2943, 2009.
KR1020080080482 A
US20100063114 A1
- (73) 특허권자
주식회사 레고켐 바이오사이언스
대전광역시 대덕구 문평서로 8-26 (문평동)
- (72) 발명자
김용주
대전 유성구 유성대로 1662, 3층 (전민동, 대전바
이오벤처타운)
박태교
대전 유성구 유성대로 1662, 3층 (전민동, 대전바
이오벤처타운)
(뒷면에 계속)
- (74) 대리인
권오식, 김종관, 박창희

전체 청구항 수 : 총 23 항

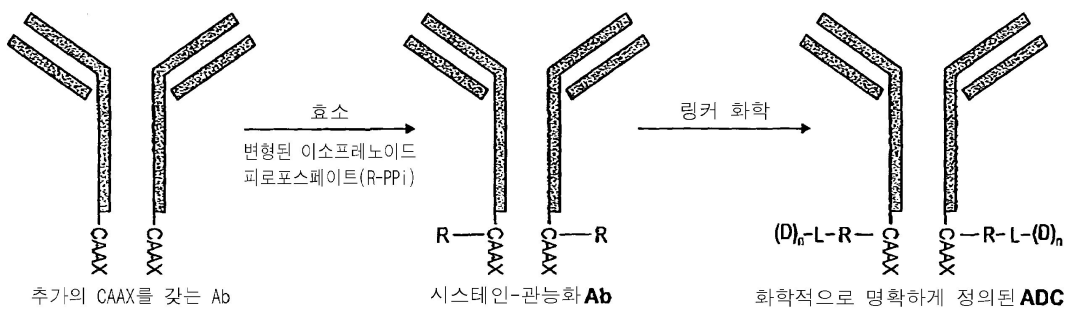
심사관 : 이재정

(54) 발명의 명칭 단백질-활성제 접합체 및 이의 제조 방법

(57) 요약

본 발명은 이소프레노이드 트랜스퍼라제에 의하여 인식될 수 있는 아미노산 모티프를 갖는 단백질-활성제 접합체를 제공한다. 본 발명은 또한 접합체를 함유하는 조성물뿐만 아니라, 접합체 및 조성물의 제조 방법을 제공한다. 본 발명은 추가로 접합체를 사용하여 활성제를 표적 세포로 전달하는 방법뿐만 아니라, 접합체를 사용하여 이를 필요로 하는 피검체(예: 활성제를 필요로 하는 피검체)를 치료하는 방법을 제공한다.

대표도



R: 개질된 이소프레노이드 그룹, L: 링커, D: 약물, n: 수

(72) 발명자

우성호

대전 유성구 유성대로 1662, 3층 (전민동, 대전바이오벤처타운)

이항수

대전 유성구 유성대로 1662, 3층 (전민동, 대전바이오벤처타운)

김영운

대전 유성구 유성대로 1662, 3층 (전민동, 대전바이오벤처타운)

조종운

대전 유성구 유성대로 1662, 3층 (전민동, 대전바이오벤처타운)

정두환

대전 유성구 유성대로 1662, 3층 (전민동, 대전바이오벤처타운)

김선영

대전 유성구 유성대로 1662, 3층 (전민동, 대전바이오벤처타운)

권현진

대전 유성구 유성대로 1662, 3층 (전민동, 대전바이오벤처타운)

오규만

대전 유성구 유성대로 1662, 3층 (전민동, 대전바이오벤처타운)

정윤서

대전 유성구 유성대로 1662, 3층 (전민동, 대전바이오벤처타운)

박윤희

대전 유성구 유성대로 1662, 3층 (전민동, 대전바이오벤처타운)

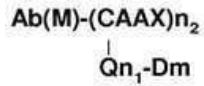
명세서

청구범위

청구항 1

하기 조건을 만족하는 하기 [화학식 II]를 특징으로 하는 항체-활성제 접합체:

[화학식 II]



Ab(M)은 항체 또는 상기 항체의 일부인 단편이며;

Q는 제1 관능 그룹(FG1)을 포함하며 항체와 하기 활성제를 연결하는 링커이며;

n_1 및 n_2 는 독립적으로 1 내지 4의 정수이며;

m은 1 내지 16의 정수이며;

Dm은 활성제이고, 상기 활성제는 면역조절 화합물, 항암제, 항바이러스제, 항박테리아제, 항진균제, 구충제 및 그 조합을 포함한다.

a) 항체에서 하나 또는 둘의 경쇄, 하나 또는 둘의 중쇄, 또는 그 조합이 직간접적으로 아미노산을 포함하는 스페이서(spacer)를 통해 아미노산 모티프에 연결되며;

b) 상기 아미노산 모티프는 C, CAAX, XXCC, XCXC 또는 CXX로, 상기 C는 시스테인, A는 지방족 아미노산, X는 이소프레노이드 트랜스퍼라제의 기질적 특이성을 결정하는 아미노산이며;

c) 이소프레노이드 트랜스퍼라제에 의해 인식될 수 있는 아미노산 모티프와 이소프레노이드가 연결되며;

d) 상기 이소프레노이드는 상기 링커에 의해 면역조절 화합물, 항암제, 항바이러스제, 항박테리아제, 항진균제 및 구충제를 포함하는 상기 활성제에 연결된다.

청구항 2

삭제

청구항 3

제1항에 있어서, 상기 항체가

(a) 항체의 카복시 말단에서의 결실(deletion),

(b) 항체의 카복시 말단에서의 올리고펩티드 또는 폴리펩티드 부가 및

(c) 항체의 카복시 말단에서의 결실 및 항체의 카복시 말단에서의 올리고펩티드 또는 폴리펩티드 부가로 본질적으로 이루어진 그룹으로부터 선택된 변형을 포함하고, 변형이 아미노산 모티프에 결합되는 항체-활성제 접합체.

청구항 4

제 1항에 있어서,

상기 스페이서는 G(글리신), G_5 , G_7 또는 G_{10} 인 것을 특징으로 하는 항체-활성제 접합체.

청구항 5

제 1항에 있어서,

상기 CAAX의 X는 메티오닌인 것을 특징으로 하는 항체-활성제 접합체.

청구항 6

제1항에 있어서,

상기 이소프레노이드 트랜스퍼라제는 FTase 또는 GGTase인 것을 특징으로 하는 항체-활성제 접합체.

청구항 7

삭제

청구항 8

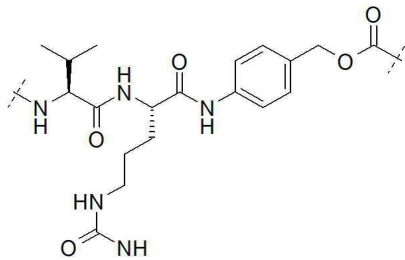
제1항에 있어서,

상기 링커는 카텡신 B에 의해 항체-활성제 접합체에서 탈리되어 활성제와 항체를 분리하여 활성제를 방출하도록 하는 펩티드 또는 β -글루쿠로니다제에 의해 항체-활성제 접합체에서 탈리되어 활성제와 항체를 분리하여 활성제를 방출하도록 하는 글루쿠로니다스를 포함하는 것을 특징으로 하는 항체-활성제 접합체.

청구항 9

제 8항에 있어서,

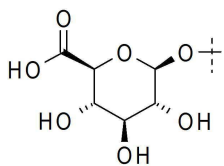
상기 카텡신 B에 의해 항체-활성제 접합체에서 탈리되어 활성제와 항체를 분리하여 활성제를 방출하도록 하는 펩티드는 하기 화학식을 갖는 것을 특징으로 하는 항체-활성제 접합체.



청구항 10

제 8항에 있어서,

상기 β -글루쿠로니다제에 의해 항체-활성제 접합체에서 탈리되어 활성제와 항체를 분리하여 활성제를 방출하도록 하는 글루쿠로니다스는 하기 화학식을 갖는 것을 특징으로 하는 항체-활성제 접합체.



청구항 11

제1항에 있어서,

상기 접합체는 Herceptin-LC-G7CVIM-BG-MMAF(Herceptin - Light Chain - G₇CVIM - Beta Glucuronide linker - MonoMethyl Auristatin F), Herceptin-LC-G7CVIM-VC-MMAF-OMe(Herceptin - Light Chain - G₇CVIM - Valine Citrulline linker - MonoMethyl Auristatin F - O Methyl) 및 Herceptin-LC-G7CVIM- BG-MMAE(Herceptin - Light Chain - G₇CVIM - Beta Glucuronide - MonoMethyl Auristatin E)으로 이루어진 군으로부터 선택되는 것을 특징으로 하는 항체-활성제 접합체.

청구항 12

(a) 이소프레노이드 트랜스퍼라제에 의해 인식될 수 있으며, C, CAAX, XXCC, XCXC 또는 CXX로, 상기 C

는 시스테인, A는 지방족 아미노산, X는 이소프레노이드 트랜스퍼라제의 기질적 특이성을 결정하는 아미노산인 아미노산 모티프를 가지는 항체를 발현시키는 단계로 하기 조건을 추가로 만족시키는 단계;

i) 항체에서 하나 또는 둘의 경쇄, 하나 또는 둘의 중쇄, 또는 그 조합이 직간접적으로 아미노산을 포함하는 스페이서(spacer)를 통해 아미노산 모티프에 연결되며;

(b) 제1 관능 그룹(FG1)을 갖는 이소프레노이드와 발현된 단백질을 이소프레노이드 트랜스퍼라제를 사용하여 효소적으로 프레닐화하여 관능화된 항체를 생성하는 단계로 하기 조건을 추가로 만족시키는 단계;

iii) 상기 관능화된 항체는 이소프레노이드를 통해 FG1에 연결되며;

iv) 상기 FG1은 아세틸렌, 아지드, 알데히드, 히드록실아민, 히드라진, 케톤, 니트로벤조퓨란(NBD), 단 실, 플루오레신, 바이오틴 및 로다민으로부터 선택되며;

(c) 제2 관능 그룹(FG2)이 면역조절 화합물, 항암제, 항바이러스제, 항박테리아제, 항진균제, 구충제 및 그 조합을 포함하는 활성제에 결합된, 관능화된 활성제를 생성하는 단계로 하기 조건을 추가로 만족시키는 단계;

v) FG2는 아세틸렌, 히드록실아민, 아지드, 알데히드, 히드라진, 케톤 및 아민으로부터 선택되며;

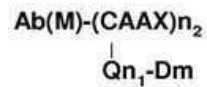
(d) 관능화된 항체의 FG1을 관능화된 활성제의 FG2와 반응시켜 항체-활성제 접합체를 생성하는 단계로 하기 조건을 추가로 만족시키는 단계;

vi) FG2는 하기 링커에 의해 활성제에 연결되며;

vii) FG2는 FG1과 커플링되는 그룹으로부터 선택되며, FG1은 FG2와 반응하여 항체-활성제 접합체를 형성한다;

를 포함하는 하기 [화학식 II]의 형태인 항체-활성제 접합체의 제조방법.

[화학식 II]



Ab(M)은 항체 또는 상기 항체의 일부인 단편이며;

Q는 제1 관능 그룹(FG1)을 포함하며 항체와 하기 활성제를 연결하는 링커이며;

n_1 및 n_2 는 독립적으로 1 내지 4의 정수이며;

m은 1 내지 16의 정수이며;

Dm은 활성제이고, 상기 활성제는 면역조절 화합물, 항암제, 항바이러스제, 항박테리아제, 항진균제, 구충제 및 그 조합을 포함한다.

청구항 13

제12항에 있어서,

상기 스페이서는 G, G₅, G₇ 또는 G₁₀인 것을 특징으로 하는 항체-활성제 접합체의 제조방법.

청구항 14

제12항에 있어서,

상기 CAAX의 X는 메티오닌인 것을 특징으로 하는 항체-활성제 접합체의 제조방법.

청구항 15

제12항에 있어서,

상기 아미노산 모티프가 항체의 카복시 말단에 존재하는 항체-활성제 접합체의 제조방법.

청구항 16

제12항에 있어서,

상기 관능화 항체와 관능화 활성제 사이의 반응이 클릭 화학 반응; 또는 하이dra존 형성, 옥심 형성 또는 그 조합;인 항체-활성제 접합체의 제조방법.

청구항 17

제16항에 있어서,

상기 FG1이 아지드 그룹이고 상기 FG2가 아세틸렌 그룹이거나, 상기 FG1이 아세틸렌 그룹이고 상기 FG2가 아지드 그룹인 항체-활성제 접합체의 제조방법.

청구항 18

제16항에 있어서,

상기 FG1이 알데히드 또는 케톤 그룹이고 상기 FG2가 하이dra진 또는 하이드록실아민이거나, 상기 FG1이 하이dra진 또는 하이드록실아민이고 상기 FG2가 알데히드 또는 케톤인 항체-활성제 접합체의 제조방법.

청구항 19

(a) 이소프레노이드 트랜스퍼라제에 의하여 인식될 수 있으며, C, CAAX, XXCC, XCXC 또는 CXX로, 상기 C는 시스테인, A는 지방족 아미노산, X는 이소프레노이드 트랜스퍼라제의 기질적 특이성을 결정하는 아미노산인 아미노산 모티프를 갖는 항체를 발현시키는 단계로 하기 조건을 추가로 만족시키는 단계;

i) 항체에서 하나 또는 둘의 경쇄, 하나 또는 둘의 중쇄, 또는 그 조합이 직간접적으로 아미노산을 포함하는 스페이서(spacer)를 통해 아미노산 모티프에 연결되며;

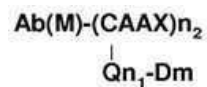
(b) 이소프레노이드 트랜스퍼라제를 이용하여 제1 관능 그룹(FG1)을 갖는 이소프레노이드를 면역조절 화합물, 항암제, 항바이러스제, 항박테리아제, 항진균제, 구충제 및 그 조합을 포함하는 활성제에 결합시키는 단계로 하기 조건을 추가로 만족시키는 단계;

iii) 상기 FG1은 아세틸렌, 아지드, 알데히드, 히드록실아민, 히드라진, 케톤, 니트로벤조퓨란(NBD), 단질, 플루오레신, 바이오틴 및 로다민으로부터 선택되며;

(c) 발현된 항체와 이소프레노이드에 결합된 활성제를 이소프레노이드 트랜스퍼라제를 이용하여 효소적으로 프레닐화하는 단계;

를 포함하는 하기 [화학식 II]의 형태인 항체-활성제 접합체의 제조방법.

[화학식 II]



Ab(M)은 항체 또는 상기 항체의 일부인 단편이며;

Q는 제1 관능 그룹(FG1)을 포함하며 항체와 하기 활성제를 연결하는 링커이며;

n_1 및 n_2 는 독립적으로 1 내지 4의 정수이며;

m은 1 내지 16의 정수이며;

Dm은 활성제이고, 상기 활성제는 면역조절 화합물, 항암제, 항바이러스제, 항박테리아제, 항진균제, 구충제 및 그 조합을 포함한다.

청구항 20

제19항에 있어서,

상기 스페이서는 G, G_5 , G_7 또는 G_{10} 인 것을 특징으로 하는 항체-활성제 접합체의 제조방법.

청구항 21

제19항에 있어서,

상기 CAAX의 X는 메티오닌인 것을 특징으로 하는 항체-활성제 접합체의 제조방법.

청구항 22

제19항에 있어서,

상기 아미노산 모티프가 항체의 카복시 말단에 존재하는 항체-활성제 접합체의 제조방법.

청구항 23

제1항, 제3항 내지 제6항 및 제8항 내지 제11항 중의 어느 한 항에 따르는 항체-활성제 접합체를 포함하는 항암용 조성물.

청구항 24

제23항에 있어서,

상기 조성물은 항체-활성제 접합체의 균질 혼합물인 항암용 조성물.

청구항 25

제1항에 있어서,

상기 링커는 항체-활성제 접합체에서 탈리되지 않는 비탈리성 링커(non-cleavable linker)인 것을 특징으로 하는 항체-활성제 접합체.

청구항 26

삭제

청구항 27

삭제

청구항 28

삭제

청구항 29

삭제

청구항 30

삭제

청구항 31

삭제

청구항 32

삭제

청구항 33

삭제

청구항 34

삭제

청구항 35

삭제

청구항 36

삭제

청구항 37

삭제

청구항 38

삭제

청구항 39

삭제

청구항 40

삭제

발명의 설명

기술 분야

[0001] 관련 출원의 상호 참조

[0002] 본원은 2011년 5월 8일자로 출원된 미국 가출원 제61/483,698호의 우선권을 주장하며, 이의 내용은 전체적으로 참조로 본원에서 인용된다.

[0003] 본 발명은 단백질-활성제 접합체에 관한 것이다. 단백질(예: 올리고펩티드, 폴리펩티드, 항체 등)은 표적하는 표적에 대한 기질 특이성을 갖고, 활성제(예: 약물, 독소, 리간드, 검출용 탐침 등)는 특이적 기능 또는 활성을 갖는다. 본 발명은 또한 접합체의 제조 방법에 관한 것이다. 본 발명은 추가로 접합체를 사용하여 활성제를 피검체의 표적 세포로 전달하는 방법뿐만 아니라, 활성제를 필요로 하는 피검체(예: 암 환자)의 치료 방법에 관한 것이다.

배경 기술

[0004] 항암제의 표적화 전달에 의한 암 세포의 성장 억제 방법이 제안된 바 있다. 예를 들면, 항체-약물 접합체의 표적화 전달이 특정 암 세포를 파괴할 수 있다고 나타난 바 있다. 항체(또는 항체 단편)가 암 세포에 특이적으로 결합함에 따라, 약물이 표적 암 세포로 전달된다. 약물의 표적화 전달은 약물이 정상 숙주 세포 대신 표적 암 세포에 작용하도록 보장하여, 정상 세포에 대한 손상으로 인한 부작용을 최소화시킨다.

[0005] 항체 접합체는 화학 및/또는 생물 분자를 전달하는 데 사용할 수 있다. 예시적인 화학 및/또는 생물 분자는 화학 치료, 박테리아 단백질 독소(예: 디프테리아 독소), 식물 단백질 독소(예: 리신(ricin)), 소분자 독소(예: 아우리스타틴, 켈다나마이신, 마이탄시노이드, 칼리케아마이신, 다우노마이신, 메토틱렉세이트, 빈데신 및 투블리신), 친화성 리간드, 검출 탐침(예: 형광 탐침, 방사능 탐침) 등(이들의 조합 포함)에 통상적으로 사용되는 약물을 포함한다.

[0006] 이제까지 제안된 항체-약물 접합체는 약물 잔기(drug moiety)를 항체의 복수의 리신 그룹과 결합시켜 제조한다. 대안적으로는, 항체-약물 접합체는 항체의쇄간 디설파이드 그룹의 전부 또는 일부를 환원시키거나, 모든쇄간 디설파이드 그룹을 환원시킨 다음 부분 산화시켜 유리 시스테인 티올 그룹을 제공하고, 이어서 유리 시스테인 티올 그룹을 약물 잔기와 결합시켜 제조한다.

[0007] 그러나, 기존의 제조 방법에는 몇 가지 문제가 있다. 예를 들면, 전체의 제조 방법은, 기존의 제조 방법에 의하여 제조한 항체-약물 접합체가 균일(균질)하지 않기 때문에 복잡하다. 항체-약물 접합체가 약물 잔기를 리신

그룹과 결합시켜 제조되는 경우, 항체내 다수의 리신(lysine) 그룹(예: 항체당 100개의 리신 그룹)의 존재로 인하여 다양한 유형 및 형태의 항체-약물 접합체가 수득된다. 유사하게, 티올 그룹을 약물 잔기와 결합시켜 항체-약물 접합체를 제조하는 경우, 티올 그룹과 말레이미드 그룹 사이의 결합으로 인하여 부분입체이성체의 혼합물이 수득된다. 예를 들면, n개의 약물이 접합되는 경우, 2^n 개의 입체이성체의 혼합물이 수득된다. 따라서, 약

$$\sum_{n=0}^{n=8} 2^n$$

물 분포 수가 0-8인 경우(예: 쇠간 디설파이드 그룹이 환원되는 경우), $\sum_{n=0}^{n=8} 2^n$ 개의 입체이성체의 혼합물이 수득

$$\sum_{i=0}^i q C_i^i$$

된다. 또한, i개의 약물이 q개의 부위와 접합되는 경우, $\sum_{i=0}^i q C_i^i$ 개의 상이한 화합물의 혼합물이 수득된다.

[0008] 추가로, 리신 그룹을 약물 잔기와 결합시켜 항체-약물 접합체를 제조 시, 리신 그룹의 전기 전하가 손실되어, 항체가 이의 독특한 항원 특이성을 손실할 수 있다. 또한, 항체의 3원 또는 4원 구조는 디설파이드 그룹을 환원시켜 항체-약물 접합체를 제조 시 유지되지 않아 항체를 불활성화시키거나 비특이적 항체가 되도록 할 수 있다. 티올-말레이미드 결합을 사용하여 항체-약물 접합체를 제조 시, 약물은 예를 들면, 역반응을 통하여 접합체로부터 탈리될 수 있다(비특이적으로).

[0009] 기존의 제조 방법과 관련된 문제를 극복하기 위하여, 항체의 특정 위치의 아미노산 그룹이 시스테인 그룹으로 대체되는 대안적인 방법이 제안되었다. 당해 방법은 독성, 활성 및 안전성 측면에서 기존의 제조 방법보다 우수한 결과를 나타내지만, 여전히 티올-말레이미드 결합을 포함하고, 따라서 티올-말레이미드 결합과 관련된 부분입체이성체 및 불안정성 문제로 손해를 입는다. 셀레노시스테인 그룹이 항체의 카복시 말단에 결합된 또 다른 대안적 방법이 제안되었다.

[0010] 시스테인 치환을 사용하여 접합체의 부위를 조절하는 이외에, 암브르스 테크놀로지(Ambrx Technology)(<http://www.ambrx.com>)에서 비-천연 아미노산을 항체에 혼입시켜 링커 화학에 사용될 수 있는 관능 그룹(functional group)을 제공하는 연구를 하였다. 암브르스의 발현 시스템은 원 tRNA를 비-천연 아미노산으로 아미노아실화시키는 tRNA 신세테아제를 함유하여, 엠버 종결(amber stop)에 직면할 때마다 비-천연 아미노산을 삽입한다.

[0011] 레드우드 바이오사이언스(Redwood Bioscience) (<http://www.redwoodbioscience.com>)의 기술은 유전적으로 인코딩된 알데히드 태그를 사용하고, 후해독적으로 인식되고 효소, 즉 포르밀 글리신 발생 효소에 의해 변형되는 특이적 서열을 이용하려는 것을 목적으로 하여, 이른바 알데히드 화학적 취급을 생성하는 것이다. 항체 내 특이적 위치에서의 CxPxR 서열의 혼입은 약물 접합에 순응하는 반응성 알데히드를 생성하는 수단을 제공한다.

[0012] 그러나, 항체-약물 접합체의 제조에 대한 당해 기술분야의 위에서 언급한 문제를 고려하면, 신규한 항체-약물 접합체 및 항체-약물 접합체의 신규한 제조 방법이 매우 바람직하다.

[0013] 당해 배경 부문에 기재된 위의 정보는 본 발명의 배경의 이해 증진을 위한 것일 뿐이며, 따라서 당업자에게 이미 공지된 선행 기술을 형성하지 않는 정보를 함유할 수 있다.

발명의 내용

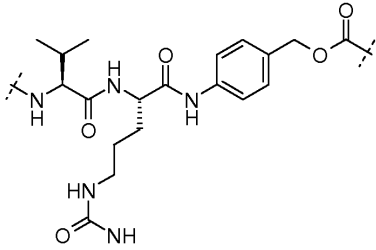
[0014] 아래에 기재된 바와 같이, 본 발명은 일반적으로 단백질-활성제 접합체 및 단백질-활성제 접합체의 제조 방법을 특징으로 한다. 본 발명은 또한, 단백질-활성제 접합체를 피검체의 표적 세포로 전달하는 방법뿐만 아니라, 활성제를 필요로 하는 피검체의 치료 방법을 특징으로 한다. 본 발명의 단백질-활성제 접합체는 균질하게 생성되고 질환의 표적 치료에 유리하게 사용될 수 있다.

[0015] 측면에서, 본 발명은 단백질-활성제 접합체를 제공한다. 양태에서, 단백질은 이소프레노이드 트랜스퍼라제에 의하여 인식될 수 있는 아미노산 모티프를 갖는다. 양태에서, 활성제는 아미노산 모티프에서 단백질에 공유 결합된다.

[0016] 양태에서, 단백질은 단백질의 카복시 말단에서 결실(deletion)을 갖는다. 관련 양태에서, 변형이 아미노산 모티프에 결합된다.

[0017] 양태에서, 단백질은 단백질의 카복시 말단에 올리고펩티드 또는 폴리펩티드 부가를 갖는다. 관련 양태에서, 변형이 아미노산 모티프에 결합된다.

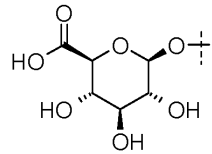
[0038] [화학식 III]



[0039]

[0040] 양태에서, β -글루쿠로니다제에 의하여 탈리될 수 있는 글루쿠로나이드는 화학식 IV의 화합물이다.

[0041] [화학식 IV]



[0042]

[0043] 측면에서, 본 발명은 본원에 기재된 단백질-활성제 접합체 중의 어느 것이라도 제조하는 방법을 제공한다. 양태에서, 당해 방법은 이소프레노이드 트랜스퍼라제에 의하여 인식될 수 있는 아미노산 모티프를 갖는 단백질을 발현시킴을 포함한다. 양태에서, 당해 방법은 이소프레노이드 트랜스퍼라제로, 발현된 단백질과 제1 관능 그룹(FG1)을 갖는 하나 이상의 이소기질(isosubstrate)을 효소적으로 반응시켜, 관능화 단백질을 생성함을 포함한다. 양태에서, 당해 방법은 제2 관능 그룹(FG2)을 활성제에 결합시켜, 관능화 활성제를 생성함을 포함한다. 양태에서, 당해 방법은 관능화 단백질을 관능화 활성제와 반응시켜, 단백질-활성제 접합체를 생성함을 포함한다.

[0044] 관련 양태에서, 아미노산 모티프는 단백질의 카복시 말단에 존재한다.

[0045] 관련 양태에서, 아미노산 모티프는 CAAX, XXCC, XCXC 또는 CXX(여기서, C는 시스테인이고, A는 지방족 아미노산이고, X는 이소프레노이드 트랜스퍼라제의 기질 특이성을 결정하는 아미노산이다)이다.

[0046] 관련 양태에서, 아미노산 모티프는 CAAX이고, 여기서 당해 방법은 단계(b) 이후 아미노산 모티프로부터 AAX를 제거함을 추가로 포함한다.

[0047] 관련 양태에서, FG2는 하나 이상의 링커에 의하여 활성제에 결합된다.

[0048] 관련 양태에서, 관능화 단백질과 관능화 활성제 사이의 반응은 클릭 화학 반응 또는 하이dra존 및/또는 옥심 형성이다. 양태에서, FG1은 아지드 그룹이고, FG2는 아세틸렌 그룹이다. 양태에서, FG1은 아세틸렌 그룹이고, FG2는 아지드 그룹이다. 양태에서, FG1은 알데히드 또는 케톤 그룹이고, FG2는 하이dra진 또는 하이드록실아민이다. 양태에서, FG1은 하이dra진 또는 하이드록실아민이고, FG2는 알데히드 또는 케톤이다.

[0049] 측면에서, 본 발명은 본원에 기재된 단백질-활성제 접합체 중의 어느 것이라도 제조하는 방법을 제공하고, 당해 방법은 이소프레노이드 트랜스퍼라제에 의하여 인식될 수 있는 아미노산 모티프를 갖는 단백질을 발현시킴을 포함한다. 양태에서, 당해 방법은 이소프레노이드 트랜스퍼라제의 이소기질을 활성제에 결합시킴을 포함한다. 양태에서, 당해 방법은 이소프레노이드 트랜스퍼라제로, 발현된 단백질과 이소기질에 결합된 활성제를 효소적으로 반응시킴을 포함한다.

[0050] 관련 양태에서, 아미노산 모티프는 단백질의 카복시 말단에 존재한다.

[0051] 관련 양태에서, 아미노산 모티프는 CAAX, XXCC, XCXC 또는 CXX(여기서, C는 시스테인이고, A는 지방족 아미노산이고, X는 이소프레노이드 트랜스퍼라제의 기질 특이성을 결정하는 아미노산이다)이다.

[0052] 관련 양태에서, 이소기질은 하나 이상의 링커에 의하여 활성제에 결합된다.

[0053] 측면에서, 본 발명은 본원에 기재된 단백질-활성제 접합체 중의 어느 것이라도 함유하는 조성물을 제공한다. 양태에서, 당해 조성물은 단백질-활성제 접합체의 균질 혼합물이다. 양태에서, 단백질은 항체 또는 항원 폴리펩티드의 단편이다.

[0054] 측면에서, 본 발명은 활성제를 피검체의 표적 세포에 전달하는 방법을 제공한다. 양태에서, 당해 방법은 본원에 기재된 하나 이상의 단백질-활성제 접합체 또는 조성물을 투여함을 포함한다. 양태에서, 표적 세포는 암 세포이다. 양태에서, 표적 세포는 병원세포를 포함하는 세포이다. 양태에서, 병원체는 바이러스, 박테리아, 진균 또는 기생충일 수 있다.

[0055] 측면에서, 본 발명은 이를 필요로 하는(즉, 활성제를 필요로 하는) 피검체의 치료 방법을 제공한다. 양태에서, 당해 방법은 본원에 기재된 하나 이상의 단백질-활성제 접합체 또는 조성물을 투여함을 포함한다. 양태에서, 피검체는 암을 앓는다. 양태에서, 피검체는 병원체로 감염되어 있다. 병원체는 바이러스, 박테리아, 진균 또는 기생충일 수 있다.

[0056] 위에서 기재된 단백질-활성제 접합체, 조성물 및 방법에서, 일부 양태에서는, 활성제는 면역조절 화합물, 항암제, 항바이러스제, 항박테리아제, 항진균제 또는 구충제일 수 있다.

[0057] 본 발명의 위의 측면 및 기타 측면, 특징 및 이점은 첨부한 도면으로부터 명확해지거나 이에 보다 상세히 설명되어 있으며, 당해 도면은 본 명세서 및 다음의 상세한 설명의 일부에 포함되거나 이를 형성하고, 이들은 함께 본 발명의 원리를 예로 들어 설명하는 역할을 한다.

도면의 간단한 설명

[0058] 도 1은 허셉틴의 중쇄의 C-말단에 GCVIM을 삽입하여 제조한 변형된 허셉틴 항체(허셉틴-HC-GCVIM)의 아미노산 서열을 나타낸다.

도 2는 허셉틴의 경쇄의 C-말단에 GCVIM을 삽입하여 제조한 변형된 허셉틴 항체(허셉틴-LC-GCVIM)의 아미노산 서열을 나타낸다.

도 3은 허셉틴의 중쇄의 C-말단에 G₅CVIM을 삽입하여 제조한 변형된 허셉틴 항체(허셉틴-HC-G₅CVIM)의 아미노산 서열을 나타낸다.

도 4는 허셉틴의 경쇄의 C-말단에 G₅CVIM을 삽입하여 제조한 변형된 허셉틴 항체(허셉틴-LC-G₅CVIM)의 아미노산 서열을 나타낸다.

도 5는 허셉틴의 중쇄의 C-말단에 G₇CVIM을 삽입하여 제조한 변형된 허셉틴 항체(허셉틴-HC-G₇CVIM)의 아미노산 서열을 나타낸다.

도 6은 허셉틴의 경쇄의 C-말단에 G₇CVIM을 삽입하여 제조한 변형된 허셉틴 항체(허셉틴-LC-G₇CVIM)의 아미노산 서열을 나타낸다.

도 7은 허셉틴의 중쇄의 C-말단에 G₁₀CVIM을 삽입하여 제조한 변형된 허셉틴 항체(허셉틴-HC-G₁₀CVIM)의 아미노산 서열을 나타낸다.

도 8은 허셉틴의 경쇄의 C-말단에 G₁₀CVIM을 삽입하여 제조한 변형된 허셉틴 항체(허셉틴-LC-G₁₀CVIM)의 아미노산 서열을 나타낸다.

도 9는 허셉틴의 중쇄의 C-말단에 G₁₀CVLL을 삽입하여 제조한 변형된 허셉틴 항체(허셉틴-HC-G₁₀CVLL)의 아미노산 서열을 나타낸다.

도 10은 허셉틴의 경쇄의 C-말단에 G₁₀CVLL을 삽입하여 제조한 변형된 허셉틴 항체(허셉틴-LC-G₁₀CVLL)의 아미노산 서열을 나타낸다.

도 11은 항 cMET 항체의 중쇄의 C-말단에 G₇CVIM을 삽입하여 제조한 변형된 항 cMET 항체(항 cMET-HC-G₇CVIM), 항 cMET 항체의 경쇄의 C-말단에 G₇CVIM을 삽입하여 제조한 변형된 항 cMET 항체(항 cMET-LC-G₇CVIM), 항 cMET 항체의 중쇄의 C-말단에 G₁₀CVIM을 삽입하여 제조한 변형된 항 cMET 항체(항 cMET-HC-G₁₀CVIM), 및 항 cMET 항체의 경쇄의 C-말단에 G₁₀CVIM을 삽입하여 제조한 변형된 항 cMET 항체(항 cMET-LC-G₁₀CVIM)를 분석한 SDS-PAGE 겔을 나타낸다.

도 12는 FTase 및 NBD-GPP를 사용하여 허셉틴-HC-G_nCVIM의 프레닐화를 분석하는 SDS-PAGE 겔을 나타낸다.

- 도 13은 FTase 및 NBD-GPP를 사용하여 허셉틴-LC-G_nCVIM의 프레닐화를 분석하는 SDS-PAGE 겔을 나타낸다.
- 도 14는 FTase 및 NBD-GPP를 사용하여 cMET-HC-G_nCVIM의 프레닐화를 분석하는 SDS-PAGE 겔을 나타낸다.
- 도 15는 FTase 및 NBD-GPP를 사용하여 cMET-LC-G_nCVIM의 프레닐화를 분석하는 SDS-PAGE 겔을 나타낸다.
- 도 16은 FTase/NBD-GPP 또는 GGTase I/NBD-FPP를 사용하여 허셉틴-HC-G₁₀CVLL 및 허셉틴-LC-G₁₀CVLL의 프레닐화를 분석하는 SDS-PAGE 겔을 나타낸다.
- 도 17은 프레닐화 허셉틴-LC-G₇CVIM의 LC/MS 분석으로부터의 결과를 나타낸다.
- 도 18은 프레닐화 허셉틴-LC-G₁₀CVIM의 LC/MS 분석으로부터의 결과를 나타낸다.
- 도 19는 LCB14-0104(허셉틴-LC-G₇CVIM-NC-MMAF-Ome)의 LC/MS 및 역컨볼루션화(deconvoluted) 질량 스펙트럼 분석으로부터의 결과를 나타낸다.
- 도 20은 허셉틴-LC-G₇CVIM, 프레닐화 허셉틴-LC-G₇CVIM 및 LCB14-0101(허셉틴-LC-G₇CVIM-BG-MMAF)의 HIC-HPLC 크로마토그램을 나타낸다.
- 도 21은 유방암 세포주 MCF-7, MDA-MB-468 및 SK-BR-3을 사용한 LCB14-0101(허셉틴-LC-G₇CVIM-BG-MMAF)의 항-증식 검정으로부터의 결과를 나타낸다.
- 도 22는 유방암 세포주 MCF-7 및 SK-BR-3을 사용한 LCB14-0102(허셉틴-LC-G₇CVIM-VC-MMAF-OMe)의 항-증식 검정으로부터의 결과를 나타낸다.
- 도 23은 유방암 세포주 MCF-7 및 SK-BR-3을 사용한 LCB14-0103(허셉틴-LC-G₇CVIM-BG-MMAE)의 항-증식 검정으로부터의 결과를 나타낸다.
- 도 24는 단백질(C-말단 CVIM)의 후해독 변형의 과정을 나타낸다.
- 도 25는 활성 약물의 방출 메카니즘(비-탈리성 링커 제외)을 나타낸다.
- 도 26은 항체-약물 접합체 LCB14-0101, LCB14-0102, LCB14-0103 및 LCB14-0104의 화학 구조를 나타낸다.
- 도 27은 이소프레노이드 트랜스퍼라제 및 CAAX 모티프의 시스템이 알킬화된 이의 이소기질을 사용하여 단백질-활성제 접합체를 제조하는 방법을 나타내는 도식적 다이어그램이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0059] 이제, 본 발명의 양태를 보다 상세히 언급하고, 이의 예는 아래에 첨부된 도면에 설명하며, 도면에서 유사한 참조 번호는 유사한 요소를 나타낸다. 양태를 아래에 기재하여 도면을 참조하여 본 발명을 설명하도록 한다.
- [0060] 정의
- [0061] "제제" 또는 "활성제"란, 어떠한 소분자 화학적 화합물, 항체, 핵산 분자 또는 폴리펩티드 또는 이들의 단편이라도 의미한다. 예는, 이들로 제한되지는 않지만, 약물, 독소, 친화성 리간드, 검출 탐침 또는 이들의 조합을 포함한다.
- [0062] "유사체"란, 동일하지 않지만 유사한 기능 또는 구조적 특징을 갖는 분자를 의미한다. 예를 들면, 폴리펩티드 유사체는 상응하는 천연 폴리펩티드의 생물 활성을 보유하는 한편, 천연 폴리펩티드에 대한 유사체의 기능을 강화시키는 특정한 생화학적 변형을 갖는다. 이러한 생화학적 변형은 예를 들면, 리간드 결합성을 변경시키지 않고, 유사체의 프로테아제 저항, 막 투과성 또는 반감기를 증가시킬 수 있다. 유사체는 비천연 아미노산을 포함할 수 있다.
- [0063] 당해 기재 내용에서, "포함하다(comprise)", "포함하는", "함유하는" 및 "갖는" 등은 미국 특허법에서 이들에 부여된 의미를 가질 수 있고, "포함하다(include)", "포함하는" 등을 의미할 수 있고; "본질적으로 ...로 이루어진" 또는 "본질적으로 ...로 이루어지다" 또한 미국 특허법에서 부여된 의미를 갖고, 용어는 개방적이어서, 기재된 것의 기본적 또는 신규한 특징이 기재된 것 이상의 존재에 의하여 변경되지 않는 한 기재된 것 이상의 존재를 허용하지만, 선행 기술의 양태는 제외시킨다.

- [0064] "세포를 접촉시킴"은 본원에서 제제를 세포, 예를 들면, 배양물 중에서, 생체 외에서 또는 동물에서 치료되는 세포에 제공하여, 제제가 세포(예: 치료되는 세포)와 상호 작용하고, 잠재적으로 세포에 의하여 흡수되고, 세포에 영향을 미칠 수 있도록 하는 것으로 이해한다.
- [0065] 제제(예: 보조제)는 세포에 직접(예: 제제를 배양 매질에 가하거나 관심 있는 세포 또는 조직으로 주입하여), 또는 혈관, 림프 또는 기타 수단에 의하여 세포에 전달하기 위한 경구 또는 비경구 투여 경로에 의한 유기체로의 전달에 의하여 전달될 수 있다. 당업자는 본 발명의 단백질-활성제 접합체를 피검체에 투여하는 것은 단백질-활성제 접합체를 피검체의 세포와 접촉시킴을 포함한다는 것을 즉시 이해할 것이다.
- [0066] "질환"이란, 세포, 조직 또는 기관의 정상적 기능을 손상시키거나 방해하는 어떠한 상태 또는 장애라도 의미한다.
- [0067] 용어 "유효량", "치료학적 유효량", "유효 용량" 또는 "치료학적 유효 용량"이란, 의도하는 약리학적, 치료학적 또는 예방적 결과를 생성하는 제제의 양을 말한다. 예를 들면, 약리학적 유효량은 개별적으로 또는 개체수의 질환 빈도수로, 질환의 예방 또는 개시 지연을 발생시킨다. 1용량 이상이 유효 용량을 제공하는 데 필요할 수 있다. 한 개체수의 유효 용량은 모든 개체수에 충분하거나 충분하지 않을 수 있음을 이해한다. 따라서, 제제 또는 면역발생 조성물의 투여와 관련하여, 제제 또는 면역발생 조성물은 임상적으로 적합한 방식으로 투여하여 적어도 통계학적으로 상당한 비율의 피검체에 유리한 효과, 예를 들면, 질환 개시의 예방, 증상의 개선, 치료, 질환 징후 또는 증상의 감소, 수명 연장, 삶의 질 개선 또는 특정 유형의 질환 또는 상태의 치료에 친숙한 의사에 의하여 일반적으로 긍정적으로 인식된 기타 효과를 발생시키는 경우 질환 또는 상태"에 대하여 유효"하다.
- [0068] "강화"란, 적어도 10%, 25%, 50%, 75%, 100%, 또는 그 사이의 임의의 수의 양의 교체를 의미한다.
- [0069] "단편"이란, 폴리펩티드 또는 핵산 분자의 부분을 의미한다. 이러한 부분은 바람직하게는 참조 핵산 분자 또는 폴리펩티드의 전체 길이의 적어도 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80% 또는 90%를 함유한다. 단편은 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 또는 100, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900 또는 1000개의 뉴클레오티드 또는 아미노산을 함유할 수 있다.
- [0070] "하이브리드화"란, 상보적 뉴클레오티드 염기 사이의 왓슨-크릭(Watson-Crick), 후그스틴(Hoogsteen) 또는 역 후그스틴 수소 결합일 수 있는, 수소 결합을 의미한다. 예를 들면, 아데닌 및 티민은 수소 결합의 형성을 통해 쌍을 이루는 상보적 뉴클레오티드 염기이다.
- [0071] "수득"은 본원에서 제조, 구입, 합성, 분리, 정제 또는 그 밖의 소유되는 것으로 이해한다.
- [0072] "약제학적으로 허용되는 담체, 부형제 또는 희석제"라는 구문은 당해 기술분야에 인식되어 있으며, 본 발명의 화합물을 포유동물에게 투여하기에 적합한, 약제학적으로 허용되는 물질, 조성물 또는 비히클을 포함한다. 본원에서 사용된 바와 같이, 용어 "약제학적으로 허용되는"이란, 포유동물, 예를 들면, 사람에게 사용하는 데 대하여 연방 또는 주 정부의 감독 기관에 의하여 승인되거나 미국 약전, 유럽 약전 또는 기타 일반적으로 인정된 약전에 열거되어 있음을 의미한다.
- [0073] "감소"란, 적어도 10%, 25%, 50%, 75%, 100%, 또는 그 사이의 임의의 수의 음성적 변경을 의미한다.
- [0074] "참조"란, 표준 또는 대조 상태를 의미한다.
- [0075] 본원에서 사용된 바와 같은 "샘플"은 이의 환경으로부터 분리된 생물학적 물질(예: 동물로부터의 혈액 또는 조직, 세포 또는 조직 배양물로부터의 컨디셔닝된 배지)을 말한다. 양태에서, 샘플은 관심 있는 단백질(예: 항체, 시토카인 등)과 같은, 분석물을 함유하는 것으로 보이거나, 함유하는 것으로 공지된다. 샘플은 또한 조직 또는 체액의 부분 정제 부분일 수도 있다. 참조 샘플은 질환 또는 상태 유체를 갖지 않는 공여자로부터 또는 질환 또는 상태를 갖는 피검체 또는 치료되지 않은 피검체(예: 백신으로 치료되지 않은 피검체)의 정상 조직으로부터의, "정상" 샘플일 수 있다. 참조 샘플은 또한 세포 또는 피검체를 치료되는 제제 또는 치료상 개입과 접촉시키기 전에 "0 시점"에서 채취할 수도 있다.
- [0076] "특이적으로 결합"이란, 표적(예: 폴리펩티드, 세포 등)에 대한 인식 및 결합을 의미하지만, 실질적으로 샘플, 예를 들면, 생물학적 샘플의 기타 분자를 인식하고 결합하지는 않는다.
- [0077] 본원에서 사용된 바와 같은 "피검체"란, 살아 있는 유기체를 말한다. 양태에서, 살아 있는 유기체는 동물이다. 양태에서, 피검체는 포유동물이다. 양태에서, 피검체는 포유동물 가축 또는 사람이 아닌 영장류를 포함하는 영장류이다. 피검체의 예는, 이들로 제한되지는 않지만, 사람, 원숭이, 개, 고양이, 마우스, 래트, 소, 말,

돼지, 염소, 양 및 새를 포함한다. 피검체는 또한 환자를 말하기도 한다.

[0078] 특정 질환, 상태 또는 증후군으로 "고통받거나 고통받는다"고 의심되는 피검체는 합법적인 개인이 피검체가 질환, 상태 또는 증후군으로 고통받는다"고 진단하거나 의심할 정도로 충분한 수의 위험 인자를 갖거나 충분한 수의 질환, 상태 또는 증후군의 징후 또는 증상 또는 이들의 조합을 나타낸다. 질환 또는 상태로 고통받거나 고통받는다"고 의심되는 피검체의 확인 방법은 당업자의 능력 내에 있다. 특정 질환, 상태 또는 증후군으로 고통받거나 고통받는다"고 의심되는 피검체는 반드시 두 개의 별개 그룹은 아니다. 당업자는 또한 활성제를 필요로 하는 피검체가 특정 질환, 상태 또는 증후군으로 고통받거나 고통받는다"고 의심될 수도 있음을 즉시 이해할 것이다.

[0079] 본원에서 사용된 바와 같이, 용어 "치료하다", "치료하는", "치료" 등은 장애 및/또는 이와 관련된 증상(예: 암 또는 암 관련 증상)을 감소시키거나 개선시킴을 말한다. 완전히 배제되지는 않지만, 장애 또는 상태를 치료하는 데 장애, 상태 또는 이와 관련된 증상이 완전히 제거되는 것을 필요로 하지 않음이 인정된다.

[0080] 본원에서 제공된 범위는 범위 내의 모든 값에 대해 약기한 것으로 이해한다. 예를 들면, 1 내지 50의 범위는 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49 또는 50으로 이루어진 그룹으로부터의 임의 수, 수의 조합 또는 하위 범위를 포함하는 것으로 이해한다.

[0081] 본원에서 사용된 바와 같이, 문맥으로부터 명시적으로 기술되거나 명백하지 않는 한, 용어 "또는"은 포괄적인 것으로 이해한다.

[0082] 본원에서 사용된 바와 같이, 문맥으로부터 명시적으로 기술되거나 명백하지 않는 한, 관사("a", "an" 및 "the")는 단수 또는 복수인 것으로 이해한다.

[0083] 본원에서 사용된 바와 같이, 문맥으로부터 명시적으로 기술되거나 명백하지 않는 한, 용어 "약"은 당해 기술 분야에서의 통상의 허용 범위 내, 예를 들면, 평균의 2 표준 편차 내인 것으로 이해한다. 약은 기술된 값의 10%, 9%, 8%, 7%, 6%, 5%, 4%, 3%, 2%, 1%, 0.5%, 0.1%, 0.05% 또는 0.01% 내인 것으로 이해할 수 있다. 문맥으로부터 명확하지 않는 한, 본원에서 제공된 모든 수치 값은 용어 약으로 변경될 수 있다.

[0084] 본원에서 변수에 대한 어떠한 정의에서의 화학 그룹의 목록 열거는 어떠한 단일 그룹 또는 열거된 그룹의 조합으로서의 변수의 정의를 포함한다. 본원에서 변수 또는 측면에 대한 양태의 열거는 어떠한 단일 양태로서의 또는 어떠한 기타 양태 또는 이의 부분과 결합한 양태를 포함한다.

[0085] 본원에 제공된 어떠한 조성물 또는 방법이라도 본원에 제공된 기타 조성물 및 방법 중의 어느 하나 이상과 결합할 수 있다.

[0086] **1. 단백질-활성제 접합체의 제조 방법**

[0087] 본 발명의 단백질-활성제 접합체의 제조 방법 및 이의 변형방법은 본원의 기재 내용을 기반으로 하여 당업자에게 즉시 명백하다. 아래에 예시적인 방법이 제공되어 있으며, 이는 예시를 위하여 제공된 것이고, 본 발명을 제한하려는 것이 아니다.

[0088] 양태 1

[0089] 본 발명의 양태에 따르는 단백질-활성제 접합체의 제조 방법은, (a) 이소프레노이드 트랜스퍼라제에 의하여 인식될 수 있는 아미노산 모티프를 갖는 단백질을 발현시키고, (b) 이소프레노이드 트랜스퍼라제를 사용하여, 발현된 단백질과 제1 관능 그룹(FG1)을 갖는 하나 이상의 이소기질을 효소적으로 반응시켜 관능화 단백질을 생성하고, (c) 제2 관능 그룹(FG2)을 활성제에 결합시켜 관능화 활성제를 생성하고, (d) 관능화 단백질을 관능화 활성제와 반응시켜 단백질-활성제 접합체를 생성함을 포함한다.

[0090] 본원에서 사용된 용어 "단백질"은 공유 결합(예: 펩티드 결합)에 의하여 접합된 2개 이상의 독립적으로 선택된 천연 또는 비-천연 아미노산으로서 이해한다. 펩티드는 펩티드 결합에 의해 접합된 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20개 또는 그 이상의 천연 또는 비-천연 아미노산을 포함할 수 있다. 본원에 기재된 바와 같은 폴리펩티드는 전장 단백질(예: 전 가공된 단백질)뿐만 아니라 보다 짧은 아미

노산 서열(예: 천연 단백질의 단편 또는 합성 폴리펩티드 단편)을 포함한다.

- [0091] 단백질은 하나 이상의 C-말단 및 하나 이상의 N-말단을 함유하는 올리고펩티드 또는 폴리펩티드를 말한다. 당해 용어는 본원에서 원형 올리고펩티드 또는 폴리펩티드, 이의 변형된 형태, 이의 단편 및 이의 유사체를 포함하는 데 사용된다. 예를 들면, 당해 용어는 올리고펩티드 또는 폴리펩티드, 또는 이소프레노이드 트랜스퍼라제에 의하여 인식될 수 있는 아미노산 서열을 여기에 결합시켜 변형된 올리고펩티드 또는 폴리펩티드를 나타낼 수 있다. 본원에서 사용된 용어 "단편"은 올리고펩티드 또는 폴리펩티드로 이루어진 아미노산 서열의 부분을 말한다. 당해 용어는 올리고펩티드 또는 폴리펩티드의 기질 특이성을 갖는 아미노산 서열의 부분을 포함하는 데 사용된다. 용어 "유사체"는 참조 올리고펩티드 또는 폴리펩티드와 서열 동일성(sequence identity)이 70% 또는 75% 이상, 80% 또는 85% 이상, 90%, 91%, 92%, 93%, 94% 또는 95% 이상, 또는 96%, 97%, 98% 또는 99% 이상인 올리고펩티드 또는 폴리펩티드를 말한다.
- [0092] 본원에서 사용된 용어 "단백질"은 또한 항체, 항원성 폴리펩티드의 단편, 또는 이의 유사체 또는 유도체를 포함한다. 용어 "항체"는 면역글로불린 분자의 가변부 내의 하나 이상의 항원 인식 부위를 통하여 표적, 예를 들면, 단백질, 폴리펩티드, 펩티드, 탄수화물, 폴리뉴클레오티드, 지질 또는 이들의 조합을 인식하고 이에 특이적으로 결합하는 면역글로불린 분자를 의미한다. 본원에서 사용된 바와 같이, 용어 "항체"는, 항체가 목적하는 생물학적 활성을 나타내는 한, 원형 다클론 항체, 원형 단일클론 항체, 항체 단편(예: Fab, Fab', F(ab')₂, Fd 및 Fv 단편), 단쇄 Fv(scFv) 돌연변이, 다중특이 항체, 예를 들면, 2개 이상의 원형 항체로부터 발생된 이중특이 항체, 키메라 항체, 인간화 항체, 인간 항체, 항체의 항원 결정 부분을 포함하는 융합 단백질 및 항원 인식 부위를 포함하는 기타 변형된 면역글로불린 분자를 포함한다. 항체는 면역글로불린의 어떠한 5가지 주요 분류라도 가질 수 있다: 각각 알파, 델타, 엡실론, 감마 및 뮤라고 나타내는 이의 중쇄 지속적 도메인의 동일성을 기준으로 하여, IgA, IgD, IgE, IgG 및 IgM, 또는 이들의 하위분류(동종형)(예: IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1 and IgA2). 상이한 분류의 면역글로불린은 상이하고 익히 공지된 아단위(subunit) 구조 및 3차원 형태를 갖는다.
- [0093] 용어 "항체 단편"은 원형 항체의 부분을 나타내고, 원형 항체의 항원 결정 가변부를 나타낸다. 항체 단편의 예는, 이들로 제한되지는 않지만, Fab, Fab', F(ab')₂, Fd 및 Fv 단편, 선형 항체, 단쇄 항체 및 항체 단편으로부터 형성된 다중특이성 항체를 포함한다.
- [0094] "단일클론 항체"는 단일 항원 결정자 또는 에피토프의 매우 특이적 인식 및 결합에 수반되는 동종 항체 개체수를 말한다. 이는 통상적으로 상이한 항원 결정자를 향한 상이한 항체를 포함하는 다클론 항체와 대조적이다. 용어 "단일클론 항체"는 원형 및 전장 단일클론 항체 둘 다뿐만 아니라, 항체 단편(예: Fab, Fab', F(ab')₂, Fd, Fv), 단쇄(scFv) 돌연변이, 항체 부분을 포함하는 융합 단백질 및 항체 인식 부위를 포함하는 어떠한 기타 변형된 면역글로불린 분자라도 포함한다. 추가로, "단일클론 항체"는 이들로 제한되지는 않지만, 하이브리도마, 파지 선택, 재조합 발현 및 형질전환 동물을 포함하는 어떠한 수의 방식으로 제조된 이러한 항체를 말한다.
- [0095] 용어 "인간화 항체"는 특이성 면역글로불린 쇄, 키메라 면역글로불린 또는 최소의 비-인간(예: 뮤라인) 서열을 함유하는 이의 단편인 비-인간(예: 뮤라인) 항체의 형태를 말한다. 통상적으로, 인간화 항체는 상보적 결정부(CDR)로부터의 잔기가 목적하는 특이성, 친화도 및 가능성을 갖는 비-인간 종(예: 마우스, 래트, 래빗, 햄스터)의 CDR로부터의 잔기에 의하여 대체된 인간 면역글로불린이다(참조: Jones et al., 1986, Nature, 321:522-525; Riechmann et al., 1988, Nature, 332:323-327; Verhoeyen et al., 1988, Science, 239:1534-1536). 일부 예에서, 인간 면역글로불린의 Fv 프레임워크 부위(FR) 잔기는 목적하는 특이성, 친화도 및 가능성을 갖는 비-인간 종으로부터의 항체내 상응하는 잔기로 대체된다. 인간화 항체는 Fv 프레임워크 부위에서의 및/또는 대체된 비-인간 잔기 내의 추가의 잔기의 치환에 의하여 추가로 변형되어 항체 특이성, 친화도 및/또는 가능성을 개량하고 최적화시킬 수 있다. 일반적으로, 인간화 항체는 실질적으로 비-인간 면역글로불린에 상응하는 CDR 부위 전체 또는 실질적으로 전체를 함유하는 하나 이상, 통상적으로 2 또는 3개의 가변성 도메인 전체를 포함하는 반면, FR 부위 전체 또는 실질적으로 전체는 인간 면역글로불린 일치 서열을 갖는 것이다. 인간화 항체는 면역글로불린 일정 부위 또는 도메인(Fc), 통상적으로 인간 면역글로불린의 적어도 일부를 포함할 수도 있다. 인간화 항체를 발생시키는 데 사용되는 방법의 예는 미국 특허 제5,225,539호에 기재되어 있다.
- [0096] 용어 "인간 항체"는 사람에게 의하여 생성된 항체 또는 당해 기술분야에 공지된 어떠한 기술이라도 사용하여 제조된 사람에게 의하여 생성된 항체에 상응하는 아미노산 서열을 갖는 항체를 의미한다. 인간 항체의 이러한 정의는

원형 또는 전장 항체, 이의 단편 및/또는 예를 들면, 무라인 경쇄 및 인간 중쇄 폴리펩티드를 포함하는 항체와 같은, 하나 이상의 인간 중쇄 및/또는 경쇄 폴리펩티드를 포함하는 항체를 포함한다.

[0097] 용어 "키메라 항체"는 면역글로불린 분자의 아미노산 서열이 2개 이상의 종으로부터 유도된 항체를 말한다. 통상적으로, 경쇄 및 중쇄 둘 다의 가변부는 목적하는 특이성, 친화도 및 가능성을 갖는 포유동물의 한 종(예: 마우스, 래트, 래빗 등)으로부터 유도된 항체의 가변부에 상응하는 한편, 일정 부위는 서로(통상적으로 사람)로부터 유도된 상체내 서열에 상동성이어서 상기 종의 면역 반응을 유도하는 것을 피한다.

[0098] 용어 "에피토프" 또는 "항원 결정자"는 본원에서 상호 교환적으로 사용되고, 특정 항체에 의하여 인식되고 특이적으로 결합될 수 있는 항원의 부분을 말한다. 항원이 폴리펩티드인 경우, 에피토프는 단백질의 3차 폴딩에 의하여 병렬된 비인접 아미노산과 인접 아미노산 둘 다로부터 형성될 수 있다. 인접 아미노산으로부터 형성된 에피토프는 통상적으로 단백질 변성 시 보유되는 반면, 3차 폴딩에 의하여 형성된 에피토프는 통상적으로 단백질 변성 시 손실된다. 에피토프는 통상적으로 독특한 공간 형태에 3개 이상, 5개 이상, 또는 8 내지 10개 이상의 아미노산을 포함한다.

[0099] 항체가 에피토프 또는 항원 분자에 "특이 결합함"은 항체가 비관련 단백질을 포함한, 대체 물질보다 에피토프 또는 항원 분자에 보다 빈번하게, 보다 신속하게, 보다 장기간 동안, 보다 큰 친화도로, 또는 위의 일부 조합으로 반응하거나 결합됨을 의미한다. 특정 양태에서, "특이 결합함"은, 예를 들면, 항체가 약 1.0mM 이하, 보다 통상적으로는 약 1 μ M 미만의 K_D 를 갖는 단백질에 결합함을 의미한다. 특정 양태에서, "특이 결합함"은 항체가 때로는 적어도 약 0.1 μ M 이하, 다른 경우 적어도 약 0.01 μ M 이하의 K_D 를 갖는 단백질에 결합함을 의미한다. 상이한 화학종의 동종 단백질 사이의 서열 동일성 때문에, 특이 결합은 한 종 초과와 특정 단백질을 인식하는 항체를 포함할 수 있다. 제1 표적에 특이 결합하는 항체 또는 결합 잔기는 제2 표적에 특이적으로 결합하거나 결합하지 않을 수 있음을 이해한다. 이와 같이, "특이 결합"은 반드시 독점적인 결합, 즉, 단일 표적으로의 결합을 (포함할 수는 있지만) 필요로 하지 않는다. 일반적으로, 반드시 그렇지는 않지만, 결합에 대한 언급은 특이 결합을 의미한다.

[0100] 이의 단편/유도체 및 단일클론 항체를 포함하는 항체는 당해 기술분야에 공지된 방법을 사용하여 수득할 수 있다(참조: McCafferty et al., Nature 348:552-554 (1990); Clackson et al., Nature 352:624-628; Marks et al., J. Mol. Biol. 222:581-597 (1991); Marks et al., Bio/Technology 10:779-783 (1992); Waterhouse et al., Nucleic. Acids Res. 21:2265-2266 (1993); Morimoto et al., Journal of Biochemical and Biophysical Methods 24:107-117 (1992); Brennan et al., Science 229:81(1985); Carter et al., Bio/Technology 10:163-167 (1992); Kohler et al., Nature 256:495 (1975); U.S. Pat. No. 4,816,567); Kilpatrick et al., Hybridoma 16(4):381-389 (1997); Wring et al., J. Pharm. Biomed. Anal. 19(5):695-707 (1999); Bynum et al., Hybridoma 18(5):407-411 (1999), Jakobovits et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA,90:2551 (1993); Jakobovits et al., Nature, 362:255-258 (1993); Bruggemann et al., Year in Immuno. 7:33 (1993); Barbas et al., Proc. Nat. Acad. Sci. USA 91:3809-3813 (1994); Schier et al., Gene 169:147-155 (1995); Yelton et al., J. Immunol. 155:1994-2004 (1995); Jackson et al., J. Immunol. 154(7):3310-9 (1995); Hawkins et al., J. Mol. Biol. 226:889-896 (1992), U.S. Pat. Nos. 5514548, 5545806, 5569825, 5591669, 5545807; WO 97/17852, 이들 모두는 본원에서 전체적으로 참조로 인용된다).

[0101] 항체의 비제한적 예는, 이들로 제한되지는 않지만, 뮤로모나브-CD3 아브식시마브(Muromonab-CD3 Abciximab), 리특시마브(Rituximab), 다클리주마브(Daclizumab), 팔리비주마브(Palivizumab), 인플릭시마브(Infliximab), 트라스투주마브(Trastuzumab), 에타너셉트(Etanercept), 바실릭시마브(Basiliximab), 겐투주마브 오조가마이신(Gemtuzumab ozogamicin), 알렘투주마브(Alemtuzumab), 이브리투모마브 티옥세탄(Ibritumomab tiuxetan), 아달리무마브(Adalimumab), 알레파셉트(Alefacept), 오말리주마브(Omalizumab), 에팔리주마브(Efalizumab), 토시투모모브(Tositumomab)-1131, 세투시마브(Cetuximab), 베박시주마브(Bevacizumab), 나탈리주마브(Natalizumab), 라니비주마브(Ranibizumab), 파니투무마브(Panitumumab), 에콜리주마브(Ecolizumab), 리로나셉트(Rilonacept), 서톨리주마브 페골(Certolizumab pegol), 로미플로스팀(Romiplostim), AMG-531, CNTO-148, CNTO-1275, ABT-874, LEA-29Y, 벨리무마브(Belimumab), TACI-Ig, 2세대 항-CD20, ACZ-885, 토실리주마브(Tocilizumab)(Atlizumab), 메폴리주마브(Mepolizumab), 퍼투주마브(Pertuzumab), 휴막스(Humax) CD20, CP-675, 206(Ticilimumab), MDX-010, IDEC-114, 이노투주마브 오조가마이신(Inotuzumab ozogamycin), 휴막스 EGFR, 알리버셉트(Aflibercept), VEGF Trap-Eye, 휴막스-CD4, Ala-Ala, ChAglyCD3;TRX4, 카투막소마브(Catumaxomab), IGN101, MT-201, 프레고보마브(Pregovomab), CH-14.18, WX-G250, AMG-162, AAB-001, 모타비주

마브(Motavizumab);MEDI-524, 에푸마구마브(efungumab), 아우로그라브(Aurograb)®, 락시바쿠마브(Raxibacumab), 3세대 항-CD20, LY2469298, 벨투주마브(Veltuzumab)를 포함한다.

- [0102] 일부 양태에서, 단백질이 단일클론 항체인 경우, 단일클론 항체의 하나 이상의 경쇄, 단일클론 항체의 하나 이상의 중쇄 또는 둘 다는 이소프레노이드 트랜스퍼라제에 의하여 인식될 수 있는 아미노산 모티프를 갖는 아미노산 부위를 포함할 수 있다.
- [0103] 양태에서, 경쇄 또는 중쇄의 C-말단은 변형된다. 또한, Fc 부위의 CH2 부위는 글리코실화될 수 있다.
- [0104] 일부 양태에서, 단백질의 C-말단(단편, 이의 유사체 또는 유도체)은 이소프레노이드 트랜스퍼라제에 의하여 인식될 수 있는 아미노산 모티프에 결합될 수 있다. 다른 양태에서, C-말단은 변형될 수 있다. 변형은 (i) 단백질의 카복시 말단에서의 결실, (ii) 단백질의 카복시 말단에서의 올리고펩티드 또는 폴리펩티드 부가, 또는 (iii) 단백질의 카복시 말단에서의 결실 및 단백질의 카복시 말단에서의 올리고펩티드 또는 폴리펩티드 부가일 수 있다. 관련 양태에서, 변형은 아미노산 모티프에 결합될 수 있다.
- [0105] 본원에서 사용된 용어 "이소프레노이드 트랜스퍼라제"는 단백질의 C-말단에 또는 그 부근에 특정 아미노산 모티프를 인식할 수 있고, 특정 아미노산 모티프를 갖는 단백질에 이소프레노이드 단위(들)를 부가함으로써 특정 아미노산 모티프의 시스테인 잔기(들)의 티올 위치에 선택적 알킬화를 수행할 수 있는 효소를 말한다.
- [0106] 이소프레노이드 트랜스퍼라제의 예는 파네실트랜스퍼라제(FTase) 및 게라닐게라닐트랜스퍼라제(GGTase)를 포함하고, 이들은 각각 파네실 또는 게라닐-게라닐 잔기의 표적 단백질의 C-말단 시스테인(들)로의 전이를 수반한다. GGTase는 GGTase I 및 GGTase II로 분류될 수 있다. FTase 및 GGTase I은 CAAX 모티프를 인식할 수 있고, GGTase II는 XXCC, XCXC 또는 CXX 모티프(여기서 C는 시스테인이고, A는 지방족 아미노산이고, X는 이소프레노이드 트랜스퍼라제의 기질 특이성을 결정하는 아미노산이다)를 인식할 수 있다(참조: Nature Rev. Cancer 2005, 5(5), pp. 405-12; Nature Chemical Biology, 2010, 17, pp. 498-506; Lane KT, Bees LS, Structural Biology of Protein of Farnesyltransferase and Geranylgeranyltransferase Type I, Journal of Lipid Research, 47, pp. 681-699 (2006); Patrick J. Kasey, Miguel C. Seabra; Protein Prenyltransferases, The Journal of Biological Chemistry, Vol. 271, No. 10, Issue of March 8, pp. 5289-5292 (1996), 이의 내용은 이로써 전체적으로 참조로 인용됨).
- [0107] 본 발명에서, 다양한 공급원, 예를 들면, 사람, 동물, 식물, 박테리아, 바이러스 등으로부터의 이소프레노이드 트랜스퍼라제가 사용될 수 있다. 일부 양태에서는, 천연 이소프레노이드 트랜스퍼라제가 사용될 수 있다. 일부 기타 양태에서는, 천연 또는 인공 변형된 이소프레노이드 트랜스퍼라제가 사용될 수 있다. 예를 들면, 자연 변화된 하나 이상의 아미노산 서열을 갖는 이소프레노이드 트랜스퍼라제(후해독 변형 포함), 천연 이소프레노이드 트랜스퍼라제의 천연 또는 인공적으로 절단된 형태, (His)-태그, GST, GFP, MBP, CBP, 이오스셉태그(Iosseptag), BCCP, Myc-태그, Calmodulin-태그, FLAG-태그, HA-태그, 말토스 결합 단백질-태그, Nus-태그, 글루타티온-S-트랜스퍼라제-태그, 녹색 형광 단백질-태그, 티오레독신(Thioredoxin)-태그, S-태그, 소프트태그(Softag) 1, 소프트태그 3, 스트렙(Strep)-태그, SBP-태그, Ty 태그 등 중의 하나 이상에 의하여 변형된 이소프레노이드 트랜스퍼라제가 있다.
- [0108] 이소프레노이드 트랜스퍼라제는 이소기질(isosubstrate)뿐만 아니라 기질을 인식할 수 있다. 이소기질은 기질에 변형을 갖는 기질 유사체를 말한다. 이소프레노이드 트랜스퍼라제는 단백질의 C-말단에서 특정 아미노산 모티프(예: CAXX 모티프)를 알킬화시킨다(참조: Benjamin P. Duckworth et al, ChemBioChem 2007, 8, 98; Uyen T. T. Nguyen et al, ChemBioChem 2007, 8, 408; Guillermo R. Labadie et al, J. Org. Chem. 2007, 72(24), 9291; James W. Wollack et al, ChemBioChem 2009, 10, 2934, 이의 내용은 본원에서 참조로 인용됨). 관능화 단백질은 C-말단 시스테인(들)에서 알킬화를 통하여 이소프레노이드 트랜스퍼라제 및 이소기질을 사용하여 생성할 수 있다.
- [0109] 예를 들면, C-말단 CAAX 모티프의 시스테인 잔기는 이소프레노이드 트랜스퍼라제를 사용하여 이소기질과 반응시킬 수 있다. 특정 경우, AAX는 이어서 프로테아제에 의하여 제거할 수 있다. 수득한 시스테인은 이어서 효소에 의하여 카복시 말단에서 메틸화시킬 수 있다(참조: Iran M. Bell, J. Med. Chem. 2004, 47(8), 1869, 이는 본원에서 참조로 인용됨).
- [0110] 일부 단백질의 경우, 디설파이드 결합 형성을 통한 시스테인화 및 글루타티오닐화는 후해독 변형으로 인하여 발생할 수 있다. 그러나, 이러한 디설파이드 결합은 이러한 알킬화가 이소프레노이드 트랜스퍼라제에 의하여 발생하는 경우 감소될 수 있다.

- [0111] 본 발명의 단백질은 당해 기술분야에 익히 공지된 어떠한 분자 생물 또는 세포 생물법을 사용하여 제조할 수 있다. 예를 들면, 일시적 트랜스펙션법이 사용될 수 있다. 이소프레노이드 트랜스퍼라제에 의하여 인식될 수 있는 특정 아미노산 모티프를 인코딩하는 유전적 서열은 이의 C-말단에 특정 아미노산 모티프를 갖는 단백질(단편 또는 이의 유사체)을 발현하도록 표준 PCR 기술을 사용하여 공지된 프라스미드 벡터로 삽입할 수 있다. 이와 같이, 이소프레노이드 트랜스퍼라제에 의하여 인식될 수 있는 하나 이상의 아미노산 모티프를 갖는 단백질이 발현될 수 있다. 발현된 단백질은 이어서 이소프레노이드 트랜스퍼라제를 사용하여 이소프레노이드 트랜스퍼라제의 이소기질과 효소적으로 반응시켜 관능화 단백질을 생성할 수 있다. 이소기질은 관능 그룹을 함유한다.
- [0112] 일단 이소프레노이드 트랜스퍼라제에 의하여 인식될 수 있는 아미노산 모티프를 갖는 단백질이 발현되면, 이는 이소프레노이드 트랜스퍼라제 및 제1 관능 그룹(FG1)을 갖는 하나 이상의 이소기질을 사용하여 효소적으로 반응시켜, 관능화 단백질을 생성할 수 있다.
- [0113] 본원에서 사용된 용어 "관능 그룹"은 예를 들면, 1,3-이극성 사이클로부가 반응, 헤테로-디엘스 반응, 친핵 치환 반응(예: 헤테로사이클릭 친전자체, 예를 들면, 에폭사이드, 아지리딘, 사이클릭 설페이트 및 아지리디움의 개환 반응의), 비-알데형 카보닐 반응(예: 옥심 에테르, 우레아, 티오우레아, 방향족 헤테로사이클, 하이드라존 및 아미드의 형성), 탄소-탄소 다중 결합으로의 부가, 산화 반응(예: 에폭시화, 아지리딘화 및 설페닐 할라이드 부가) 및 클릭 화학을 유도할 수 있는 그룹을 말한다. 관능 그룹은 이들로 제한되지는 않지만, 형광 태그, 트리아졸, 말레이미드 및 방사성 동위원소를 포함할 수 있다(참조: *Angew. Chem. Int. Ed.* 2001, 40, 2004-2021; *Drug Discovery Today*, 2003, 8(24), 1128-1137; *Chem. Rev.* 2008, 108, 2952-3015, 이의 내용은 본원에서 참조로 인용됨). 양태에서, 관능 그룹은 아세틸렌 그룹 및 아지드 그룹일 수 있다.
- [0114] 관능 그룹은 하나 이상의 링커를 통하여 단백질 또는 활성제에 결합될 수 있다. 일부 양태에서, 링커는 선형 링커이다. 일부 다른 양태에서, 링커는 분지 링커이다. 링커가 분지된 링커인 경우, 활성제는 모든 분지에 결합될 수 있다. 각각의 분지는 동일하거나 상이한 활성제를 가질 수 있다. 일부 양태에서, 링커는 탈리성일 수 있다. 일부 다른 양태에서, 이는 비탈리성일 수 있다.
- [0115] 일부 양태에서, 관능화 활성제는 제2 관능 그룹(FG2)을 활성제에 결합시켜 생성한다. 예시적인 활성제는, 이들로 제한되지는 않지만, 약물, 독소, 친화성 리간드, 검출 탐침 또는 이들의 조합을 포함한다.
- [0116] 예시적인 약물은, 이들로 제한되지는 않지만, 어로티니브(TARCEVA; Genentech/OSI Pharm.), 보어테조미브(VELCADE; MilleniumPharm.), 폴베스트란트(FASLODEX; AstraZeneca), 수텐트(SU11248; Pfizer), 레트로졸(FEMARA; Novartis), 이마티니브 메실레이트(GLEEVEC; Novartis), PTK787/ZK 222584(Novartis), 옥살리플라틴(Eloxatin; Sanofi), 5-플루오로우라실(5-FU, leucovorin), 라파마이신(Sirolimus, RAPAMUNE; Wyeth), 라파티니브(TYKERB, GSK572016; GlaxoSmithKline), 로나파니브(SCH 66336), 소라페니브(BAY43-9006; Bayer Labs.), 게피티니브(IRESSA; Astrazeneca), AG1478, AG1571(SU 5271; Sugen), 알킬화제, 예를 들면, 티오테파 및 CYTOXAN® 사이클로포스파미드; 알킬 설포네이트, 예를 들면, 부설판, 임프로설판 및 피포설판; 아지리딘, 예를 들면, 벤조도파, 카보쿠온, 메투레도파 및 우레도파; 알트레타민, 트리에틸렌멜라민, 트리에틸렌포스포라미드, 트리에틸렌티오포스포라미드 및 트리메틸올로멜라민을 포함하는 에틸렌이민 및 메틸아멜라민; 아세토게닌스(특히 블라탁신 및 블라탁시논); 캄프토테신(합성 유사체 토포테칸을 유도); 브리오스타틴; 칼리스타틴; CC-1065(이의 아도켈레신, 카켈레신 및 비켈레신 합성 유사체를 포함); 크립토파이신(특히 크립토파이신 1 및 크립토파이신 8); 둘라스타틴; 두오카마이신(합성 유사체, KW-2189 및 CB1-TM1 포함); 엘레우테로빈; 판크라티스타틴; 사코디틴; 스펀기스타틴; 질소 머스타드, 예를 들면, 클로람부실, 클로르나파진, 클로로포스파미드, 에스트라무스틴, 이포스파미드, 메클로레타민, 메클로레타민 옥사이드 하이드로클로라이드, 멜팔란, 노벤비킨, 페네스터린, 프레드니무스틴, 트로포스파미드, 우라실 머스타드; 아질산우레아, 예를 들면, 카무스틴, 클로로조톡신, 포테무스틴, 로무스틴, 니무스틴 및 라님누스틴; 항생 물질, 예를 들면, 에네딘 항생 물질(예: 칼리케아마이신, 특히 칼리케아마이신 감마 1I 및 칼리케아마이신 오메가 1I(예를 들면, 참조: *Agnew, Chem Intl ed Engl.*, 33: 183-186 (1994)) 및 다인미신 A를 유도하는 다인미신; 비스포스포네이트, 예를 들면, 클로드로네이트; 에스페라미신, 니오카지노스타틴 발색단 및 관련 크로모단백질 에네티인 항생 발색단, 아클라시노마이신, 악티노마이신, 안트라마이신, 아자세린, 블레오마이신, 캅티노마이신, 카라비신, 카니노마이신, 카지노필린, 크로모마이신, 닥티노마이신, 다우노루비신, 데투루부신, 6-디아조-5-옥소-L-노르류신, ADRLIMYCIN® 독소루비신(모르폴리노-독소루비신, 시아노모르폴리노-독소루비신, 2-피롤리노-독소루비신, 리포숨 독소루비신 및 데옥시독소루비신 포함), 에피루비신, 에소루비신, 마셀로마이신, 미토마이신, 예를 들면, 미토마이신 C, 마이코페놀산, 노갈라마이신, 올리보마이신, 페플로마이신, 포트피로마이신, 푸로마이신, 쿠엘라마이신, 로두루비신, 스트렙토미그린, 스트렙토조신, 투베르시딘, 우베니맥스, 지노스타틴 및 조루비신; 항-대사산물, 예를 들면, 5-플루오로우라실

(5-FU); 폴산 유사체, 예를 들면, 테노프테린, 메토티렉세이트, 프테로프테린, 트리메트렉세이트; 푸린 유사체, 예를 들면, 플루다라빈, 6-머캅토푸린, 티아미프린 및 티구아닌; 피리미딘 유사체, 예를 들면, 아시타빈, 아자시티딘, 6-아자우리딘, 카모푸르, 사이타라빈, 디데옥시우리딘, 독시플루리딘, 에노시타빈 및 플록수리딘; 안드로겐, 예를 들면, 칼루스테론, 드로모스타놀론 프로피오네이트, 에피티오스타놀, 메피티오스탄 및 테스토라톤; 항-아드레날, 예를 들면, 아미노글루테티미드, 미토탄 및 트리로스탄; 폴산 보충제, 예를 들면, 폴린산; 아세글라톤; 알도포스파미드 글리코사이드; 아미노레볼린산; 에닐우라실; 암사크린; 베스트라부실; 비산트렌; 에다트락세이트; 데포파민; 데메콜신; 디아지쿠온; 엘포르니틴; 엘립티늄 아세테이트; 에포틸론; 에토글루시드; 갈륨니트레이트; 하이드록시우레아; 렌티난; 로니다이닌; 마이탄시노이드, 예를 들면, 마이탄신 및 안사미톡신; 미토구아존; 미톡산트론; 모피단몰; 니트라에린; 펜토스타틴; 페나메트; 피라루비신; 로속사트론; 2-에틸하이드라지드; 프로카바진; PSK® 다당류 착체(JHS Natural Products, Eugene, Oreg.); 라족산; 리족신; 시조피란; 스피로게르마늄; 테누아존산; 트리아지쿠온; 2,2',2"-트리클로로트리에틸아민; 트리코테센(특히 T-2 독소, 베라쿠린 A, 로리딘 A 및 안구이딘); 우레탄; 빈데신; 다카바진; 만노무스틴; 미토브로니톨; 미토라톨; 피포브로만; 가시토신; 아라비노시드('Ara-C'); 사이클로포스파미드; 티오테과; 탁소이드, 예를 들면, TAXOL® 파클리탁셀(Bristol-Myers Squibb Oncology, Princeton, N. J.) ABRAXANE™ 크레모포 부재, 파클리탁셀의 알부민 가공 나노입자 제형(American Pharmaceutical Partners, Schaumber, Ill.) 및 TAXOTERE® 독세탁셀(Rhone-Poulenc Rorer, Antony, France); 클로란부실; 겐시타빈; 6-티오구아닌; 머캅토푸린; 백금 유사체, 예를 들면, 시스플라틴, 카보플라틴; 빈블라스틴; 백금; 에토포시드, 이포스파미드; 미톡산트론; 빈크리스틴; NAVELBINE® 비노렐빈; 노반트론; 테니포시드; 데아트렉세이트; 다우노마이신; 아미노프테린; 젤로다; 이반드로네이트; CPT-11; 토포이소머라제 억제제 RFS 2000; 디플루오로메틸로르니틴(DFMO); 레티노이드, 예를 들면, 레티산; 카페시타빈; 및 약제학적으로 허용되는 이의 염, 용매화물, 산 또는 유도체를 포함한다.

[0117] 추가의 약물은 이들로 제한되지는 않지만, (i) 예를 들면, 타목시펜(NOLVADEX® 타목시펜 포함), 라록시펜, 드로록시펜, 4-하이드록시타목시펜, 트리옥시펜, 케옥시펜, LY117018, 오나프리스톤 및 FAREATON® 토레미펜을 포함하는, 항-에스트로겐 및 선택적 에스트로겐 수용체 조절제(SERM)와 같은 종양에 대한 호르몬 작용을 조절하거나 억제하는 작용을 하는 항-호르몬제; (ii) 부신내 에스트로겐 생성을 조절하는, 아로마타제 효소를 억제하는 아로마타제 억제제, 예를 들면, 4(5)-이미다졸, 아미노글루테티미드, MEGASE® 메게스트롤 아세테이트, AROMASIN® 엑세메스탄, FEMARA® 레트로졸 및 ARIMIDEX® 아나스트로졸; (iii) 항-안드로겐, 예를 들면, 플루타미드, 닐루타미드, 비칼루타미드, 레우프로리드 및 고세렐린; 뿐만 아니라 트록사시타빈(1,3-디옥솔란 뉴클레오시드 시토신 유사체); (iv) 아로마타제 억제제; (v) 단백질 키나제 억제제; (vi) 지질 키나제 억제제; (vii) 안티센스 올리고뉴클레오티드, 특히 부착 세포에 연관된 시그널링 통로 내 유전자 발현을 억제하는 것, 예를 들면, PKC-알파, Raf, H-Ras; (viii) 리보자임, 예를 들면, VEGF 억제제, 예를 들면, ANGIOZYME 리보자임 및 HER2 발현 억제제; (ix) 백신, 예를 들면, 유전자 치료 백신; ALLOVECTIN® 백신, LEUVECTIN 백신 및 VAXID 백신; PROLEUKIN® rIL-2; LURTOTECAN® 토포이소머라제 1 억제제; ABARELIX® rmRH; (x) 항-맥관발생제, 예를 들면, 베박시주마브(AVASTIN, Genentech); 및 (xi) 약제학적으로 허용되는 이의 염, 용매화물, 산 또는 유도체를 포함한다.

[0118] 일부 양태에서, 시토카인이 약제로서 사용될 수 있다. 시토카인은 다수의 세포에 의하여 분비되는 소세포-시그널링 단백질 분자이고, 세포 내 정보교환에 광범위하게 사용되는 시그널링 분자의 범주이다. 이는 모노카인, 림포카인, 전통적인 폴리펩티드 호르몬 등을 포함한다. 시토카인의 예는, 이들로 제한되지는 않지만, 성장 호르몬, 예를 들면, 사람 성장 호르몬, N-메티오닐 사람 성장 호르몬 및 보바인 성장 호르몬; 부갑상선 호르몬; 티록신; 인슐린; 프로인슐린; 레락신; 프로레락신; 당단백질 호르몬, 예를 들면, 소포 자극 호르몬(FSH), 갑상선 자극 호르몬(TSH) 및 황체형성 호르몬(LH); 간 성장 인자 섬유아세포 성장 인자; 프로락틴; 태반 락토겐; 종양 괴사 인자- α 및 $-\beta$; 물러-억제 물질; 마우스 고나도트로핀 결합 펩티드; 인히빈; 악티빈; 혈관 내피 성장 인자; 인테그린; 트롬보포이에틴(TPO); 신경 성장 인자, 예를 들면, NGF- β ; 혈소판-성장 인자; 변환 성장 인자(TGF), 예를 들면, TGF- α 및 TGF- β ; 인슐린 유사 성장 인자-I 및 -II; 에리트로포이에틴(EPO); 골유도 인자; 인터페론, 예를 들면, 인터페론- α , $-\beta$ 및 $-\gamma$; 집락 자극 인자(CSF), 예를 들면, 대식 세포-CSF(M-CSF); 과립구-대식 세포-CSF(GM-CSF); 및 과립구-CSF(G-CSF); 인터류킨(IL), 예를 들면, IL-1, IL-1 α , IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-9, IL-10, IL-11, IL-12; 종양 괴사 인자, 예를 들면, TNF- α 및 TNF- β ; 및 LIF 및 키트 리간드(KL)를 포함하는 기타 폴리펩티드 인자를 포함한다. 본원에서 사용된 바와 같이, 용어 시토카인은 또한 천연 공급원으로부터 또는 기본 서열 시토카인의 재조합 세포 배양물 및 생물학적 활성 동등물을 포함한다.

[0119] 용어 "독소"는 살아 있는 세포 또는 유기체 내에서 생성되는 독성 물질을 말한다. 독소는 생물학적 거대분자,

예를 들면, 효소 또는 세포 수용체와 상호 작용하는 체조직과 접촉 또는 이에 의하여 흡수 시 질환을 유발할 수 있는 소분자, 펩티드 또는 단백질일 수 있다. 독소는 식물 독소 및 동물 독소를 포함한다. 동물 독소의 예는, 이들로 제한되지는 않지만, 디프테리아 항독소, 보툴리움 독소, 파상풍 항독소, 이질 독소, 콜레라 독소, 테트로도톡신, 브레베톡신, 시구아톡신을 포함한다. 식물 독소의 예는, 이들로 제한되지는 않지만, 리신 및 AM-독소를 포함한다.

[0120] 소분자 독소의 예는, 이들로 제한되지는 않지만, 아우리스타틴, 겔다나마이신(Kerr et al., 1997, Bioconjugate Chem. 8(6):781-784), 마이타시노이드(EP 1391213, ACR 2008, 41, 98-107), 칼리케아마이신(US 2009105461, Cancer Res. 1993, 53, 3336-3342), 다우노마이신, 독소루비신, 메토티렉세이트, 빈테신, SG2285(Cancer Res. 2010, 70(17), 6849-6858), 돌라스타틴, 돌라스타틴 유사체의 아우리스타틴(US563548603), 크립토파이신, 캄프토테신, 리족신 유도체, CC-1065 유사체 또는 유도체, 두오카마이신, 엔디인 항생 물질, 에스페라미신, 에포틸론 및 톡소이드를 포함한다. 독소는 튜불린 결합, DNA 결합, 토포이소머라제 억제 등에 의하여 세포독성 및 세포 성장 억제 활성을 나타낼 수 있다.

[0121] 용어 "리간드"는 표적 생체분자와 착체를 형성할 수 있는 분자를 말한다. 리간드의 예는 표적 단백질의 소정 위치에 결합하여 신호를 전송하는 분자이다. 이는 기질, 억제제, 자극제, 신경전달 물질 또는 방사성 동위원소일 수 있다.

[0122] "검출 가능한 잔기" 또는 "표지"는 분광, 광화학, 생화학, 면역화학, 방사성 또는 화학적 수단에 의하여 검출 가능한 조성물을 말한다. 예를 들면, 유용한 표지는 ³²P, ³⁵S, 형광성 염료, 전자-밀집 시약, 효소(예: ELISA에 통상적으로 사용되는 것), 비오틴-스트렙타비딘, 디옥시게닌, 합텐 및 항혈청 또는 단일클론 항체가 사용 가능한 단백질, 또는 표적에 상보적인 서열을 갖는 핵산 분자를 포함한다. 검출 가능한 잔기는 종종 샘플내 결합된 검출 가능한 잔기의 양을 정량하는 데 사용될 수 있는, 측정 가능한 신호, 예를 들면, 방사성, 발색성 또는 형광 신호를 발생시킨다. 신호의 정량은 예를 들면, 신틸레이션 카운팅, 밀도계, 유동 세포분석, ELISA 또는 원형 또는 후속적으로 다이제스트된 펩티드의 질량 분광법에 의한 직접 분석(하나 이상의 펩티드가 검정될 수 있다)에 의하여 달성된다. 당업자는 관심 있는 표지 화합물에 대한 기술 및 검출 수단에 친숙하다. 이러한 기술 및 방법은 통상적이고 당해 기술분야에 익히 공지되어 있다.

[0123] 본원에서 사용된 바와 같은 용어 "탐침"은 (i) 검출 가능한 신호를 제공하거나, (ii) 제1 탐침 또는 제2 탐침을 상호 반응시켜 형광 공명 에너지 전달(FRET)과 같은, 제1 또는 제2 탐침에 의하여 제공된 검출 가능한 신호를 변경시키거나, (iii) 항원 또는 리간드와의 상호 작용을 안정화시키거나 결합 친화도를 증가시키거나, (iv) 전하, 소수성 등과 같은 물리적 파라미터에 의하여 전기 이동도 또는 세포-침입 작용에 영향을 미치거나, (v) 리간드 친화도, 항원-항체 결합 또는 이온 착체 형성을 조절할 수 있는 물질을 말한다.

[0124] 일단 관능화 단백질 및 관능화 활성제가 생성되면, 이들은 서로 반응하여, 단백질-활성제 접합체를 생성한다. 양태에서, 관능화 단백질과 관능화 활성제 사이의 반응은 클릭 화학 반응이거나 하이드라존 및/또는 옥심 형성을 통할 수 있다. 양태에서, FG1은 아지드 그룹이고 FG2는 아세틸렌 그룹이거나, 그 반대이다. 다른 양태에서, FG1은 알데히드 또는 케톤 그룹이고 FG2는 하이드라진 또는 하이드록실아민이거나, 그 반대이다.

[0125] 클릭 화학 반응은 온화한 조건에서 수행하여, 단백질을 용이하게 취급하는 것을 가능하게 한다. 클릭 화학 반응은 매우 높은 반응 특이성을 나타낸다. 따라서, 단백질이 다른 관능 그룹을 갖는 경우에도(예: 측쇄 잔기 또는 C-말단 또는 N-말단에서), 당해 관능 그룹은 클릭 화학 반응에 의하여 영향받지 않는다. 예를 들면, 단백질의 아지드 그룹과 아세틸렌 그룹 사이의 클릭 화학 반응은, 단백질의 다른 관능 그룹이 클릭 화학 반응에 의하여 영향받지 않는 동안, 발생할 수 있다. 또한, 클릭 화학 반응은 수반된 리간드 종류에 의하여 영향받지 않고 특이적으로 발생할 수 있다. 일부 경우, 리간드는 전체 반응 효율성을 개선시키도록 선택될 수 있다. 예를 들면, 아지드-아세틸렌 클릭 화학은 트리아졸을 고 수율로 생성할 수 있다(참조: Rhiannon K. Hia et al, Chem. Rev. 2009, 109, 5620; Morten Meldal and Christian Wenzel Tornøe, Chem Rev., 2008, 108, 2952; Hartmuth C. Kolb et al, Angew. Chemie Int. Ed. Engl., 2001, 40, 2004, 이들 모두는 본원에서 참조로 인용됨.).

[0126] 아지드 및 아세틸렌 그룹은 천연 단백질의 아미노산 서열에 존재하지 않는 관능 그룹이다. 당해 관능 그룹을 사용하여 접합 반응이 발생하는 경우, 측쇄 잔기 중 어느 것도 그리고 N-말단 또는 C-말단 관능 그룹 중 어느 것도 클릭 화학 반응에 의하여 영향받지 않는다. 따라서, 활성제가 표적 위치에서 접합되는 단백질-활성제 접합체가 생성될 수 있다.

[0127] 단백질이 항체인 경우, 항체 전부 또는 일부가 이소프레노이드 트랜스퍼라제에 의한 알킬화 동안 단일 쇠로 환

원될 수 있다. 단일 쇠는 클릭 화학 반응에 사용된 산화제로 인하여 산화되어 H₂L₂-형 항체를 형성할 수 있다.

[0128] 항체가 4개의 쇠(2H + 2L)를 가지므로, 알킬화는 항체당 1 내지 4개의 위치에서 수행될 수 있다. 복수의 활성제가 링커에 결합될 수 있으므로, 활성제의 수는 4개 초과일 수 있다.

[0129] 특정 양태에서, 이소프레노이드 트랜스퍼라제에 의하여 인식될 수 있는 아미노산 모티프가 CAAX인 경우, 당해 방법은 AAX를 제거함을 추가로 포함할 수 있다. 다른 양태에서, 당해 방법은 AAX를 제거 후 C-말단에서 메틸 그룹을 가함을 추가로 포함할 수 있다(참조: Journal of Lipid Research, 2006, 47, 681-699, 이는 본원에서 참조로 인용됨.).

[0130] 양태 2

[0131] 또 다른 양태에 따르는 단백질-활성제 접합체의 제조 방법은, (a) 이소프레노이드 트랜스퍼라제에 의하여 인식될 수 있는 아미노산 모티프를 갖는 단백질을 발현시키고, (b) 이소프레노이드 트랜스퍼라제의 이소기질을 활성제에 결합시키고, (c) 이소프레노이드 트랜스퍼라제를 사용하여 발현된 단백질을 이소기질에 결합된 활성제와 효소적으로 반응시킴을 포함한다.

[0132] 당해 양태에서, 일단 이소프레노이드 트랜스퍼라제에 의하여 인식될 수 있는 아미노산 모티프를 갖는 단백질이 발현되면, 단백질은 이소프레노이드 트랜스퍼라제의 이소기질에 결합된 활성제와 반응한다. 이러한 경우, 티올-말레이미드 접합이 발생할 수 있다. 그러나, 티올-말레이미드 접합이 발생하는 경우에도, 활성제는 단지 본 발명에 따르는 표적 위치에서 접합된다. 따라서, 비-균질 혼합물이 생성되는 선행 기술과 관련된 문제를 피한다.

[0133] 2. 단백질-활성제 접합체

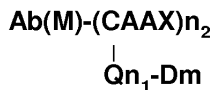
[0134] 또 다른 측면에서, 본 발명은 이소프레노이드 트랜스퍼라제에 의하여 인식될 수 있는 아미노산 모티프를 갖는 단백질을 포함하는 단백질-활성제 접합체를 제공하며, 여기서 활성제는 아미노산 모티프에서 단백질에 공유 결합된다.

[0135] 당업자는 관심 있는 표적을 선택적으로 결합시키는 단백질(예: 피검체의 표적 세포)을 즉시 선택할 수 있다. 예시적인 단백질은, 이들로 제한되지는 않지만, 관심 있는 표적에 특이적으로 결합하는 항체 또는 항원의 단편을 포함한다.

[0136] CAAX 단백질(CAAX 항체)

[0137] 본 발명의 방법에 의하여 제조되는 단백질-활성제 접합체의 예는 다음 화학식 II[여기서, 단백질은 항체(단편 또는 이의 유사체)(Ab)이고, 활성제는 약물(D)이고, 이소프레노이드 트랜스퍼라제에 의하여 인식될 수 있는 아미노산 모티프는 CAAX이다]로 나타낸다.

[0138] [화학식 II]

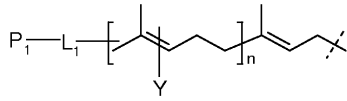


[0139]

[0140] Ab(M)은 이의 항체 또는 단편을 나타내며, 이는 변형을 포함할 수 있다. 변형은 (i) 이의 항체 또는 단편의 카복시 말단에서의 결실, (ii) 이의 항체 또는 단편의 카복시 말단에서의 올리고펩티드 또는 폴리펩티드 부가 및 (iii) 이의 항체 또는 단편의 카복시 말단에서의 결실 및 이의 항체 또는 단편의 카복시 말단에서의 올리고펩티드 또는 폴리펩티드 부가일 수 있다. Q는 링커를 나타낸다. 링커는 선형 링커 또는 분지형 링커일 수 있다. 양태에서, 링커는 제1 관능 그룹(FG1)을 포함할 수 있고, n₁, n₂ 및 m은 항체, 아미노산 모티프, 링커, 활성제 등에 따라 적합하게 결정될 수 있다. 바람직하게는, n₁ 및 n₂는 독립적으로 1 내지 4의 정수이고, m은 1 내지 16의 정수이다.

[0141] 일부 양태에서, 링커는 다음 화학식 I로 나타낼 수 있다:

[0142] 화학식 I



[0143]

[0144] 위의 화학식 I에서,

[0145] P₁ 및 Y는 독립적으로, 아세틸렌, 아지드, 알데히드, 하이드록실아민, 하이드라진, 케톤, 니트로벤조푸라잔 (NBD), 단실, 플루오레세인, 비오틴 및 로다민으로 이루어진 그룹으로부터 선택된, 제1 관능 그룹(FG1)을 함유하는 그룹이고,

[0146] L₁은 (CH₂)_rX_q(CH₂)_p이고,

[0147] X는 산소, 황, -NR₁-, -C(O)NR₁-, -NR₁C(O)-, -NR₁SO₂-, -SO₂NR₁-, -(CH=CH)- 또는 아세틸렌이고,

[0148] R₁은 수소, C₁₋₆ 알킬, C₁₋₆ 알킬 아릴 또는 C₁₋₆ 알킬 헤테로아릴이고,

[0149] r 및 p는 독립적으로 0 내지 6의 정수이고,

[0150] q는 0 또는 1의 정수이고,

[0151] n은 1 내지 4의 정수이다.

[0152] 일부 특정 양태에서, 약물(D)은 FG1과 반응할 수 있는 제2 관능 그룹(FG2)을 함유하는 그룹을 통하여 링커에 결합될 수 있다. FG2는 아세틸렌, 하이드록실아민, 아지드, 알데히드, 하이드라진, 케톤 및 아민으로 이루어진 그룹으로부터 선택될 수 있다.

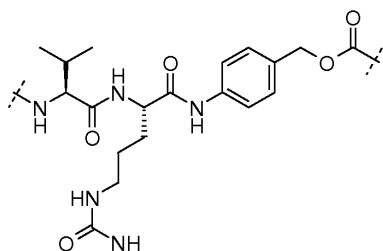
[0153] 일부 특정 양태에서, 약물(D)은 -(CH₂)_rX_q(CH₂)_p- 또는 -[ZCH₂CH₂O(CH₂CH₂O)_wCH₂CH₂Z]- (여기서, X는 산소, 황, -NR₁-, -C(O)NR₁-, -NR₁C(O)-, -NR₁SO₂- 또는 -SO₂NR₁-이고; Z는 산소, 황 또는 NR₁이고; R₁은 수소, C₁₋₆ 알킬, C₁₋₆ 알킬 아릴 또는 C₁₋₆ 알킬 헤테로아릴이고; r 및 p는 독립적으로 0 내지 6의 정수이고; q는 0 또는 1의 정수이고; w는 0 내지 6의 정수이다)를 통하여 FG2를 함유하는 그룹에 결합될 수 있다.

[0154] 일부 특정 양태에서, (i) 카텝신 B에 의하여 탈리될 수 있는 펩티드(들) 또는 (ii) β-글루쿠로니다제에 의하여 탈리될 수 있는 글루쿠로나이드는 -(CH₂)_rX_q(CH₂)_p- 또는 -[ZCH₂CH₂O(CH₂CH₂O)_wCH₂CH₂Z]-에 결합될 수 있다.

[0155] 일부 특정 양태에서, 비 자기-희생 그룹(self-immolative group) 또는 자기-희생 그룹이 (i) 카텝신 B에 의하여 탈리될 수 있는 펩티드(들) 또는 (ii) β-글루쿠로니다제에 의하여 탈리될 수 있는 글루쿠로나이드에 결합될 수 있다. 자기-희생 그룹의 비제한적인 예는 아미노페닐메틸옥시카보닐 및 하이드록시페닐메틸옥시카보닐일 수 있다.

[0156] 일부 특정 양태에서, 카텝신 B에 의하여 탈리될 수 있는 펩티드는 다음 화학식 III으로 나타낸다:

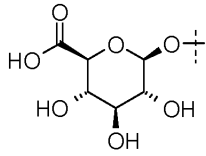
[0157] 화학식 III



[0158]

[0159] 일부 특정 양태에서, β-글루쿠로니다제에 의하여 탈리될 수 있는 글루쿠로나이드는 다음 화학식 IV로 나타낸다:

[0160] 화학식 IV



[0161]

[0162] **3. 조성물**

[0163] 또 다른 측면에서, 본 발명은 본원에 기재된 단백질-활성제 접합체를 포함하는 조성물을 제공한다. 양태에서, 조성물은 활성제를 피검체의 표적 세포에 전달하는 데 사용한다. 양태에서, 조성물은 이를 필요로 하는(즉, 활성제를 필요로 하는) 피검체를 치료하는 데 사용한다.

[0164] 이러한 조성물의 제조는 당업자에게 공지되어 있으며, 이러한 조성물은 생체 내에서 피검체에게 전달될 수 있다.

[0165] 한 측면에서, 조성물은 액체 용액으로서 또는 현탁액으로서 주사 가능한 형태로 제조한다. 주사에 적합한 고체 형태는 또한 에멀전으로서 또는 리포솜에 캡슐화된 폴리펩티드와 제조할 수도 있다. 단백질-활성제 접합체는 담체를 수용하는 피검체에 해로운 항체의 생성을 유도하지 않는 어떠한 담체라도 포함하는, 약제학적으로 허용되는 담체와 배합할 수 있다. 적합한 담체는 통상적으로 서서히 대사되는 큰 거대분자, 예를 들면, 단백질, 다당류, 폴리락트산, 폴리글리콜산, 중합체성 아미노산, 아미노산 공중합체, 지질 응집물 등을 포함한다. 이러한 담체는 당업자에게 익히 공지되어 있다.

[0166] 본 발명의 조성물은 또한 희석제, 예를 들면, 물, 염수, 글리세롤, 에탄올을 함유할 수 있다. 보조 물질, 예를 들면, 습윤제 또는 유화제, pH 완충 물질 등이 또한 존재할 수 있다. 단백질은 중성 또는 염 형태로서 백신으로 제형화시킬 수 있다. 조성물은 주사에 의하여 비경구 투여할 수 있으며; 이러한 주사는 피하 또는 근육 내일 수 있다. 추가의 제형은 예를 들면, 좌제에 의하여 또는 경구와 같은, 기타 투여 형태에 적합하다. 경구용 조성물은 용제, 현탁제, 정제, 환제, 캡슐 또는 서방성 제형으로서 투여할 수 있다.

[0167] 조성물은 용량 제형과 혼화성인 방식으로 투여한다. 조성물은 치료학적 유효량의 단백질-활성제 접합체를 포함한다. 치료학적 유효량이란, 질환 또는 장애의 치료 또는 예방에 유효한, 단일 용량, 또는 다중 용량 스케줄로 투여되는 조성물을 의미한다. 투여 용량은 치료되는 피검체, 피검체의 건강 및 신체 상태, 목적하는 보호도 및 기타 관련 인자에 따라 변화한다. 활성 성분의 정확한 필요량은 의사의 판단에 따른다.

[0168] **4. 단백질-활성제 접합체 및 조성물을 사용하는 방법**

[0169] 추가의 측면에서, 본 발명은 활성제를 피검체의 표적 세포에 전달하는 방법을 제공하며, 당해 방법은 단백질-활성제 접합체 또는 조성물을 투여함을 포함한다. 추가의 측면에서, 본 발명은 이를 필요로 하는 피검체(즉, 활성제를 필요로 하는 피검체)의 치료 방법을 제공하며, 당해 방법은 유효량의 단백질-활성제 접합체 또는 피검체에 대한 접합체를 포함하는 조성물을 투여함을 포함한다.

[0170] 양태에서, 치료학적 유효량의 단백질-활성제 접합체(예: 항체-약물 접합체) 또는 접합체를 포함하는 조성물은 암 또는 종양으로 고통받는 환자에게 투여하여 암 또는 종양을 치료할 수 있다.

[0171] 양태에서, 치료학적 유효량의 단백질-활성제 접합체(예: 항체-약물 접합체) 또는 접합체를 포함하는 조성물은 환자에게 투여하여 병원체(예: 바이러스, 박테리아, 진균, 기생충 등)에 의한 감염을 치료 또는 예방할 수 있다. 이러한 방법은 질환 또는 장애가 예방되거나 치료되도록 하는 조건하에, 포유동물에게 질환 또는 장애 또는 이의 증상을 치료하기에 충분한 치료학적 또는 예방적 양의 접합체를 투여하는 단계를 포함한다.

[0172] 일부 양태에서, 단백질-활성제 접합체 또는 조성물은 약제학적으로 허용되는 이의 염 또는 용매화물의 형태로 투여할 수 있다. 일부 양태에서, 이는 약제학적으로 허용되는 담체, 약제학적으로 허용되는 부형제 및/또는 약제학적으로 허용되는 첨가제와 투여할 수 있다. 약제학적 유효량 및 약제학적으로 허용되는 염 또는 용매화물, 부형제 및 첨가제의 유형은 표준 방법(참조: Remington's Pharmaceutical Sciences, Mack Publishing Co., Easton, PA, 18th edition, 1990)을 사용하여 측정할 수 있다.

- [0173] 암 또는 종양에 관한 용어 "치료학적 유효량"은 암 세포 수를 감소시키고/거나; 암 세포 크기를 감소시키고/거나; 암 세포가 주변 계통으로 침입하는 것을 억제하거나 침입을 감소시키고/거나; 암 세포가 다른 계통으로 확산되는 것을 억제하거나 확산을 감소시키고/거나; 암 세포가 성장하는 것을 억제하고/거나; 암과 관련된 하나 이상의 증상을 개선시킬 수 있는 양을 의미한다. 암의 치료에서, 약물의 유효성은 종양 대 종양 진행(TTP) 및/또는 응답(반응) 속도(RR)에 의하여 검정할 수 있다.
- [0174] 병원체에 의한 감염에 관한 용어 "치료학적 유효량"은 감염과 관련된 증상을 예방, 치료 또는 감소시킬 수 있는 양을 의미한다.
- [0175] 본원에서 사용된 용어 "약제학적으로 허용되는 염"은 유기 염 및 무기 염을 포함한다. 이의 예는, 이들로 제한되지는 않지만, 하이드로클로라이드, 하이드로브로마이드, 하이드로요오다이드, 설페이트, 시트레이트, 아세테이트, 옥살레이트, 클로라이드, 브로마이드, 요오다이드, 니트레이트, 비설페이트, 포스페이트, 산 포스페이트, 이소니코티네이트, 락테이트, 살리실레이트, 산 시트레이트, 타르트레이트, 올레에이트, 탄네이트, 판토네이트, 비타르트레이트, 아스코르베이트, 석시네이트, 말레에이트, 겐티시네이트, 푸마레이트, 글루코네이트, 글루코로네이트, 사카레이트, 포르메이트, 벤조에이트, 글루타메이트, 메탄 설포네이트, 에탄 설포네이트, 벤젠 설포네이트, p-톨루엔 설포네이트 및 파모에이트(즉, 1,1'-메틸렌비스-(2-하이드록시-3-나프토에이트))를 포함한다. 약제학적으로 허용되는 염은 또 다른 분자(예: 아세테이트 이온, 석시네이트 이온 및 기타 대이온 등)를 포함할 수 있다. 이는 또한 하나 이상의 하전된 원자를 포함할 수도 있다. 이는 또한 하나 이상의 대이온(counter ion)을 포함할 수도 있다.
- [0176] 본 발명에 따르는 화합물의 약제학적으로 허용되는 용매화물에 사용될 수 있는 예시적인 용매화물은 이들로 제한되지는 않지만, 물, 이소프로판올, 에탄올, 메탄올, DMSO, 에틸아세테이트, 아세트산 및 에탄올 아민을 포함한다.
- [0177] 실시예
- [0178] 다음 실시예는 본 발명을 예시하려는 것이며, 이를 제한하려는 것이 아니다.
- [0179] 실시예 1: Ab(M)-CAAX의 제조
- [0180] 1-1. 허셉틴-CAAX의 제조, 발현 및 정제
- [0181] 변형된 허셉틴 항체를 표준 재조합 DNA 기술 및 pNATABH::허셉틴 HC 플라스미드 또는 pNATABL::허셉틴 LC 플라스미드를 갖는 PCR 클로닝 프로토콜을 사용하여 발생시켰다. 재조합 플라스미드를 일시적 트랜스팩션에 의하여 HEK293E 세포주에 발현시켰다. 항체를 분리하고, 단백질 A 컬럼 크로마토그래피에 의하여 정제하였다
- [0182] 허셉틴-HC-GCVIM 및 허셉틴-LC-GCVIM의 제조
- [0183] 표준 PCR 클로닝 프로토콜을 사용하여 변형된 허셉틴 항체를 발생시켰다. 일반적으로, 허셉틴-HC-GCVIM 및 허셉틴-LC-GCVIM 플라스미드는 CAAX 모티프를 인코딩하는 DNA 서열(예: GCVIM, G₅CVIM, G₇CVIM, G₁₀CVIM 또는 G₁₀CVLL)을 pNATABH::허셉틴 HC 또는 pNATABH::허셉틴 LC 플라스미드에 인코딩된 중쇄 또는 경쇄의 C-말단에 삽입시켜 제조하였다.
- [0184] 예를 들면, SacII 인식 서열은 사람 IgG1-Fc 부위의 C-말단내 아미노산 172에 존재한다. 따라서, 정방향 프라이머가 Fc 부위의 SacII 위치에 결합하도록 계획되었다. 삽입되는 DNA 서열(예: GCVIM 5-mer 서열을 인코딩하는 15-mer)을 Fc-C 말단에 특이적인 역방향 프라이머에 부가하였다. 정방향 및 역방향 프라이머를 사용하여 PCR 생성물을 증폭시키고, 수득한 생성물을 PCR 증폭 키트를 사용하여 정제하였다. 역방향 프라이머는 XhoI 위치를 함유하므로, PCR 생성물은 SacII 및 XhoI로 다이제스팅하였다. 또한, pNATABH::허셉틴 HC 플라스미드를 SacII 및 XhoI로 다이제스팅하였다. 다이제스팅된 주쇄를 겔 정제 키트를 사용하여 정제하고, 다이제스팅된 PCR 생성물로 리게이팅(ligating)시켰다. 벡터와 인서트의 비를 적절히 조절하여 리게이션을 수행하고, 리게이션 생성물을 스크리닝용 적응 박테리아 세포로 변환시켰다. 허셉틴-HC-GCVIM 및 허셉틴-LC-GCVIM 플라스미드를 시퀀싱된 클론으로부터 제조하였다

- [0185] 수득한 플라즈미드로부터의 아미노산 서열을 아래 도 1 내지 10에 나타낸다. 아래 1-4 및 1-7 부분은 구조물 각각에 대한 상세한 설명을 제공한다.
- [0186] 허셉틴-HC-GCVIM 및 허셉틴-LC-GCVIM의 발현 및 정제
- [0187] HEK293 E 세포를 70-80% 컨플루언시까지 150mm 플레이트(# 430599, Corning USA) 위의 DMEM/10% FBS 배지에서 배양하였다. DNA 13 μ g과 PEI(#23966, Polysciences, USA) 26 μ g을 1:2의 비율로 혼합하고, 실온에서 약 20분 동안 배양한 다음, HEK193E 세포에 가하였다. 16-20시간 후, 배지를 혈청 부재 배지(No FBS DMEM(#SH30243.01, Hyclone Thermo.,USA))로 대체시키고, 상청액을 2일 또는 3일마다 회수하였다.
- [0188] 상청액을 0.22 μ m 탐-필터(#PR02890, Millipore, USA)로 여과한 다음, 5ml 컬럼에 팩킹된 단백질 A 비드(#17-1279-03, GE healthcare Sweden) 500 μ l에 결합시켰다. 연동성 펌프를 사용하여, 밤새 결합을 4 $^{\circ}$ C에서 0.9ml/min으로 수행하였다. 컬럼을 PBS(#70011, Gibco,USA) 100ml 이상으로 세척하였다. 결합된 단백질을 이어서 0.1M 글리신-HCl(#G7126, Sigma, USA)을 사용하여 6 분획으로 용출시키고, 1M 트리스(#T-1503, Sigma, USA)(pH 9.0)로 중화시켰다. 단백질을 정량화시켰다. 단백질을 함유하는 2 또는 3 분획을 회수하고, 아미콘 울트라 필터 단위(Amicon Ultra filter unit)(#UFC805024, Millipore, USA)로 농축시켰다. 원충액을 1 \times PBS(#70011, Gibco, USA)로 약 10배 변화시켰다. 단백질 생성물은 웨스턴 블롯(Western blot)에 의하여 허셉틴-HC-GCVIM 또는 허셉틴-LC-GCVIM인 것으로 확인되었다. 허셉틴을 함유하는 단백질을 동정하기 위하여, 이뮤노퓨어(ImmunoPure) 퍼옥시다제 접합 염소 항-사람 IgG Fc(#31413, Pierce, USA)를 사용하였다. 정제시, 세포 배양 배지 1 l로부터 허셉틴-HC-GCVIM 또는 허셉틴-LC-GCVIM 1-2mg을 수득하였다.
- [0189] 허셉틴-HC-GCVIM 및 허셉틴-LC-GCVIM 생성물은 또한 애질런트(Agilent) 생물분석기로 분석하였다. 간략하게는, 정제된 단백질 샘플(약 1mg/ml) 8 μ l를 애질런트 단백질 230 키트(5067-1515 Agilent Technologies, USA)를 사용하여 분석하였다. 단백질 샘플을 2분획(각각 4 μ l)으로 분리하였다. 비-환원 완충액 또는 환원 완충액 2 μ l를 각각의 샘플에 가하였다. 샘플을 95-100 $^{\circ}$ C에서 5분 동안 가열하고, 얼음으로 4 $^{\circ}$ C로 냉각시켰다. 스핀-다운 후, 탈이온수 84 μ l를 샘플 및 래더에 가하고, 와동(vortex)시켰다. 그 후, 샘플을 가중시키고, 제조자의 설명서에 따라 키트로 분석하였다.
- [0190] 1-2. 항 cMET-CAAX의 제조, 발현 및 정제
- [0191] 변형된 항 cMET-CAAX 항체를 또한 위에서 기재된 방법에 의하여 제조하였다. 예를 들면, 변형된 항 cMET-CAAX 항체를 표준 재조합 DNA 기술 및 pPMC-C1A5 플라즈미드를 갖는 PCR 클로닝 프로토콜을 사용하여 발생시켰다. 재조합 플라즈미드를 일시적 트랜스팩션에 의하여 HEK293T 세포주에 발현시켰다. 항체를 분리하고, 단백질 A 컬럼 크로마토그래피에 의하여 정제하였다.
- [0192] 1-3. 허셉틴-HC-G_nCVIM
- [0193] 허셉틴-HC-GCVIM, 허셉틴-HC-G₅CVIM, 허셉틴-HC-G₇CVIM 및 허셉틴-HC-G₁₀CVIM 항체들을 제조하였다. 항체들은 각각 중쇄의 C-말단에 5-mer(GCVIM), 9-mer(G₅CVIM), 11-mer(G₇CVIM) 또는 14-mer(G₁₀CVIM) 서열을 갖는다(도 1, 3, 5 및 7).
- [0194] 1-4. 허셉틴-LC-G_nCVIM
- [0195] 허셉틴-LC-GCVIM, 허셉틴-LC-G₅CVIM, 허셉틴-LC-G₇CVIM 및 허셉틴-LC-G₁₀CVIM 항체들을 제조하였다. 항체들은 경쇄의 C-말단에 각각 5-mer(GCVIM), 9-mer(G₅CVIM), 11-mer(G₇CVIM) 또는 14-mer(G₁₀CVIM) 서열을 갖는다(도 2, 4, 6 및 8).
- [0196] 1-5. 허셉틴-HC-G₁₀CVLL

[0197] 허셉틴-HC-G₁₀CVLL 항체를 제조하였다. 항체는 중쇄의 C-말단에 14-mer(G₁₀CVLL) 서열을 갖는다(도 9).

[0198] 1-6. 허셉틴-LC-G₁₀CVLL

[0199] 허셉틴-LC-G₁₀CVLL 항체를 제조하였다. 항체는 경쇄의 C-말단에 14-mer(G₁₀CVLL) 서열을 갖는다(도 10).

[0200] 1-7. 항 cMET-HC-G_nCVIM

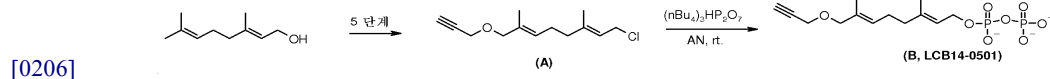
[0201] 항 cMET-HC-G₇CVIM 및 항 cMET-HC-G₁₀CVIM 항체들을 제조하였다. 항체들은 중쇄의 C-말단에 각각 11-mer(G₇CVIM) 또는 14-mer(G₁₀CVIM) 서열을 갖는다(나타내지 않음). 도 11은 항 cMET-HC-G₇CVIM 및 항 cMET-HC-G₁₀CVIM 항체들을 분석하는 SDS-PAGE 겔을 나타낸다.

[0202] 1-8. 항 cMET-LC-G_nCVIM

[0203] 항 cMET-LC-G₇CVIM 및 항 cMET-LC-G₁₀CVIM 항체들을 제조하였다. 항체들은 경쇄의 C-말단에 각각 11-mer(G₇CVIM) 또는 14-mer(G₁₀CVIM) 서열을 갖는다(나타내지 않음). 도 11은 항 cMET-LC-G₇CVIM 및 항 cMET-LC-G₁₀CVIM 항체들을 분석하는 SDS-PAGE 겔을 나타낸다.

[0204] 실시예 2: AB(M)-CAAX의 관능화

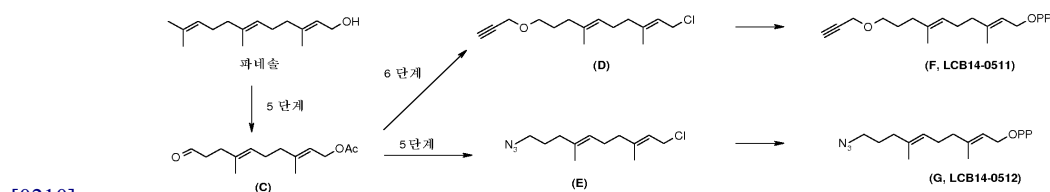
[0205] 2-1. 게라닐 알킨 디포스페이트(B, LCB14-0501)



[0207] 위에서 언급한 화합물을 문헌(참조: ChembioChem 207, 8, 98-105, 이의 내용은 이로써 전체적으로 참조로 인용됨)에 기재된 방법과 유사한 방법에 의하여 출발 물질로서 게라니올을 사용하여 6단계로 제조하였다.

[0208] (B): ¹H NMR (600MHz, D₂O) δ 5.38 (t, J = 7.8Hz, 1H), 5.30 (t, J = 7.8Hz, 1H), 4.31 (brs, 2H), 3.96 (m, 2H), 3.84 (s, 2H), 2.70 (bs, 1H), 2.07 (m, 2H), 1.98 (m, 2H), 1.56 (s, 3H), 1.48 (s, 3H)

[0209] 2-2. 데카디에닐 프로파르길 에테르 디포스페이트(F, LCB14-0511) 및 데카디에닐 아지드 디포스페이트(G, LCB14-0512)



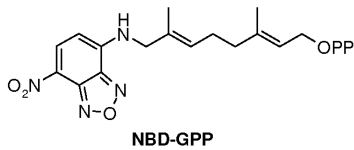
[0211] 아세톡시데카디에닐 알데히드(C)를 파네솔로부터 5단계로 제조하였다. 화합물(C)로부터, 화합물(D) 및 (E)를 각각 6단계 및 5단계로 제조하였다. 화합물(D) 및 (E)로부터, 위에서 언급한 화합물(F) 및 (G)를 위의 2-1 부문에서 기재된 방법과 유사한 방법에 의하여 제조하였다. 화합물(C), (D) 및 (E)를 문헌(참조: JOC 2007, 72(24), 9291-9297, 이의 내용은 이로써 전체적으로 참조로 인용됨)에 기재된 방법과 유사한 방법에 의하여 제조하였다.

[0212] (F): ^1H NMR (600MHz, D_2O) δ 5.44 (t, J = 6Hz, 1H), 5.22 (t, J = 6Hz, 1H), 4.46 (t, J = 8.4Hz, 2H), 4.16 (t, J = 2.4Hz, 2H), 3.55 (m, 2H), 2.85 (m, 1H), 2.15 (m, 2H), 2.09 (t, J = 7.2Hz, 2H), 2.03 (t, J = 7.2Hz, 2H), 1.70-1.65 (m, 5H), 1.60 (s, 3H)

[0213] (G): ^1H NMR (600MHz, D_2O) δ 5.43 (t, J = 6.6Hz, 1H), 5.23 (t, J = 6.6Hz, 1H), 4.40 (t, J = 6Hz, 2H), 3.26 (t, J = 6.0Hz, 2H), 2.15 (m, 2H), 2.10-2.04 (m, 4H), 1.70-1.65(m, 5H), 1.60 (s, 3H)

[0214] 2-3. NBD-GPP

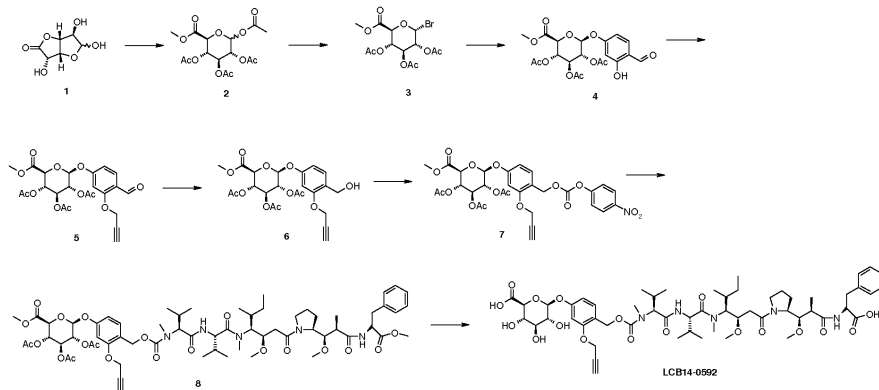
[0215] 트리스-아모늄[3,7-디메틸-8-(7-니트로-벤조[1,2,5]옥사디아졸-4-일아미노)-옥타-2,6-디엔-1]피로포스페이트(NBD-GPP)를 문헌(참조: JACS 2006, 128, 2822-2835, 이의 내용은 이로써 전체적으로 참조로 인용됨)에 기재된 방법과 유사한 방법에 의하여 제조하였다.



[0216] .

[0217] ^1H NMR (600MHz, D_2O) δ 8.51 (d, J = 9Hz, 1H), 6.37 (d, J = 9Hz, 1H), 5.50 (t, J = 6.6Hz, 1H), 5.42 (t, J = 6.6Hz, 1H), 4.43 (t, J = 6.6Hz, 2H), 4.08 (s, 2H), 2.22 (m, 2H), 2.10 (t, J = 7.2Hz, 2H), 1.69 (s, 6H)

[0218] 2-4. 글루쿠로나이드 링커-MMAF(LCB14-0592)



[0219] .

[0220] **화합물 2**

[0221] 질소 대기하에 메탄올(250ml) 중의 D-글루쿠로노-6,3-락톤(19g, 107.88mmol) 용액에 메탄올(100ml) 중의 NaOH(100mg) 용액을 서서히 가하였다. 수득한 혼합물을 2시간 동안 교반하였다. 메탄올(15ml) 중의 NaOH(200mg)의 용액을 가하였다. 수득물을 3시간 동안 교반하였다. 메탄올을 감압하에 제거하였다. 10℃ 이하에서, 피리딘(50ml) 및 아세트산 무수물(Ac_2O , 54ml)을 순차적으로 가하였다. 수득한 혼합물을 실온에서 4시간 동안 교반하였다. 반응을 완료한 후, 수득한 혼합물을 감압하에 농축시키고, 컬럼 크로마토그래피시켜 화합물 2(20g, 50%)를 고체로서 수득하였다.

[0222] ^1H NMR (600MHz, CDCl_3) δ 5.77 (d, J = 7.8Hz, 1H), 5.31 (t, J = 9.6Hz, 1H), 5.24 (t, J = 9.6Hz, 1H), 5.14 (m, 1H), 4.17 (d, J = 9Hz, 1H), 3.74 (s, 3H), 2.12 (s, 3H), 2.04 (m, 9H)

- [0223] 화합물 3
- [0224] 화합물 2(5g, 13.28mmol)를 0℃에서 AcOH(20ml) 중의 33% HBr의 용액에 가하였다. 수득한 혼합물을 실온에서 2시간 동안 교반하였다. 반응을 완료한 후, 수득한 혼합물을 톨루엔(50ml)으로 희석하였다. 수득한 혼합물을 감압하에 농축시켰다. 에틸 아세테이트(100ml) 및 포화 NaHCO₃ 용액(100ml)을 가하여 유기 층을 추출하였다. 이렇게 수득한 유기 층을 무수 황산나트륨으로 건조시켜 화합물 3(5.27g, 100%)을 수득하였다.
- [0225] ¹H NMR (600MHz, CDCl₃) δ 6.64 (d, J= 3.6Hz, 1H), 5.61 (t, J= 3.6Hz, 1H), 5.24 (t, J= 3.6Hz, 1H), 4.85 (m, 1H), 4.58 (d, J= 10.2Hz, 1H), 3.76 (s, 3H), 2.10 (s, 3H), 2.06 (s, 3H), 2.05 (s, 3H)
- [0226] 화합물 4
- [0227] 아세토니트릴(30ml) 중의 화합물 3(4g, 10.07mmol)과 2,4-디하이드록시벤즈알데히드(1.67g, 12.084mmol)의 용액을 분자 씨브(5g) 및 Ag₂O(9.33g, 40.28mmol)로 순차적으로 처리하였다. 수득한 혼합물을 실온에서 3시간 동안 교반하였다. 반응을 완료한 후, 고체를 여과시키고, 여액을 감압하에 농축하였다. 잔사(residue)를 컬럼 크로마토그래피시켜 화합물 4(2g, 43.5%)를 수득하였다.
- [0228] ¹H NMR (400MHz, CDCl₃) δ 11.38 (s, 1H), 9.77 (s, 1H), 7.48 (d, J= 8.4Hz, 1H), 6.61 (dd, J= 8.4, 2.0Hz, 1H), 6.53 (d, J= 2.0Hz, 1H), 5.36-5.25 (m, 4H), 4.23 (m, 1H), 3.73 (s, 1H), 2.06 (s, 9H)
- [0229] 화합물 5
- [0230] 아세톤(10ml) 중의 화합물 4(1g, 2.20mmol)의 용액을 탄산칼륨(760mg, 5.50mmol) 및 톨루엔 중의 80% 프로파르길 브로마이드(735μl, 6.60mmol)로 처리하였다. 수득한 혼합물을 45℃에서 12시간 동안 교반하였다. 반응을 완료한 후, 에틸 아세테이트(100ml) 및 증류수(100ml)를 가하였다. 이렇게 수득한 유기 층을 무수 황산나트륨으로 건조시키고, 감압하에 농축시켰다. 잔사를 컬럼 크로마토그래피시켜 화합물 5(930mg, 87%)를 수득하였다.
- [0231] ¹H NMR (600MHz, CDCl₃) δ 10.33 (s, 1H), 7.83 (d, J= 9Hz, 1H), 6.75 (d, J= 1.8Hz, 1H), 6.67 (dd, J= 9, 1.8Hz, 1H), 5.39-5.34 (m, 2H), 5.31-5.26 (m, 2H), 4.79 (d, J= 2.4Hz, 2H), 4.23 (m, 2H), 3.72 (s, 3H), 2.59 (t, J= 2.4Hz, 1H), 2.07 (s, 3H), 2.06 (s, 3H), 2.05 (s, 3H)
- [0232] 화합물 6
- [0233] 0℃에서 이소프로필 알콜(2ml)과 클로로포름(10ml) 중의 화합물 5(930mg, 1.88mmol)의 용액을 실리카-겔(5g) 및 NaBH₄(178mg, 4.79mmol)로 순차적으로 처리하였다. 수득한 혼합물을 3시간 동안 교반하였다. 반응을 완료한 후, 실리카 겔을 여과시켰다. 반응을 디클로로메탄(100ml) 및 증류수(100ml)로 추출하고, 무수 황산나트륨으로 건조시키고, 진공하에 농축시켰다. 잔사를 컬럼 크로마토그래피시켜 화합물 6(610mg, 65%)을 수득하였다.
- [0234] ¹H NMR (600MHz, CDCl₃) δ 7.23 (d, J= 8.4Hz, 1H), 6.72 (d, J= 2.4Hz, 1H), 6.61 (dd, 8.4, 2.4Hz, 1H), 5.35-5.32 (m, 2H), 5.27 (m, 1H), 5.13 (d, J= 7.8Hz, 1H), 4.72 (d, J= 2.4Hz, 2H), 4.63 (d, J= 5.4Hz, 2H), 4.17 (m, 1H), 3.73 (s, 3H), 2.07 (s, 3H), 2.05 (s, 3H), 2.04 (s, 3H)
- [0235] 화합물 7
- [0236] 디메틸포름아미드(0.5ml) 중의 화합물 6(250mg, 0.50mmol)의 용액을 비스(4-니트로페닐)카보네이트(308mg, 100mmol) 및 디이소프로필에틸아민(DIPEA, 132μl, 0.75mmol)으로 처리하였다. 수득한 혼합물을 실온에서 3시간 동안 교반하였다. 반응을 완료한 후, 반응을 감압하에 농축시켰다. 잔사를 컬럼 크로마토그래피시켜 화합물

7(310mg, 94%)을 수득하였다.

[0237] ^1H NMR (600MHz, CDCl_3) δ 8.26 (d, J= 9Hz, 2H), 7.37 (d, J= 9Hz, 2H), 7.34 (d, J= 8.4Hz, 1H), 6.77 (d, J= 1.8Hz, 1H), 6.64 (dd, 7.8, 2.4Hz, 1H), 5.37-5.33 (m, 2H), 5.30-5.27 (m, 3H), 5.17 (d, J= 7.2Hz, 1H), 4.74 (d, J= 2.4Hz, 2H), 4.18 (m, 1H), 3.74 (s, 3H), 2.54 (t, J= 2.4Hz, 1H), 2.07 (s, 3H), 2.05 (s, 3H), 2.04 (s, 3H)

[0238] 화합물 8

[0239] 디메틸포름아미드(3ml) 중의 화합물 7(150mg, 0.227mmol), MMAF-OMe(169.6mg, 0.227mmol) 및 무수 1-하이드록시벤조트리아졸(HOBt, 6.2mg, 0.0454mmol)의 용액에 피리딘(0.8ml) 및 디이소프로필에틸아민($40\mu\text{l}$, 0.227mmol)을 가하였다. 수득한 혼합물을 실온에서 12시간 동안 교반하였다. 반응을 완료한 후, 에틸 아세테이트(100ml) 및 증류수(100ml)를 가하였다. 이렇게 수득한 유기 층을 무수 황산나트륨으로 건조시키고, 감압하에 농축시켰다. 잔사를 컬럼 크로마토그래피시켜 화합물 8(146mg, 50%)을 수득하였다.

[0240] EI-MS m/z: 1067(M^+)

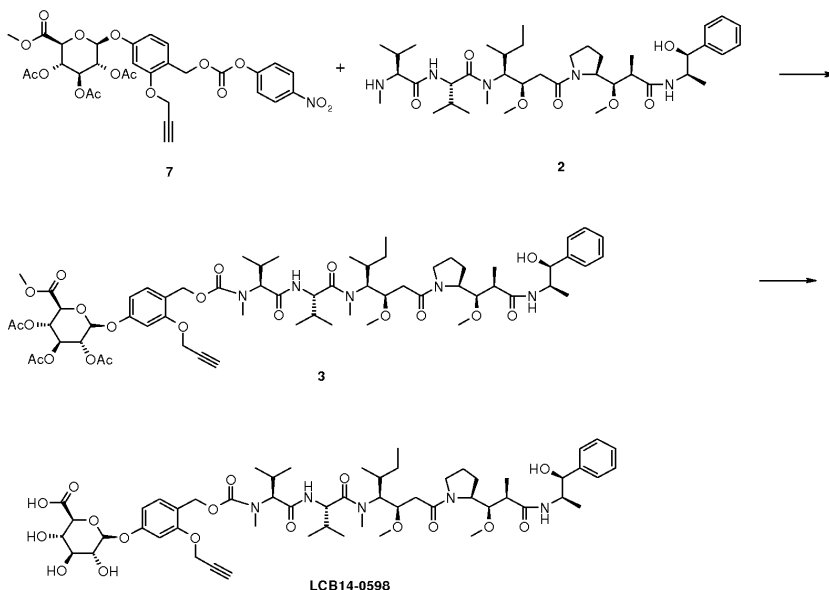
[0241] MMAF-OMe를 US 제61/483,698호, 문헌[ChemPharmBuU, 1995, 43(10), 1706-1718], US 제7423116호, US 제7498298호 및 제W02002/088172호(이들의 내용은 이로써 전체적으로 참조로 인용됨)에 기재된 방법에 따라 제조하였다.

[0242] LCB14-0592

[0243] 메탄올(2ml) 중의 화합물 8(85mg, 0.067mmol)의 용액을 증류수(1ml) 중의 LiBH_4 (28.2mg, 0.670mmol)의 용액으로 0°C에서 처리하였다. 수득한 혼합물을 실온에서 3시간 동안 교반하였다. 반응을 완료한 후, 메탄올을 감압하에 제거하였다. 잔사를 증류수(50ml)에 용해시키고, 아세트산을 사용하여 pH=3으로 산성화시켰다. 반응을 디클로로메탄($3 \times 50\text{ml}$)으로 3회 추출하였다. 합한 유기 층을 감압하에 농축시켜 고체를 수득하고 이를 디에틸에테르(50ml)로 세척하여 화합물 LCB14-0592(62mg, 83%)을 수득하였다.

[0244] EI-MS m/z: 1112(M^+)

[0245] 2-5. 글루쿠로나이드 링커-MMAE (LCB14-0598)



[0246]

[0247] 화합물 3

[0248] 디메틸포름아미드(3ml) 중의 실시예 2-4의 화합물 7(150mg, 0.227mmol), MMAE(163mg, 0.227mmol; ChemPharmBuU, 1995, 43(10), 1706-1718, US7423116, W02002/088172) 및 무수 1-하이드록시벤조트리아졸(HOBT, 6.2mg, 0.0454mmol)의 용액을 피리딘(0.8ml) 및 디이소프로필에틸아민(40 μ l, 0.227mmol)으로 처리하였다. 수득한 혼합물을 실온에서 24시간 동안 교반하였다. 반응을 완료한 후, 수득한 혼합물을 에틸 아세테이트(100 ml), 0.5N HCl(10ml) 및 증류수(100ml)로 희석시켰다. 이렇게 수득한 유기 층을 무수 황산나트륨으로 건조시키고, 감압하에 농축시켰다. 잔사를 컬럼 크로마토그래피시켜 화합물 3(30mg, 10%)을 수득하였다.

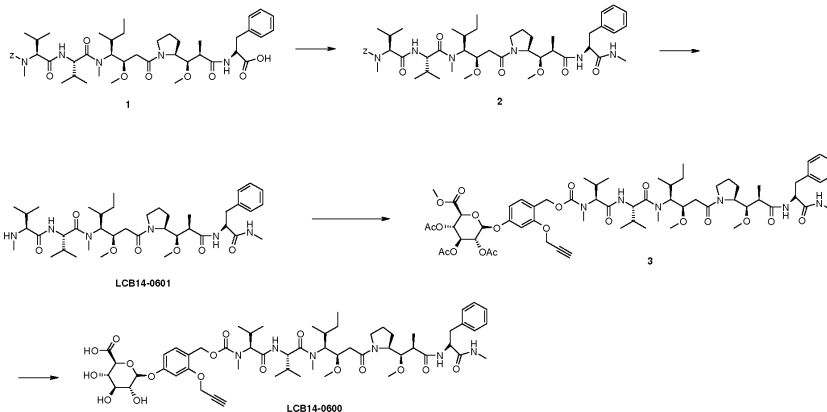
[0249] EI-MS m/z: 1238(M⁺)

[0250] LCB14-0598

[0251] 메탄올(3ml) 중의 화합물 3(30mg, 0.024mmol)의 용액을 0°C에서 증류수(0.5ml) 중의 LiOH(10mg, 0.24mmol)로 처리하였다. 수득한 혼합물을 실온에서 3시간 동안 교반하였다. 반응을 완료한 후, 유기 용매를 감압하에 제거하였다. 수득한 생성물을 증류수(50ml)로 희석하고, 0.5N HCl을 사용하여 pH = 3으로 산성화시켰다. 디클로로메탄(50ml)으로 추출한 다음, 감압하에 농축시켜 화합물 LCB14-0598(21mg, 79%)을 수득하였다.

[0252] EI-MS m/z: 1098(M⁺)

[0253] 2-6. 글루쿠로나이드 링커-MMAF-메틸 아미드(LCB14-0600)



[0254]

[0255] 화합물 2

[0256] 디메틸포름아미드(5ml) 중의 화합물 1(Z-MMAF, 558mg, 0.644mmol, ChemPharmBull, 1995, 43(10), 1706-1718)의 용액을 메틸아민 하이드로클로라이드(130mg, 1.932mmol), 디에틸시아노포스포네이트(DEPC, 144mg, 0.966mmol) 및 트리에틸아민(270 μ l, 1.932mmol)으로 처리하였다. 수득한 혼합물을 실온에서 12시간 동안 교반하였다. 반응을 완료한 후, 에틸 아세테이트(100ml) 및 증류수(100ml)를 가하였다. 이렇게 수득한 유기 층을 무수 황산나트륨으로 건조시키고, 감압하에 농축시켰다. 잔사를 컬럼 크로마토그래피시켜 화합물 2(490mg, 86%)를 수득하였다.

[0257] EI-MS m/z: 879(M⁺)

[0258] LCB14-0601(MMAF-메틸 아미드)

[0259] 화합물 2(470mg, 0.53mM)를 3급 부탄올(^tBuOH, 8ml) 및 증류수(0.8ml)에 용해시켰다. 0°C에서 10% Pd/C(50mg)

를 가하였다. 수득한 혼합물을 H₂ 기체 중에서 2시간 동안 교반하였다. 반응을 완료한 후, Pd/C를 셀라이트를 사용하여 여과시켰다. 수득한 여과 용액을 감압하에 농축시켜 화합물 LCB14-0601(340mg, 85%)을 수득하였다.

[0260] EI-MS m/z: 745(M⁺)

[0261] 화합물 3

[0262] 디메틸아미드(3ml) 중의 실시예 2-4의 화합물 7(133mg, 0.20mmol), LCB14-601(150mg, 0.20mmol) 및 무수 1-하이드록시벤조트리아졸(HOBt, 5.44mg, 0.04mmol)의 용액을 피리딘(0.8ml) 및 디이소프로필에틸아민(DIPEA, 35μl, 0.20mmol)으로 처리하였다. 수득한 혼합물을 실온에서 12시간 동안 교반하였다. 반응을 완료한 후, 에틸 아세테이트(100ml) 및 0.5N HCl 용액(50ml)을 가하였다. 이렇게 수득한 유기 층을 무수 황산나트륨으로 건조시키고, 감압하에 농축시켰다. 잔사를 컬럼 크로마토그래피시켜 화합물 3(123mg, 48%)을 수득하였다.

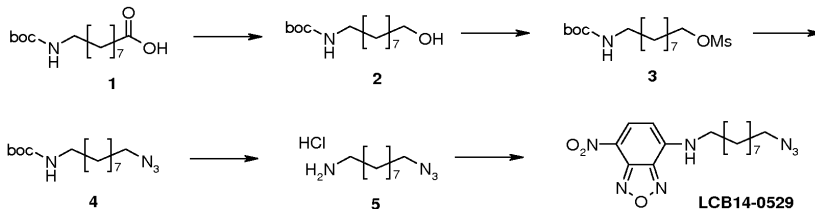
[0263] EI-MS m/z: 1265(M⁺)

[0264] LCB14-0600(글루쿠로나이드 링커-MMAF-메틸 아미드)

[0265] 메탄올(3ml) 중의 화합물 3(60mg, 0.047mmol)의 용액을 0℃에서 증류수(0.5ml) 중의 LiOH(20mg, 0.47mmol)로 처리하였다. 수득한 혼합물을 실온에서 2시간 동안 교반하였다. 반응을 완료한 후, 유기 용매를 감압하에 제거하였다. 잔사를 증류수(50ml)로 희석시키고, 0.5N HCl을 사용하여 pH = 3으로 산성화시켰다. 디클로로메탄(50ml)으로 추출한 다음 농축시켜 화합물 LCB14-0600(25mg, 47%)을 수득하였다.

[0266] EI-MS m/z: 1125(M⁺)

[0267] 2-7. 아지드-링커-NBD: LCB14-0529



[0268]

[0269] 화합물 2

[0270] 테트라하이드로푸란(30ml) 중의 화합물 1(4g, 12.67mmol)과 N-메틸모르폴린(1.6ml, 14.57mmol)의 용액을 -15℃에서 질소 대기하에 이소부틸클로로포르메이트(1.8ml, 13.94mmol)로 서서히 처리하였다. 수득한 혼합물을 동일한 온도에서 30분 동안 교반하였다. 수득한 혼합물을 -78℃에서 테트라하이드로푸란/메탄올(36ml/12ml) 중의 붕수소화나트륨(959mg, 25.34mmol)의 용액으로 효율적으로 교반하면서 여과-부가하였다. 수득물을 실온으로 서서히 가온시키는 한편, 2시간 동안 교반하였다. 반응을 완료한 후, 아세트산(4ml)을 가하고, 15분 동안 교반하였다. 에틸 아세테이트(100ml) 및 증류수(100ml)를 가하였다. 이렇게 수득한 유기 층을 무수 황산나트륨으로 건조시키고, 감압하에 농축시켰다. 잔사를 컬럼 크로마토그래피시켜 화합물 2(3.69g, 96.5%)를 수득하였다.

[0271] ¹H NMR (600MHz, CDC₃) δ 4.50 (s, 1H), 3.64 (q, J = 6.6Hz, 2H), 3.11 (m, 2H), 1.56 (m, 2H), 1.44 (m, 11H), 1.29 (m, 10H)

[0272] 화합물 3

[0273] 테트라하이드로푸란(5ml) 중의 화합물 2(450mg, 1.73mmol)와 N-메틸모르폴린(381μl, 3.46mmol)의 용액을 0℃에

서 질소 대기하에 메탄설폰산 무수물(363mg, 2.07mmol)로 서서히 처리하였다. 수득한 혼합물을 서서히 실온으로 가온시키는 한편, 1시간 동안 교반하였다. 반응을 완료한 후, 에틸 아세테이트(50ml) 및 증류수(50ml)를 가하였다. 이렇게 수득한 유기 층을 무수 황산나트륨으로 건조시키고, 감압하에 농축시켰다. 잔사를 컬럼 크로마토그래피시켜 화합물 3을 백색 고체(520mg, 89%)로서 수득하였다.

[0274] $^1\text{H NMR}$ (600MHz, CDCl_3) δ 4.50 (s, 1H), 4.22 (t, J= 6.6Hz, 2H), 3.11 (m, 2H), 3.01 (s, 3H), 1.74 (m, 2H), 1.44-1.36 (m, 13H), 1.29 (m, 8H)

[0275] 화합물 4

[0276] 디메틸포름아미드(5ml) 중의 화합물 3(520mg, 1.54mmol)의 용액을 질소 대기하에 나트륨 아지드(120mg, 1.85mmol)로 처리하고, 수득한 혼합물을 70°C에서 3시간 동안 교반하였다. 반응을 완료한 후, 에틸 아세테이트(50ml) 및 증류수(50ml)를 가하였다. 이렇게 수득한 유기 층을 무수 황산나트륨으로 건조시키고, 감압하에 농축시켜 액체 형태의 화합물 4(430mg, 98%)를 수득하였다.

[0277] $^1\text{H NMR}$ (600MHz, CDCl_3) δ 4.49 (s, 1H), 3.26 (t, J= 6.9Hz, 2H), 3.09-3.12 (m, 2H), 1.59 (m, 2H), 1.44 (m, 11H), 1.33 (m, 10H)

[0278] 화합물 5

[0279] 디클로로메탄(6ml) 중의 화합물 4(430mg, 1.51mmol)의 용액을 0°C에서 질소 대기하에 1,4-디옥산(4ml) 중의 4M-HCl로 처리하였다. 수득한 혼합물을 3시간 동안 교반하고, 감압하에 농축시켜 화합물 5(330mg, 99%)를 수득하였다.

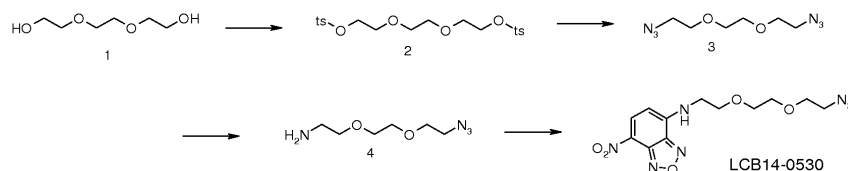
[0280] $^1\text{H NMR}$ (600MHz, CDCl_3) δ 8.29 (s, 2H), 3.26 (t, J= 6.9Hz, 2H), 2.98 (m, 2H), 1.46 (m, 2H), 1.59 (m, 2H), 1.31-1.39 (m, 10H)

[0281] LCB14-0529

[0282] 아세토니트릴과 25mmol 중탄산나트륨의 혼합 용매(10ml) 중의 화합물 5(326mg, 1.47mmol)의 용액을 4-클로로-7-니트로벤조푸라잔(442mg, 2.20mmol)으로 처리하였다. 수득한 혼합물을 실온에서 3시간 동안 교반하였다. 에틸 아세테이트(50ml) 및 증류수(50ml)를 가하였다. 이렇게 수득한 유기 층을 무수 황산나트륨으로 건조시키고, 감압하에 농축시켰다. 잔사를 컬럼 크로마토그래피시켜 화합물 LCB14-0529(250mg, 49%)를 수득하였다.

[0283] $^1\text{H NMR}$ (600MHz, CDCl_3) δ 8.48 (d, J= 8.4Hz, 1H), 6.16 (d, 8.4Hz, 1H), 3.47 (q, 6.6Hz, 2H), 3.24 (t, 6.9Hz, 2H), 1.79 (m, 2H), 1.59 (m, 2H), 1.42-1.48 (m, 2H), 1.20-1.37 (m, 8H)

[0284] 2-8. 아지드-링커-NBD: LCB14-0530



[0285]

[0286] 화합물 2

[0287] 디클로로메탄(30ml) 중의 트리(에틸렌)글리콜(5g, 33.29mmol)의 용액을 0°C에서 질소하에 p-톨루엔설포닐 클로라이드(13.96g, 73.24mmol) 및 수산화칼륨(8.96g, 159.79mmol)으로 처리하였다. 수득한 혼합물을 0°C에서 3시

간 동안 교반하였다. 에틸 아세테이트(100ml) 및 증류수(100ml)를 가하였다. 이렇게 수득한 유기 층을 무수 황산나트륨으로 건조시키고, 감압하에 농축시켰다. 잔사를 컬럼 크로마토그래피시켜 화합물 2(13.2g, 86.5%)를 백색 고체로서 수득하였다.

[0288] $^1\text{H NMR}$ (600MHz, CDCl_3) δ 7.79 (m, 4H), 7.35 (m, 4H), 4.14 (m, 4H), 3.65 (m, 4H), 3.53 (s, 4H), 2.44 (s, 6H)

[0289] 화합물 3

[0290] 디메틸포름아미드(20ml) 중의 화합물 2(4.5g, 9.81mmol)의 용액을 질소 대기하에 나트륨 아지드(1.6g, 24.52mmol)로 처리하였다. 수득한 혼합물을 65°C에서 10시간 동안 교반하였다. 에틸 아세테이트(100ml) 및 증류수(100ml)를 가하였다. 이렇게 수득한 유기 층을 무수 황산나트륨으로 건조시키고, 감압하에 농축시켰다. 잔사를 컬럼 크로마토그래피시켜 화합물 3(1.96g, 99%)을 수득하였다.

[0291] $^1\text{H NMR}$ (600MHz, CDCl_3) δ 3.68-3.66 (m, 8H), 3.37 (t, J=4.8Hz, 4H)

[0292] 화합물 4

[0293] 디에틸에테르, 테트라하이드로푸란 및 1N HCl(V:V:V=3:0.6:3)의 혼합 용매 6.6ml 중의 화합물 3(500mg, 2.49mmol)의 용액. 디에틸에테르(3.5ml) 중의 트리페닐포스핀(655mg, 2.49mmol) 용액을 5분에 걸쳐 서서히 가하였다. 수득한 혼합물을 실온에서 5시간 동안 교반하였다. 수득한 혼합물을 에틸 아세테이트(50ml) 및 증류수(50ml)로 희석하고, 1N NaOH 용액으로 중화시켰다. 이렇게 수득한 유기 층을 무수 황산나트륨으로 건조시키고, 감압하에 농축시켰다. 잔사를 컬럼 크로마토그래피시켜 화합물 4(370mg, 85%)를 수득하였다.

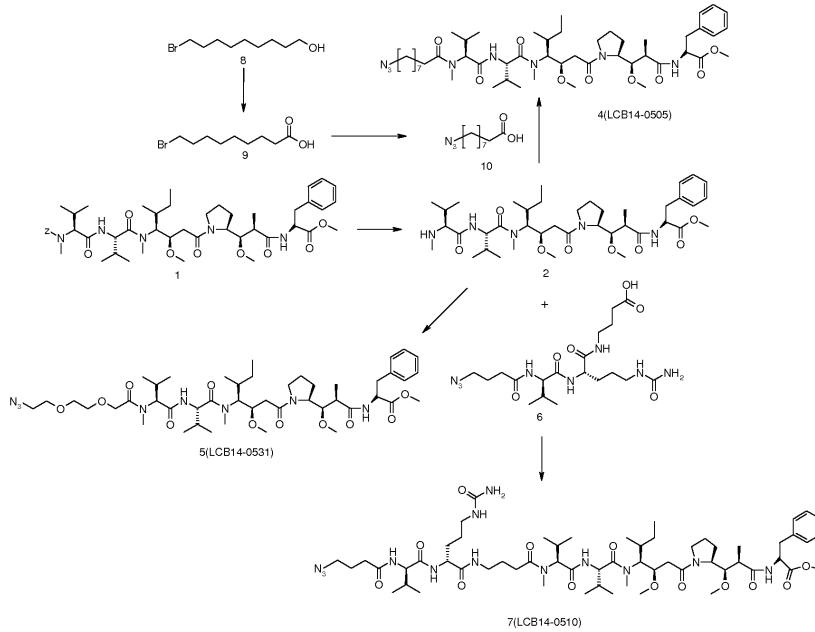
[0294] $^1\text{H NMR}$ (600MHz, CDCl_3) δ 3.69-3.63 (m, 6H), 3.52 (t, J=5.1Hz, 2H), 3.40 (t, J=4.8Hz, 2H), 2.87 (t, J=5.1Hz, 2H)

[0295] LCB14-0530

[0296] 테트라하이드로푸란(4ml) 중의 화합물 4(200mg, 1.14mmol)의 용액을 트리에틸아민(320 μl , 2.28mmol) 및 테트라하이드로푸란(1ml) 중의 4-클로로-7-니트로벤조푸라잔(442mg, 2.20mmol)의 용액으로 순차적으로 처리하였다. 수득한 혼합물을 실온에서 1시간 동안 교반하였다. 에틸 아세테이트(50ml) 및 증류수(50ml)를 가하였다. 이렇게 수득한 유기 층을 무수 황산나트륨으로 건조시키고, 감압하에 농축시켰다. 잔사를 컬럼 크로마토그래피시켜 화합물 LCB14-0530(305mg, 78.8%)을 수득하였다.

[0297] $^1\text{H NMR}$ (600MHz, CDCl_3) δ 8.47 (d, J=8.4Hz, 1H), 6.75 (s, 1H), 6.17 (d, J=8.4Hz, 1H), 3.86 (t, J=4.8Hz, 2H), 3.66-3.73 (m, 8H), 3.41 (t, J=4.8Hz, 2H)

[0298] 2-9. 아지드-링커-약물: LCB14-0505, -0531 및 -0510



[0299]

[0300] 화합물 2

[0301] 문헌(참조: ChemPharmBuU, 1995, 43(10), 1706-1718, 이의 내용은 이로써 전체적으로 참조로 인용됨)에 기재된 방법을 참조하여 화합물 1을 제조하였다. 3급 부탄올(6ml)과 물(0.6ml) 중의 화합물 1(0.50g, 0.57mmol)의 용액을 수소 대기하에 Pd/C(6mg, 0.06mmol)와 4시간 동안 교반하였다. 수득한 용액을 셀라이트 패드를 통하여 여과시키고, 여액을 감압하에 농축시켜 화합물 2(0.42g)를 백색 고체로서 수득하였다.

[0302] EI-MS m/z: 747(M⁺)

[0303] 화합물 9

[0304] 삼산화크롬(CrO₃, 7g, 0.07mol)을 0°C에서 증류수(10ml)에 용해시켰다. 당해 용액에 18M-H₂SO₄(6.1ml, 0.11mol) 및 증류수(20ml)를 순차적으로 가하였다. 수득한 혼합물을 5분 동안 교반하였다(= 존스 시약). 아세트톤(250ml) 중의 9-브로모-1-노난올(5g, 22.4mmol)을 -5°C에서 존스 시약(18ml)으로 서서히 처리하였다. 수득한 혼합물을 실온에서 3시간 동안 교반한 후, 녹색을 띠는 고체를 여과시키고, 여액을 농축시켰다. 잔사를 디에틸 에테르(100ml) 및 물(50ml)로 추출하였다. 유기 추출물을 무수 Na₂SO₄로 건조시키고, 여과하고, 진공하에 농축시켰다. 잔사를 섬광 컬럼 크로마토그래피시켜 화합물 9(4.95g, 93%)를 수득하였다.

[0305] ¹H NMR (600MHz, CDCl₃) δ 3.40 (t, J= 6.6Hz, 2H), 2.35 (t, J= 7.2Hz, 2H), 1.85 (m, 2H), 1.62 (m, 2H), 1.41 (m, 2H), 1.32 (m, 6H)

[0306] 화합물 10

[0307] N,N-디메틸포름아미드(15ml) 중의 화합물 9(4g, 16.86mmol)의 용액을 나트륨 아지드(1.64g, 25.29mmol)로 처리하였다. 수득한 혼합물을 교반하면서 80°C로 6시간 동안 가열하였다. 반응을 완료한 후, 에틸 아세테이트(100ml) 및 증류수(100ml)를 가하였다. 이렇게 수득한 유기 층을 분리하고, 무수 Na₂SO₄로 건조시키고, 여과하고, 진공하에 농축시켰다. 잔사를 섬광 컬럼 크로마토그래피시켜 화합물 10(3.3g, 98%)을 수득하였다.

[0308] ¹H NMR (600MHz, CDCl₃) δ 3.26 (t, J=7.2Hz, 2H), 2.35 (t, J=7.2Hz, 2H), 1.64-1.57 (m, 4H), 1.35-1.32

(m, 8H)

[0309] LCB14-0505

[0310] 메틸렌클로라이드(3ml) 중의 화합물 2(0.16g, 0.21mmol)와 9-아지도-노난산(10)(47mg, 0.24mmol)의 용액을 0℃에서 DIPEA(0.06ml, 0.32mmol) 및 PyBOP(0.15g, 0.28mmol)로 처리하였다. 수득한 용액을 3시간 동안 교반하였다. 수득한 혼합물을 메틸렌클로라이드(100ml) 및 물(20ml)로 추출하였다. 이렇게 수득한 유기 층을 감압하에 농축시켰다. 잔사를 에틸 아세테이트 및 헥산으로 컬럼 크로마토그래피시켜 화합물 LCB14-0505(0.12g, 59%)를 백색 고체로서 수득하였다.

[0311] EI-MS m/z: 928(M⁺)

[0312] LCB14-0531

[0313] 위에서 기재한 방법과 유사한 방법으로 화합물 LCB14-0531(65%)을 제조하였다.

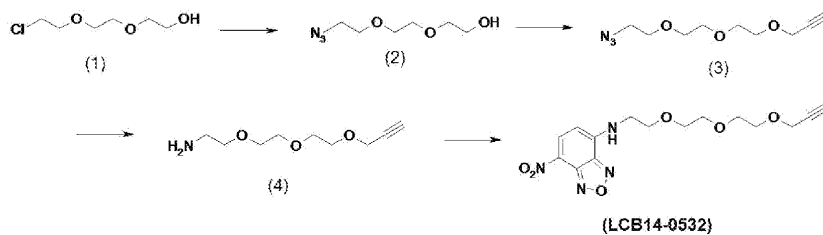
[0314] EI-MS m/z: 917(M⁺)

[0315] LCB14-0510

[0316] 문헌(참조: BioconjugateChem. 2002, 13, 855-869 and US2005238649, 이의 내용은 이로써 전체적으로 참조로 인용된다)에 기재된 방법을 사용하여 화합물 6을 제조하였다. DMF(2ml) 중의 화합물 6(69mg, 0.15mmol) 및 화합물 2(100mg, 0.13mmol)의 용액을 0℃에서 DIPEA(0.04ml, 0.2mmol) 및 PyBOP(0.09g, 0.17mmol)로 처리하였다. 수득한 혼합물을 3시간 동안 교반하였다. 에틸 아세테이트(100ml) 및 물(30ml)을 사용하여 유기 층을 추출하고, 이를 감압하에 농축시켰다. 잔사를 메틸렌클로라이드 및 메탄올로 컬럼 크로마토그래피시켜 화합물 LCB14-0510(94mg, 64%)을 갈색 고체로서 수득하였다.

[0317] EI-MS m/z: 1199(M⁺)

[0318] 2-10. 아세틸렌-링커-NBD: LCB14-0532



[0319]

[0320] 화합물 2

[0321] 디메틸포름아미드 10ml 중의 화합물 1(1g, 5.93mmol)의 용액을 질소 대기하에 나트륨 아지드(578mg, 8.89mmol)로 처리하였다. 수득한 혼합물을 80℃에서 3시간 동안 교반하였다. 반응을 완료한 후, 에틸 아세테이트(50ml) 및 증류수(50ml)를 가하였다. 이렇게 수득한 유기 층을 무수 황산나트륨으로 건조시키고, 감압하에 농축시켜 화합물 2(1.03g, 99%)를 수득하였다.

[0322] ¹H NMR (600MHz, CDCl₃) δ 3.75 (m, 2H), 3.69 (m, 6H), 3.62 (m, 2H), 3.41 (t, J=3.5Hz, 2H), 2.30 (m, 1H)

[0323] 화합물 3

[0324] 0℃에서 테트라하이드로푸란(10ml) 중의 수소화나트륨(광유중 55%, 250mg, 5.7mmol)의 현탁액에 테트라하이드로푸란(5ml) 중의 화합물 2(500mg, 2.85mmol)의 용액을 가하였다. 수득한 혼합물을 1시간 동안 교반하였다. 수득한 혼합물을 이어서 실온으로 가온시키고, 2시간 동안 교반하였다. 프로파르길 브로마이드(톨루엔 중의 80%, 800 μ l, 7.12mmol)를 가하고, 수득한 혼합물을 실온에서 12시간 동안 교반하였다. 염화암모늄 용액(20ml) 및 디에틸에테르(30ml)를 가하였다. 이렇게 수득한 유기 층을 무수 황산나트륨으로 건조시키고, 감압하에 농축시켜 화합물 3(530mg, 86.6%)을 수득하였다.

[0325] ^1H NMR (600MHz, CDCl_3) δ 4.21 (d, J=2.4Hz, 2H), 3.66-3.72 (m, 10H), 3.39 (t, J=5.1Hz, 2H), 2.43 (t, J=2.4Hz, 1H)

[0326] 화합물 4

[0327] 테트라하이드로푸란과 증류수(V:V=2:1)의 혼합 용액 3ml 중의 화합물 3(250mg, 1.17mmol)의 용액을 5분에 걸쳐 테트라하이드로푸란(1ml) 중의 트리페닐 포스핀(461mg, 1.75mmol)으로 서서히 처리하였다. 수득한 혼합물을 실온에서 교반하였다. 반응을 완료한 후, 디에틸에테르(30ml) 및 증류수(30ml)를 가하였다. 수득한 혼합물을 1N HCl로 산성화시키고, 유기 층을 분리하였다. 수성 층을 디클로로메탄(50ml)으로 희석하고, 1N NaOH 용액으로 중화시켰다. 이렇게 수득한 유기 층을 분리하고, 무수 황산나트륨으로 건조시키고, 감압하에 농축시켜 화합물 4(200mg, 91.3%)를 얻은 황색으로 수득하였다.

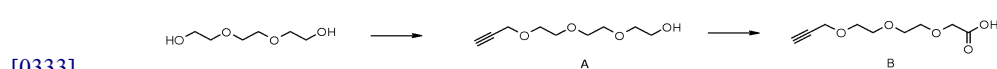
[0328] ^1H NMR (600MHz, CDCl_3) δ 4.18 (d, J= 2.4Hz, 2H), 3.59-3.69 (m, 8H), 3.48 (t, J=5.4Hz, 2H), 2.84 (s, 2H), 2.40 (m, 1H)

[0329] LCB14-0532

[0330] 테트라하이드로푸란(4ml) 중의 화합물 4(195mg, 1.04mmol)의 용액을 트리에틸아민(290 μ l, 2.08mmol)으로 처리하였다. 테트라하이드로푸란(1ml) 중의 4-클로로-7-니트로벤조푸라잔(270mg, 1.35mmol)을 가하였다. 수득한 혼합물을 실온에서 1시간 동안 교반하였다. 에틸 아세테이트(50ml) 및 증류수(50ml)를 가하였다. 이렇게 수득한 유기 층을 무수 황산나트륨으로 건조시키고, 감압하에 농축시켜 화합물 LCB14-0532(280mg, 77%)을 수득하였다.

[0331] ^1H NMR (600MHz, CDCl_3) δ 8.50 (d, J= 8.4Hz, 1H), 6.99 (s, 1H), 6.19 (d, J=8.4Hz, 1H), 4.19 (d, J=2.4Hz, 2H), 3.89 (t, J=5.1Hz, 2H), 3.68-3.75 (m, 10H), 2.41 (t, J=2.4Hz, 1H)

[0332] 2-11. 아세틸렌-링커-MMAF-OMe(LCB14-0536)



[0334] 화합물 A

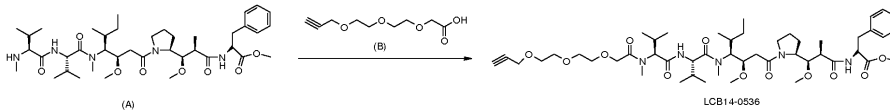
[0335] 0℃에서 질소 대기하에 테트라하이드로푸란(10ml) 중의 NaH(광유중 55%, 390mg, 16.25mmol)의 현탁액에 테트라하이드로푸란(20ml) 중의 트리에틸렌 글리콜(4g, 26.63mmol)의 용액을 서서히 가하였다. 톨루엔(1.97g, 13.31mmol) 중의 80% 프로파르길 브로마이드를 서서히 가하였다. 수득한 혼합물을 동일한 온도에서 2시간 동안 교반하였다. 반응을 완료한 후, 디클로로메탄(100ml) 및 물(100ml)을 가하였다. 이렇게 수득한 유기 층을 농축시키고, 잔사를 컬럼 크로마토그래피시켜 수성 형태의 화합물(A)(1g, 43%)을 수득하였다.

[0336] ^1H NMR (600MHz, CDCl_3) δ 4.21-4.20 (m, 2H), 3.74-3.66 (m, 10H), 3.62-3.61 (m, 2H), 2.43 (t, J=2.4Hz, 1H)

[0337] 화합물 B

[0338] -5℃에서 질소 대기하에 아세톤 중의 화합물 A(1g, 5.31mmol)의 용액에 존스 시약 5.3ml를 서서히 가하였다. 수득한 혼합물을, 실온으로 서서히 가온시키는 한편, 3시간 동안 교반하였다. 반응을 완료한 후, 에틸 아세테이트(100ml) 및 물(100ml)을 가하였다. 이렇게 수득한 유기 층을 농축시켜 화합물(B)(886mg, 82%)를 황색 액체로서 수득하였다.

[0339] ¹H NMR (600MHz, CDCl₃) δ 4.21 (d, J=2.4, 2H), 4.18-4.17 (m, 2H), 3.78-3.77 (m, 2H), 3.74-3.70 (m, 6H), 2.44(t, J=2.4Hz, 1H)



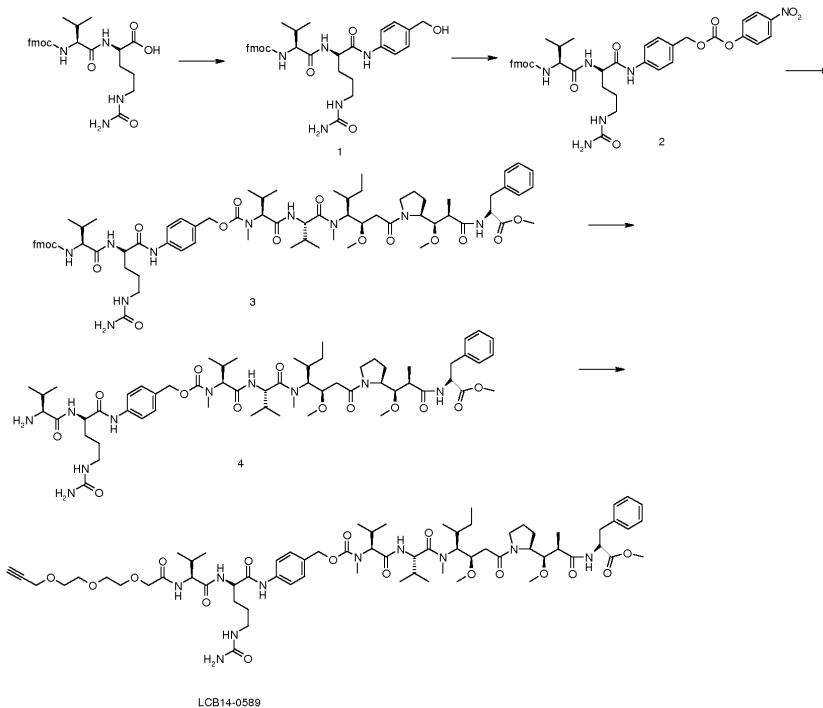
[0340]

[0341] LCB14-0536

[0342] 실온에서 아세트니트릴(2ml) 중의 화합물(A)(MMAF-OMe, 100mg, 0.13mmol)의 용액에 화합물(B)(27mg, 0.13mmol), PyBOP(104mg, 0.19mmol) 및 DIPEA(0.03ml, 0.19mmol)를 가하였다. 수득한 혼합물을 12시간 동안 교반하였다. 반응을 완료한 후, 에틸 아세테이트(50ml) 및 물(20ml)을 가하였다. 이렇게 수득한 유기 층을 감압하에 농축시켰다. 잔사를 디클로로메탄 및 메탄올로 컬럼 크로마토그래피시켜 화합물 LCB14-0536(82mg, 68%)을 황색 고체로서 수득하였다.

[0343] EI-MS m/z: 930(M⁺)

[0344] 2-12. 아세틸렌-링커(펩티드 서열)-MMAF-OMe (LCB14-0589)



[0345]

[0346] 화합물 1(Fmoc-Val-Cit-PAB)

[0347] 제W02007/008603호(이의 내용은 이로써 전체적으로 참조로 인용됨)에 기재된 방법에 따라 Fmoc-Val-Cit-OH를 제조하였다. 질소 대기하에 디클로로메탄(50ml)과 메탄올(20ml) 중의 Fmoc-Val-Cit-OH(4.89g, 9.85mmol)의 용액

에 파라-아미노벤질알콜(2.43g, 19.70mmol) 및 1-에톡시카보닐-2-에톡시-1,2-디하이드로퀴놀린(1.98g, 19.7mmol)을 가하였다. 수득한 혼합물을 실온에서 12시간 동안 교반하였다. 반응을 완료한 후, 용매를 농축시켰다. 수득한 고체를 디에틸에테르로 다수회 세척하여 화합물 1(4.12g, 70%)을 황색 고체로서 수득하였다.

[0348] ^1H NMR (600MHz, DMSO- d_6) δ 10.00 (s, 1H), 8.12 (d, J=7.8Hz, 1H), 7.89 (d, J=7.8Hz, 2H), 7.75-7.72 (m, 2H), 7.55(d, J=7.8Hz, 2H), 7.44-7.41 (m, 2H), 7.33-7.31(m, 2H), 7.23(d, J=8.4Hz, 2H), 6.02(bs, 1H), 5.41-5.38(m, 2H), 5.09(bs, 1H), 4.42(bs, 2H), 4.30-4.28(m, 1H), 4.24-4.23(m, 2H), 3.94-3.91(m, 1H), 3.02-2.99(m, 1H), 2.94-2.93(m, 1H), 2.00-1.99(m, 1H), 1.7(bs, 1H), 1.60(bs, 1H), 1.43(bs, 1H), 1.36(bs, 1H), 0.88-0.84(m, 6H)

[0349] 화합물 2(Fmoc-Val-Cit-PABC-PNA)

[0350] DMF(8ml) 중의 화합물 1(2g, 3.32mmol)의 용액을 질소 대기하에 비스(4-니트로페닐)카보네이트(2.02g, 6.64mmol) 및 디이소프로필에틸아민(0.647ml, 4.98mmol)으로 순차적으로 처리하였다. 수득한 혼합물을 실온에서 12시간 동안 교반하였다. 반응을 완료한 후, 디에틸 에테르를 응고를 위하여 가하였다. 수득한 고체를 디에틸에테르 및 물로 다수회 세척하여 화합물 2(1.52g, 60%)를 황색 고체로서 수득하였다.

[0351] ^1H NMR (600MHz, DMSO- d_6) δ 10.19 (s, 1H), 8.31 (d, J=9.6Hz, 2H), 8.15 (d, J=7.8Hz, 1H), 7.89 (d, J=7.2Hz, 2H), 7.75-7.72(m, 2H), 7.66(d, J=8.4Hz, 2H), 7.57(d, J=9.0Hz, 2H), 7.43-7.39(m, 4H), 7.32(t, J=7.2Hz, 2H), 6.05-6.04(m, 1H), 5.42(m, 2H), 5.24(s, 2H), 4.42(m, 1H), 4.30-4.28(m, 1H), 4.25-4.23(m, 2H), 3.94-3.91(m, 1H), 3.01-3.00(m, 1H), 2.96-2.94(m, 1H), 2.00-1.99(m, 1H), 1.70(m, 1H), 1.59(m, 1H), 1.45(m, 1H), 1.37(m, 1H), 0.89-0.83(m, 6H).

[0352] EI-MS m/z: 767(M^+)

[0353] 화합물 3(Fmoc-Val-Cit-PABC-MMAF-OMe)

[0354] DMF(2ml) 중의 화합물 2(200mg, 0.261mmol)와 MMAF-OMe(194mg, 0.261mmol)의 용액을 HOBt(7.1mg, 0.052mmol), 피리딘(1ml) 및 DIPEA(0.045ml, 0.261mmol)로 처리하였다. 수득한 혼합물을 실온에서 12시간 동안 교반하였다. 반응을 완료한 후, 에틸 아세테이트(30ml), 물(30ml) 및 염수 용액(30ml)을 사용하여 유기 층을 추출하였다. 이렇게 수득한 유기 층을 농축시키고, 컬럼 크로마토그래피시켜 화합물 3(153mg, 42%)을 황색 고체로서 수득하였다.

[0355] EI-MS m/z: 1375(M^+)

[0356] 화합물 4(Val-Cit-PABC-MMAF-OMe)

[0357] 실온에서 테트라하이드로푸란(5ml) 중의 화합물 3(153mg, 0.112mmol)의 용액에 피페리딘(0.2ml)을 가하였다. 수득한 혼합물을 동일한 온도에서 2시간 동안 교반하였다. 반응을 완료한 후, 재결정화를 에테르 및 헥산으로 수행하여 화합물 4(85mg, 66%)를 밝은 황색 고체로서 수득하였다.

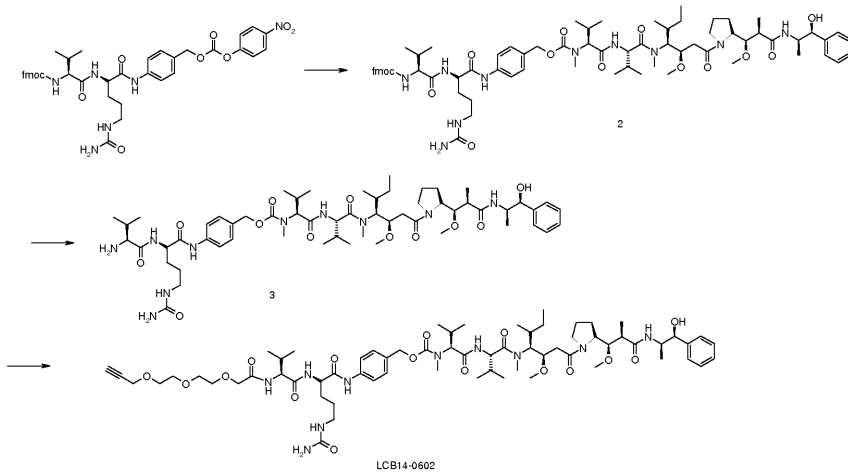
[0358] EI-MS m/z: 1152(M^+)

[0359] LCB14-0589(아세틸렌 링커-Val-Cit-PABC-MMAF-OMe)

[0360] DMF(2ml) 중의 화합물 4(85mg, 0.074mmol)와 실시예 2-11의 화합물 B(18mg, 0.088mmol)의 용액에 DIPEA(0.03ml, 0.148mmol) 및 PyBOP(58mg, 0.111mmol)를 가하였다. 수득한 혼합물을 실온에서 5시간 동안 교반하였다. 반응을 완료한 후, 에틸 아세테이트(20ml) 및 물(20ml)로 추출을 수행하였다. 수득한 조 생성물을 컬럼 크로마토그래피시켜 화합물 LCB14-0589(35.4mg, 36%)를 백색 고체로서 수득하였다.

[0361] EI-MS m/z: 1336(M⁺)

[0362] 2-13. 아세틸렌-링커-Val-Cit-PABC- MMAE(LCB14-0602)



[0363]

[0364] 화합물 2(Fmoc-Val-Cit-PABC-MMAE)

[0365] DMF(2ml) 중의 Fmoc-Val-Cit-PABC-PNP(200mg, 0.261mmol)와 MMAE(187mg, 0.261mmol)의 용액에 HOBt(7.1mg, 0.052mmol), 피리딘(1ml) 및 DIPEA(0.045ml, 0.261mmol)를 가하였다. 수득한 혼합물을 실온에서 12시간 동안 교반하였다. 반응을 완료한 후, 에틸 아세테이트(30ml), 물(30ml) 및 염수 용액(30ml)을 가하여 유기 층을 추출하였다. 이렇게 수득한 유기 층을 농축시키고, 컬럼 크로마토그래피시켜 화합물 2(50mg, 14.3%)를 황색 고체로서 수득하였다.

[0366] EI-MS m/z: 1346(M⁺)

[0367] 화합물 3(Val-Cit-PABC-MMAE)

[0368] 실온에서 테트라하이드로푸란(5ml) 중의 화합물 2(50mg, 0.037mmol)의 용액에 피페리딘(0.1ml)을 가하였다. 수득한 혼합물을 동일한 온도에서 2시간 동안 교반하였다. 반응을 완료한 후, 에테르 및 헥산으로 재결정화를 수행하여 화합물 3(37mg, 89%)을 맑은 황색 고체로서 수득하였다.

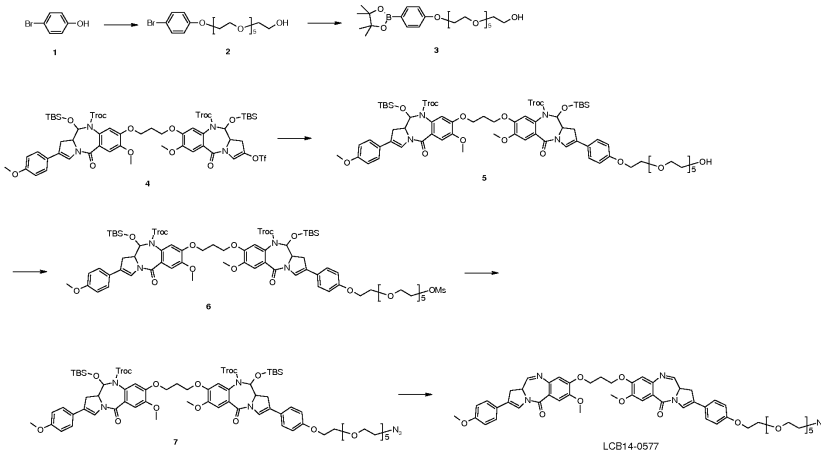
[0369] EI-MS m/z: 1124(M⁺)

[0370] LCB14-0602(아세틸렌 링커-Val-Cit-PABC-MMAE)

[0371] 실온에서 DMF(2ml) 중의 화합물 3(35mg, 0.031mmol)과 실시예 2-11의 화합물 B(7.6mg, 0.037mmol)의 용액에 DIPEA(0.011ml, 0.062mmol) 및 PyBOP(24mg, 0.47mmol)를 가하였다. 수득한 혼합물을 5시간 동안 교반하였다. 반응을 완료한 후, 에틸 아세테이트(20ml) 및 물(20ml)로 추출을 수행하였다. 수득한 조 생성물을 컬럼 크로마토그래피시켜 화합물 LCB14-0602(28.5mg, 70%)를 백색 고체로서 수득하였다.

[0372] EI-MS m/z: 1308(M⁺)

[0373] 2-14. 아지드 링커-PBD(피롤로벤조디아제핀) 이량체(LCB14-0577)



[0374]

[0375] 화합물 2

[0376] 0℃에서 질소 대기하에 테트라하이드로푸란(10ml) 중의 화합물 1(1.22g, 7.08mmol), 트리페닐포스핀(TPP, 2.23g, 8.50mmol) 및 헥사에틸렌 글리콜(2g, 7.08mmol)의 용액에 디소프로필아조디카보네이트(DIAD, 1.67ml, 8.50mmol)를 가하였다. 수득한 혼합물을 1시간 동안 교반하였다. 반응을 완료한 후, 에틸 아세테이트(50ml) 및 증류수(50ml)를 가하였다. 이렇게 수득한 유기 층을 무수 황산나트륨으로 건조시키고, 감압하에 농축시켰다. 잔사를 컬럼 크로마토그래피시켜 화합물 2(1.4g, 45%)를 수득하였다.

[0377] ¹H NMR (600MHz, CDCl₃) δ 7.35 (d, J= 8.4Hz, 2H), 6.80 (d, J= 8.4Hz, 2H), 4.09 (t, J= 4.8Hz, 2H), 3.84 (t, J= 4.8Hz, 2H), 3.72(t, J= 4.8Hz, 4H), 3.68-3.65 (m, 14H), 3.60 (t, J= 4.8Hz, 2H), 2.85 (bs, 1H)

[0378] 화합물 3

[0379] 1,4-디옥산(5ml) 중의 화합물 2(300mg, 0.68mmol)의 용액에 아세트산칼륨(200mg, 2.04mmol), PdCl₂(dppf)(28mg, 0.034mmol) 및 비스(피리콜레이트)이붕소(174mg, 0.68mmol)를 가하였다. 수득한 혼합물을 70℃에서 12시간 동안 교반하였다. 반응을 완료한 후, 에틸 아세테이트(50ml) 및 증류수(50ml)를 가하였다. 이렇게 수득한 유기 층을 무수 황산나트륨으로 건조시키고, 감압하에 농축시켰다. 잔사를 컬럼 크로마토그래피시켜 화합물 3(300mg, 90%)을 수득하였다.

[0380] ¹H NMR (600MHz, CDCl₃) δ 7.73 (d, J= 8.4Hz, 2H), 6.90 (d, J= 8.4Hz, 2H), 4.15 (t, J= 4.8Hz, 2H), 3.86 (t, J= 4.8Hz, 2H), 3.73-3.72 (m, 4H), 3.68-3.64 (m, 14H), 3.60 (t, J= 4.8Hz, 2H), 1.33 (s, 12H)

[0381] 화합물 4

[0382] 제WO2006/111759 A1호, 제WO2010/043880 A1호 및 제WO2010/010347 A1호(당해 문헌들 각각의 내용은 이로써 전 체적으로 참조로 인용됨)에 기재된 방법에 따라 화합물 4를 제조하였다.

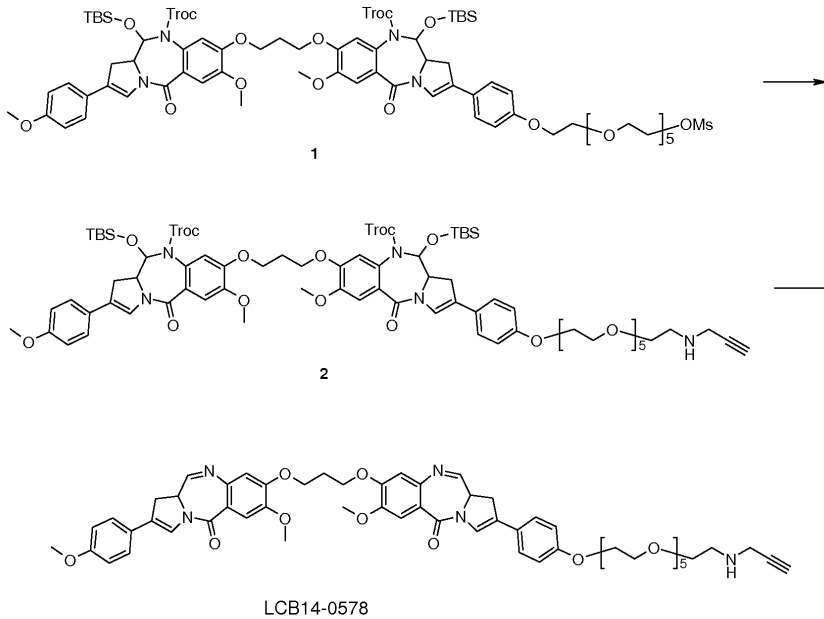
[0383] ¹H NMR (600MHz, CDCl₃) δ 7.35 (s, 1H), 7.29 (d, J= 9Hz, 2H), 7.27 (s, 1H), 7.23 (s, 1H), 7.17 (s, 1H), 6.89 (d, J= 9Hz, 2H), 6.77 (s, 1H), 6.75 (s, 1H), 5.91 (m, 2H), 5.23 (d, J= 9Hz, 2H), 5.21 (d, J= 9Hz, 2H), 4.29 (m, 2H), 4.17-4.13 (m, 4H), 3.96-3.91 (m, 8H), 3.82 (s, 3H), 3.33 (m, 2H), 2.82 (m, 2H), 2.44 (m, 2H), 0.90(2s, 18H), 0.27 (2s, 12H)

[0384] 화합물 5

- [0385] 화합물 4(83mg, 0.059mmol), 탄산나트륨(10mg, 0.089mmol) 및 Pd(TPP)₄(3.4mg, 0.003mmol)를 에탄올/톨루엔/증류수(0.3ml/0.3ml/0.3ml)의 혼합물 용매에 순차적으로 용해시켰다. 톨루엔(3ml) 중의 화합물 3(31.6mg, 0.065mmol)의 용액을 가하였다. 수득한 혼합물을 실온에서 1시간 동안 교반하였다. 반응을 완료한 후, 에틸 아세테이트(50ml) 및 증류수(50ml)를 가하였다. 이렇게 수득한 유기 층을 무수 황산나트륨으로 건조시키고, 감압하에 농축시켰다. 잔사를 컬럼 크로마토그래피시켜 화합물 5(79mg, 74%)를 수득하였다.
- [0386] ¹H NMR (600MHz, CDCl₃) δ 7.35 (m, 2H), 7.31-7.27 (m, 6H), 6.92-6.89 (m, 4H), 6.78 (s, 2H), 5.90 (d, J= 9Hz, 2H), 5.23 (d, J= 12.6Hz, 2H), 4.30 (m, 2H), 4.16-4.13 (m, 6H), 3.97-3.94 (m, 8H), 3.87 (t, J= 4.8Hz, 2H), 3.83 (s, 3H), 3.74-3.64 (m, 18H), 3.61 (m, 2H), 3.34 (m, 2H), 2.82 (m, 2H), 2.45 (m, 2H), 0.90 (s, 18H), 0.25 (2s, 12H)
- [0387] 화합물 6
- [0388] 0℃에서 테트라하이드로푸란(3ml) 중의 화합물 5(250mg, 0.155mmol)의 용액에 4-메틸모르폴린(34.2μl, 0.310mmol) 및 메탄 설펡산 무수물(Ms₂O, 32.5mg, 0.186mmol)을 가하였다. 수득한 혼합물을 실온에서 3시간 동안 교반하였다. 반응을 완료한 후, 에틸 아세테이트(50ml) 및 증류수(50ml)를 가하였다. 이렇게 수득한 유기 층을 무수 황산나트륨으로 건조시키고, 감압하에 농축시켰다. 잔사를 컬럼 크로마토그래피시켜 화합물 6(220mg, 84%)을 수득하였다.
- [0389] ¹H NMR (600MHz, CDCl₃) δ 7.33 (m, 2H), 7.28-7.23 (m, 6H), 6.89-6.86 (m, 4H), 6.76 (s, 2H), 5.88 (d, J= 9Hz, 2H), 5.21 (d, J= 12.6Hz, 2H), 4.35 (m, 2H), 4.26 (m, 2H), 4.13-4.11 (m, 6H), 3.92 (s, 6H), 3.84 (t, J= 4.8Hz, 2H), 3.80 (s, 3H), 3.74-3.60 (m, 20H), 3.31 (m, 2H), 3.06 (s, 3H), 2.80 (m, 2H), 2.43 (m, 2H), 0.88 (s, 18H), 0.23(2s, 12H)
- [0390] 화합물 7
- [0391] 디메틸포름아미드(2ml) 중의 화합물 6(100mg, 0.059mmol)의 용액에 나트륨 아지드(NaN₃, 4.6mg, 0.071mmol)를 가하였다. 수득한 혼합물을 55℃에서 4시간 동안 교반하였다. 반응을 완료한 후, 에틸 아세테이트(50ml) 및 증류수(50ml)를 가하였다. 이렇게 수득한 유기 층을 무수 황산나트륨으로 건조시키고, 감압하에 농축시켰다. 잔사를 컬럼 크로마토그래피시켜 화합물 7(85mg, 88%)을 수득하였다.
- [0392] ¹H NMR (600MHz, CDCl₃) δ 7.33 (bs, 2H), 7.28-7.24 (m, 6H), 6.89-6.87 (m, 4H), 6.76 (s, 2H), 5.88 (d, J= 9Hz, 2H), 5.21 (d, J= 12.6Hz, 2H), 4.26 (m, 2H), 4.13-4.11 (m, 6H), 3.92 (m, 8H), 3.84 (t, J= 4.8Hz, 2H), 3.80 (s, 3H), 3.71 (m, 2H), 3.67-3.64 (m, 16H), 3.36 (t, J= 4.8Hz, 2H), 3.31 (m, 2H), 2.80 (m, 2H), 2.43 (m, 2H), 0.88 (s, 18H), 0.23 (2s, 12H)
- [0393] LCB14-0577
- [0394] 테트라하이드로푸란(1.5ml) 중의 화합물 7(80mg, 0.049mmol)의 용액에 1N-암모늄 아세테이트(1ml) 및 10% 카복실/납 커플(120mg)을 가하였다. 수득한 혼합물을 실온에서 4시간 동안 교반하였다. 반응을 완료한 후, 디클로로메탄(50ml) 및 증류수(50ml)를 가하였다. 이렇게 수득한 유기 층을 무수 황산나트륨으로 건조시키고, 감압하에 농축시켰다. 잔사를 컬럼 크로마토그래피시켜 화합물 LCB14-0577(9mg, 18%)을 수득하였다.
- [0395] ¹H NMR (600MHz, CDCl₃) δ 7.86 (d, J= 4.2Hz, 2H), 7.36 (m, 2H), 7.31-7.23 (m, 6H), 6.89-6.80 (m, 6H), 4.34-4.22 (m, 6H), 4.11(m, 2H), 3.92 (m, 6H), 3.84~3.77(m, 5H), 3.71 (m, 2H), 3.67-3.63 (m, 18H), 3.36 (m, 2H), 3.03 (m, 2H), 2.44-2.40 (m, 2H)

[0396] EI-MS m/z: 1017(M⁺)

[0397] 2-15. 아세틸렌-링커-PBD 이량체(LCB14-0578)



[0398]

[0399] 화합물 2

[0400] 아세토니트릴(1ml) 중의 실시예 2-14의 화합물 6(95mg, 0.056mmol)의 용액에 프로파르길 아민(18 μ l, 0.28mmol)과 증류수(500 μ l) 중의 탄산나트륨(18mg, 0.168mmol)의 용액을 가하였다. 수득한 혼합물을 40 $^{\circ}$ C에서 12시간 동안 교반하였다. 반응을 완료한 후, 에틸 아세테이트(50ml) 및 증류수(50ml)를 가하였다. 이렇게 수득한 유기 층을 무수 황산나트륨으로 건조시키고, 감압하에 농축시켰다. 잔사를 컬럼 크로마토그래피시켜 화합물 2(45mg, 48%)를 수득하였다.

[0401] ¹H NMR (600MHz, CDCl₃) δ 7.35 (m, 2H), 7.30-7.27 (m, 6H), 6.91-6.89 (m, 4H), 6.78 (s, 2H), 5.91 (d, J=9Hz, 2H), 5.23 (d, J= 11.4Hz, 2H), 4.30 (m, 2H), 4.16-4.11 (m, 6H), 3.94 (s, 6H), 3.87 (t, J= 4.8Hz, 2H), 3.83 (s, 3H), 3.73 (m, 2H), 3.69-3.60 (m 18H), 3.45 (d, J= 2.4Hz, 2H), 3.33 (m, 2H), 2.87 (t, J= 4.8Hz, 2H), 2.82 (m, 2H), 2.45 (m, 2H), 2.22 (t, J= 4.4Hz, 1H), 0.90 (s, 18H), 0.24 (2s, 12H)

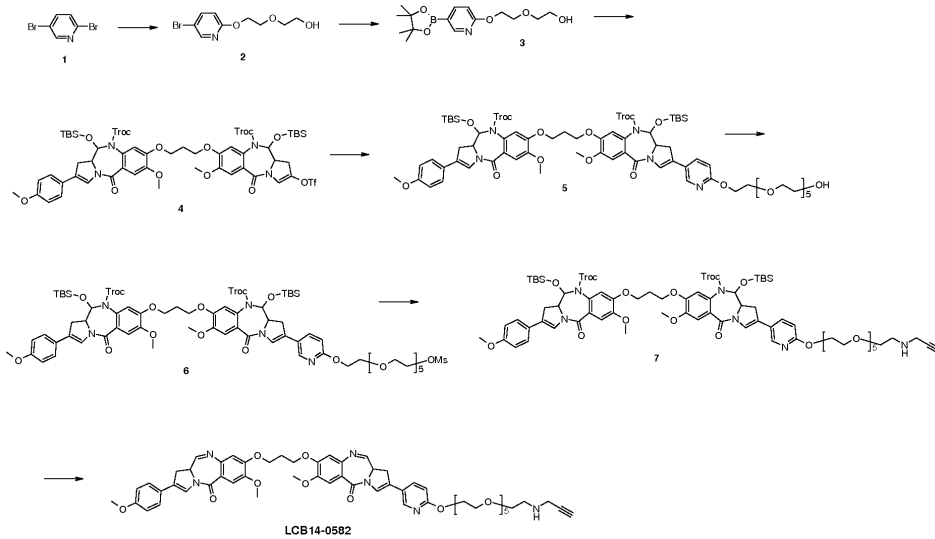
[0402] LCB14-0578

[0403] 테트라하이드로푸란(750 μ l) 중의 화합물 2(40mg, 0.024mmol)의 용액에 1N-암모늄 아세테이트(0.5ml) 및 10% 카드뮴/납 커플(70mg)을 가하였다. 수득한 혼합물을 실온에서 4시간 동안 교반하였다. 반응을 완료한 후, 디클로로메탄(50ml) 및 증류수(50ml)를 가하였다. 이렇게 수득한 유기 층을 무수 황산나트륨으로 건조시키고, 감압하에 농축시켰다. 잔사를 컬럼 크로마토그래피시켜 화합물 LCB14-0578(13mg, 52%)을 수득하였다.

[0404] ¹H NMR (600MHz, CDCl₃) δ 7.88 (d, J= 4.2Hz, 2H), 7.38 (m, 2H), 7.33-7.28 (m, 6H), 6.91-6.86 (m, 6H), 4.38-4.20 (m, 6H), 4.13 (m 2H), 3.94 (s, 6H), 3.88-3.80 (m, 5H), 3.73 (m, 2H), 3.69-3.61 (m, 16H), 3.46 (d, J= 2.4Hz, 2H), 3.39(m, 2H), 3.30 (m, 2H), 2.88 (t, J= 4.8Hz, 2H), 2.43 (m, 2H), 2.23 (t, J= 4.4Hz, 1H))

[0405] EI-MS m/z: 1028(M⁺)

[0406] 2-16. 아세틸렌-링커-PBD 이량체(피리딘 버전)(LCB14-0582)



[0407]

[0408] 화합물 2

[0409] 0℃에서 질소 대기하에 테트라하이드로푸란(5ml) 중의 NaH(광유 중 55%, 184mg, 4.22mmol)의 현탁액에 테트라하이드로푸란(3ml) 중의 헥사에틸렌글리콜(2.4g, 8.44mmol)을 가하였다. 수득한 혼합물을 0℃에서 10분 동안 교반하였다. 화합물 1(1g, 4.22mmol)을 디메틸포름아미드(0.5ml)와 테트라하이드로푸란(0.5ml)에 용해시켜 제조한 혼합물 용액을 서서히 가하였다. 수득한 혼합물을 실온에서 1시간 동안 교반한 다음, 70℃에서 12시간 동안 교반하였다. 수득한 혼합물을 0℃로 냉각 후, 증류수(2ml)를 가하였다. 반응을 완료한 후, 에틸 아세테이트(100ml) 및 증류수(100ml)를 가하였다. 이렇게 수득한 유기 층을 무수 황산나트륨으로 건조시키고, 감압하에 농축시켰다. 잔사를 컬럼 크로마토그래피시켜 화합물 2(1.5g, 81%)를 수득하였다.

[0410] ¹H NMR (600MHz, CDCl₃) δ 8.13(d, J= 2.4Hz, 1H), 7.61 (dd, J= 8.4, 2.4Hz, 1H), 6.67 (d, J= 9Hz, 1H), 4.41 (m, 2H), 3.81 (m, 2H), 3.70-3.61 (m, 18H), 3.58 (m, 2H), 2.71 (bs, 1H)

[0411] 화합물 3

[0412] 디메틸포름아미드(5ml) 중의 화합물 2(500mg, 1.14mmol)의 용액을 아세트산칼륨(336mg, 3.42mmol), PdCl₂(dppf)(46.5mg, 0.057mmol) 및 비스(피나콜레이트)이붕소(318mg, 1.25mmol)로 순차적으로 처리하였다. 수득한 혼합물을 70℃에서 12시간 동안 교반하였다. 반응을 완료한 후, 에틸 아세테이트(100ml) 및 증류수(50 ml)를 가하였다. 이렇게 수득한 유기 층을 무수 황산나트륨으로 건조시키고, 감압하에 농축시켰다. 잔사를 컬럼 크로마토그래피시켜 화합물 3(250mg, 45%)을 수득하였다.

[0413] ¹H NMR (400MHz, CDCl₃) δ 8.50 (s, 1H), 7.90 (d, J= 8.4Hz, 1H), 6.74 (d, J= 8.4Hz, 1H), 4.50 (t, J= 4.8Hz, 2H), 3.84 (m, 2H), 3.74-3.70 (m, 20H), 1.33 (s, 12H)

[0414] 화합물 5

[0415] 화합물 4(245mg, 0.175mmol), 탄산나트륨(28mg, 0.262mmol) 및 Pd(TPP)₄(10mg, 0.009mmol)를 에탄올/톨루엔/증류수(1.5ml/1.5ml/1.5ml)의 혼합 용액에 순차적으로 용해시켰다. 톨루엔(1.5ml) 중의 화합물 3(94mg, 0.192mmol)의 용액을 가하였다. 수득한 혼합물을 실온에서 12시간 동안 교반하였다. 반응을 완료한 후, 에틸 아세테이트(100ml) 및 증류수(100ml)를 가하였다. 이렇게 수득한 유기 층을 무수 황산나트륨으로 건조시키고, 감압하에 농축시켰다. 잔사를 컬럼 크로마토그래피시켜 화합물 5(100mg, 35.5%)를 수득하였다.

[0416] ^1H NMR (600MHz, CDCl_3) δ 8.02 (d, J= 2.4Hz, 1H), 7.66 (m, 1H), 7.38(s, 1H), 7.35 (s, 1H), 7.29 (d, J= 9Hz, 2H), 7.27 (m, 2H), 6.89 (d, J= 9Hz, 2H), 6.80 (d, J= 8.4Hz, 1H), 6.78 (s, 2H), 5.90 (d, J= 9Hz, 2H), 5.23 (dd, J= 11.4, 4.2Hz, 2H), 4.47 (m, 2H), 4.29 (m, 2H), 4.17~4.12(m, 2H), 3.4 (m, 8H), 3.86 (t, J= 4.8Hz, 2H), 3.82 (m, 4H), 3.74~3.65 (m, 18H), 3.61(m, 2H), 3.33(m, 2H), 2.83 (m, 2H), 2.45 (m, 2H), 0.90 (s, 18H), 0.25 (2s, 12H)

[0417] 화합물 6

[0418] 0℃에서 테트라하이드로푸란(3ml) 중의 화합물 5(180mg, 0.11mM)의 용액에 4-메틸모르폴린(NMM, 61.5 μ l, 0.55mM) 및 메탄 설폰산 무수물(Ms_2O , 22mg, 0.121mM)을 가하였다. 수득한 혼합물을 실온에서 3시간 동안 교반하였다. 반응을 완료한 후, 에틸 아세테이트(50ml) 및 증류수(50ml)를 가하여 유기 층을 추출하였다. 유기 층을 무수 황산나트륨으로 건조시키고, 감압하에 농축시켰다. 잔사를 컬럼 크로마토그래피시켜 화합물 6(80mg, 43%)을 제조하였다.

[0419] ^1H NMR (600MHz, CDCl_3) δ 8.03 (d, J= 2.4Hz, 1H), 7.66 (dd, J= 7.8, 2.4Hz, 1H), 7.38 (s, 1H), 7.35 (s, 1H), 7.30 (d, J= 9Hz, 2H), 7.27 (m, 2H), 6.89 (d, J= 9Hz, 2H), 6.80 (d, J= 9Hz, 1H), 6.78 (s, 2H), 5.90 (d, J= 9Hz, 2H), 5.22 (dd, J= 12, 4.2Hz, 2H), 4.47 (m, 2H), 4.38 (m, 2H), 4.30 (m, 2H), 4.15 (m, 3H), 3.99~3.93 (m, 7H), 3.86 (m, 2H), 3.83 (s, 3H), 3.76 (m, 2H), 3.71 (m, 2H), 3.69~3.63 (m, 16H), 3.34 (m, 2H), 3.08 (s, 3H), 2.83 (m, 2H), 2.45 (m, 2H), 0.90 (2s, 18H), 0.25 (2s, 12H)

[0420] 화합물 7

[0421] 아세토니트릴(4ml) 중의 화합물 6(80mg, 0.047mmol)의 용액에 프로파르길아민(30 μ l, 0.47mmol)과 증류수(500 μ l) 중의 탄산나트륨(20mg, 0.141mmol) 용액을 가하였다. 수득한 혼합물을 50℃에서 12시간 동안 교반하였다. 반응을 완료한 후, 에틸 아세테이트(50ml) 및 증류수(50ml)를 가하였다. 이렇게 수득한 유기 층을 무수 황산나트륨으로 건조시키고, 감압하에 농축시켰다. 잔사를 컬럼 크로마토그래피시켜 화합물 7(25mg, 32%)을 수득하였다.

[0422] ^1H NMR (600MHz, CDCl_3) δ 8.03 (d, J= 1.8Hz, 1H), 7.66 (dd, J= 8.4, 2.4Hz, 1H), 7.38 (s, 1H), 7.35 (s, 1H), 7.30 (d, J= 8.4Hz, 2H), 7.28 (m, 2H), 6.89 (d, J= 9Hz, 2H), 6.79 (d, J= 9Hz, 1H), 6.78 (s, 2H), 5.90 (d, J= 9Hz, 2H), 5.22 (dd, J= 12, 4.2Hz, 2H), 4.47 (m, 2H), 4.30 (m, 2H), 4.17~4.14 (m, 3H), 3.98~3.93 (m, 7H), 3.86 (m, 2H), 3.82 (s, 3H), 3.72 (m, 2H), 3.69~3.60 (m, 18H), 3.45 (d, J= 2.4Hz, 2H), 3.34 (m, 2H), 2.87 (t, J= 4.8Hz, 2H), 2.83 (m, 2H), 2.45 (m, 2H), 2.22 (m, 1H), 0.90 (2s, 18H), 0.25 (2s, 12H)

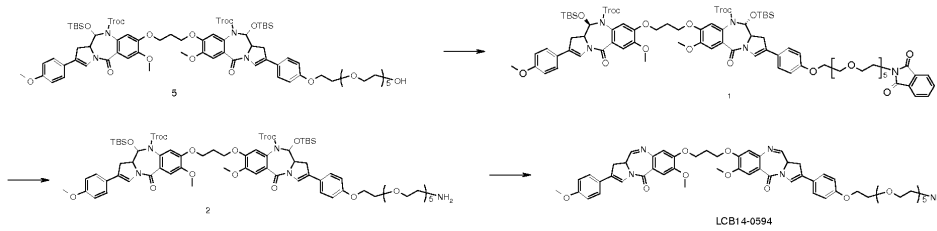
[0423] LCB14-0582

[0424] 테트라하이드로푸란(750 μ l) 중의 화합물 7(25mg, 0.015mmol)의 용액에 1N-암모늄 아세테이트(0.5ml) 및 10% 카드뮴/납 커플(50mg)을 가하였다. 수득한 혼합물을 실온에서 3시간 동안 교반하였다. 반응을 완료한 후, 디메틸클로로메탄(50ml) 및 증류수(50ml)를 가하였다. 이렇게 수득한 유기 층을 무수 황산나트륨으로 건조시키고, 감압하에 농축시켰다. 잔사를 컬럼 크로마토그래피시켜 화합물 LCB14-0582(6mg, 38.4%)를 수득하였다.

[0425] ^1H NMR (600MHz, CDCl_3) δ 8.00 (m, 1H), 7.88 (m, 2H), 7.60 (m, 1H), 7.41~7.28 (m, 6H), 6.90~6.71 (m, 5H), 4.46 (m, 2H), 4.35~4.24 (m, 4H), 3.95~3.79 (m, 11H), 3.70 (m, 2H), 3.68~3.61 (m, 18H), 3.47 (m, 2H), 3.38 (m, 2H), 3.04 (m, 2H), 2.89 (t, J= 5.4Hz, 2H), 2.40 (m, 2H), 2.23 (bs, 1H)

[0426] EI-MS m/z: 1029(M^+)

[0427] 2-17. 아미노-Peg5-PBD 이량체(LCB14-0594)



[0428]

[0429] 화합물 1

[0430] 테트라하이드로푸란 중의 실시예 2-14의 화합물 5(456mg, 0.284mmol)의 용액에 트리페닐포스핀(108mg, 0.411mmol) 및 프탈이미드(50mg, 0.341mmol)를 가하였다. DIAD(0.058ml, 0.340mmol)를 0℃에서 서서히 가하였다. 수득한 혼합물을 실온에서 2시간 동안 교반하였다. 반응을 완료한 후, 디클로로메탄(40ml) 및 물(40ml)로 추출을 수행하였다. 잔사를 컬럼 크로마토그래피시켜 화합물 1(492mg, 정량적)을 황색 고체로서 수득하였다.

[0431] ¹H NMR (600MHz, CDCl₃) δ 7.84-7.82 (m, 2H), 7.70-7.69 (m, 2H), 7.34 (m, 2H), 7.29-7.25 (m, 6H), 6.90(d, J=7.2, 4H), 6.78(s, 2H), 5.92(d, J=9.0, 2H), 5.21(d, J=12.6, 2H), 4.28(m, 2H), 4.19-4.10(m, 4H), 3.93(m, 6H), 3.89-3.87(m, 2H), 3.86-3.84(m, 2H), 3.82(s, 3H), 3.74-3.71(m, 4H), 3.67-3.66(m, 2H), 3.63-3.62(m, 6H), 3.59-3.58(m, 6H), 3.33(m, 2H), 2.85-2.82(m, 2H), 2.42(m, 2H), 0.91(s, 18H), 0.27 (2s, 12H)

[0432] 화합물 2

[0433] 에틸 알콜(2ml)과 테트라하이드로푸란(2ml) 중의 화합물 1(492mg, 0.283mmol)의 용액에 하이dra진 일수화물 (0.07ml, 1.417mmol)을 가하였다. 수득한 혼합물을 60℃에서 5시간 동안 교반하였다. 반응을 완료한 후, 에틸 아세테이트 2ml를 가하였다. 고체를 여과하였다. 여액을 농축하고 컬럼 크로마토그래피시켜 화합물 2(380mg, 83%)를 황색 고체로서 수득하였다.

[0434] ¹H NMR (600MHz, CDCl₃) δ 7.35 (bs, 2H), 7.29-7.26 (m, 6H), 6.92-6.88 (m, 4H), 6.79 (bs, 2H), 5.92 (d, J=8.4, 2H), 5.21 (d, J=12, 2H), 4.29-4.28 (m, 2H), 4.19-4.17 (m, 6H), 3.93-3.90(m, 6H), 3.89-3.87 (m, 2H), 3.82(s, 3H), 3.75-3.73 (m, 2H), 3.69-3.63 (m, 12H), 3.35-3.31 (m, 2H), 2.96 (bs, 2H), 2.85 (d, J=16.8, 2H), 2.43 (m, 2H), 0.91 (s, 18H), 0.27 (2s, 12H).

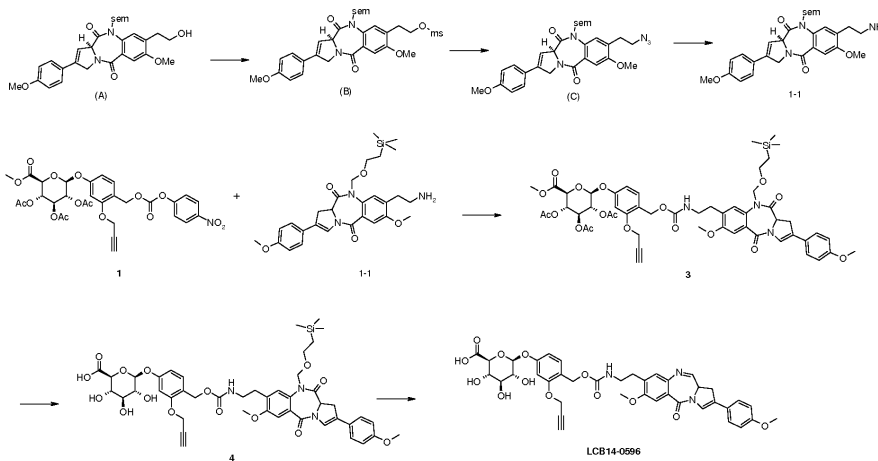
[0435] EI-MS m/z: 1606(M⁺)

[0436] LCB14-0594

[0437] 실온에서 테트라하이드로푸란(1ml) 중의 화합물 2(25mg, 0.015mmol)의 용액에 1N 암모늄 아세테이트(0.4ml) 및 10% 카드뮴/납 커플(40mg)을 가하였다. 수득한 혼합물을 동일한 온도에서 12시간 동안 교반하였다. 반응을 완료한 후, 수득한 혼합물을 디클로로메탄으로 여과시켰다. 여과된 용액을 농축시키고 컬럼 크로마토그래피시켜 LCB14-0594(4mg, 26%)를 황색 고체로서 수득하였다.

[0438] EI-MS m/z: 990(M⁺)

[0439] 2-18. 글루쿠로나이드-링커-PBD 단량체(LCB14-0596)



[0440]

[0441] 화합물 (B)

[0442] 실온에서 테트라하이드로푸란(5ml) 중의 화합물(A)(300mg, 0.57mmol)의 용액에 N-메틸모르폴린(0.16ml, 1.43mmol) 및 메탄설폰산 무수물(120mg, 0.69mmol)을 가하였다. 수득한 혼합물을 4시간 동안 교반하였다. 에틸 아세테이트(100ml) 및 물(50ml)을 가하였다. 이렇게 수득한 유기 층을 감압하에 농축시켰다. 잔사를 에틸 아세테이트 및 헥산으로 컬럼 크로마토그래피시켜 화합물(B)(330mg, 96%)을 수득하였다.

[0443] $^1\text{H NMR}$ (600MHz, CDCl_3) δ : 7.53(s, 1H), 7.40(s, 1H), 7.39-7.37(m, 2H), 7.33(t, $J = 1.8\text{Hz}$, 1H), 6.90-6.89(m, 2H), 5.47(d, $J = 10.2\text{Hz}$, 1H), 4.81(d, $J = 10.2\text{Hz}$, 1H), 4.62(dd, $J = 7.2, 3.0\text{Hz}$, 1H), 4.49-4.41(m, 2H), 3.97-3.93(m, 1H), 3.92(s, 3H), 3.83(s, 3H), 3.76-3.72(m, 1H), 3.68-3.64(m, 1H), 3.17-3.10(m, 3H), 2.96(s, 3H), 0.98(t, $J = 8.4\text{Hz}$, 2H), 0.02(s, 9H).

[0444] EI-MS m/z : 603(M^+)

[0445] 화합물 (C)

[0446] 실온에서 DMF(3ml) 중의 화합물(B)(330mg, 0.55mmol)의 용액에 나트륨 아지드(43mg, 0.66mmol)를 가하였다. 수득한 혼합물을 60°C에서 3시간 동안 교반하였다. 에틸 아세테이트(100ml) 및 물(50ml)을 가하였다. 이렇게 수득한 유기 층을 감압하에 농축시켰다. 잔사를 에틸 아세테이트 및 헥산으로 컬럼 크로마토그래피시켜 화합물(C)(307mg, 99%)을 황색 고체로서 수득하였다.

[0447] $^1\text{H NMR}$ (600MHz, CDCl_3) δ : 7.54(s, 1H), 7.38-7.37(m, 3H), 7.34(t, $J = 1.8\text{Hz}$, 1H), 6.90-6.88(m, 2H), 5.49(d, $J = 10.2\text{Hz}$, 1H), 4.76(d, $J = 10.2\text{Hz}$, 1H), 4.63(dd, $J = 7.2, 3.0\text{Hz}$, 1H), 3.96-3.93(m, 1H), 3.92(s, 3H), 3.83(s, 3H), 3.79-3.75(m, 1H), 3.69-3.65(m, 1H), 3.52-3.50(m, 2H), 3.16-3.12(m, 1H), 3.03-2.99(m, 1H), 2.96-2.91(m, 1H), 0.99(t, $J = 8.4\text{Hz}$, 2H), 0.02(s, 9H).

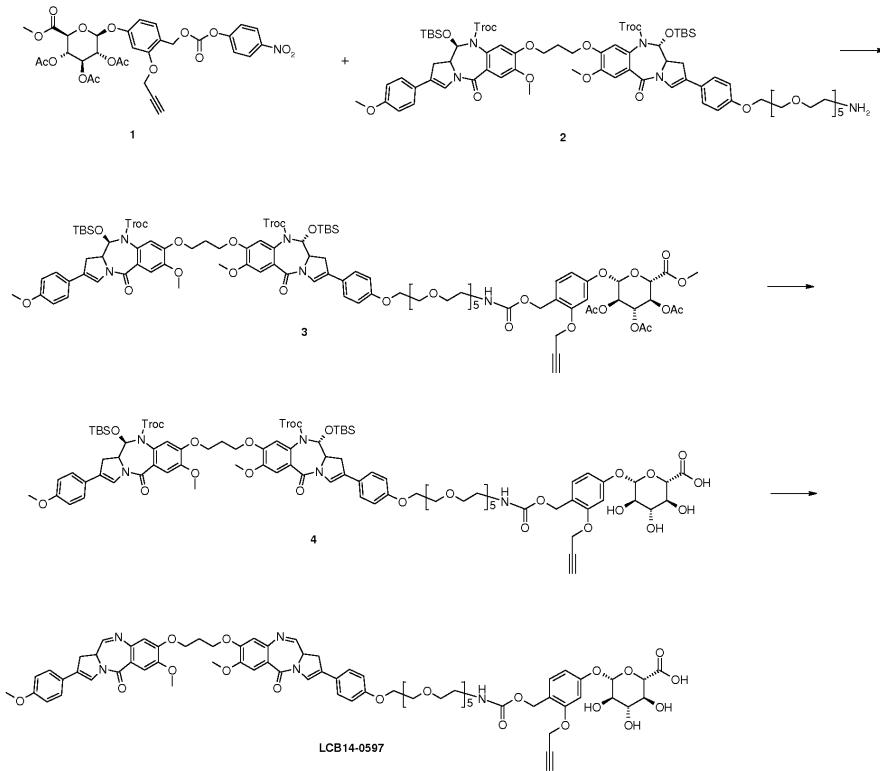
[0448] EI-MS m/z : 550(M^+)

[0449] 화합물 (1-1)

[0450] 실온에서 테트라하이드로푸란(2ml)과 증류수(0.5ml) 중의 화합물(C)(500mg, 0.91mmol)의 용액에 트리페닐포스핀(285mg, 1.09mmol)을 가하였다. 수득한 혼합물을 40°C에서 13시간 동안 교반하였다. 에틸 아세테이트(200ml) 및 물(100ml)을 가하였다. 이렇게 수득한 유기 층을 감압하에 농축시켰다. 잔사를 에틸 아세테이트 및 헥산으로 컬럼 크로마토그래피시켜 화합물(1-1)(435mg, 93%)을 황색 고체로서 수득하였다.

- [0451] ^1H NMR (600MHz, CDCl_3) δ : 7.50(s, 1H), 7.38-7.36(m, 3H), 7.33(t, J = 1.8Hz, 1H), 6.90-6.88(m, 2H), 5.47(d, J = 9.6Hz, 1H), 4.81(d, J = 9.6Hz, 1H), 4.67(dd, J = 7.2, 3.0Hz, 1H), 3.95-3.92(m, 1H), 3.91(s, 3H), 3.83(s, 3H), 3.76-3.72(m, 1H), 3.68-3.64(m, 1H), 3.15-3.10(m, 2H), 3.06-2.96(m, 2H), 2.94-2.88(m, 1H), 2.86-2.80(m, 1H), 0.98(t, J = 8.4Hz, 2H), 0.02(s, 9H).
- [0452] EI-MS m/z: 524(M^+)
- [0453] 화합물 3
- [0454] 디메틸포름아미드(3ml) 중의 실시예 2-4의 화합물 7(126mg, 0.190mmol)과 화합물(1-1)(100mg, 0.190mmol)의 용액에 트리에틸아민(TEA, 80 μl , 0.57mmol)을 가하였다. 수득한 혼합물을 실온에서 3시간 동안 교반하였다. 반응을 완료한 후, 에틸 아세테이트(100ml) 및 증류수(100ml)를 가하였다. 이렇게 수득한 유기 층을 무수 황산나트륨으로 건조시키고, 감압하에 농축시켰다. 잔사를 컬럼 크로마토그래피시켜 화합물 3(178mg, 89%)을 수득하였다.
- [0455] ^1H NMR (400MHz, CDCl_3) δ 7.46 (s, 1H), 7.37 (d, J= 8.8Hz, 2H), 7.34 (m, 2H), 7.22 (m, 1H), 6.87 (d, J= 8.8Hz, 2H), 6.71(d, J= 2.0Hz, 1H), 6.60 (m, 1H), 5.44 (d, J= 10.4Hz, 1H), 5.34 (m, 2H), 5.27 (m, 1H), 5.16 (d, J= 7.6Hz, 1H), 5.07 (s, 2H), 4.82-4.77 (m, 2H), 4.68 (d, J= 2.0Hz, 2H), 4.60 (m, 1H), 4.19 (d, J= 9.2Hz, 1H), 3.93 (m, 1H), 3.87 (s, 3H), 3.82 (s, 3H), 3.72-3.61 (m, 5H), 3.45 (m, 2H), 3.11 (m, 1H), 2.93-2.84 (m, 2H), 2.51 (bs, 1H), 2.05 (s, 3H), 2.04 (s, 3H), 2.03 (s, 3H), 0.97 (t, J= 7.2Hz, 2H), 0.01 (s, 9H)
- [0456] 화합물 4
- [0457] 0 $^\circ\text{C}$ 에서 메탄올(5ml) 중의 화합물 3(100mg, 0.094mmol)의 용액에 증류수(2ml) 중의 수산화리튬(40mg, 1.880mmol)을 가하였다. 수득한 혼합물을 실온에서 3시간 동안 교반하였다. 반응을 완료한 후, 메탄올을 감압하에 제거하였다. 잔사를 증류수(50ml)로 희석하고, 아세트산을 사용하여 pH = 3으로 서서히 산성화시켰다. 추출을 디클로로메탄(3 \times 50ml)을 사용하여 3회 수행하였다. 수득한 생성물을 감압하에 농축하여 고체 화합물을 수득하였다. 고체 화합물을 디에틸에테르(50ml)로 세척하여 화합물 4(86.5mg, 100%)를 수득하였다.
- [0458] ^1H NMR (600MHz, CD_3OD) δ 7.43 (s, 1H), 7.41 (d, J= 9Hz, 2H), 7.30 (d, J= 10.2Hz, 2H), 7.14 (d, J= 7.8Hz, 1H), 6.90 (d, J= 9Hz, 2H), 6.86 (m, 1H), 6.66 (m, 1H), 5.22 (m, 2H), 4.98-4.94 (m, 3H), 4.71-4.67 (m, 3H), 3.96 (m, 1H), 3.87 (s, 3H), 3.78 (s, 3H), 3.75 (m, 1H), 3.59-3.47 (m, 5H), 3.36 (m, 2H), 3.25 (m, 1H), 3.13 (m, 1H), 2.90 (bs, 1H), 2.85 (m, 2H), 0.83 (m, 2H), 0.01 (s, 9H)
- [0459] EI-MS m/z: 904(M^+)
- [0460] LCB14-0596
- [0461] 0 $^\circ\text{C}$ 에서 테트라하이드로푸란(1ml)과 에탄올(1ml) 중의 화합물 4(86.5mg, 0.094mmol)의 용액에 붕수소화리튬 2M-테트라하이드로푸란 용액(940 μl , 1.88mmol)을 가하였다. 수득한 혼합물을 실온에서 12시간 동안 교반하였다. 추가의 붕수소화리튬 2M-테트라하이드로푸란 용액(1.41ml, 2.82mmol)을 가하였다. 수득한 혼합물을 5시간 동안 교반하고, 0 $^\circ\text{C}$ 로 냉각시켰다. 반응을 1% 포름산 용액(33ml)을 가하여 퀀칭시켰다. 수득한 혼합물을 3시간 동안 교반하였다. 반응을 완료한 후, 추출을 증류수(50ml) 및 에틸 아세테이트(20ml)와 메탄올(10ml)의 혼합 용액으로 수행하였다. 잔사를 클로로포름/메탄올/포름산(V:V:V=9:1:0.05)을 사용하여 컬럼 크로마토그래피시켜 화합물 LCB14-0596(50mg, 69%)을 수득하였다.
- [0462] EI-MS m/z: 756(M^+)

[0463] 2-19. 글루쿠로나이드 링커-PBD 이량체(LCB14-0597)



[0464]

[0465] 화합물 3

[0466] 디메틸포름아미드(3ml) 중의 실시예 2-4의 화합물 7(150mg, 0.220mmol)과 실시예 2-17의 화합물 2(365mg, 0.220mmol)의 용액에 트리에틸아민(95 μ l, 0.66mmol)을 가하였다. 수득한 혼합물을 실온에서 2시간 동안 교반하였다. 반응을 완료한 후, 에틸 아세테이트(100ml) 및 증류수(100ml)를 가하였다. 이렇게 수득한 유기 층을 무수 황산나트륨으로 건조시키고, 감압하에 농축시켰다. 잔사를 컬럼 크로마토그래피시켜 화합물 3(310mg, 64%)을 수득하였다.

[0467] ^1H NMR (600MHz, CDCl_3) δ 7.35 (m, 2H), 7.30-7.25 (m, 7H), 6.90 (m, 4H), 6.78 (s, 2H), 6.73 (d, J=2.4Hz, 1H), 6.60 (dd, 8.4, 1.8Hz, 1H), 5.90 (d, J=2.4Hz, 2H), 5.36-5.32 (m, 2H), 5.27 (m, 2H), 5.22 (m, 2H), 5.13 (d, J=7.2Hz, 1H), 5.09 (s, 2H), 4.69 (d, J=2.4Hz, 2H), 4.29 (m, 2H), 4.17-4.13 (m, 6H), 3.94 (m, 8H), 3.85 (t, J=4.8Hz, 2H), 3.82 (s, 3H), 3.73 (s, 3H), 3.71 (m, 2H), 3.67-3.59 (m, 14H), 3.54 (t, J=4.8Hz, 2H), 3.39-3.31 (m, 4H), 2.82 (m, 2H), 2.52 (t, J=2.4Hz, 1H), 2.44 (m, 2H), 2.06 (s, 3H), 2.05 (s, 3H), 2.04 (s, 3H), 0.91 (s, 18H), 0.26 (2s, 12H)

[0468] 화합물 4

[0469] 0 $^\circ\text{C}$ 에서 메탄올(3ml)과 테트라하이드로푸란(1.5ml) 중의 화합물 3(100mg, 0.047mmol)의 용액에 증류수(1.5ml) 중의 수산화리튬(20mg, 0.47mmol)을 가하였다. 수득한 혼합물을 실온에서 3시간 동안 교반하였다. 반응을 완료한 후, 유기 용매를 감압하에 제거하였다. 잔사를 증류수(50ml)로 희석시키고, 0.5N HCl 용액을 사용하여 pH = 3으로 서서히 산성화시켰다. 추출을 디클로로메탄(3 \times 50ml)으로 3회 수행하였다. 추출물을 감압하에 농축시켜 화합물 4(93.4mg, 100%)를 수득하였다.

[0470] ^1H NMR (600MHz, CDCl_3) δ 7.35 (m, 2H), 7.30-7.24 (m, 7H), 4.89 (m, 4H), 6.78 (m, 3H), 6.64 (m, 1H), 5.91 (m, 2H), 5.65 (m, 1H), 5.21 (m, 2H), 5.07 (m, 2H), 4.89 (m, 1H), 4.67 (m, 2H), 4.28 (m, 2H), 4.18-4.12 (m, 6H), 3.93 (m, 8H), 3.85-3.82 (m, 5H), 3.72 (m, 2H), 3.65-3.54 (m, 20H), 3.34-3.32 (m,

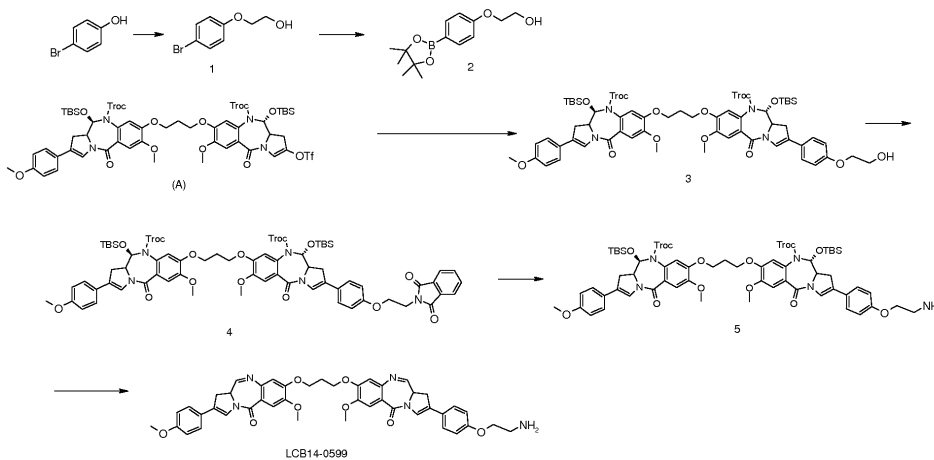
4H), 2.82 (m, 2H), 2.56 (m, 1H), 2.44 (m, 2H), 0.90 (2s, 18H), 0.25 (2s, 12H)

[0471] LCB14-0597

[0472] 테트라하이드로푸란(1.5ml) 중의 화합물 4(90mg, 0.045mmol)의 용액에 1N-암모늄 아세테이트(1.2ml) 및 10% 카드름/납 커플(120mg)을 가하였다. 수득한 혼합물을 실온에서 3시간 동안 교반하였다. 반응을 완료한 후, 에틸 아세테이트(50ml) 및 증류수(50ml)를 가하였다. 이렇게 수득한 유기 층을 무수 황산나트륨으로 건조시키고, 감압하에 농축시켰다. 잔사를 컬럼 크로마토그래피시켜 화합물 LCB14-0597(16.4mg, 26%)을 수득하였다.

[0473] EI-MS m/z: 1371(M⁺)

[0474] 2-20. 아미노-Peg1-PBD 이량체(LCB14-0599)



[0475]

[0476] 화합물 1

[0477] 실온에서 에탄올(18ml) 중의 4-브로모페놀(4.0g, 23.1mmol)의 용액에 수산화나트륨(1.0g, 25.40mmol) 및 2-브로모에탄올(1.7ml, 23.10mmol)을 가하였다. 에틸 아세테이트(500ml) 및 물(200ml)을 가하였다. 이렇게 수득한 유기 층을 감압하에 농축시켰다. 잔사를 에틸 아세테이트 및 헥산으로 컬럼 크로마토그래피시켜 화합물 1(4.3g, 86%)을 액체 형태로 수득하였다.

[0478] ¹H NMR (600MHz, CDCl₃) δ: 7.39-7.36(m, 2H), 6.81-6.78(m, 2H), 4.05-4.03(m, 2H), 3.95(t, J = 4.2Hz, 2H), 2.18(bs, 1H).

[0479] 화합물 2

[0480] 실온에서 1,4-디옥산(10ml) 중의 화합물 1(0.3g, 1.38mmol)의 용액에 비스(피나콜레이트)이붕소(0.35g, 1.38mmol), 아세트산칼륨(0.41g, 4.14mmol) 및 PdCl₂(dppf)(56mg, 0.07mmol)를 가하였다. 수득한 혼합물을 70 °C에서 12시간 동안 교반한 다음, 감압하에 농축시켰다. 에틸 아세테이트로 여과를 수행하였다. 여과된 용액을 감압하에 농축시켰다. 잔사를 에틸 아세테이트 및 헥산으로 컬럼 크로마토그래피시켜 화합물 2(0.36g, 97%)를 수득하였다.

[0481] ¹H NMR (600MHz, CDCl₃) δ: 7.76-7.75(m, 2H), 6.92-6.91(m, 2H), 4.11(t, J = 4.2Hz, 2H), 3.97-3.96(m, 2H), 1.99(bs, 1H), 1.33(s, 12H).

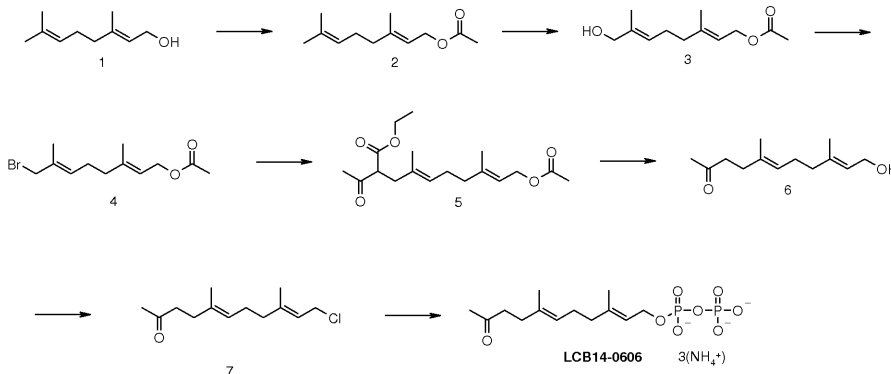
- [0482] 화합물 3
- [0483] 톨루엔(2ml) 중의 제WO 2006/111759호, 제WO 2010/043880호 및 제WO 2010/010347호(이들의 내용은 이로써 전체적으로 참조로 인용됨)에 기재된 방법에 따라 제조한, 화합물(A)(85mg, 0.11mmol) 및 화합물 2(35mg, 0.13mmol)의 용액에 탄산나트륨(17mg, 0.16mmol), 증류수(1ml) 및 에탄올(1ml)을 가하였다. 수득한 혼합물을 5분 동안 교반한 후, Pd(TPP₃)₄(22mg, 0.02mmol)를 가하였다. 수득한 혼합물을 2시간 동안 교반하였다. 에틸 아세테이트(10ml) 및 물(10ml)을 가하였다. 이렇게 수득한 유기 층을 감압하에 농축시켰다. 잔사를 에틸 아세테이트 및 헥산으로 컬럼 크로마토그래피시켜 화합물 3(79mg, 53%)을 황색 고체로서 수득하였다.
- [0484] ¹H NMR (600MHz, CDCl₃) δ : 7.36-7.35(m, 2H), 7.32-7.25(m, 6H), 6.92-6.89(m, 4H), 6.78(s, 2H), 5.92(d, J = 9.0Hz, 2H), 5.22(d, J = 12.0Hz, 2H), 4.30-4.28(m, 2H), 4.17-4.10(m, 6H), 3.98-3.94(m, 4H), 3.94(s, 6H), 3.83(s, 3H), 3.37-3.32(m, 2H), 2.85-2.82(m, 2H), 2.46-2.44(m, 2H), 1.98(bs, 1H), 0.91(s, 18H), 0.26(2s, 12H).
- [0485] EI-MS m/z: 1387(M⁺)
- [0486] 화합물 4
- [0487] 실온에서 테트라하이드로푸란(2ml) 중의 화합물 3(77mg, 0.06mmol)의 용액에 트리페닐포스핀(18mg, 0.07mmol), 프탈이미드(10mg, 0.07mmol) 및 DIAD (13ul, 0.07mmol)를 순차적으로 가하였다. 수득한 혼합물을 12시간 동안 교반하였다. 에틸 아세테이트(10ml) 및 물(10ml)을 가하였다. 이렇게 수득한 유기 층을 감압하에 농축시켰다. 잔사를 에틸 아세테이트 및 헥산으로 컬럼 크로마토그래피시켜 화합물 4(72mg, 87%)를 황색 고체로서 수득하였다.
- [0488] ¹H NMR (600MHz, CDCl₃) δ : 7.88-7.86(m, 2H), 7.77-7.75(m, 2H), 7.39-7.36(m, 2H), 7.30-7.24(m, 6H), 6.90-6.86(m, 4H), 6.78(d, J = 1.8Hz, 2H), 5.92- 5.88(m, 2H), 5.24-5.22(m, 2H), 4.28-4.24(m, 4H), 4.17-4.11(m, 6H), 3.98-3.90(m, 8H), 3.83(s, 3H), 3.36-3.29(m, 2H), 2.85-2.78(m, 2H), 2.47-2.43(m, 2H), 0.91(d, J = 1.8Hz, 18H), 0.27-0.24(m, 12H).
- [0489] EI-MS m/z: 1516(M⁺)
- [0490] 화합물 5
- [0491] 에탄올(2ml) 중의 화합물 4(70mg, 0.05mmol)의 용액을 실온에서 하이dra진 일수화물(12ul, 0.23mmol)로 처리하였다. 수득한 혼합물을 60℃에서 5시간 동안 교반하였다. 고체를 에틸 아세테이트(10ml)를 사용하여 여과시켰다. 여액을 감압하에 농축시켰다. 잔사를 디클로로메탄 및 메탄올로 컬럼 크로마토그래피시켜 화합물 5(64mg, 63%)를 수득하였다.
- [0492] ¹H NMR (600MHz, CDCl₃) δ : 7.36-7.35(m, 2H), 7.32-7.25(m, 6H), 6.92-6.89(m, 4H), 6.78(s, 2H), 5.92(d, J = 9.0Hz, 2H), 5.22(d, J = 12.0Hz, 2H), 4.30-4.28(m, 2H), 4.17-4.10(m, 6H), 3.98-3.94(m, 4H), 3.94(s, 6H), 3.83(s, 3H), 3.37-3.32(m, 2H), 2.85-2.82(m, 2H), 2.46-2.44(m, 2H), 1.98(bs, 1H), 0.91(s, 18H), 0.26(2s, 12H).
- [0493] EI-MS m/z: 1386(M⁺)
- [0494] LCB14-0599
- [0495] 실온에서 테트라하이드로푸란(2ml) 중의 화합물 5(30mg, 0.02mmol)의 용액에 1N 암모늄 아세테이트 용액(0.6ml) 및 카드뮴/납 커플(60mg)을 가하였다. 수득한 혼합물을 4시간 동안 교반하였다. 고체를 에틸 아세테이트(10ml)를 사용하여 여과시켰다. 여액을 감압하에 농축시켰다. 잔사를 디클로로메탄 및 메탄올을 사

용하여 컬럼 크로마토그래피시켜 화합물 LCB14-0599(9.0mg, 60%)을 황색 고체로서 수득하였다.

[0496] ^1H NMR (600MHz, CDCl_3 , CD30D_1 액적) δ : 7.54-7.49(m, 3H), 7.35-7.30(m, 5H), 7.26(s, 1H), 6.93-6.86(m, 5H), 6.51(s, 1H), 6.29(s, 1H), 4.67-4.59(m, 2H), 4.28-4.09(m, 6H), 3.85(s, 9H), 3.31-3.27(m, 1H), 3.07-3.03(m, 2H), 2.92-2.89(m, 1H), 2.39-2.30(m, 2H), 2.05-2.03(m, 2H).

[0497] EI-MS m/z : 770(M^+)

[0498] 2-21. 카보닐 그룹을 포함하는 변형된 GPP 유도체(LCB14-0606)



[0499]

[0500] 화합물 2

[0501] 실온에서 피리딘 중의 화합물 1(3g, 19.45mmol)의 용액에 아세트산 무수물(7.9ml, 77.8mmol)을 가하였다. 수득한 혼합물을 2시간 동안 교반하였다. 석유 에테르(100ml) 및 0.1N HCl(100ml)을 가하였다. 이렇게 수득한 유기 층을 감압하에 농축시켜 화합물 2(3.81g, 100%)를 수성 형태로 수득하였다.

[0502] ^1H NMR (600MHz, CDCl_3) δ 5.35-5.33 (m, 1H), 5.08-4.58 (m, 1H), 4.59 (d, $J=6.6\text{Hz}$, 2H), 2.11-2.03(m, 4H), 2.05(s, 3H), 1.70(s, 3H), 1.68(s, 3H), 1.60(s, 3H)

[0503] 화합물 3

[0504] 실온에서 디클로로메탄(30ml) 중의 화합물 2(3.81g, 19.41mmol)의 용액에 이산화셀레늄(65mg, 0.58mmol) 및 70% 3급 부틸하이드로퍼옥사이드(6.72ml, 48.52mmol)를 순차적으로 가하였다. 수득한 혼합물을 20시간 동안 교반하였다. 반응을 완료한 후, 디클로로메탄(100ml) 및 물(100ml)을 가하였다. 이렇게 수득한 유기 층을 감압하에 농축시켰다. 잔사를 에틸 아세테이트 및 헥산으로 컬럼 크로마토그래피시켜 화합물 3(1.8g, 43%)을 액체로서 수득하였다.

[0505] ^1H NMR (600MHz, CDCl_3) δ 5.38-5.30(m, 2H), 4.59 (d, $J=7.2\text{Hz}$, 2H), 4.00-3.99 (d, $J=6\text{Hz}$, 2H), 2.18-2.15(m, 2H), 2.10-2.06(m, 2H), 2.05(s, 3H), 1.70(s, 3H), 1.66(s, 3H)

[0506] 화합물 4

[0507] 0°C에서 디클로로메탄(18ml) 중의 화합물 3(1.8g, 8.48mmol)의 용액에 트리페닐포스핀(3.33g, 12.72mmol) 및 사브롬화탄소(3.37g, 10.18mmol)를 가하였다. 수득한 혼합물을 0°C에서 4시간 동안 교반하였다. 디클로로메탄(100ml) 및 물(100ml)을 가하였다. 이렇게 수득한 유기 층을 감압하에 농축시켰다. 잔사를 에틸 아세테이트 및 헥산으로 컬럼 크로마토그래피시켜 화합물 4(2.33g, 100%)를 액체 형태로 수득하였다.

[0508] ^1H NMR (600MHz, CDCl_3) δ 5.57-5.55(m, 1H), 5.35-5.32 (m, 2H), 4.59 (d, $J=7.2\text{Hz}$, 2H), 3.96(s, 2H),

2.18-2.15(m, 2H), 2.10-2.07(m, 2H), 2.05(s, 3H), 1.75(s, 3H), 1.70(s, 3H)

[0509] 화합물 5

[0510] 0℃에서 테트라하이드로푸란(35ml) 중의 수소화나트륨(348mg, 8.71mmol)의 용액에 테트라하이드로푸란(5ml) 중의 에틸아세트아세테이트(1.85ml, 14.52mmol)의 용액을 적가하였다. 수득한 혼합물을 0℃에서 30분 동안 교반한 후, 테트라하이드로푸란(5ml)에 용해시킨 화합물 4(2g, 7.26mmol)를 0℃에서 서서히 가하였다. 수득한 혼합물을 80℃에서 4시간 동안 교반하였다. 에틸 아세테이트(80ml) 및 물(80ml)을 가하였다. 이렇게 수득한 유기층을 감압하에 농축시켰다. 잔사를 에틸 아세테이트 및 헥산으로 컬럼 크로마토그래피시켜 화합물 5(1.56g, 66%)를 백색 액체로서 수득하였다.

[0511] ¹H NMR (600MHz, CDCl₃) δ 5.34-5.31(m, 1H), 5.17-5.14 (m, 1H), 4.60-4.58 (m, 2H), 4.20-4.16 (m, 2H), 3.61 (t, J=7.2Hz, 2H), 2.55-2.51 (m, 2H), 2.22 (s, 3H), 2.12-2.02 (m, 4H), 2.06 (s, 3H), 1.27(t, J=7.2Hz, 3H)

[0512] 화합물 6

[0513] 에탄올(20ml) 중의 화합물 5(1.56g, 4.81mmol)의 용액에 수산화칼륨(2.16g, 38.47mmol)을 에탄올(20ml)과 가하였다. 수득한 혼합물을 100℃에서 4시간 동안 교반하고, 에틸 에테르(100ml) 및 0.1N HCl 용액(50ml)으로 희석한 다음, Na₂CO₃ 용액으로 중화시켰다. 이렇게 수득한 유기층을 감압하에 농축시켰다. 잔사를 컬럼 크로마토그래피시켜 화합물 6(819mg, 81%)을 수득하였다.

[0514] ¹H NMR (600MHz, CDCl₃) δ 5.39-5.37(m, 1H), 5.09-5.07 (m, 1H), 4.15 (d, J=6.6Hz, 2H), 2.53-2.51 (m, 2H), 2.27-2.24(m, 2H), 2.13 (s, 3H), 2.12-2.09 (m, 2H), 2.04-2.01 (m, 2H), 1.66 (s, 3H), 1.60(s, 3H)

[0515] 화합물 7

[0516] 질소 대기하에 디클로로메탄(10ml) 중의 N-클로로석신이미드(210mg, 1.57mmol)의 용액에 디메틸설파이드(126μl, 1.71mmol)를 서서히 가하였다. 수득한 혼합물을 0℃에서 5분 동안 교반하였다. 디클로로메탄(5ml)에 용해된 화합물 6(300mg, 1.43mmol)의 용액을 30℃에서 가하였다. 수득한 혼합물을 0℃에서 2시간 동안 교반하였다. 반응을 완료한 후, n-펜탄(100ml) 및 물(100ml)을 가하였다. 이렇게 수득한 유기층을 감압하에 농축시켜 화합물 7(325mg, 99%)을 수득하였다.

[0517] ¹H NMR (600MHz, CDCl₃) δ 5.42 (m, 2H), 5.09 (m, 2H), 4.11 (d, J= 8.4Hz, 2H), 2.52 (m, 2H), 2.24 (m, 2H), 2.14 (s, 3H), 2.11 (m, 2H), 2.05 (m, 2H), 1.71 (s, 3H), 1.60 (s, 3H).

[0518] LCB14-0606

[0519] 문헌[참조: JACS, 2010, 132(12), 4281, 이의 내용은 본원에서 전체적으로 참조로 인용됨]에 기재된 유사한 방법에 따라 화합물 LCB14-0606을 제조하였다. 아세트니트릴 7ml 중의 화합물 7(320mg, 1.40mmol)의 용액에 아세트니트릴(7ml) 중의 트리소(테트라부틸암모늄) 수소 피로포스페이트(2.25g, 2.80mmol)의 용액을 서서히 가하였다. 수득한 혼합물을 1시간 동안 교반하였다. 반응을 완료한 후, 수득한 혼합물을 25℃ 미만에서 감압하에 농축시켰다. 잔사를 암모니아수:희석수(V:V=3:1) 및 25mM 중탄산암모늄:이소프로필 알콜(V:V=50:1)로 컬럼 크로마토그래피(팩킹된 BioRad AG 50W-X8 수지, 수소 형태, 15g)시켜 화합물 LCB14-0606(585mg, 99%)을 수득하였다.

[0520] ¹H NMR (600MHz, D₂O) δ 5.42 (m, 1H), 5.16 (m, 1H), 4.46 (t, J= 6.6Hz, 2H), 2.66 (t, J= 7.2Hz, 2H), 2.25 (t, J= 7.2Hz, 2H), 2.19 (s, 3H), 2.14 (m, 2H), 2.06 (m, 2H), 1.69 (s, 3H), 1.60 (s, 3H)

- [0521] 실시예 3: Ab(M)-CAAX의 프레닐화
- [0522] 3-1. 프레닐화 방법
- [0523] NBD-GPP(트리스-암모늄[3,7-디메틸-8-(7-니트로-벤조[1,2,5]옥사디아졸-4-일아미노)-옥타-2,6-디엔-1]피로포스페이트) 및 FTase(#344146, Calbiochem, USA) 또는 NBD-FPP(#LI-013, Jena Bioscience, Germany) 및 GGTase I(#345852, Calbiochem, USA)을 사용하여 Ab(M)-CAAX의 프레닐화를 수행하였다.
- [0524] 프레닐화 반응을 5mM MgCl₂, 10 μM ZnCl₂ 및 5mM DTT를 함유하는 50mM 트리스-HCl(pH 7.4) 완충 용액을 사용하여 30℃에서 3시간 동안 수행하였다. 반응을 완료한 후, SDS-PAGE 분석을 수행하였다. 이미지 분석기(ChemiDoc XRS⁺, BioRad, USA)를 사용하여 형광 단백질 밴드(들)를 확인하여 프레닐화 반응이 발생하였음을 입증하였다.
- [0525] 3-2. FTase 및 NBD-GPP를 사용하는 허셉틴-HC-CAAX의 프레닐화
- [0526] 허셉틴-HC-G₅CVIM, 허셉틴-HC-G₇CVIM 및 허셉틴-HC-G₁₀CVIM 항체들을 위에서 기재된 방법에 NBD-GPP 및 FTase를 사용하여 프레닐화하였다. 각각의 항체들의 중쇄(들)(약 50K 달톤)에 상응하는 단백질 밴드(들)에 대해 형광을 검출하였다. 이러한 결과는 각각 다양한 길이를 갖는 스페이서를 갖는, 허셉틴-HC-CAAX 항체들이 프레닐화될 수 있음을 입증하였다(도 12).
- [0527] 3-3. FTase 및 NBD-GPP를 사용하는 허셉틴-LC-CAAX의 프레닐화
- [0528] 허셉틴-LC-G₅CVIM, 허셉틴-LC-G₇CVIM 및 허셉틴-LC-G₁₀CVIM 항체들을 위에서 기재된 방법에 NBD-GPP 및 FTase를 사용하여 프레닐화하였다. 각각의 항체들의 경쇄(들)(약 25K 달톤)에 상응하는 단백질 밴드(들)에 대하여 형광을 검출하였다. 이러한 결과는 각각 다양한 길이를 갖는 스페이서를 갖는, 허셉틴-LC-CAAX 항체들이 프레닐화될 수 있음을 입증하였다(도 13).
- [0529] 3-4. FTase 및 NBD-GPP를 사용한 항 cMET-HC-CAAX의 프레닐화
- [0530] 항 cMET-HC-G₇CVIM 및 항 cMET-HC-G₁₀CVIM 항체들을 위에서 기재된 방법에 NBD-GPP 및 FTase를 사용하여 프레닐화하였다. 각각의 항체들의 중쇄(들)(약 50K 달톤)에 상응하는 단백질 밴드(들)에 대하여 형광을 검출하였다. 이러한 결과는 각각 다양한 길이를 갖는 스페이서를 갖는, 항 cMET-HC-CAAX 항체들이 프레닐화될 수 있음을 입증하였다(도 14).
- [0531] 3-5. FTase 및 NBD-GPP를 사용한 항 cMET-LC-CAAX의 프레닐화
- [0532] 항 cMET-LC-G₇CVIM 및 항 cMET-LC-G₁₀CVIM 항체들을 위에서 기재된 방법에 NBD-GPP 및 FTase를 사용하여 프레닐화하였다. 각각의 항체들의 경쇄(들)(약 25K 달톤)에 상응하는 단백질 밴드(들)에 대하여 형광을 검출하였다. 이러한 결과는 각각 다양한 길이를 갖는 스페이서를 갖는, 항 cMET-LC-CAAX 항체들이 프레닐화될 수 있음을 입증하였다(도 15).
- [0533] 3-6. GGTase I 및 NBD-FPP를 사용한 허셉틴-HC-CAAX의 프레닐화
- [0534] 허셉틴-HC-G₁₀CVLL 항체를 위에서 기재된 방법에 NBD-FPP 및 GGTase I을 사용하여 프레닐화하였다. G₁₀ 스페이서를 통하여 C-말단에서 CAAX-모티프와 연결된 항체의 중쇄(들)(약 50K 달톤)에 상응하는 단백질 밴드(들)에 대하여 형광을 검출하였다. 이러한 결과는 허셉틴-HC-CAAX 항체가 GGTase I에 의하여 프레닐화될 수 있음을 입증하였다(도 16).

- [0535] 3-7. GGTase I 및 NBD-FPP를 사용한 허셉틴-LC-CAAX의 프레닐화
- [0536] 허셉틴-LC-G₁₀CVLL 항체를 위에서 기재된 방법에 NBD-FPP 및 GGTase I을 사용하여 프레닐화하였다. G₁₀ 스페이서를 통하여 C-말단에서 CAAX-모티프와 연결된 항체의 경쇄(들)(약 25K 달톤)에 상응하는 단백질 밴드(들)에 대하여 형광을 검출하였다. 이러한 결과는 허셉틴-LC-CAAX 항체가 GGTase I에 의하여 프레닐화될 수 있음을 입증하였다(도 16).
- [0537] 3-8. FTase 및 이소기질을 사용한 허셉틴-LC-CAAX의 프레닐화
- [0538] 허셉틴-LC-G₇CVIM
- [0539] 허셉틴-LC-G₇CVIM 항체를 위에서 기재된 방법에 LCB14-0512 및 FTase를 사용하여 프레닐화하였다. 프레닐화 허셉틴-LC-G₇CVIM 항체를 PNGase F를 처리하지 않고 환원 상태에서 LC/MS 분석하는 경우, 중쇄 및 경쇄의 이론적 분자량은 각각 50,597달톤 및 24,480달톤일 것으로 예상되었다. 도 17에 나타낸 바와 같이, 중쇄 및 경쇄의 실험적 분자량은 각각 50,600달톤 및 24,479달톤인 것으로 측정되었다. 이론적 분자량 값과 실험적 분자량 값 사이의 차이는 표준 오차 범위 내였다. 이러한 결과는 허셉틴-LC-G₇CVIM 항체가 FTase 및 이소기질에 의하여 프레닐화되었음을 입증하였다(LCB14-0512).
- [0540] 허셉틴-LC-G₁₀CVIM
- [0541] 허셉틴-LC-G₁₀CVIM 항체를 위에서 기재된 방법에 LCB14-0512 및 FTase를 사용하여 프레닐화하였다. 프레닐화 허셉틴-LC-G₁₀CVIM 항체를 PNGase F를 처리하지 않고 환원 상태에서 LC/MS 분석하는 경우, 중쇄 및 경쇄의 이론적 분자량은 각각 50,596달톤 및 24,651달톤일 것으로 예상되었다. 도 18에 나타낸 바와 같이, 중쇄 및 경쇄의 실험적 분자량은 각각 50,601달톤 및 24,651달톤인 것으로 측정되었다. 이론적 분자량 값과 실험적 분자량 값 사이의 차이는 표준 오차 범위 내였다. 이러한 결과는 허셉틴-LC-G₁₀CVIM 항체가 FTase 및 이소기질에 의하여 프레닐화되었음을 입증하였다(LCB14-0512).
- [0542] 실시예 4: 클릭 화학을 사용하는 약물 접합
- [0543] 4-1. 프레닐화 Ab(M)-CAAX의 재산화
- [0544] 희석여과(diafiltration)를 수행하여 위에서 기재된 방법에 따라 제조한 프레닐화 허셉틴-LC-G₇CVIM 중의 과량의 시약을 제거하였다. 항체를 CuSO₄를 사용하여 재산화시켰다. 희석여과를 수행하여 CuSO₄를 제거하였다.
- [0545] 4-2. 클릭 화학 및 링커-약물을 사용한 Ab(M)-CAAX의 약물 접합
- [0546] 재산화된, 프레닐화 허셉틴-LC-G₇CVIM과 화합물 LCB14-0536 사이의 클릭 화학 반응을 10분 동안 수행하였다. 수득한 접합체(LCB14-0104)(FIG. 26)를 LC/MS 분석하였다. 항체를 PNGase F를 처리하지 않고 환원 상태에서 LC/MS 분석하는 경우, 중쇄 및 경쇄의 이론적 분자량은 각각 49,153달톤 및 25,410달톤일 것으로 예상되었다. 도 19에 나타낸 바와 같이, 중쇄 및 경쇄의 실험적 분자량은 각각 49,154달톤 및 25,408달톤인 것으로 측정되었다. 이론적 분자량 값과 실험적 분자량 값 사이의 차이는 표준 오차 범위 내이다. 이러한 결과는 프레닐화 허셉틴-LC-G₇CVIM 항체가 클릭 화학 반응에 의하여 약물과 접합체를 형성하였음을 입증하였다.
- [0547] 4-3. 허셉틴-LC-CAAX-약물 접합체의 분석
- [0548] 접합체 LCB14-0101을 에테르-5PW 컬럼(7.5×75mm, 10 μm, Tosoh Bioscience, USA)으로 소수성 상호 작용 크로마토그래피-고성능 액체 크로마토그래피시켰다. 1.5M 황산암모늄을 함유하는 50mM 인산칼륨 완충액(pH 7.0)을 완충액 A로서 사용하고, 20% 이소프로필 알콜을 함유하는 50mM 인산칼륨 완충액(pH 7.0)을 완충액 B로서 사용하

였다. 90% A/10% B를 5분 동안 유지시켰다. 90% A/10% B 대 10% A/90% B의 선형 구배를 사용하여 그 다음 30분 동안 용출을 수행하였다. 유량 및 온도를 각각 0.8ml/min 및 25°C로 설정하였다. 검출을 254 및 280nm 둘다에서 후속하였다. 변형되지 않은 허셉틴-LC-G₇CVIM 및 프레닐화 허셉틴-LC-G₇CVIM을 대조군으로서 사용하였다. 변형되지 않은 허셉틴-LC-G₇CVIM, 프레닐화 허셉틴-LC-G₇CVIM 및 접합체 LCB14-0101의 보유 시간은 각각 9.6, 11.7 및 12.4분이었다(도 20).

[0549] 실시예 5: ADC의 항증식

[0550] 5-1. 세포주

[0551] 시판 중인 사람 유방암 세포주 MCF-7(HER2 음성 내지 정상), MDA-MB-468(HER2 음성) 및 SK-BR-3(HER2 양성)을 사용하였다. 세포주를 시판 중인 세포주가 제공된 권장된 명세서에 따라 배양하였다.

[0552] 5-2. 시험 샘플

[0553] 항체로서, 시판 중인 허셉틴 항체 및 허셉틴-LC-G₇CVIM를 사용하였다. 약물로서, LCB14-0537(MMAF), LCB14-0508(MMAF-OMe) 및 LCB14-0562(MMAE)를 사용하였다. 단백질-활성제 접합체로서, LCB14-0101, LCB14-0102 및 LCB14-0103을 사용하였다(도 26). LCB14-0512를 사용하여 허셉틴-LC-G₇CVIM을 프레닐화하였다. 프레닐화 허셉틴-LC-G₇CVIM을 LCB14-0592를 사용하여 클릭 반응시켜 β-글루쿠로나이드 링커(BG)-MMAF를 접합시킴으로써, LCB14-0101을 제조하였다. 또한, 허셉틴-LC-G₇CVIM을 LCB14-0589를 사용하여 클릭 반응시켜 Val-Cit 링커(VC)-MMAF-OMe를 접합시킴으로써, LCB14-0102를 제조하였다. 추가로, LCB14-0598을 사용하여 프레닐화 허셉틴-LC-G₇CVIM을 클릭 반응시켜 β-글루쿠로나이드 링커(BG)-MMAE를 접합시킴으로써, LCB14-0103을 제조하였다.

[0554] 5-3. 시험 방법

[0555] 암 세포주에 관한 항체, 약물 및 접합체의 항-증식 활성을 측정하였다. 세포를 웰당 1×10⁴개의 세포로 96-웰, 조직 배양 플레이트에 플레이팅하였다. 24시간 동안 배양 후, 항체, 약물 및 접합체를 다양한 농도로 가하였다. 72시간 후 살아 있는 세포의 수를 SRB 염료를 사용하여 계수하였다. 흡광도를 스펙트라맥스(SpectraMax) 190(Molecular Devices, USA)을 사용하여 540nm에서 측정하였다.

[0556] 5-4. 시험 결과

[0557] LCB14-0101(허셉틴-LC-G₇CVIM-BG-MMAF)

[0558] 허셉틴-LC-G₇CVIM의 IC₅₀은 MCF-7, MDA-MB-468 및 SK-BR-3으로는 10μg/ml 이상이였다. LCB14-0101(MMAF 접합체)의 IC₅₀은 MCF-7 및 MDA-MB-468로는 각각 8.09μg/ml 및 4.18μg/ml이며, 이는 없거나 낮은 HER2 수준을 발현하는 반면, SK-BR-3으로는 IC₅₀이 0.11μg/ml였으며, 이는 HER2를 과발현한 것이다. 이의 탁월한 억제 활성 이외에, LCB14-0101은 허셉틴-LC-G₇CVIM보다 약 40-80배 더 선택적이다. 따라서, LCB14-0101은 세포독성 약물 효능 및 항 HER2 선택도를 둘 다 가짐이 입증된다(도 21).

[0559] LCB14-0102(허셉틴-LC-G₇CVIM-VC-MMAF-OM)

[0560] 허셉틴-LC-G₇CVIM의 IC₅₀은 MCF-7 및 SK-BR-3으로는 10μg/ml이였다. LCB14-0102(MMAF-OMe 접합체)의 IC₅₀은 MCF-7로는 4.38μg/ml인 반면, SK-BR-3로는 IC₅₀이 0.15μg/ml였다. 이의 탁월한 억제 활성 이외에, LCB14-0102는 허셉틴-LC-G₇CVIM보다 약 30배 더 선택적이다. 따라서, LCB14-0102는 세포독성 약물 효능과 항 HER2 선택도를 둘 다 가짐이 입증된다(도 22).

- [0561] LCB14-0103(허셉틴-LC-G₇CVIM-BG-MMAE)
- [0562] LCB14-0103(MMAE 접합체)의 IC₅₀은 MCF-7로는 7.25 μ g/ml인 반면, SK-BR-3으로는 IC₅₀이 0.072 μ g/ml였다. 이의 탁월한 억제 활성 이외에, LCB14-0103은 허셉틴-LC-G₇CVIM보다 약 100배 더 선택적이다. 따라서, LCB14-0103은 세포독성 약물 효능과 항 HER2 선택도를 둘 다 가짐이 입증된다(도 23).
- [0563] 기타 양태
- [0564] 위의 설명으로부터, 본원에 기재된 본 발명을 변형 및 변경하여 다양한 용도 및 조건을 채택할 수 있다는 것이 명백하다. 이러한 양태는 다음 청구의 범위 내이다.
- [0565] 본원에서의 변수의 어떠한 정의에서의 요소들의 목록 열거는 어떠한 단일 요소 또는 열거된 요소의 조합(또는 하위조합)으로서의 변수의 정의를 포함한다. 본원에서 양태의 열거는 어떠한 단일 양태로서의 양태 또는 어느 다른 양태 또는 이의 일부와 조합한 양태를 포함한다.
- [0566] 당해 명세서에 언급된 모든 특허 및 간행물은 각각의 독립적 특허 및 간행물이 참조로 포함된다고 구체적으로 및 개별적으로 나타나 있는 것과 동일한 범위를 참조하여 포함된다.

도면

도면1

중쇄

10	20	30	40	50	60
EVQLVESGGG	LVQPGGSLRL	SCAASGFNIK	DTYIHWVRQA	PGKGLEWVAR	IYPTNGYTRY
70	80	90	100	110	120
ADSVKGRFTI	SADTSKNTAY	LQMNSLRAED	TAVYYCSRWG	GDGFYAMDYW	GQGTLVTVSS
130	140	150	160	170	180
ASTKGPSVF	LAPSSKSTSG	GTAALGCLVK	DYFPEPVTVS	WNSGALTSGV	HTFPAVLQSS
190	200	210	220	230	240
GLYSLSSVVT	VPSSSLGTQT	YICNVNHPK	NTKVDKRVPE	KSCDKTHTCP	PCPAPELLGG
250	260	270	280	290	300
PSVFLFPPKP	KDTLMISRTP	EVTCVVVDVS	HEDPEVKFNW	YVDGVEVHNA	KTKPREEQYN
310	320	330	340	350	360
STYRVVSVLT	VLHQDWLNGK	EYCKVSNKA	LPAPIEKTIIS	KAKGQPREPQ	VYTLPPSRDE
370	380	390	400	410	420
LTKNQVSLT	LVKGFYPSDI	AVEWESNGQP	ENNYKTPPV	LDSGGSFFLY	SKLTVDKSRW
430	440	450			
QQGNVFSCSV	MHEALHNHYT	QKSLSLSPGK	GCVIM		

경쇄

10	20	30	40	50	60
DIQMTQSPSS	LSASVGDRVIT	ITCRASQDVN	TAVAWYQQK	GKAPKLLIYS	ASFLYSGVPS
70	80	90	100	110	120
RFSGSRSGTD	FTLTISSLQP	EDFATYYCQQ	HYTTPPTFGQ	GTKVEIKRSV	AAPSVFIFPP
130	140	150	160	170	180
SDEQLKSGTA	SVVCLLNNFY	PREAKVQWKV	DNALQSGNSQ	ESVTEQDSKD	STYLSLSTLT
190	200	210			
LSKADYEKHK	VYACEVTHQG	LSSPVTKSFN	RGEC		

도면2

중쇄

10 20 30 40 50 60
 EVQLVESGGG LVQPGGSLRL SCAASGFNIK DTYIHWVRQA PGKGLEWVAR IYPTNGYTRY
 70 80 90 100 110 120
 ADSVKGRFTI SADTSKNYAY LQMNSLRAED TAVYYCSRWG GDGFYAMDYW GQGTLVTVSS
 130 140 150 160 170 180
 ASTKGPSVFP LAPSSKSTSG GTAALGCLVK DYFPEPVTVS WNSGALTSGV HTFPAVLQSS
 190 200 210 220 230 240
 GLYSLSSVVT VPSSSLGTQT YICNVNHKPS NTKVDKRVEP KSCDKTHTCP PCPAPELLGG
 250 260 270 280 290 300
 PSVFLFPPKP KDTLMISRTP EIVTCVVVDVSHEDPEVKFNW YVDGVEVHNA KTKPREEQYN
 310 320 330 340 350 360
 STYRVVSVLT VLHQDWLNGK EYKCKVSNKA LPAPIEKTIS KAKGQPREPQ VYTLPPSRDE
 370 380 390 400 410 420
 LTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPPVLDSDGSEFFLYSKLTVDKSRW
 430 440 450
 QQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

경쇄

10 20 30 40 50 60
 DIQMTQSPSSLSASVGRVITCRASQDVNTAVAWYQQKPGKAPKLLIYSASFLYSGVPS
 70 80 90 100 110 120
 RFGSRSRGTDFLTISSLQPEDFATYYCQQHYTTPPTFGQGTKVEIKRSVAAPSVFIFPP
 130 140 150 160 170 180
 SDEQLKSGTASVVCLLNFFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDESTYLSSTLT
 190 200 210
 LSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGECGCVIM

도면3

중쇄

10 20 30 40 50 60
 EVQLVESGGG LVQPGGSLRL SCAASGFNIK DTYIHWVRQA PGKGLEWVAR IYPTNGYTRY
 70 80 90 100 110 120
 ADSVKGRFTI SADTSKNYAY LQMNLSRAED TAVYYCSRWG GDGFYAMDYW GQGTLVTVSS
 130 140 150 160 170 180
 ASTKGPSVFP LAPSSKSTSG GTAALGCLVK DYFPEPVTVS WNSGALTSGV HTFPAVLQSS
 190 200 210 220 230 240
 GLYSLSSVVT VPSSSLGTQT YICNVNHKPS NTKVDKRVEP KSCDKHTHCP PCPAPELLGG
 250 260 270 280 290 300
 PSVFLFPPKP KDTLMISRTP EVTCVVVDV S HEDPEVKFNW YVDGVEVHNA KTKPREEQYN
 310 320 330 340 350 360
 STYRVVSVLT VLHQDWLNGK EYCKVSNKA LPAPIEKTIS KAKGQPREPQ VYTLPPSRDE
 370 380 390 400 410 420
 LTKNQVSLT C LVKGFYPSDI AVEWESNGQP ENNYKTTTPV LDSDGSFFLY SKLTVDKSRW
 430 440 450
 QQGNVFSCSV MHEALHNHYT QKSLSLSPGK GGGGGCVIM

경쇄

10 20 30 40 50 60
 DIQMTQSPSS LSASVGRVT ITCRASQDVN TAVAWYQQKPK GKAPKLLIYS ASFLYSGVPS
 70 80 90 100 110 120
 RFGSGRSGTD FTLTISSLQP EDFATYYCQQ HYTTPPTFGQ GTKVEIKRSV AAPSVFIFPP
 130 140 150 160 170 180
 SDEQLKSGTA SVVCLLNNFY PREAKVQWKV DNALQSGNSQ ESVTEQDSKD STYLSLSTLT
 190 200 210
 LSKADYEKHK VYACEVTHQG LSSPVTRKSN RGEK

도면4

중쇄

10 20 30 40 50 60
 EVQLVESGGG LVQPGGSLRL SCAASGFNIK DTYIHWVRQA PGKGLEWVAR IYPTNGYTRY
 70 80 90 100 110 120
 ADSVKGRFTI SADTSKNTAY LQMNSLRAED TAVYYCSRWG GDGFYAMDYW GQGTLVTVSS
 130 140 150 160 170 180
 ASTKGPSVFP LAPSSKSTSG GTAALGCLVK DYFPEPVTVS WNSGALTSGV HTFPAVLQSS
 190 200 210 220 230 240
 GLYSLSSVVT VPSSSLGTQT YICNVNHNKPS NTKVDKRVEP KSCDKTHTCP PCPAPELLGG
 250 260 270 280 290 300
 PSVFLFPPKP KDTLMISRTP EVTCVVVDVSHEDPEVKFNW YVDGVEVHNA KTKPREEQYN
 310 320 330 340 350 360
 STYRVVSVLT VLHQDWLNGK EYCKVSNKA LPAPIEKTIS KAKGQPREPQ VYTLPPSRDE
 370 380 390 400 410 420
 LTKNQVSLTCLVKGFYPSDI AVEWESNGQP ENNYKTTTPPV LDSDGSFFLY SKLTVDKSRW
 430 440 450
 QQGNVFSCSV MHEALHNHYT QKSLSLSPGK

경쇄

10 20 30 40 50 60
 DIQMTQSPSS LSASVGRVT ITCRASQDVN TAVAWYQKPK GKAPKLLIYS ASFLYSGVPS
 70 80 90 100 110 120
 RFGSRSRGTDFLTISLQPEDFATYYCQQHYTTPPTFGQGTKVEIKRSVAAPSVFIFPP
 130 140 150 160 170 180
 SDEQLKSGTASVVCCLLNFFYPREAKVQWVKV DNALQSGNSQESVTEQDSKDESTYLSLSTLT
 190 200 210 220
 LSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGECGGGGG VIM

도면5

중쇄

10 20 30 40 50 60
 EVQLVESGGG LVQPGGSLRL SCAASGFNIK DTYIHVVQRQ PGKGLEWVAR IYPTNGYTRY
 70 80 90 100 110 120
 ADSVKGRFTI SADTSKNTAY LQMNSLRAED TAVYYCSRWG GDGFYAMDYW GQGTLVTVSS
 130 140 150 160 170 180
 ASTKGPSVFP LAPSSKSTSG GTAALGCLVK DYFPEPTVS WNSGALTSGV HTFPAVLQSS
 190 200 210 220 230 240
 GLYSLSSVVT VPSSSLGTQT YICNVNHKPS NTKVDKRVEP KSCDKTHTCP PCPAPELLGG
 250 260 270 280 290 300
 PSVFLFPPK KDTLMISRTP EVTCVVVDVS HEDPEVKFNW YVDGVEVHNA KTKPREEQYN
 310 320 330 340 350 360
 STYRVVSVLT VLHQDWLNGK EYKCKVSNKA LPAPIEKTIK KAKGQPREPQ VYTLPPSRDE
 370 380 390 400 410 420
 LTKNQVSLTC LVKGFYPSDI AVEWESNGQP ENNYKTPPPV LDSDGSFFLY SKLTVDKSRW
 430 440 450 460
 QQGNVFSCSV MHEALHNHYT QKSLSLSPGK GGGGGGCVI M

경쇄

10 20 30 40 50 60
 DIQMTQSPSS LSASVGRVIT ITCRASQDVN TAVAWYQQKPKAPKLLIYS ASFLYSGVPS
 70 80 90 100 110 120
 RFGSGRSGTD FTLTISSLQP EDFATYYCQQ HYTTPPTFGQ GTKVEIKRSV AAPSVFIFPP
 130 140 150 160 170 180
 SDEQLKSGTA SVVCLLNNFY PREAKVQWKV DNALQSGNSQ ESVTEQDSKD STYLSLSTLT
 190 200 210
 LSKADYEEKH VYACEVTHQG LSSPVTKSPN RGEN

도면6

중쇄

10 20 30 40 50 60
 EVQLVESGGG LVQPGGSLRL SCAASGFNIK DTYIHWVRQA PGKGLEWVAR IYPTNGYTRY

 70 80 90 100 110 120
 ADSVKGRFTI SADTSKNTAY LQMNSLRAED TAVYYCSRWG GDGFYAMDYW GQGTLVTVSS

 130 140 150 160 170 180
 ASTKGPSVFP LAPSSKSTSG GTAALGCLVK DYFPEPVTVS WNSGALTSGV HTFPAVLQSS

 190 200 210 220 230 240
 GLYSLSSVVT VPSSSLGTQT YICNVNHKPS NTKVDKRVEP KSCDKTHTCP PCPAPELLGG

 250 260 270 280 290 300
 PSVFLFPPKP KDTLMISRTP EVTCVVVDVS HEDPEVKFNW YVDGVEVHNA KTKPREEQYN

 310 320 330 340 350 360
 STYRVVSVLT VLHQDWLNGK EYKCKVSNKA LPAPIEKTIS KAKGQPREPQ VYTLPPSRDE

 370 380 390 400 410 420
 LTKNQVSLTQ LVKGFYPSDI AVEWESNGQP ENNYKTTTPPV LDSDGSFFLY SKLTVDKSRW

 430 440 450
 QQGNVFSCSV MHEALHNHYT QKSLSLSPGK

경쇄

10 20 30 40 50 60
 DIQMTQSPSS LSASVGDRTV ITCRASQDVN TAVAWYQQKFP GKAPKLLIYS ASFLYSGVPS

 70 80 90 100 110 120
 RFGSRSRGTQ FTLLTISSLQP EDFATYYCQQ HYTTPPTFGQ GTKVEIKRSV AAPSVEIFPP

 130 140 150 160 170 180
 SDEQLKSGTA SVVCLLNNFY PREAKVQWKV DNALQSGNSQ ESVTEQDSKD STYLSLSTLT

 190 200 210 220
 LSKADYEKHK VYACEVTHQG LSSPVTKSFN RGECGGGGGG GGVIM

도면7

중쇄

10 20 30 40 50 60
 EVQLVESGGG LVQPGGSLRL SCAASGFNIK DTYIHWRQA PGKGLEWVAR IYPTNGYTRY

 70 80 90 100 110 120
 ADSVKGRFTI SADTSKNTAY LQMNSLRAED TAVYYCSRWG GDGFYAMDYW GQGTLVTVSS

 130 140 150 160 170 180
 ASTKGPSVFP LAPSSKSTSG GTAALGCLVK DYFPEPVTVS WNSGALTSGV HTFPAVLQSS

 190 200 210 220 230 240
 GLYSLSSVVT VPSSSLGTQT YICNVNHPKS NTKVDKRVFP KSCDKTHTCP PCPAPELLGG

 250 260 270 280 290 300
 PSVFLFPPKP KDTLMISRTP EVTCVVVDVS HEDPEVKFNW YVDGVEVHNA KTKPREEQYN

 310 320 330 340 350 360
 STYRVVSVLT VLHQDWLNGK EYKCKVSNKA LPAPIEKTIK KAKGQPREPQ VYTLPPSRDE

 370 380 390 400 410 420
 LTKNQVSLTC LVKGFYPSDI AVEWESNGQP ENNYKTTTPV LDSDGSFFLY SKLTVDKSRW

 430 440 450 460
 QQGNVFSCSV MHEALHNHYT QKSLSLSPGK GGGGGGGGG CVIM

경쇄

10 20 30 40 50 60
 DIQMTQSPSS LSASVGRVT ITCRASQDVN TAVAWYQQK GKAPKLLIYS ASFLYSGVPS

 70 80 90 100 110 120
 RFGSRSRGTD FTLTISSLQP EDFATYYCQQ HYTTPPTFGQ GTKVEIKRSV AAPSVFIFPP

 130 140 150 160 170 180
 SDEQLKSGTA SVVCLLNNFY PREAKVQWKV DNALQSGNSQ ESVTEQDSKD STYLSLSTLT

 190 200 210
 LSKADYEKHK VYACEVTHQG LSSPVTKSFN RGEN

도면8

증쇄

10	20	30	40	50	60
EVQLVESGGG	LVQPGGSLRL	SCAASGFNIK	DTYIHWVRQA	PGKGLEWVAR	IYPTNGYTRY
70	80	90	100	110	120
ADSVKGRFTI	SADTSKNTAY	LQMNSLRAED	TAVYYCSRWG	GDGFYAMDYW	GQGTLLVTVSS
130	140	150	160	170	180
ASTKGPSVFP	LAPSSKSTSG	GTAALGCLVK	DYFPEPVTVS	WNSGALTSGV	HTFPAVLQSS
190	200	210	220	230	240
GLYSLSSVVT	VPSSSLGTQT	YICNVNHKPS	NTKVDKRVEP	KSCDKTHTCP	PCPAPELLGG
250	260	270	280	290	300
PSVFLFPPKP	KDTLMISRTP	EVTCVVVDVS	HEDPEVKFNW	YVDGVEVHNA	KTKPREEQYN
310	320	330	340	350	360
STYRVVSVLT	VLHQDWLNGK	EYKCKVSNKA	LPAPIEKTIS	KAKGQPREPQ	VYTLPPSRDE
370	380	390	400	410	420
LTKNQVSLTC	LVKGFYPSDI	AVEWESNGQP	ENNYKTPPV	LDSDGSFFLY	SKLTVDKSRW
430	440	450			
QQGNVFSCSV	MHEALHNHYT	QKSLSLSPGK			

경쇄

10	20	30	40	50	60
DIQMTQSPSS	LSASVGDRVV	ITCRASQDVN	TAVAWYQQK	GKAPKLLIYS	ASFLYSGVPS
70	80	90	100	110	120
RFSGSRSGTD	FTLTISSLQP	EDFATYYCQQ	HYTTPPTFGQ	GTKVEIKRSV	AAPSVFIFPP
130	140	150	160	170	180
SDEQLKSGTA	SVVCLLNNFY	PREAKVQWKV	DNALQSGNSQ	ESVTEQDSKD	STYLSLSTLT
190	200	210	220		
LSKADYEKHK	VYACEVTHQG	LSSPVTKSFN	RGECGGGGGG	GGGCVLM	

도면9

중쇄

10 20 30 40 50 60
 EVQLVESGGG LVQPGGSLRL SCAASGFNIK DTYIHWVRQA PGKGLEWVAR IYPTNGYTRY

 70 80 90 100 110 120
 ADSVKGRFTI SADTSKNTAY LQMNSLRAED TAVYYCSRWG GDGFYAMDYW GQGTLVTVSS

 130 140 150 160 170 180
 ASTKGPSVFP LAPSSKSTSG GTAALGCLVK DYFPEPVTVS WNSGALTSGV HTFPAVLQSS

 190 200 210 220 230 240
 GLYSLSSVVT VPSSSLGTQT YICNVNHKPS NTKVDRKVEP KSCDKTHTCP PCPAPELLGG

 250 260 270 280 290 300
 PSVFLFPPKP KDTLMISRTP EVTCVVVDVS HEDPEVKFNW YVDGVEVHNA KTKPREEQYN

 310 320 330 340 350 360
 STYRVVSVLT VLHQDWLNGK EYKCKVSNKA LPAPIEKTI S KAKGQPREPQ VYTLPPSRDE

 370 380 390 400 410 420
 LTKNQVSLTC LVKGFYPSDI AVEWESNGQP ENNYKTPPPV LDSDGSFFLY SKLTVDKSRW

 430 440 450 460
 QQGNVFSCSV MHEALHNHYT QKSLSLSPGK GGGGGGGGG CVLL

경쇄

10 20 30 40 50 60
 DIQMTQSPSS LSASVGDRTV ITCRASQDVN TAVAWYQQKPK GRAPKLLIYS ASFLYSGVPS

 70 80 90 100 110 120
 RFGSGRSGTD FTLTISSLQP EDFATYYCQQ HYTTPPTFGQ GTKVEIKRSV AAPSVFIFPP

 130 140 150 160 170 180
 SDEQLKSGTA SVVCLLNNFY PREAKVQWKV DNALQSGNSQ ESVTEQDSKD STYLSLSTLT

 190 200 210
 LSKADYEKHK VYACEVTHQG LSSPVTKSFN RGEN

도면10

중쇄

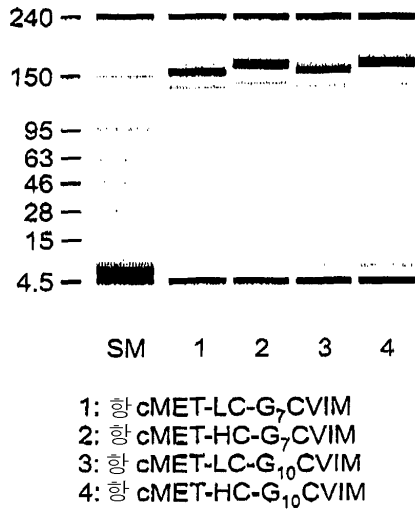
10 20 30 40 50 60
 EVQLVESGGG LVQPGGSLRL SCAASGFNIK DTYIHWVROA PGKGLEWVAR IYPTNGYTRY
 70 80 90 100 110 120
 ADSVKGRFTI SADTSKNYAY LQMNSLRAED TAVYYCSRWG GDGFYAMDYW GQGTLVTVSS
 130 140 150 160 170 180
 ASTKGPSVFP LAPSSKSTSG GTAALGCLVK DYFPEPVTVS WNSGALTSGV HTFPAVLQSS
 190 200 210 220 230 240
 GLYSLSSVVT VPSSSLGTQT YICNVNHKPS NTKVDKRVEP KSCDKTHTCP PCPAPELLGG
 250 260 270 280 290 300
 PSVFLFPPKP KDTLMISRTP EVTCVVVDVS HEDPEVKFNW YVDGVEVHNA KTKPREEQYN
 310 320 330 340 350 360
 STYRVSVLT VLHQDWLNGK EYKCKVSNKA LPAPIEKTIS KAKGQPREPQ VYTLPPSRDE
 370 380 390 400 410 420
 LTKNQVSLTC LVKGFYPSDI AVEWESNGQP ENNYKTTTPV LDSDGSFFLY SKLTVDKSRW
 430 440 450
 QQGNVFSCSV MHEALHNHYT QKSLSLSPGK

경쇄

10 20 30 40 50 60
 DIQMTQSPSS LSASVGRVIT ITCRASQDVN TAVAWYQQKPKAPKLLIYS ASFLYSGVPS
 70 80 90 100 110 120
 RFGSGRSGTD FTLTISSLQP EDFATYYCQQ HYTTPPTFGQ GTKVEIKRSV AAPSVFIFPP
 130 140 150 160 170 180
 SDEQLKSGTA SVVCLLNIFY PREAKVQWKV DNALQSGNSQ ESVTEQDSKD STYLSLSTLT
 190 200 210 220
 LSKADYEKHK VYACEVTHQG LSSPVTKSFN RGECSGGGGG GGGGCVLL

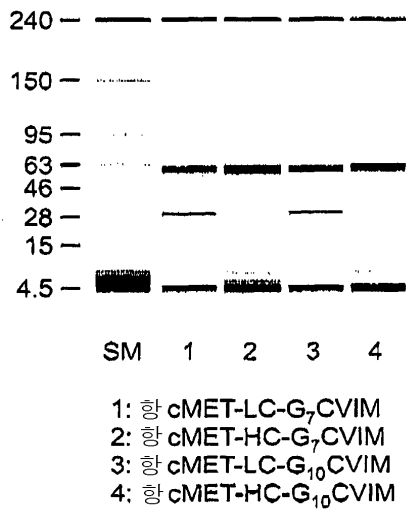
도면11a

비환원

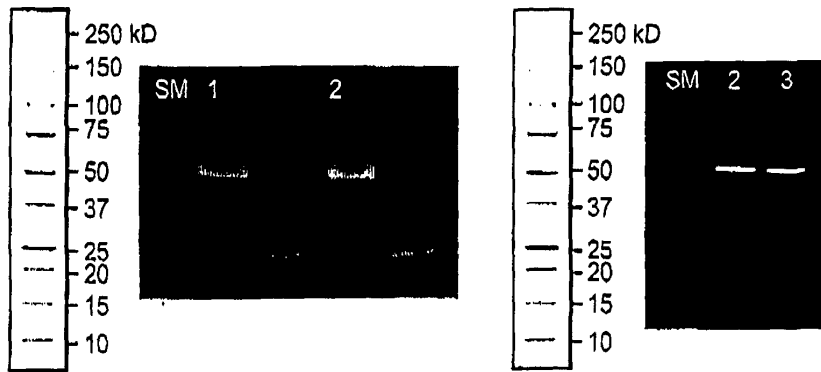


도면11b

환원

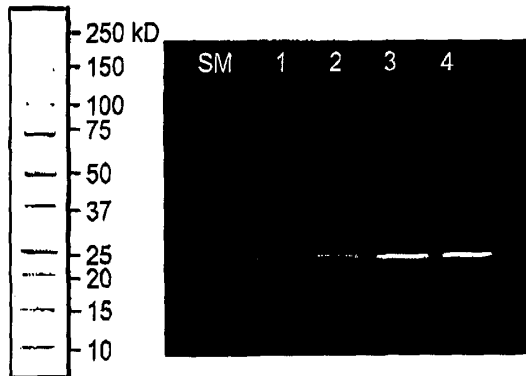


도면12



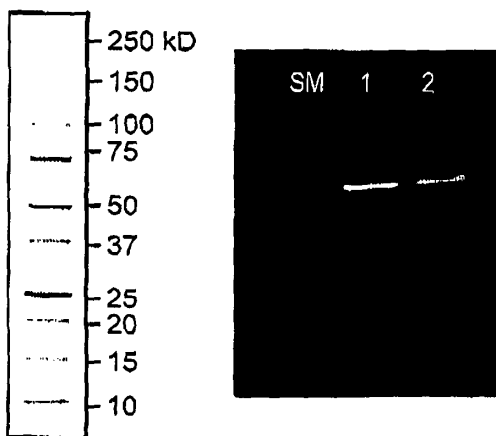
- 1: 허셉틴-HC-GCVIM
- 2: 허셉틴-HC-G₇CVIM
- 3: 허셉틴-HC-G₁₀CVIM

도면13



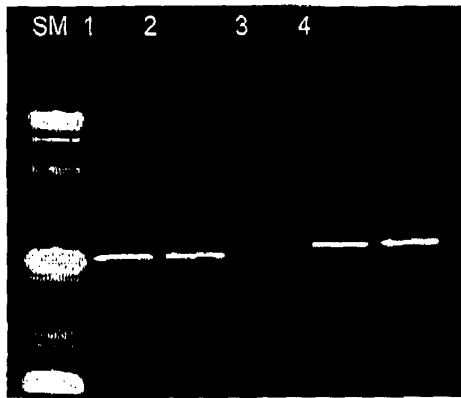
- 1: 허셉틴-LC-GCVIM
- 2: 허셉틴-LC-G₅CVIM
- 3: 허셉틴-LC-G₇CVIM
- 4: 허셉틴-LC-G₁₀CVIM

도면14



- 1: 항 cMET-HC-G₇CVIM
- 2: 항 cMET-HC-G₁₀CVIM

도면15



- 1: 허셉틴 tin-LC-G₇CVIM
- 2: 허셉틴 tin-LC-G₁₀CVIM
- 3: 항 cMET-LC-G₇CVIM
- 4: 항 cMET-LC-G₁₀CVIM

도면16



- 1: 허셉틴 -LC-G₇CVIM(양성 대조군)
- 2: 허셉틴 -HC-G₁₀CVLL
- 3: 허셉틴 -LC-G₁₀CVLL
- 4: 허셉틴 -HC-G₁₀CVLL
- 5: 허셉틴 -LC-G₁₀CVLL

도면17

샘플	이론적 질량(달톤)			실험적 질량(달톤)			델타 질량(달톤)
	HC	LC, 원형	LC, 프레닐화	HC	LC, 원형	LC, 프레닐화	
허셉틴-LC-G ₇ CVIM	49,152*	24,275	-	49,156*	24,274	-	
프레닐화 허셉틴-LC-G ₇ CVIM	50,597**	24,275	24,480	50,600**	-	24,479	205

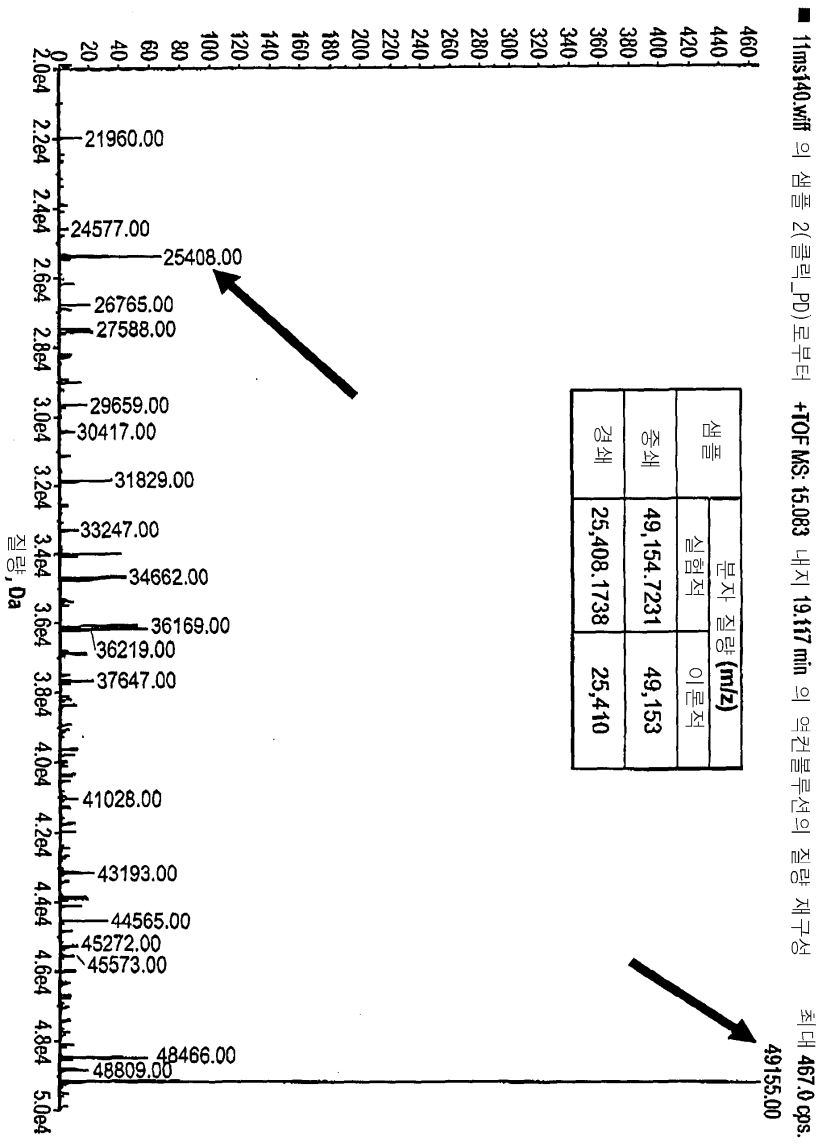
*PNGase F 처리됨
 **PNGase F 처리되지 않음

도면18

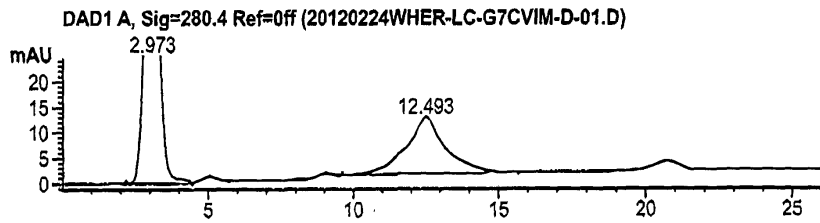
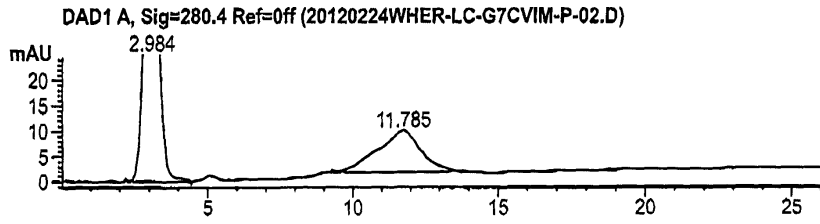
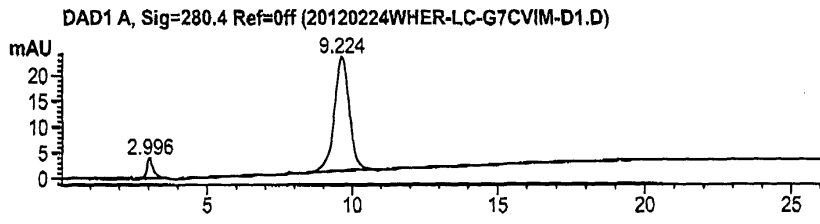
샘플	이론적 질량(달톤)			질량(달톤)			델타 질량(달톤)
	HC	LC, 원형	LC, 프레닐화	HC	LC, 원형	LC, 프레닐화	
허셉틴-LC-G ₁₀ CVIM	49,152*	24,446	-	49,156*	24,445	-	
프레닐화 허셉틴-LC-G ₁₀ CVIM	50,596**	24,446	24,651	50,601**	-	24,651	206

*PNGase F 처리됨
 **PNGase F 처리되지 않음

도면19

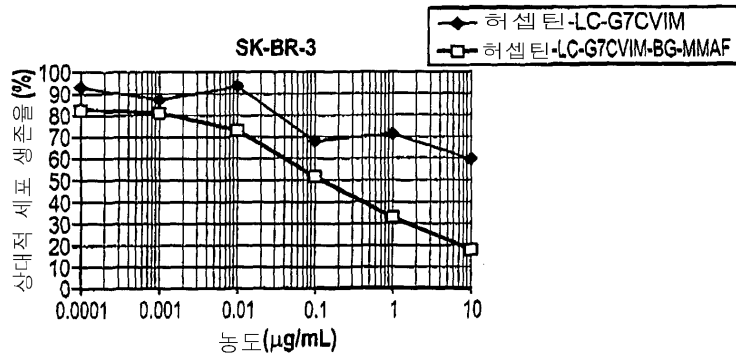
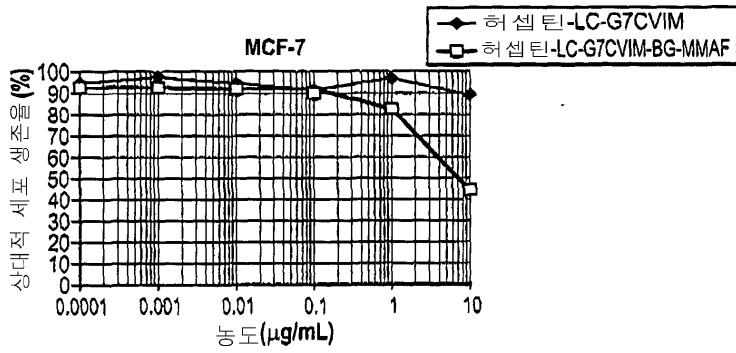
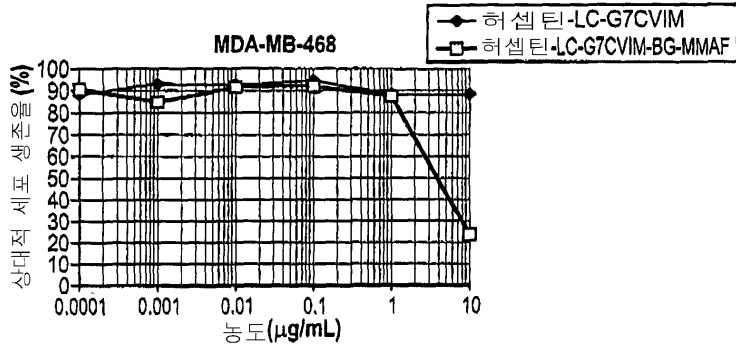


도면20



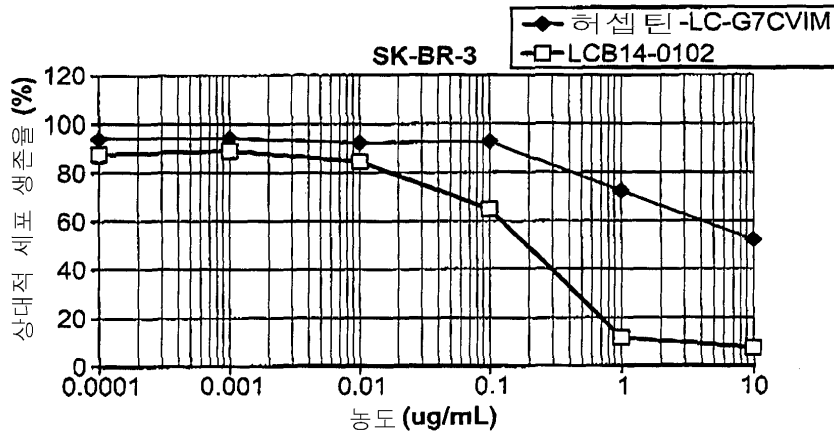
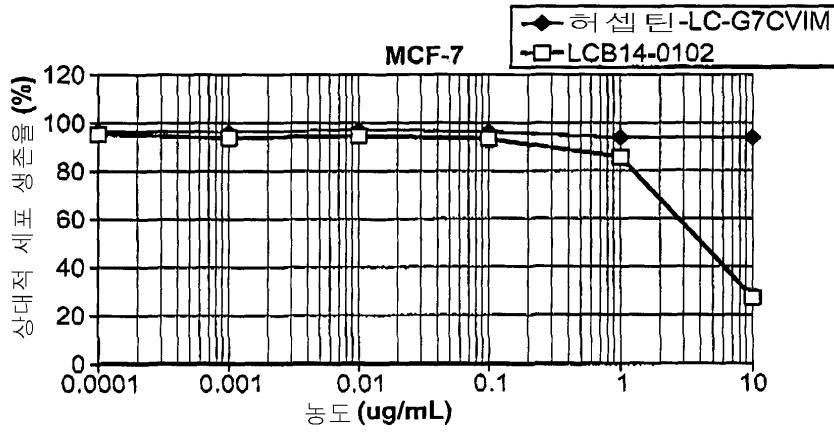
도면21

Cmpds	IC ₅₀ (ug/mL)		
	MCF-7	MDA-MB-468	SK-BR-3
허셀틴-LC-G ₇ CVIM	>10	>10	>10
LCB14-0101 (허셀틴-LC-G ₇ CVIM-BG-MMAF)	8.09	4.18	0.11



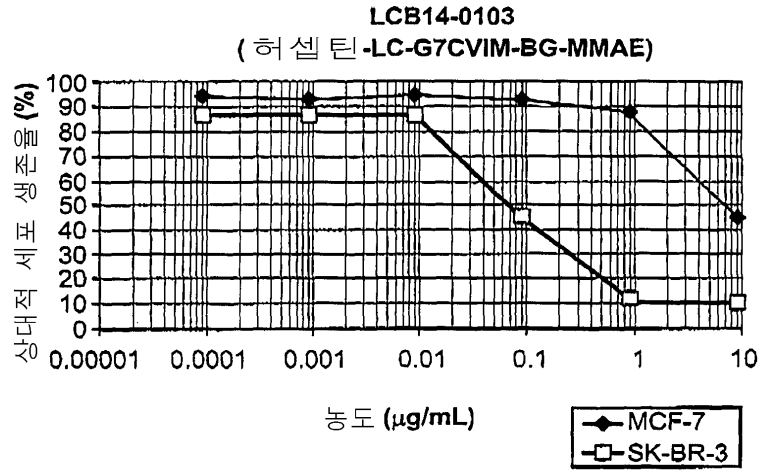
도면22

Cmpds	IC ₅₀ ($\mu\text{g/mL}$)	
	MCF-7	SK-BR-3
허셉틴-LC-G ₇ CVIM	>10	>10
LCB14-0102 (허셉틴-LC-G ₇ CVIM-VC-MMAF-Ome)	4.38	0.15

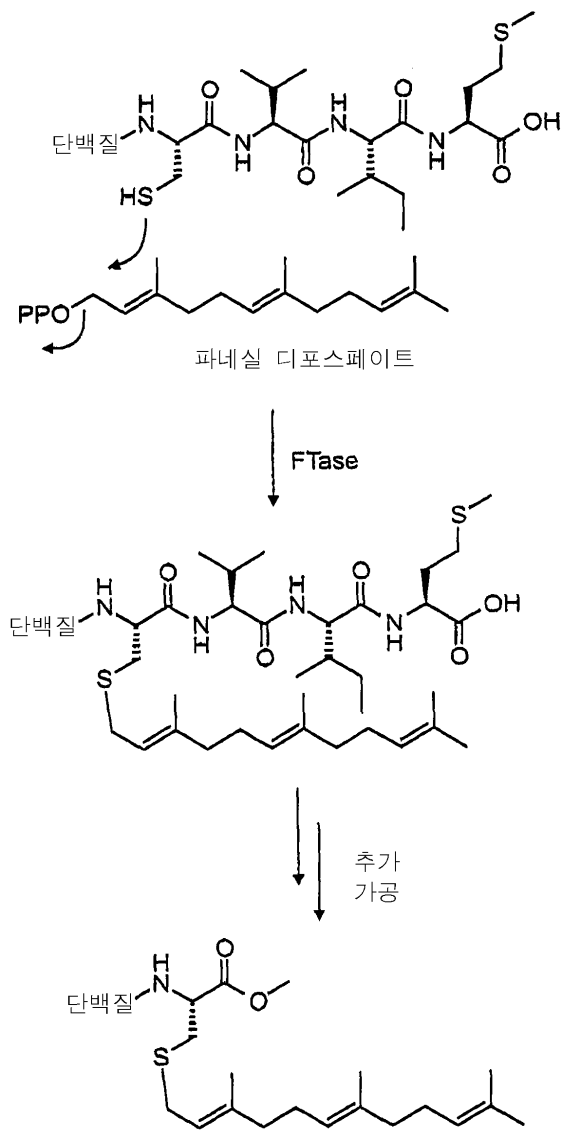


도면23

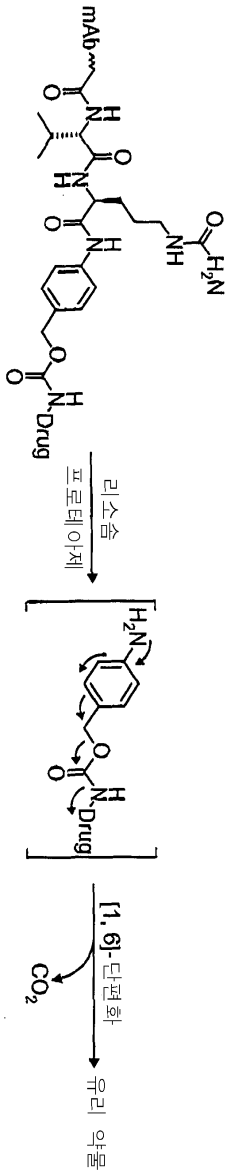
ADC	IC ₅₀ ($\mu\text{g/mL}$)	
	MCF-7	SK-BR-3
LCB14-0103 (허셉틴-LC-G7CVIM-BG-MMAE)	7.25	0.072



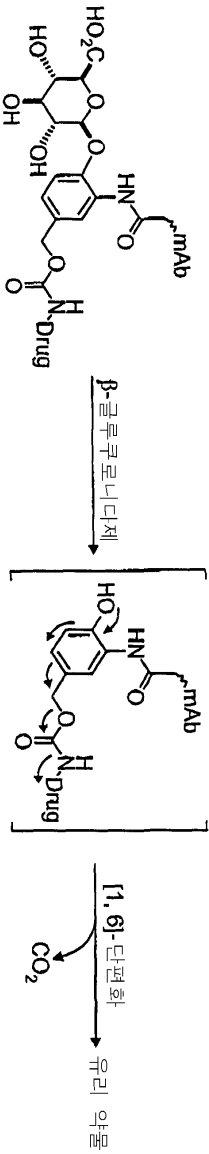
도면24



1) Val-Cit 계 약물 링커

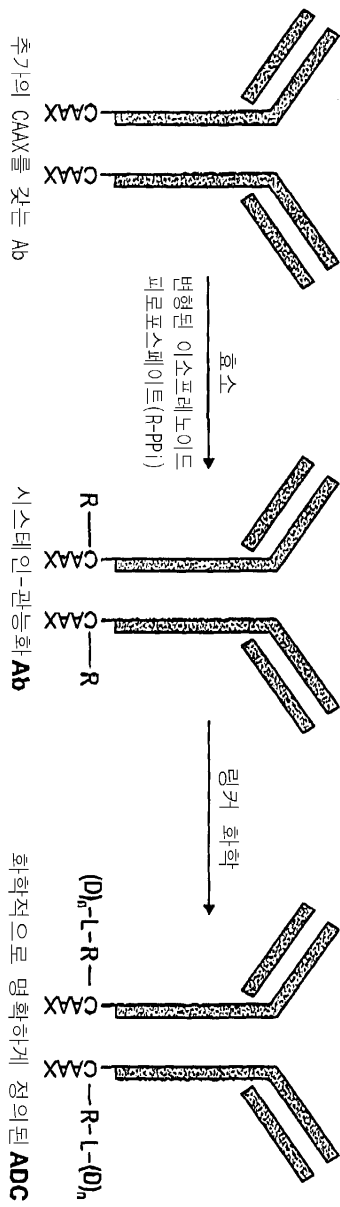


2) 글루쿠로니다이드계 약물 링커



도면25

도면27



R: 개질된 이소프레노이드 그룹, L: 링커, D: 약물, n: 수