



(19) 대한민국특허청(KR)

(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2015년12월01일

(11) 등록번호 10-1573124

(24) 등록일자 2015년11월24일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

C12N 1/00 (2006.01) C07D 491/12 (2006.01)

(21) 출원번호 10-2013-7023561(분할)

(22) 출원일자(국제) 2004년10월12일

심사청구일자 2013년10월04일

(85) 번역문제출일자 2013년09월05일

(65) 공개번호 10-2014-0033003

(43) 공개일자 2014년03월17일

(62) 원출원 특허 10-2006-7006874

원출원일자(국제) 2004년10월12일

심사청구일자 2009년09월03일

(86) 국제출원번호 PCT/US2004/030917

(87) 국제공개번호 WO 2005/037992

국제공개일자 2005년04월28일

(30) 우선권주장

10/960,602 2004년10월08일 미국(US)

60/509,901 2003년10월10일 미국(US)

(56) 선행기술조사문헌

WO2001024763 A2\*

\*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

(73) 특허권자

이뮤노젠 아이엔씨

미국 02451-1477 매사추세츠주 월섬 윈터 스트리트 830

(72) 발명자

스티브스 리타

미국 매사추세츠 02180 스톤햄 68 콜린콧 스트리트

체리 라비

미국 매사추세츠 02161 뉴턴 174 윈체스터 스트리트

(뒷면에 계속)

(74) 대리인

박창남

전체 청구항 수 : 총 4 항

심사관 : 신영신

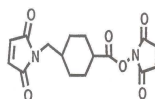
(54) 발명의 명칭 비절단성 링커를 통해 연결된 세포결합물질 메이탄시노이드 접합체, 및 상기 접합체 생산방법

(57) 요약

본 발명은, 선택된 세포 집단에 메이탄시노이드를 표적화하기 위한 방법을 개시하고, 이 표적화 방법은 세포집단 또는 선택된 세포 집단을 포함하는 것으로 의심되는 조직에, 세포 결합 물질 메이탄시노이드 접합체를 접촉시키는 것을 포함하고, 그 경우 하나 또는 하나 이상의 메이탄시노이드는 비절단링커를 개입시켜 세포 결합체에 공유 결합으로 연결되고 상기 세포 결합체는 선택된 세포 집단의 세포에 결합한다.

대표도 - 도1

SMCC(숙시니미딜 4-(N-말레이미도메틸 사이클로헥산 카르복실레이트)



(72) 발명자

**월터 에이. 블라터**

미국 매사추세츠 02446 부록클린 메이슨 테라스  
197

**웨인 씨. 워드슨**

미국 매사추세츠 02478 벨몬트 홀덴 로드 7

---

명세서

청구범위

청구항 1

삭제

청구항 2

삭제

청구항 3

삭제

청구항 4

삭제

청구항 5

삭제

청구항 6

삭제

청구항 7

삭제

청구항 8

삭제

청구항 9

삭제

청구항 10

삭제

청구항 11

삭제

청구항 12

삭제

청구항 13

삭제

청구항 14

삭제

청구항 15

삭제

청구항 16

삭제

청구항 17

삭제

청구항 18

삭제

청구항 19

삭제

청구항 20

삭제

청구항 21

삭제

청구항 22

삭제

청구항 23

삭제

청구항 24

삭제

청구항 25

삭제

청구항 26

삭제

청구항 27

삭제

청구항 28

삭제

청구항 29

삭제

청구항 30

삭제

청구항 31

삭제

### 청구항 32

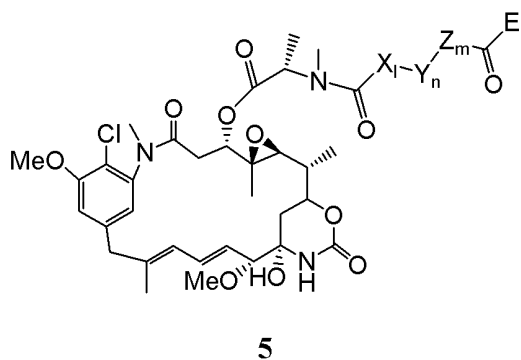
삭제

### 청구항 33

삭제

### 청구항 34

아래 구조식 5의 화합물을 제조하는 방법이고,



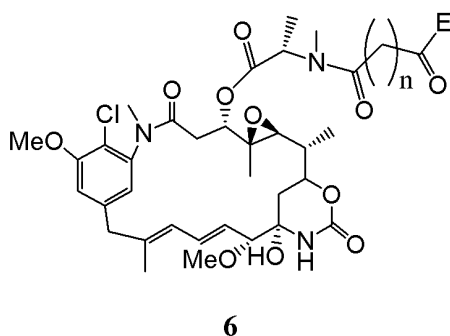
상기 X 는 2 내지 20개 탄소를 갖는 선형 또는 가지형 알킬, 알케닐 또는 알킬닐기이며, Y 는 3 내지 10개 탄소를 갖는 사이클로알킬 또는 사이클로알케닐기이며, Z 는 6 내지 10개 탄소를 갖는 방향족 작용기 또는 헤테로사이클릭 작용기로서, 헤테로원자는 N, O 또는 S로부터 선택되고, l ,m 및 n이 모두 동시에 0이 아닌 경우 각각 0 또는 1이며,E는 카르보닐기와 함께, 황 불포함 비절단성 링커를 가진 접합체를 형성하기 위하여 세포결합물질과 직접 반응할 수 있는 활성 에스테르를 형성하고,

상기 제조방법은,

- (a) 메이텐시노이드를 제공하는 단계,
- (b) 메이텐시노이드를,  $\text{HOOC-X}_l\text{-Y}_n\text{-Z}_m\text{-COOH}$ 의 구조식을 가진  $\alpha, \omega$ -디카르복시산계 잔기(moiety)로부터 유도된 연결물질로 변형하는 단계를 포함하는 화합물 제조방법.

### 청구항 35

아래 구조식 6의 화합물을 제조하는 방법이고,



상기 n은 3에서 24까지의 정수이고, E는 카르보닐기와 함께, 황 불포함 비절단성 링커를 가진 접합체를 형성하기 위하여 세포결합물질과 직접 반응할 수 있는 활성 에스테르를 형성하며,

상기 상기 제조방법은,

(a) 메이텐시노이드를 제공하는 단계; 및

(b) 메이텐시노이드를,  $\text{HOOC}-(\text{CH}_2)_n-\text{COOH}$ 의 구조식을 가진  $\alpha, \omega$ -디카르복시산계 잔기(moiety)로부터 유도된 연결물질로 변형하는 단계;를 포함하는 화합물 제조방법.

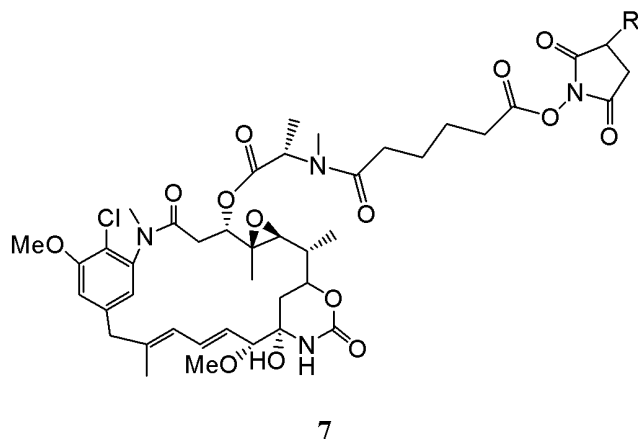
### 청구항 36

제34항 또는 제35항에 있어서,

상기 활성 에스테르는, N-하이드록시 숙시니미딜, N-하이드록시 설포숙시니미딜 에스테르, N-하이드록시 프탈리미딜 에스테르, N-하이드록시 설포프탈리미딜 에스테르, 오르소-니트로페닐 에스테르, 파라-니트로페닐 에스테르, 2,4-디니트로페닐 에스테르, 3-술포닐-4-니트로페닐 에스테르, 3-카르복시-4-니트로페닐 에스테르, 펜타플루오로페닐 에스테르, 및 술포닐 테트라플루오로페닐 에스테르로 이루어진 그룹에서 선택되는 것을 특징으로 하는 화합물 제조방법.

### 청구항 37

아래 구조식 7의 화합물을 제조하는 방법이고,



상기 R은 H 또는  $\text{SO}_3^- \text{Na}^+$ 이고,

상기 제조방법은

(a) 메이텐시노이드를 제공하는 단계; 및

(b) 메이텐시노이드를,  $\text{HOOC}-(\text{CH}_2)_4-\text{COOH}$ 의 구조식을 가진  $\alpha, \omega$ -디카르복시산계 잔기(moiety)로부터 유도된 연결물질로 변형하는 단계;를 포함하는 화합물 제조방법.

### 발명의 설명

### 기술 분야

[0001]

본 출원은 2003. 10. 10에 출원된 미국 가특허출원번호 60/509,901의 이점을 주장하고 있으며, 여기 참고 문헌에 의해 개시된 것을 알 수 있다.

[0002]

본 발명은 비절단성 링커를 통해 연결된 세포결합물질 메이텐시노이드를 사용한 특정 세포집단 표적화 방법과 관련이 있다. 본 발명은 또한 접합체 생산 방법과 관련이 있다. 본 발명의 구성은 메이텐시노이드가 비절단성 링커를 통해 세포결합물질에 연결되어 있는 새로운 세포결합물질 메이텐시노이드 접합체와 관련이 있다. 본 발명의 또 다른 구성은 새로운 메이텐시노이드 에스테르와 관련이 있다.

### 배경 기술

- [0003] 메이텐시노이드는 매우 세포독성이 강한 약제이다. 메이텐시노이드는 처음에 동아프리카의 *Maytenus serrata*라는 관목에서 Kupchan et al.에 의해 분리되었고, 메토크세이트(methotrexate), 다우노루비신(daun 또는 ubicin), 및 빈크리스틴(vincristine)과 같은 종래의 암 화학치료제보다도 100배에서 1000배 정도 독성이 강한 것을 보여 주고 있다 (U.S. Pat. No. 3,896,111). 이어서 몇몇 미생물이 또한 메이텐시놀과 메이텐시놀의 C-3 에스테르와 같은 메이텐시노이드를 생산하는 것이 알려졌다 (U.S. Pat. No. 4,151,042). 메이텐시놀의 합성 C-3 에스테르와 메이텐시놀 유사물이 또한 보고되었다 (Kupchan et al., 21 J. Med. Chem. 31-37 (1978); Higashide et al. 270 Nature 721-722 (1977); Kawai et al., 32 Chem. Pharm. Bull. 3441-3451 (1984)). C-3 에스테르가 생산되는 메이텐시놀 유사물의 예는 방향족 고리상에서 (예. 디클로로) 또는 C-9, C-14 (예. hydroxylated methyl group), C-15, C-18, C-20 및 C-4,5에서 변형을 가진 메이텐시놀을 포함한다.
- [0004] 메이텐시놀의 천연 및 합성 C-3 에스테르는 두 그룹으로 나눌 수 있다:
- [0005] (a) 단순한 카르복시산을 가진 C-3 에스테르 (U.S. Pat. Nos. 4,248,870; 4,265,814; 4,308,268; 4,308,269; 4,309,428; 4,317,821; 4,322,348; 및 4,331,598), 및
- [0006] (b) N-메틸-L-알라닌 유도체를 가진 C-3 에스테르 (U.S. Pat. Nos. 4,137,230 및 4,260,608; 및 Kawai et al., 32 Chem. Pharm. Bull. 3441-3451 (1984)).
- [0007] (b)그룹 에스테르는 (a)그룹 에스테르보다 더 세포독성이 강함을 알 수 있다.
- [0008] 메이텐신(Maytansine)은 유사분열 억제제이다. 메이텐신으로 생체 내에서 L1210 세포의 치료는 유사분열에 있어서 세포 축적이 67% 결과에 이르는 것으로 보고되었다. 치료되지 않은 컨트롤 세포들(control cells)은 3.2 내지 5.8%의 범위 내에서 유사분열지수를 나타내는 것으로 보고되었다 (Sieber et al., 43 Bibl. Haematol. 495-500 (1976)). 성체알과 조개알을 가지고 한 실험에서 메이텐신은 미세소관 단백질, 튜블린의 중합체화 억제를 통하여 미세소관의 형성을 방해함으로써 유사분열을 억제한다(Remillard et al., 189 Science 1002-1005 (1975)).
- [0009] 실험실 밖에서, P388, L1210, 및 LY5178 무린 백혈병 세포의 현탁물은  $10^{-3}$  내지  $10^{-1} \mu\text{g}/\mu\text{l}$  메이텐신을 투약할 때 억제되는 것으로 밝혀졌으며, P388 라인이 가장 민감한 것으로 나타났다. 메이텐신은 또한 실험실 밖에서 인간 비인강암세포(nasopharyngeal carcinoma cells)의 성장에 대해 능동적 억제제이며, 인간 급성 림포블라스틱 백혈병 라인 C.E.M.은  $10^{-7} \text{ mg/ml}$  만큼 낮은 농도로 억제되는 것으로 보고되었다 (Wolpert-DeFillippes et al., 24 Biochem. Pharmacol. 1735-1738 (1975)).
- [0010] 메이텐신은 또한 생체 내에서 활성을 가지는 것으로 보여져 왔다. P388 만성림프성 백혈병(lymphocytic leukemia) 시스템에서 종양 성장은 50 내지 100배의 투약량 범위에서 억제되는 것을 보여 주고 있는데, 이는 높은 치료지수를 의미한다; 또한 강력한 억제 활성은 L1210 쥐 백혈병 시스템, 인간 Lewis lung carcinoma 시스템 및 인간 B-16 흑색암(melanocarcinoma) 시스템에서 설명되고 있다 (Kupchan, 33 Ped. Proc 2288-2295 (1974)).
- [0011] 메이텐시노이드는 강한 독성을 가지기 때문에, 암 등의 다수 질병의 치료에 사용될 것으로 예상되었고 이러한 예상은 현실화되었다. 메이텐신을 사용한 임상실험은 다수의 부작용 때문에 바람직하지 않았다 (Issel et al., 5 Cancer Treat. Rev. 199-207 (1978)). 중추신경계에 대한 역효과 및 위장증상들은 몇몇 환자들로 하여금 더 이상의 치료를 거부하는 원인이 되었으며 (Issel at 204), 메이텐신은 말초신경장애와 연관되는 것처럼 보였다 (Issel at 207).
- [0012] 이어서, 약제를 표적세포에 선택적으로 운반하는 표적화 방법이 실현되었다. 절단성과 비절단성 링커 모두가 다양한 약제에 대해 시도되었으나, 메이텐시노이드의 경우를 포함하여 대부분의 경우에 생체 밖에서 세포독성 테스트는 항체-약제 접합체가 비접합 약제와 동일한 세포독성 효과를 갖지 않음을 보여주었다. 따라서 효과적인 메이텐시노이드의 표적화된 운반을 위해서는 일반적으로 메이텐시노이드와 세포결합물질 간의 연결이 절단성이어야 하는 것으로 받아들여졌다.
- [0013] 또한 면역독소 분야에서 단일클론 항체와 촉매활성 단백질 독소들 간의 이황화 결합을 가진 링커를 포함하는 접합체들이 다른 링커를 포함하는 접합체들보다 강한 독성을 나타내었다. Lambert et al., 260 J. Biol. Chem. 12035-12041 (1985); Lambert et al., in Immunotoxins 175-209 (A. Frankel, ed. 1988), 및 Ghetie et al., 48 Cancer Res. 2610-2617 (1988)을 참조한다. 항체 분자와 독소 간의 이황화결합의 효과적인 절단성에 기여하는 글루타티온(glutathione)의 세포 내 농도 증가에 기인한다. 보다 최근에 비절단성 링커 SMCC를 통해 항-Her2 유방암 항체 TA.1에 연결된 메이텐시노이드 접합체는 절단성 이황화 결합을 포함하는 링커를 통해 TA.1에 연결

된 메이텐시노이드 접합체보다 200배 약한 독성을 보여주었다.

- [0014] 따라서, 이황화결합을 포함하는 절단성 링커를 통해 연결된 세포독성 접합체가 연구되었다. Shen et al.는 메토크세이트를 머캅토에틸아미드 유도체로 전환하여 이황화결합을 통해 폴리-D-라이신으로 접합하는 것을 기술하였다 (260 J. Biol. Chem. 10905-10908 (1985)). 항체와의 삼황화결합을 포함하는 독소 칼리케아미신(calicheamycin) 접합체의 생산 또한 기술되었다 (Menendez et al., Fourth International Conference on Monoclonal Antibody Immunoconjugates f 또는 Cancer, San Diego, Abstract 81 (1989)).
- [0015] 미국특허번호 5,208,020 및 5,416,064는 여기서 참고자료로 인용되어 있는바, 절단성 링커를 통해 특정 메이텐시노이드 유도체에 연결된 세포결합물질의 포함하는 세포독성 접합체를 기술하고 있으며, 링커는 이황화그룹, 산불안정(acid-labile) 그룹, 광불안정 그룹, 펩티다아제 불안정 그룹 및 에스테라아제 불안정 그룹을 포함하는 링커이다.
- [0016] 미국특허번호 6,333,410 B1는 여기서 참고자료로 인용되어 있는바, 세포결합물질에 연결할 목적으로 티올을 포함하는 메이텐시노이드를 생산, 정제하는 공정을 기술하고 있으며, 미국특허번호 6,441,163 B1는 여기서 참조자료로 인용되어 있는바, 메이텐시노이드와 세포결합물질의 세포독성 접합체의 일단계 생산방법을 기술하고 있으며, 링커는 이황화결합을 포함하는 절단성 링커이다.
- [0017] 나아가서 미국특허번호 5,208,020는 비절단성 링커를 포함하는 항체-메이텐시노이드 접합체를 기술하고 있으며, 링커는 말레이미도(maleimido) 그룹으로 구성되어 있다. 단, 참고자료에는 당해 접합체가 질병 치료에 효과적임을 설명하는 아무런 실험 데이터를 포함하고 있지 않다.
- [0018] 예상치 못했지만 비절단성 링커를 통해 연결된 메이텐시노이드와 세포결합물질의 세포독성 접합체가 극히 강한 독성을 가지며 다수 경우에 절단성 링커를 가진 메이텐시노이드와 세포결합물질의 접합체에 비해 예상치 못한 이점을 가짐이 현재 밝혀졌다.

## 발명의 내용

### 해결하려는 과제

- [0019] 이하 기술되는 본 발명의 도식적이고 비한정적인 실시예들은 상기 난점들 및 상기에 언급되지 않은 다른 난점들을 극복한다. 또한 본 발명이 아래 언급된 난점들을 극복하기 위해 필요하지는 않으며 상기에 기술된 본 발명의 도식적이고 비한정적인 실시예는 상기에 언급된 문제점들 중 어느 하나를 극복하지 않을 수도 있다.

### 과제의 해결 수단

- [0020] 본 발명의 한 측면은 선택된 세포집단 중의 세포를 가진 것으로 의심되는 세포집단 또는 조직을 세포결합물질 메이텐시노이드 접합체와 결합시키며, 하나 또는 그 이상의 메이텐시노이드가 비절단성 링커를 통해 세포결합물질에 연결되는 것을 포함하여 메이텐시노이드를 선택된 세포집단에 표적화하는 방법이다.
- [0021] 본 발명의 또 다른 측면은 종양, 자가면역 질환, 조직이식거부, 이식편대숙주질환(graft versus host disease), 바이러스감염, 기생충감염 및 표적화 물질이 세포결합물질인 표적 요법에 의해 치료가능한 다른 질병에 대한 치료방법으로서, 상기 방법은 치료가 요구되는 숙주에게 적정량의 세포결합물질 메이텐시노이드 접합체를 투여하고, 하나 또는 그 이상의 메이텐시노이드가 세포결합물질 또는 약제학적으로 수용가능한 성분 또는 상기 접합체의 용매화물질에 연결되는 것을 포함한다.
- [0022] 본 발명의 또 다른 측면은 세포결합물질 메이텐시노이드 접합체로서, 하나 또는 그 이상의 메이텐시노이드가 비절단성 링커를 통해 세포결합물질에 연결된다.
- [0023] 본 발명의 또 다른 측면은 상기 기술된 접합체를 포함하는 조성물이다.
- [0024] 본 발명의 또 다른 측면은 상기 기술된 접합체를 생산하는 방법이다.
- [0025] 본 발명의 또 다른 측면은 새로운 메이텐시노이드 에스테르이다.

## 발명의 효과

- [0026] 예상치 못했지만 비절단성 링커를 통해 연결된 메이텐시노이드와 세포결합물질의 세포독성 접합체가 극히 강한



독성을 가지며 다수 경우에 절단성 링커를 가진 메이텐시노이드와 세포결합물질의 접합체에 비해 예상치 못한 이점을 가짐이 현재 밝혀졌다.

### 도면의 간단한 설명

[0027]

도 1은 SMCC의 구조를 보여준다.

도 2는 DM1의 구조를 보여준다.

도 3은 huC242 항체를 항체-메이텐시노이드 접합체 huC242-SMCC-DM1와 비교하는 FACS 결합 실험 결과를 도표로 보여준다.

도 4는 huC242-SMCC-DM1의 세포독성을 도표로 보여준다.

도 5는 huC242-SMCC-DM1에 대한 크기배제크로마토그래피를 보여준다.

도 6a-도 6c 및 도 7은 huC242-SMCC-DM1의 세포독성을 이황화결합을 포함하는 링커에 의해 제조된 접합체와 비교하는 도표를 보여준다.

도 8a-도 8d는 다양한 세포결합물질에 연결된 SMCC-DM1 접합체의 세포독성을 도표로 보여준다.

도 9는 항체-메이텐시노이드 접합체 huC242-SIAB-DM1의 세포독성을 도표로 보여준다.

도 10a는 SCID 생쥐에 있어서 COLO205 인간 결장암 이종이식에 대응한 huC242-SMCC-DM1의 항-종양 활성을 도표로 보여준다.

도 10b는 SCID 생쥐로의 SNU16 인간 위종양 이종이식에 대응한 huC242-SMCC-DM1의 항-종양 활성을 도표로 보여준다.

도 10b는 SCID 생쥐로의 인간 MCF7 종양 이종이식에 대응한 트라스투주맙-SMCC-DM1의 항-종양 효능을 도표로 보여준다.

도 11은 huC242-SMCC-DM1의 플라즈마 제거 속도를 이황화결합을 포함하는 링커로 제조된 접합체와 대비하는 도표를 보여준다.

도 12A-C는 huC242-SMCC-DM1의 급성 독성연구 결과를 이황화결합을 포함하는 링커로 제조된 접합체와 대비하는 도표를 보여준다.

도 13은 huC242-SMCC-DM1에 의해 설명된 세포 주기의 정지 및 세포 파괴 작용의 지속성을 이황화결합을 포함하는 링커로 제조된 접합체와 대비하여 보여준다.

도 14a-도 14c는 huC242-SMCC-DM1의 최소 구경꾼 활성을 이황화결합 포함 링커로 제조된 접합체와 대비하여 보여준다.

도 15는 말레이미도를 주성분으로 하는 물질연결물질의 대표 구조를 나타낸다.

도 16은 할로아세틸을 주성분으로 하는 연결물질의 대표 구조를 나타낸다.

도 17은 항체-SMCC-DM1 접합체의 구조를 보여준다.

도 18은 항체-SIAB-DM1 접합체의 구조를 보여준다.

도 19은 항체-SMCC-DM4 접합체의 구조를 보여준다.

도 20은 항체-SIAB-DM4 접합체의 구조를 보여준다.

도 21은 황을 포함하지 않는 비절단성 링커를 통해 연결된 메이텐시노이드 세포결합물질 접합체의 합성을 보여준다.

도 22는 huC242-황 불포함 비절단성 링커-DM1의 세포독성을 도표로 나타낸다.

도 23은 huC242-황 불포함 비절단성 링커-DM1의 FACS 결합 시험의 결과를 도표로 나타낸다.

도 24는 트라스투주맙 항체를 항체-메이텐시노이드 접합체 트라스투주맙-SMCC-DM1와 비교하는 HER2 ECD 판 결합 시험 결과를 도표로 나타낸다.

도 25는 트라스투주맵-SMCC-DM1의 세포독성 및 특이성을 도표로 나타낸다.

도 26은 트라스투주맵-SMCC-DM1에 대한 크기 배제 크로마토그래피를 보여준다.

도 27은 트라스투주맵 항체를 항체-메이텐시노이드 접합체 트라스투주맵-SIAB-DM1와 비교하는 HER2 ECD 판 결합 시험 결과를 도표로 나타낸다.

도 28은 트라스투주맵-SIAB-DM1의 세포독성 및 특이성을 도표로 나타낸다.

도 29는 트라스투주맵-SIAB-DM1에 대한 크기 배제 크로마토그래피를 보여준다.

### 발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0028] 이하 기술되는 본 발명의 도식적이고 비한정적인 실시예들은 상기 난점들 및 상기에 언급되지 않은 다른 난점들을 극복한다. 또한 본 발명이 아래 언급된 난점들을 극복하기 위해 필요하지는 않으며 상기에 기술된 본 발명의 도식적이고 비한정적인 실시예는 상기에 언급된 문제점들 중 어느 하나를 극복하지 않을 수도 있다.
- [0029] 본 발명의 한 측면은 선택된 세포집단 중의 세포를 가진 것으로 의심되는 세포집단 또는 조직을 세포결합물질 메이텐시노이드 접합체와 결합시키며, 하나 또는 그 이상의 메이텐시노이드가 비절단성 링커를 통해 세포결합물질에 연결되는 것을 포함하여 메이텐시노이드를 선택된 세포집단에 표적화하는 방법이다.
- [0030] 본 발명의 또 다른 측면은 종양, 자가면역 질환, 조직이식거부, 이식편대숙주질환(graft versus host disease), 바이러스감염, 기생충감염 및 표적화 물질이 세포결합물질인 표적 요법에 의해 치료가능한 다른 질병에 대한 치료방법으로서, 상기 방법은 치료가 요구되는 숙주에게 적정량의 세포결합물질 메이텐시노이드 접합체를 투여하고, 하나 또는 그 이상의 메이텐시노이드가 세포결합물질 또는 약제학적으로 수용가능한 성분 또는 상기 접합체의 용매화합물에 연결되는 것을 포함한다.
- [0031] 본 발명의 또 다른 측면은 세포결합물질 메이텐시노이드 접합체로서, 하나 또는 그 이상의 메이텐시노이드가 비절단성 링커를 통해 세포결합물질에 연결된다.
- [0032] 본 발명의 또 다른 측면은 상기 기술된 접합체를 포함하는 조성물이다.
- [0033] 본 발명의 또 다른 측면은 상기 기술된 접합체를 생산하는 방법이다.
- [0034] 본 발명의 또 다른 측면은 새로운 메이텐시노이드 에스테르이다.
- [0035] 세포독성을 감소시키지 않으면서 존재하는 약물을 변형하는 것은 매우 어렵다는 것이 업계의 실정이다. 그러나, 미국특허번호 6,441,163 B1, 6,333,410 B1, 5,416,064, 및 5,208,020 에는 절단성 링커, 특히 이황화기를 포함하는 절단성 링커를 통해 메이텐시노이드를 적합한 세포결합물질에 연결시킴으로써 강력한 세포독성물질이 생성될 수 있다는 것이 기술되어 있다. 세포결합물질 메이텐시노이드 접합체는 메이텐시노이드로 하여금 표적화 방식에 따라 원하지 않는 세포에만 작용함으로써 표적하지 않는 건강한 세포의 손상으로 인한 역효과를 피하면서 완벽한 세포독성 수단을 제공케 한다.
- [0036] 본 발명자들은 우연히 비절단성 링커를 통해 세포결합물질에 연결된 메이텐시노이드가 절단성 링커를 통해 연결된 메이텐시노이드보다 여러 가지 중요한 측면에서 우수하다는 것을 발견했다. 특히, 절단성 링커를 포함하는 접합체와 비교할 때 비절단성 링커를 가진 접합체가 시험관 내와 생체 내에서 모두 동일한 항종양 활성을 보여주지만 플라즈마 제거 및 독성에 있어서 현저한 감소를 보여준다.
- [0037] 따라서, 본 발명은 역효과를 최소화하면서 세포를, 특히 종양세포(특히 고형 종양 세포), 바이러스 감염 세포, 미생물 감염 세포, 기생충 감염 세포, 자가면역 세포(자가항체를 생산하는 세포), 활성화 세포(이식거부 또는 이식편대숙주질환과 연관된 세포), 또는 어떠한 다른 형태의 질병 또는 비정상 세포들과 같은 파괴되어야 할 세포들을 표적화하는 개선된 방법을 제공한다.
- [0038] 본 발명의 방법에서 사용된 접합체는 비절단성 링커를 통해 세포결합물질에 연결된 하나 또는 그 이상의 메이텐시노이드를 가진다. 접합체를 만드는 한가지 방법에 있어서 세포결합물질-예를 들어 항체-은 먼저 SMCC 등의 연결물질로 변형된다. 다음 단계에서 반응물인 DM1과 같은 티올 함유 메이텐시노이드는 변형된 항체와 반응하여 항체-메이텐시노이드 접합체를 형성한다. 선택사항으로 메이텐시노이드는 세포결합물질과 반응하기 전에 연결물질로 변형될 수 있다. 예를 들면 미국특허번호 6,441,163 B1를 참고할 수 있다.

[0039]

# 적합한 메이텐시노이드

[0040]

본 발명에서 사용하기에 적합한 메이텐시노이드는 당업계에 널리 알려져 있으며, 천연자원에서부터 알려진 방법에 의해 분리되거나, 유전공학 기술을 이용하여 생산되거나(Yu et al., 99 PNAS 7968-7973 (2002)참조), 알려진 방법에 의해 합성 제조될 수 있다.

[0041]

적합한 메이텐시노이드의 예에는 메이텐시놀과 메이텐시놀 유사물이 포함된다. 적합한 메이텐시놀 유사물의 예에는 변형된 방향족 고리를 가지는 물질 및 다른 위치에서 변형을 가지는 물질들이 포함된다:

[0042]

(1) C-19-테클로로 (미국특허번호 4,256,746) (안스아미토신 P2의 LAH 환원으로 제조됨);

[0043]

(2) C-20-하이드록시 (또는 C-20-테메틸) +/-C-19-테클로로 (미국특허번호 4,361,650 및 4,307,016) (스트랩토미세스 또는 악티노미세스를 사용한 탈메틸화 또는 LAH를 사용한 탈염소화에 의해 제조됨); 및

[0044]

(3) C-20-테메톡시, C-20-아실록시 (OC또는), +/-테클로로 (미국특허번호 4,294,757) (아실 클로라이드를 사용한 아실화에 의해 제조됨).

[0045]

다른 위치에서 변형을 가지는 적합한 메이텐시놀 유사물의 특정한 예는 다음과 같다:

[0046]

(1) C-9-SH (미국특허번호 4,424,219) (메이텐시놀과 H<sub>2</sub>S 또는 P<sub>2</sub>S<sub>5</sub>의 반응으로 제조됨);

[0047]

(2) C-14-알콕시메틸 (테메톡시/CH<sub>2</sub> 또는)(미국특허번호 4,331,598);

[0048]

(3) C-14-하이드록시메틸 또는 아실록시메틸(CH<sub>2</sub>OH 또는 CH<sub>2</sub>OAc) (미국특허번호 4,450,254) (노카르디아(Nocardia)로부터 제조됨);

[0049]

(4) C-15-하이드록시/아실록시 (미국특허번호 4,364,866) (스트랩토미세스에 의한 메이텐시놀의 전환으로 제조됨);

[0050]

(5) C-15-메톡시 (미국특허번호 4,313,946 및 4,315,929) (Trewia nudifl또는a로부터 분리됨);

[0051]

(6) C-18-N-테메틸 (미국특허번호 4,362,663 및 4,322,348) (스트랩토미세스에 의한 메이텐시놀의 탈메틸화에 의해 제조됨); 및

[0052]

(7) 4,5-테옥시 (미국특허번호 4,371,533) (메이텐시놀의 티타늄 트리클로라이드/LAH 환원에 의해 제조됨).

[0053]

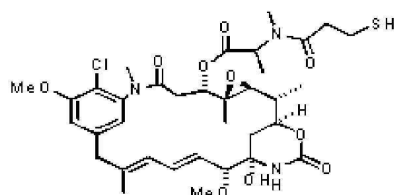
메이텐시놀 상의 많은 부위는 연결 종류에 따라서 연결 부위로서 유용한 것으로 알려져 있다. 예를 들면, 에스테르 연결을 형성하기 위해서는 하이드록실기를 갖는 C-3 부위, 하이드록시메틸로 변형된 C-14 부위, 하이드록실기로 변형된 C-15 부위, 하이드록실기를 가지는 C-20 부위 모두가 적합하다. 그러나 C-3 부위가 바람직하고 메이텐시놀의 C-3 부위가 특히 바람직하다.

[0054]

본 발명에 의하면 바람직한 메이텐시놀은 자유 티올기를 가진다. 자유 티올기를 포함하는 특히 바람직한 메이텐시노이드에는 N-메틸-알라닌 함유 에스테르가 포함되고 메이텐시놀의 N-메틸-시스테인 함유 에스테르는 메이텐시놀과 그 유사물의 C-3 에스테르이다. 바람직한 에스테르에는 메이텐시놀의 N-메틸-알라닌 함유 에스테르와 N-메틸-시스테인 함유 에스테르가 포함된다. 자유 티올기를 가지는 메이텐시놀 에스테르의 합성은 종래 기술되었는데, 예를 들면 미국특허번호 5,208,020, Chari et al., 52 Cancer Res., 127-131 (1992), 및 Liu et al., 93 Proc Natl. Acad. Sci., 8618-8623 (1996)에 기술되었다. 또한 여기서 참조문헌으로 전문 인용되고 있는 미국특허번호 6,333,410 B1에서는 세포결합물질에 연결하기에 적합한 티올 함유 메이텐시노이드의 개선된 제조, 정제 공정이 제공되고 있다.

[0055]

하기에 예시된 본 발명 접합체의 대부분은 티올 함유 메이텐시노이드 DM1, 명명법상 N<sup>2'</sup> 데아세틸-N<sup>2'</sup> (3-메르캅토-1-옥소프로필)-메이텐신을 이용한다:



[0056]

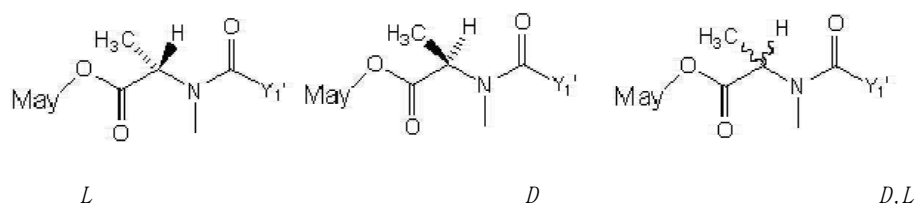
DM1

[0057] 티올 함유 메이텐시노이드 DM1의 합성은 예전에 기재되었다 (미국특허번호 5,208,020).

[0058] 여기서 참조문헌으로 전문 인용된 미국특허출원번호 10/849,136 에는 입체 장애를 가진 티올 함유 메이텐시노이드가  $\alpha$ -탄소 자리에서 하나 또는 두개의 알킬 치환기를 가지면서 티올 작용기를 형성한다는 사실에 기재되어 있다. 추가적으로 설폰하이드릴기를 가지는 메이텐시노이드의 아실화된 아미노산 측쇄 중 아실기는 아미드 중 카르보닐기와 황 원자 사이에 적어도 세개의 탄소로 된 선형 사슬을 포함한다. 이러한 새로운 메이텐시노이드는 본 발명에서 사용하기에 적합하다.

[0059] 입체 장애를 가진 티올기를 가지는 메이텐시노이드의 합성은 참조문헌 미국특허출원번호 10/849,136 중, 특히 도 3 에 기재되어 있다.

[0060] 본 발명의 한 측면으로 메이텐시노이드는 입체 장애를 갖는 티올기를 포함하며 구조식 (II'-L), (II'-D), 또는 (II'-D,L)로 표현된다:



[0061] (II' )

[0062] 구조식 (II' )에서,

[0063]  $Y_1'$  는

[0064]  $(\text{CR}_7\text{R}_8)_1(\text{CR}_9=\text{R}_{10})_p(\text{C}\equiv\text{C})_q\text{A}_0(\text{CR}_5\text{R}_6)_m\text{D}_n(\text{CR}_{11}=\text{CR}_{12})_r(\text{C}\equiv\text{C})_s\text{B}_t(\text{CR}_3\text{C}_4)_n\text{CR}_1\text{R}_2\text{SH}$ 를 나타낸다.

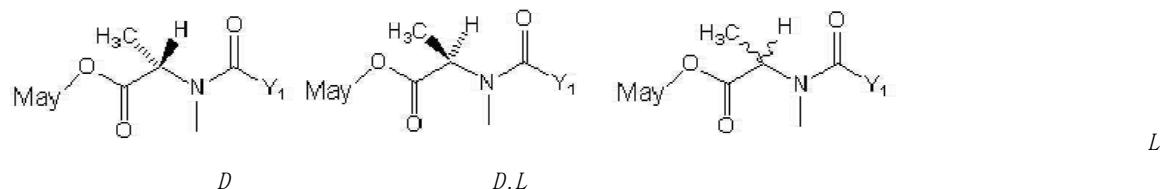
[0065] A, B, 및 D는 각각 3 내지 10개 탄소를 가지는 사이클릭 알킬 또는 사이클릭 알케닐, 단순 또는 치환된 아릴, 또는 헤테로사이클릭 방향족 또는 헤테로사이클로알킬 라디칼이다.

[0066]  $R_1$  내지  $R_{12}$ 은 각각 1 내지 10 개 탄소를 가지는 선형 알킬 또는 알케닐, 3 내지 10개 탄소를 가지는 가지형 또는 고리형 알킬 또는 알케닐, 페닐, 치환된 페닐 또는 헤테로사이클릭 방향족 또는 헤테로사이클로알킬 라디칼, 및 추가적으로  $R_2$  내지  $R_{12}$  는 H일 수 있다.

[0067] l, m, n, o, p, q, r, s, t 및 u는 그 중 적어도 두개가 모두 0이 아닌 경우 각각 0 또는 1 내지 5 중 하나의 정수이다.

[0068] May는 C-3 하이드록실, C-14 하이드록시메틸, C-15 하이드록실, C-20 테스메틸 위치에서 측쇄를 가지는 메이텐시노이드를 나타낸다.

[0069] 본 발명에 유용한 또다른 메이텐시노이드는 구조식 (II-L), (II-D), 또는 (II-D,L)로 표현된다:



[0070] (II)

[0071] 구조식 (II)에서,

[0072]  $Y_1$ 은  $(\text{CR}_7\text{R}_8)_1(\text{CR}_5\text{R}_6)_m(\text{CR}_3\text{R}_4)_n\text{CR}_1\text{R}_2\text{SH}$  이다.

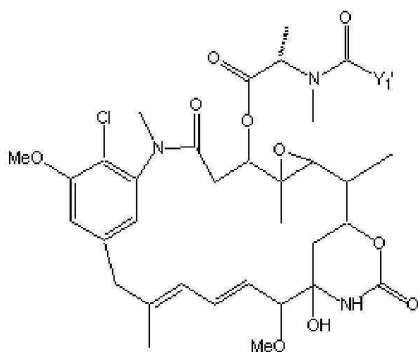
[0073]  $R_1$  내지  $R_8$ 은 각각 1 내지 10 개 탄소를 가지는 선형 알킬 또는 알케닐, 3 내지 10개 탄소를 가지는 가지형 또는 고리형 알킬 또는 알케닐, 페닐, 치환된 페닐 또는 헤테로사이클릭 방향족 또는 헤테로사이클로알킬 라디칼, 및

추가적으로  $R_2$  내지  $R_8$  는 H일 수 있다.

[0077] 1, m 및 n 는 각각 1 내지 5 중 하나의 정수이고, 추가적으로 n은 0이 될 수 있다.

[0078] May는 C-3 하이드록실기, C-14 하이드록시메틸기, C-15 하이드록실기, C-20 테스메틸기에서 측쇄를 가지는 메이텐시놀을 나타낸다.

[0079] 또다른 유용한 메이텐시노이드는 구조식 4<sub>1</sub>'에 의해 표현된다:

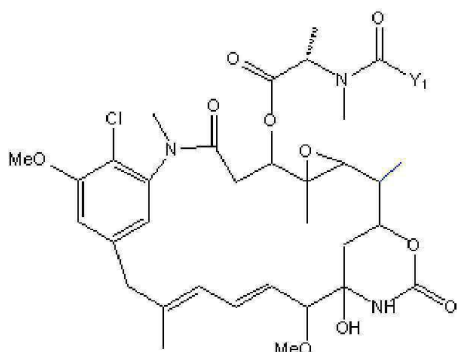


[0080]

[0081] 4<sub>1</sub>'

[0082] 여기서 치환기는 상기 구조식 (II')에서 정의된 바와 같다.

[0083] 또 다른 유용한 메이텐시노이드는 구조식 4<sub>1</sub>로 표현된다.



[0084]

[0085] 4<sub>1</sub>

[0086] 여기서 치환기는 상기 구조식 (II)에 정의된 바와 같다.

[0087] 상기 표현된 화합물 중 어느 하나에 있어서  $R_1$  은 H이고,  $R_2$  는 메틸이거나  $R_1$  와  $R_2$ 가 메틸인 것이 바람직하다.

[0088] 특히, 상기 표현된 화합물 중 어느 하나에 있어서  $R_1$  H,  $R_2$  은 메틸,  $R_5$ ,  $R_6$ ,  $R_7$  및  $R_8$  은 각각 H, 1 및 m 은 각각 1, n 은 0; 및  $R_1$  과  $R_2$  는 메틸,  $R_5$ ,  $R_6$ ,  $R_7$ ,  $R_8$  은 각각 H, 1 및 m 은 1, n 은 0인 것이 바람직하다.

[0089] 1 내지 10 개 탄소를 가지는 선형 알킬 또는 알케닐의 예에는 메틸, 에틸, 프로필, 부틸, 펜틸, 헥실, 프로페닐, 부테닐 및 헥세닐이 포함되지만 이들에만 한정되는 것은 아니다.

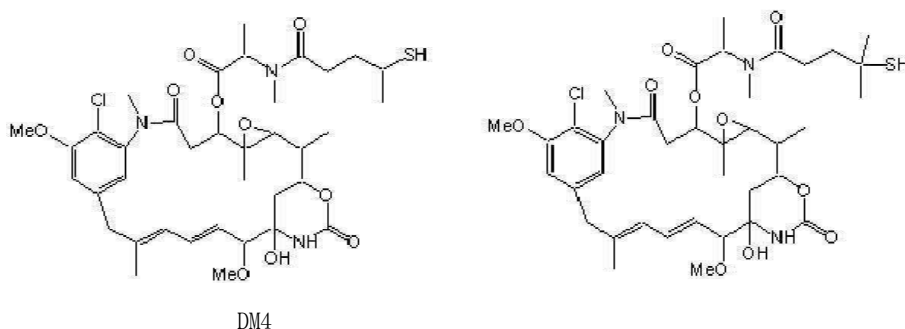
[0090] 3 내지 10 개 탄소를 가지는 가지형 알킬 또는 알케닐의 예에는 이소프로필, 이소부틸, 2차-부틸, 4차-부틸, 이소펜틸, 1-에틸-프로필, 이소부테닐 및 이소펜테닐이 포함되지만 이들에만 한정되는 것은 아니다.

[0091] 3 내지 10 개 탄소를 가지는 고리형 알킬 또는 알케닐의 예에는 사이클로프로필, 사이클로부틸, 사이클로펜틸, 사이클로헥실, 사이클로헥테닐 및 사이클로헥세닐이 포함되지만 이들에만 한정되는 것은 아니다.

[0092] 단순 아릴에는 6 내지 10개 탄소를 가지는 아릴이 포함되며, 치환된 아릴에는 6 내지 10개 탄소를 가지는 아릴으로, 1 내지 4개 탄소를 포함하는 적어도 하나의 알킬 치환기 또는 메톡시, 에톡시 등의 알콕시 치환기, 또는

할로젠 치환기 또는 니트로 치환기를 갖는 아릴이 포함된다.

- [0093] 6 내지 10개 탄소를 포함하는 단순 아릴의 예에는 페닐과 나프틸이 포함되지만 이들에만 한정되는 것은 아니다.
- [0094] 치환된 아릴의 예에는 니트로페닐과 디니트로페닐이 포함되지만 이들에만 한정되는 것은 아니다.
- [0095] 헤테로사이클릭 방향족 라디칼에는 N, O, 또는 S로부터 선택된 하나 또는 두개의 헤테로원자를 포함하는 3 내지 10 개의 고리로 된 그룹이 포함된다.
- [0096] 헤테로사이클릭 방향족 라디칼의 예에는 피리딜, 니트로-피리딜, 피롤릴, 옥사졸릴, 티에닐, 티아졸릴, 및 퓨릴이 포함되나 이들에만 한정되는 것은 아니다.
- [0097] 헤테로사이클로알킬 라디칼에는 3 내지 10 개의 고리로 구성되고 N, O 또는 S로부터 선택된 하나 또는 두개의 헤테로원자를 포함하는 사이클릭 화합물이 해당된다.
- [0098] 헤테로사이클로알킬 라디칼의 예에는 디하이드로푸릴, 테트라하이드로푸릴, 피롤리디닐, 피페리디닐, 피페라지닐, 및 모르포리노가 포함되지만 이들에만 한정되는 것은 아니다.
- [0099] \*입체 장애를 가진 티올 결합을 포함하는 측쇄로 구성되는 특별히 바람직한 메이텐시노이드는 메이텐시노이드  $N^{2'}$  데아세틸- $N^{2'}$  4-메르캅토-1-옥소펜틸)-메이텐신 (DM3이라고 함) 및  $N^{2'}$  데아세틸- $N^{2'}$  (4-메틸-4-메르캅토-1-옥소펜틸)-메이텐신 (DM4이라고 함)이다. DM3 및 DM4는 하기 구조식으로 표현된다:



[0100]

### 세포결합물질

- [0101] 본 발명의 화합물의 치료제로서의 효능은 적절한 세포결합물질에 대한 세심한 선택에 의존한다. 세포결합물질은 현재 알려져 있거나 알려지게 된 어떠한 것이라도 가능하고 펩티드 및 비-펩티드가 해당된다. 일반적으로 항체 (특히 단일클론항체), 림포카인, 호르몬, 비타민, 성장 인자, 영양분 수송분자(트랜스페린 등), 또는 어떠한 종류의 세포결합분자 또는 표적에 특정하게 결합하는 물질들이 가능하다.
- [0102] 본 발명의 화합물의 치료제로서의 효능은 적절한 세포결합물질에 대한 세심한 선택에 의존한다. 세포결합물질은 현재 알려져 있거나 알려지게 된 어떠한 것이라도 가능하고 펩티드 및 비-펩티드가 해당된다. 일반적으로 항체 (특히 단일클론항체), 림포카인, 호르몬, 비타민, 성장 인자, 영양분 수송분자(트랜스페린 등), 또는 어떠한 종류의 세포결합분자 또는 표적에 특정하게 결합하는 물질들이 가능하다.
- [0103] 사용 가능한 보다 특정한 세포결합물질의 예에는:
- [0104] 완전한 인간 항체를 포함하여 다클론 및 단일클론 항체;
- [0105] 단쇄 항체 (다클론 및 단일클론);
- [0106] Fab, Fab', F(ab')<sub>2</sub>, 및 Fv (Parham, 131 J. Immunol. 2895-2902 (1983); Spring et al., 113 J. Immunol. 470-478 (1974); Nisonoff et al., 89 Arch. Biochem. Biophys. 230-244 (1960)) 등의 항체의 절편 (다클론 및 단일클론);
- [0107] 쉬메릭 항체 및 그들의 항원 결합 절편;
- [0108] camelid 항체(Desmyter et al., 3 Nature Struct. Biol, 752, 1996)를 포함한 도메인 항체 (dAbs) 및 그들의 항원 결합 절편;
- [0109] 새로운 항원 수용체(IgNAR) (Greenberg et al., 374 Nature, 168, 1995; Stanfield et al. 305 Science 1770-



1773, 2004)로 불리는 샤크(shark) 항체;

- [0110] 인터페론(예. 알파, 베타, 감마);
- [0111] IL-2, IL-3, IL-4, IL-6 등의 림포카인;
- [0112] 인슐린, TRH (티로트로핀 방출 호르몬), MSH (멜라닌세포 자극 호르몬), 안드로겐과 에스트로겐 등의 스테로이드 호르몬 등의 호르몬;
- [0113] EGF, TGF-알파, FGF, VEGF, G-CSF, M-CSF 및 GM-CSF (Burgess, 5 Immunology Today 155-158 (1984)) 등의 성장 인자 및 콜로니 자극 인자; 및
- [0114] 엽산 등의 비타민이 포함된다.
- [0115] 단일클론 항체 기술은 특정한 단일클론 항체의 형태로서 매우 특이적인 세포결합물질의 생산을 가능케 한다. 특히 당업계에서 주지한 기술은 손상되지 않은 표적 항원 등관련 항원, 표적세포에서 분리된 항원, 전바이러스(whole virus), 감퇴된 전바이러스 및 바이러스 외피 단백질 등의 바이러스 단백질을 가진 생쥐, 랫(rat), 햄스터 또는 어떠한 다른 포유동물을 면역화하여 획득된 단일클론 항체를 형성하는 것이다. 민감해진 인간 세포들 또한 사용 가능하다. 또다른 단일클론 형성 방법은 scFv(단쇄가변영역), 특히 인간 scFv의 파지 라이브러리를 이용하는 것이다(예, Griffiths et al., 미국특허번호 5,885,793 및 5,969,108; McCafferty et al., WO 92/01047; Liming et al., WO 99/06587 참조.). 추가적으로 인간화 항체들과 마찬가지로 미국특허번호 5,639,641에 기재된 재표면화된 항체들 또한 사용 가능하다.
- [0116] 적절한 세포결합물질의 선택은 표적화 대상인 특정 세포집단에 따라 결정되는 선택의 문제이나, 적절한 것이 이용 가능하다면 일반적으로 인간 단일클론 항체가 바람직하다.
- [0117] 예를 들어 단일클론 항체 J5는 무린 IgG2a 항체로서 급성 림프구성 백혈병 항원(CALLA) (Ritz et al, 283 Nature 583-585 (1980))에 특이적이고 급성 림프구성 백혈병에서처럼 표적 세포가 CALLA를 발현하는 경우에 사용될 수 있다.
- [0118] 단일클론 항체 MY9 은 무린 IgG<sub>1</sub> 항체로서 CD33 항원에 특이하게 결합하고(J.D. Griffin et al 8 Leukemia Res., 521 (1984)) 급성 골수성 백혈병(AML)에서처럼 표적 세포가 CD33를 발현하는 경우에 사용될 수 있다.
- [0119] 유사하게 상호교환가능하게 또한 B4로 불리는 단일클론 항체 항-B4는 무린 IgG<sub>1</sub>으로서 B 세포 상의 CD19 항원에 결합하고(Nadler et al, 131 J. Immunol. 244-250 (1983)) 비-훗킨스 림프종(non-Hodgkin's lymphoma)이나 만성 골수성 백혈병과 같은 질환에서 표적 세포가 이러한 항원을 발현하는 B 세포이거나 질병세포인 경우에 사용될 수 있다.
- [0120] 추가적으로 단일클론 항체 C242는 CanAg 항원에 결합하고(U.S. patent No. 5,552,293) 결장암, 췌장암, 비-소세포폐암(non-small cell lung cancer) 및 위암 등의 CanAg 발현 종양을 치료하기 위해 사용될 수 있다. HuC242는 미국특허번호 5,552,293에 기재되어 있으며 하이브리도마가 ECACC 식별번호 90012601로 누적되는 단일클론 항체 C242의 인간화 형태이다. 인간화 형태는 CDR-이식 기술을 적용하거나 (미국특허번호 5,585,089; 5,693,761; 및 5,693,762) 재표면화 기술을 적용함으로써(미국특허번호 5,639,641) 제조될 수 있다. HuC242 는 또한 결장암, 췌장암, 비-소세포폐암 및 위암 등의 CanAg 발현 종양을 치료하기 위해 사용될 수 있다.
- [0121] 또한 트라스투주맙 항체는 Her2 항원을 발현하는 유방암 및 전립선암과 난소암 등의 다른 암을 치료하기 사용될 수 있다. 인슐린 성장 인자에 결합하는 항-IGF-IR 항체 또한 유용하다.
- [0122] 난소암 및 전립선암은, 예를 들어 항-HMFG-2 (Tayl 또는 Papadimitriou et al., 28. Int. J. Cancer 17-21, 1981) 또는 hCTM01 (56 Cancer Res. 5179-5185, 1996)와 같은 항-MUC1 항체 및 J591 (Liu et al. 57 Cancer Res. 3629-3634, 1997)와 같은 항-PSMA (전립선 특이적 막 항원)를 가지고 각각 성공적으로 표적화될 수 있다.
- [0123] 비-항체 분자들 또한 특정 세포 집단을 표적화하기 위해 사용될 수 있다. 예를 들어 GM-CSF는 골수 세포에 결합하며, 급성 골수성 백혈병으로부터 질환을 가진 세포들을 표적화하기 위해 세포결합물질로 사용될 수 있다. 추가적으로 IL-2는 활성화된 T-세포에 결합하며, 이식 거부 예방, 급성 T-세포 백혈병 치료를 위해 사용될 수 있다. MSH는 멜라닌세포에 결합하며, 흑색종 치료를 위해 사용될 수 있다.
- [0124] 엽산은 난소암 및 다른 종양에서 발현된 엽산 수용체를 표적화하기 위해 사용될 수 있다. 상피세포 성장인자(EGF)는 폐, 머리, 목 등의 편평상피암(squamous cancer)을 표적화하기 위해 사용될 수 있다. 소마토스타틴은

신경모세포와 다른 종양 유형을 표적화하기 위해 사용될 수 있다.

[0125] 지방암과 정소암은 에스트로겐(또는 에스트로겐 유사물) 또는 안드로겐(또는 안드로겐 유사물)을 각각 세포결합 물질로서 가지고 성공적으로 표적화될 수 있다.

## [0126] 연결 물질

[0127] 메이텐시노이드는 연결물질에 의해 세포결합물질에 연결되는데, 작용시 메이텐시노이드와 세포결합물질 사이에 비절단성 링커를 형성한다.

[0128] 여기서 사용되는 "링커"는 세포결합물질을 메이텐시노이드에 공유결합시키는 어떤 화학물질을 말한다. 몇가지 예에서 일부 링커는 메이텐시노이드에 의해 제공된다. 예를 들어 DM1은 티올 함유 메이텐시노이드 (도 2)이며 천연 메이텐시노이드, 즉 메이텐신의 유도체이며, 링커의 일부분을 제공한다. 메이텐신의 C-3 하이드록실기 위치에 있는 측쇄는  $-CO-CH_3$  에서 종결되며, DM1의 측쇄는  $-CO-CH_2-CH_2-SH$  에서 종결된다. 따라서 최종 링커는 두 개의 조각, 세포결합물질에 첨가된 연결물질 및 DM1으로부터의 측쇄로부터 수집된다.

[0129] \*절단성 링커는 마일드한 조건, 즉 메이텐시노이드 약물의 활성화에 영향을 주지 않는 조건 하에서 절단될 수 있는 링커이다. 많은 알려진 링커들이 이 카테고리 속에 포함되며 하기에 소개되어 있다.

[0130] 이황화기를 포함하는 링커들은 생리적 조건 하에서 발생 가능한 이황화기 교환을 통해 절단될 수 있는 것들이다.

[0131] 산-불안정 링커는 산성 pH에서 절단될 수 있는 링커이다. 예를 들어, 내포낭(endosome), 리소좀과 같은 특정 세포내물질은 산성 pH (pH 4-5)를 가지며 산-불안정 링커를 절단하기에 적합한 조건을 제공한다.

[0132] 광-불안정 링커는 신체표면 및 다수의 체강 속에서 유용하며 빛에 접근성을 가진다. 또한 적외선은 조직을 투과할 수 있다.

[0133] 몇몇 링커들은 펩티다아제에 의해 절단될 수 있다. 특정 펩티드만 용이하게 세포내 또는 외부에서 절단된다. 예를 들어 Trouet et al., 79 Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 626-629 (1982) 및 Umemoto et al. 43 Int. J. Cancer, 677-684 (1989)를 참조한다. 또한 펩티드들은  $\alpha$ -아미노산과 펩티드 결합, 즉 한개의 아미노산 카르복실기와 두번째 아미노산의  $\alpha$ -아미노기 사이에 화학적 아마이드 결합으로 구성된다. 다른 아마이드 결합, 즉 라이신의 카르복실기와  $\epsilon$ -아미노기 사이의 결합은 펩티드 결합으로는 이해되지 않지만 비절단성으로 이해된다.

[0134] \*몇몇 링커들은 에스테라아제에 의해 절단될 수 있다. 특정 에스테르만이 세포내 또는 외부에 존재하는 에스테라아제에 의해 절단될 수 있다. 에스테르들은 카르복시산과 알코올의 축합반응에 의해 형성된다. 단순 에스테르들은 단순 알코올, 예를 들면 지방족 알코올, 및 소형 고리형 및 방향족 알코올로부터 생산되는 에스테르이다. 예를 들어 에스테르의 알코올 부분, 메이텐시놀은 매우 크고 복잡하기 때문에 본 발명자들은 메이텐신의 C-3 위치에서 에스테르를 절단하는 어떠한 에스테라아제도 발견하지 못하였다.

[0135] \*비절단성 링커는 안정한 공유결합 방식으로 메이텐시노이드를 세포결합물질에 결합시킬 수 있는 어떤 화학 물질이며, 상기 절단성 링커에 대해 나열한 카테고리 속에 포함되지는 않는다. 따라서 비절단성 링커들은 산-유발 절단, 광-유발 절단, 펩티다아제-유발 절단, 에스테라아제-유발 절단 및 이황화결합 절단에 상당한 내성을 가진다.

[0136] 절단에 "상당한 내성을 가지는"은 링커 내의 화학 결합이나, 세포결합물질 메이텐시노이드 접합체군 중 적어도 80%, 바람직하게는 85%, 더욱 바람직하게는 90%, 더욱더 바람직하게는 95%, 가장 바람직하게는 99%에 있어서의 링커 연결이 산, 광불안정-절단물질, 펩티다아제, 에스테라아제, 또는 절단성 링커 내에서 화학결합(예를 들면 이황화결합)을 절단하는 화학적이거나 생리적 화합물에 대해 수시간에서 수일에 걸쳐 상기 언급된 물질들 중 어느 하나를 이용하여 치료하는 동안 비절단성으로 남아 있음을 의미한다.

[0137] 또한 "비절단성"이란 산, 광불안정-절단물질, 펩티다아제, 에스테라아제, 또는 메이텐시노이드나 세포결합물질



이 그들의 활성을 잃지 않는 조건에서 이황화결합을 절단하는 화학적이거나 생리적 화합물에 의해 유도된 절단을 견디는 링커 내 화학 결합이나, 링커에 연결하는 능력을 의미한다.

[0138] 당업계 통상의 기술을 가진 자라면 용이하게 비절단성과 절단성 링커를 식별할 수 있을 것이다.

[0139] 링커가 절단에 상당한 내성을 가지는지를 검사하기 위한 적절한 조절의 예로는 상기 언급된 물질들 중 어느 하나에 의한 절단을 허용하는 화학결합, 예를 들어 이황화결합을 가진 링커가 있다. 링커가 절단에 상당한 내성을 가지는지에 대한 검사는 접합체의 안정성을 수시간에서 수일, 일반적으로 4 내지 5 시간에 걸친 시간 동안 ELISA, HPLC, 또는 다른 적절한 수단으로 측정함으로써 가능하다. ELISA 검사는 플라스마 농도로 고정된 접합체의 수치를 측정하기 위해 사용될 수 있다.

[0140] 비절단성 링커들은 또한 비절단성 링커를 포함하는 접합체의 생체 내 반감기가 절단성 링커를 포함하는 접합체보다 일반적으로 약 20% 정도 높다는 점에서 특징적이다. 생쥐에서 비절단성 링커를 통해 연결된 IgG-메이텐시노이드 접합체의 생체 내 반감기는 최소한 4일이다.

[0141] 메이텐시노이드와 세포결합물질 사이에 비절단성 링커를 형성하는 적절한 연결물질은 당업계에서 주지하며, 항원자를 포함하는 비절단성 링커(SMCC 등) 또는 항 원자를 포함하지 않는 비절단성 링커를 형성할 수 있다.

[0142] 메이텐시노이드와 세포결합물질 사이에 비절단성 링커를 형성하는 바람직한 연결물질은 말레이미도- 또는 할로아세틸-을 주요 부분으로 하는 물질을 포함한다. 본 발명에 따르면, 그러한 비절단성 링커들은 말레이미도- 또는 할로아세틸-을 주요 부분으로 하는 물질로부터 유도되는 것으로 알려져 있다. 말레이미도-를 주성분으로 하는 물질연결물질에는 *N*-숙시니미딜 4-(말레이미도페닐)사이클로헥산카르복실레이트 (SMCC), SMCC의 "긴사슬" 유사물질(LC-SMCC)인 *N*-숙시니미딜-4-(*N*-말레이미도페닐)-사이클로헥산-1-카르복시-(6-아미도카프로에이트),  $\kappa$ -말레이미도운데카노산 *N*-숙시니미딜 에스테르(KMUA),  $\gamma$ -말레이미도부티르산 *N*-숙시니미딜 에스테르(GMBS),  $\epsilon$ -말레이미도카프로산 *N*-하이드록시숙시니미드 에스테르(EMCS), *m*-말레이미도벤조일-*N*-하이드록시숙시니미드 에스테르(MBS), *N*-( $\alpha$ -말레이미도아세톡시)-숙시니미드 에스테르[AMAS], 숙시니미딜-6-( $\beta$ -말레이미도프로피온아미도)헥사노에이트(SMPH), *N*-숙시니미딜 4-(*p*-말레이미도페닐)-부티레이트(SMPB), 및 *N*-(*p*-말레이미도페닐)아이소시아네이트(PMPI) (도 15 말레이미도를 주성분으로 하는 물질연결 물질의 대표적 구조. 참조)가 해당된다. 이들 연결 물질은 말레이미도를 주성분으로 하는 물질물질로부터 유도된 비절단성 링커를 형성한다.

[0143] 할로아세틸을 주성분으로 포함하는 연결물질에는 *N*-숙시니미딜-4-(아이오도아세틸)-아미노벤조에이트(SIAB), *N*-숙시니미딜 아이오도아세테이트(SIA), *N*-숙시니미딜 브로모아세테이트(SBA) 및 *N*-숙시니미딜 3-(브로모아세트아미도)프로피오네이트 (SBAP) (도 16 할로아세틸을 주성분으로 하는 연결 물질의 대표적 구조. 참조)가 해당된다. 이들 연결 물질은 할로아세틸을 주성분으로 하는 물질로부터 유도된 비절단성 링커를 형성한다.

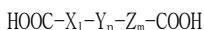
[0144] 도 15와 도 16에 언급된 활성 에스테르가 *N*-숙시니미딜 및 술포숙시니미딜 에스테르로 구성되는 반면, 다른 활성 에스테르들, 예를 들어 *N*-하이드록시 프탈리미딜 에스테르, *N*-하이드록시 술포프탈리미딜 에스테르 오르소-니트로페틸 에스테르, 파라-니트로페틸 에스테르, 2,4-디니트로페틸 에스테르, 3-술포닐-4-니트로페틸 에스테르, 3-카르복시-4-니트로페틸 에스테르, 펜타플루오로페닐 에스테르, 및 술포닐 테트라페닐 에스테르 또한 사용 가능하다.

[0145] 특히 바람직한 연결 물질은 항 원자를 포함하지 않는 비절단성 링커를 형성한다. 도 21에서는  $\alpha$ ,  $\omega$ -디카르복시산 (알칸이나 알켄이 3-24 탄소를 가지는 알칸 또는 알켄 디오익산)에서 유도되는 연결물질에 의해 유발된 메이텐시노이드 분자를 보여준다. 세포결합물질과 반응할 때 연결 물질은 항 원자를 포함하지 않는 비절단성 링커를 형성할 것이다.

[0146] 도 21의 메이텐시노이드 분자는 다음과 같이 생성된다. 먼저 아디프산의 모노에스테르 (헥산디오익산이나 1,6-헥산디카르복시산으로도 알려짐)가 디사이클로헥실카르보디이미드의 존재하에 2-트리메틸실릴에탄올의 하나의 균등물로 처리하여 얻어진다. 남아있는 카르복시산기를 아이소부틸 클로로포름산으로 활성화시킨 다음 *N*-메틸-L-알라닌과의 반응이 이어지며, 아실화된 *N*-메틸-L-알라닌을 제공한다. 디사이클로헥실카르보디이미드와 염화아연 존재 하에 메이텐시놀과 반응한 다음에는 플루오르화 테트라부틸암모늄을 가지는 트리메틸실릴 예방 그룹의 제거가 이어지고, 유리된 카르복시기를 가지는 메이텐시노이드를 제공한다. 디사이클로헥실카르보디이미드의 존재 하에 술포 *N*-하이드록시숙시니미드와의 반응을 통한 카르복시기의 에스테르화는 항 원자를 포함하지 않는 비절단성 접합체를 제공하기 위해 세포결합물질과 반응할 수 있는 활성 메이텐시놀의 에스테르를 제공한다.

[0147] 항 원자를 포함하지 않는 비절단성 링커들은 또한 하기에 설명된 방법을 사용함으로써 다른 디카르복시산을 주요소로 하는 물질로부터 유도될 수 있다. 다른 적합한 디카르복시산 기초 물질에는 구조식 (IV)의  $\alpha$ ,  $\omega$ -디카르

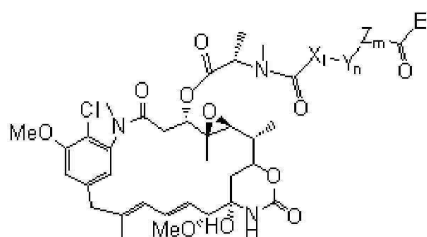
복시산이 포함되지만 이것에만 한정되는 것은 아니다:



[0149] (IV)

[0150] 구조식 (IV)에서, X 는 2 내지 20개 탄소를 갖는 선형 또는 가지형 알킬, 알케닐 또는 알키닐기이며, Y 는 3 내지 10개 탄소를 갖는 사이클로알킬 또는 사이클로알케닐기이며, Z 는 6 내지 10개 탄소를 갖는 치환되거나 치환되지 않은 방향족 작용기 또는 치환되거나 치환되지 않은 헤테로사이클릭 작용기로서, 헤테로원자는 N, O 또는 S로부터 선택되고, 1, m, n이 모두 동시에 0이 아닌 경우 각각 0 또는 1이다.

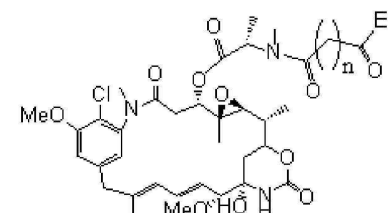
[0151] 황 원자를 포함하지 않는 비절단성 링커를 가지는 접합체를 형성할 목적으로 세포결합물질과 직접 반응할 수 있는 활성 에스테르를 포함하기 위해 유도된 메이텐시노이드는 구조식 5에 의해 표현 가능하다:



[0152] 5

[0153] 여기서 X, Y, Z, 1, m, n은 모두 상기 구조식(IV) 와 같이 정의되고, 또한 E는 카르보닐기와 함께 N-하이드록시 숙시니미딜 및 설포숙시니미딜 에스테르, N-하이드록시 프탈리미딜 에스테르, N-하이드록시 설포프탈리미딜 에스테르 오르소-니트로페닐 에스테르, 파라-니트로페닐 에스테르, 2,4-디니트로페닐 에스테르, 3-술포닐-4-니트로페닐 에스테르, 3-카르복시-4-니트로페닐 에스테르, 펜타플루오로페닐 에스테르, 및 술포닐 테트라플루오로페닐 에스테르와 같은 활성 에스테르를 형성한다.

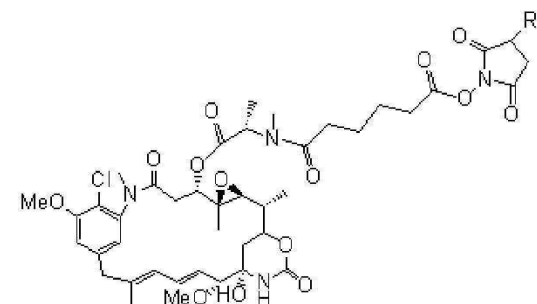
[0154] 구조식 6 에 의해 표현되는 유도된 메이텐시노이드가 바람직하다:



[0155] 6

[0156] 여기서 n은 3에서 24까지의 정수이고, E는 구조식 5의 경우와 동일한 정의를 가진다.

[0157] 보다 바람직한 실시예는 구조식 7로 표현되는 유도된 메이텐시노이드이다:



[0158] 7

[0159] 여기서 R 은 H 또는  $\text{SO}_3^-\text{Na}^+$ 이다.

- [0163] 구조식 5,6,7의 화합물은 새로운 메이텐시노이드이다.
- [0164] 2 내지 20 개 탄소를 가지는 선형 알킬, 알케닐, 또는 알킬닐의 예에는 에틸, 프로필, 부틸, 펜틸, 헥실, 프로페닐, 부테닐 및 헥세닐이 포함되지만 이들에만 한정되는 것은 아니다.
- [0165] 2 내지 20 개 탄소를 가지는 가지형 알킬, 알케닐, 또는 알킬닐의 예에는 이소프로필, 이소부틸, 2차-부틸, 4차-부틸, 이소펜틸, 1-에틸-프로필, 이소부테닐, 이소펜테닐, 에티닐, 프로피닐 (프로파르길), 1-부티닐, 2-부티닐, 및 1-헥시닐이 포함되지만 이들에만 한정되는 것은 아니다.
- [0166] 3 내지 10 개 탄소를 가지는 사이클로알킬 또는 사이클로알케닐의 예에는 사이클로프로필, 사이클로부틸, 사이클로펜틸, 사이클로헥실, 사이클로헥테닐, 사이클로헥세닐, 및 사이클로헵타디에닐이 포함되지만 이들에만 한정되는 것은 아니다.
- [0167] 6 내지 10개 탄소를 포함하는 방향족 그룹의 예에는 페닐 및 나프틸이 포함되지만 이들에만 한정되는 것은 아니다.
- [0168] 치환된 방향족 그룹의 예에는 니트로페닐 및 디니트로페닐이 포함되지만 이들에만 한정되는 것은 아니다.
- [0169] 헤테로사이클릭 방향족 그룹에는 N, O, 또는 S로부터 선택된 하나 또는 두개의 헤테로원자를 포함하는 3 내지 10 개의 고리로 된 그룹이 포함되지만 이들에만 한정되는 것은 아니다.
- [0170] 치환되고 치환되지 않는 헤테로사이클릭 방향족 그룹의 예에는 피리딜, 니트로-피리딜, 피롤릴, 옥사졸릴, 티에닐, 티아졸릴, 및 퓨릴이 포함되나 이들에만 한정되는 것은 아니다.
- [0171] 헤테로사이클로알킬 라디칼에는 3 내지 10 개의 고리로 구성되고 N, O 또는 S로부터 선택된 하나 또는 두개의 헤테로원자를 포함하는 사이클릭 화합물이 해당된다.
- [0172] 헤테로사이클로알킬 라디칼의 예에는 디하이드로퓨릴, 테트라하이드로퓨릴, 테트라하이드로피롤릴, 피페리디닐, 피페라지닐, 및 모르포리노가 포함되지만 이들에만 한정되는 것은 아니다.
- [0173] 구조식  $\text{HOOC-X}_1\text{-Y}_n\text{-Z}_m\text{-COOH}$ 의  $\alpha, \omega$ -디카르복시산의 예에는 아디프산, 글루타르산, 피메르산, 헥센-1,6-디오익산, 펜텐-1,5-디오익산, 사이클로헥산-디오익산 및 사이클로헥센-디오익산이 포함되나 이들에만 한정되는 것은 아니다.
- [0174] **세포독성 접합체의 합성**
- [0175] 세포결합물질과 메이텐시노이드의 접합체는 현재 알려지거나 이후에 개발된 어떠한 기술을 사용하더라도 형성 가능하다.
- [0176] 세포결합물질과 메이텐시노이드의 접합 방법은 일반적으로 두가지 반응 단계와 연관된다. 미국특허번호 5,208,020에서 설명된 한 가지 방법에서는 항체와 같은 세포결합물질은 하나 또는 그 이상의, 보통 1-10개의 반응기를 포함하도록 연결물질로 변형 가능하다. 변형된 세포결합물질은 이후 하나 또는 그 이상의 티올 함유 메이텐시노이드와 반응하여 접합체를 생성한다.
- [0177] 선택적으로 미국특허번호 6,441,163 B1에서 공개된 바와 같이 티올 함유 메이텐시노이드는 먼저 연결물질로 변형된 다음에 변형된 메이텐시노이드가 세포결합물질과 반응한다. 예를 들면, 활성 숙시니미딜 또는 술포숙시니미딜 에스테르를 가지는 메이텐시노이드 티오에테르를 형성하기 위해 티올 함유 메이텐시노이드는 도 15에서 기재된 말레이미도 화합물과 반응할 수 있다. 활성화된 링커부분을 포함하는 이들 메이텐시노이드와 세포결합물질의 반응은 또 다른 비절단성 세포결합물질 메이텐시노이드 접합체 생산 방법을 제공한다.
- [0178] 본 발명의 또 다른 측면으로 상기 언급된 바와 같이 황 원자를 포함하지 않는 메이텐시노이드는 먼저 디카르복시산 기초 연결물질에 의해 유도된 다음에 세포결합물질과 반응하여 메이텐시노이드가 S-불포함 비절단성 링커를 통해 세포결합물질에 연결되는 접합체를 형성한다.
- [0179] 전형적으로 항체당 평균 1-10개 메이텐시노이드가 연결된다. 접합체는 Sephadex G-25 칼럼을 통해 정제 가능하다.
- [0180] 미국특허번호 5,208,020 및 6,441,163 B1 의 공개 전문이 본원에서 인용되어 있다.

- [0181] 본 발명의 대표적인 접합체는 항체-메이텐시노이드 유도체, 항체 절편-메이텐시노이드 유도체, 상피성 성장인자(EGF)-메이텐시노이드 유도체 등의 성장인자-메이텐시노이드 접합체, 멜라닌세포 자극 호르몬(MSH)-메이텐시노이드 유도체, 갑상선 자극 호르몬(TSH)-메이텐시노이드 유도체, 에스트로겐-메이텐시노이드 유도체, 에스트로겐 유사물질-메이텐시노이드 유도체, 안드로겐-메이텐시노이드 유도체, 안드로겐 유사물질-메이텐시노이드 유도체 등의 호르몬-메이텐시노이드 접합체, 엽산 메이텐시노이드 등의 비타민-메이텐시노이드 접합체이다.
- [0182] 항체, 항체 절편, 단백질 호르몬, 단백질 성장인자 및 다른 단백질들의 메이텐시노이드 접합체들은 동일한 방식으로 제조된다. 예를 들어 펩티드와 항체는 상기 언급된 비절단성 연결물질을 가지고 변형 가능하다. 수용성 완충액 내의 항체 용액은 물 초과분의 항체-변형 연결물질, 예를 들면 숙시니미딜 4-(N-말레이미도메틸)-사이클로헥산-1-카복실레이트(SMCC), 술폰-SMCC, *m*-말레이미도벤조일-N-하이드록시숙시니미드 에스테르(MBS), 술폰-MBS, 숙시니미딜-아이오도아세테이트, 또는 N-숙시니미딜-4-(아이오도아세틸)-아미노벤조에이트 (SIAB), N-숙시니미딜 4-(N-말레이미도메틸)-사이클로헥산-1-카복시-(6-아미도카프로에이트) (SMCC의 "긴사슬" 유사물질임, LC-SMCC), 술폰-LC-SMCC,  $\kappa$ -말레이미도운데카노익산 N-숙시니미딜 에스테르 (KMUA), 술폰-KMUA,  $\gamma$ -말레이미도부티르산 N-숙시니미딜 에스테르 (GMBS), 술폰-GMBS,  $\varepsilon$ -말레이미드카프로익산 N-하이드록시숙시니미드 에스테르 (EMCS), 술폰-EMCS, N-( $\alpha$ -말레이미도아세톡시)-숙시니미드 에스테르 (AMAS), 술폰-AMAS, 숙시니미딜-6-( $\beta$ -말레이미도프로피온아미도)헥사노에이트 (SMPH), 술폰-SMPH, N-숙시니미딜 4-(*p*-말레이미도페닐)-부티레이트 (SMPB), 술폰-SMPH, N-(*p*-말레이미도페닐)이소시아네이트 (PMPI), N-숙시니미딜-4-(아이오도아세틸)-아미노벤조에이트 (SIAB), N-숙시니미딜 아이오도아세테이트 (SIA), N-숙시니미딜 브로모아세테이트 (SBA), 및 N-숙시니미딜 3-(브로모아세틸아미도) 프로피오네이트 (SBAP)로 배양될 수 있다. Yoshitake et al., 101 Eur. J. Biochem. 395-399 (1979); Hashida et al., J. Applied Biochem. 56-63 (1984); 및 Liu et al., 18 690-697 (1979); Uto et al., 138 J. Immunol. Meth. 87-94 (1991); Rich et al. 18 J. Med. Chem. 1004-1010 (1975); Kitagawa 및 Aikawa, 79 J. Biochem. (Tohyo) 233-236 (1976); Tanimoto et al., 62 J. Immunol. Meth. 123-128 (1983); Hashida et al., 6 J. Appl. Biochem. 56-63 (1984); Thompson et al., 140 Eur. J. Biochem. 63-71 (1984), Chrisey et al. 24 Nucl. Acid Res. 3031-3039 (1996), Annunziato et al., 4 Bioconjugate Chem. 212-218 (1993), Recten et al., 24 J. Immunol. Meth. 321-336 (1978), 및 Inman et al. 2 Bioconjugate. Chem. 458-463 (1991)을 참조한다.
- [0183] 이후 변형된 항체는 티올 함유 메이텐시노이드 (1.25 몰 평형/말레이미도 또는 아이오도아세틸기)로 처리되어 접합체를 생성한다. 혼합체는 약 4°C에서 하룻밤 배양된다. 항체-메이텐시노이드 접합체는 Sephadex G-25 칼럼을 통한 겔 여과에 의해 정제된다. 항체 분자 당 결합된 메이텐시노이드 분자의 수는 분광계로 252 nm 및 280 nm에서 흡광도를 측정하여 산출된다.
- [0184] 바람직한 방법은 말레이미도기를 추가하기 위해 항체를 숙시니미딜 4-(N-말레이미도메틸)-사이클로헥산-1-카복실레이트(SMCC)로 변형한 다음 변형된 항체와 티올 함유 메이텐시노이드를 반응시켜서 티오에테르 결합된 접합체를 형성하는 것이다. 다시, 항체 당 1 내지 10 약물 분자를 가진 접합체가 생성된다. 항체-메이텐시노이드 접합체의 예는 도 17-20에서 보여진다.
- [0185] 유사하게, 예를 들면 에스트로겐과 안드로겐 세포결합물질, 예를 들어 에스트라디올과 안드로스텐디올은 적절하게 차단된 염화 3-S-아세틸프로파노일과 같은 티올기 함유 염화 카복시산으로 반응함으로써 C-17 하이드록시기에서 에스테르화될 수 있다. 또 다른 에스테르화의 방법 또한 참조문헌에서 설명된 바와 같이 사용될 수 있다 (Haslam, 36 Tetrahedron 2400-2433 (1980)). 차단되거나 자유 티올 함유 안드로겐 또는 에스트로겐은 이후 티올 함유 메이텐시노이드와 반응하여 접합체를 형성할 수 있다. 접합체는 실리카겔 상에서의 칼럼 크로마토그래피 또는 HPLC에 의해 정제 가능하다.
- [0186] 특별히 바람직한 방법은 메이텐시놀을 연결물질로 변형시켜 아무런 황 원자도 포함하지 않는 연결을 형성한 다음 변형된 메이텐시노이드를 항체와 반응시켜 접합체를 생성하는 것이다.
- [0187] **본 발명의 세포독성 접합체의 치료효능**
- [0188] 본 발명의 세포결합물질 메이텐시노이드 접합체는 시험관 내에서 다양한 셀 라인의 확산을 금지시키는 능력에 따라 가치가 매겨진다. 예를 들어 인간 결장암 셀 라인 COLO205, 인간 흑색종 셀 라인 A375, 인간 골수성 백혈병 셀 라인 HL60, 인간 유방암 셀 라인 SKBR3, 또는 인간 편평상피세포암 셀 라인 KB 등의 셀 라인은 접합체의 세포독성을 검사하기 위해 사용될 수 있다. 평가 대상 세포 들은 24 시간 동안 화합물에 노출될 수 있으며, 생

존하는 세포 조각들은 알려진 방법에 의해 직접 분석하여 측정 가능하다.(예. Goldmacher et al., 135 J. Immunol. 3648-3651 (1985), 및 Goldmacher et al., 102 J. Cell Biol. 1312-1319 (1986)을 참조한다). IC<sub>50</sub> 값은 분석 결과로부터 산출 가능하다.

[0189] 높은 세포독성이라 함은 시험관 내에서 SKBR3 셀을 약물에 24 시간 노출시켜 측정한 결과 약  $10^{-8}$  M 또는 그 이하의 IC<sub>50</sub> (생존하는 조각을 0.5로 남기는 독성 물질의 억제 농도)를 가지는 것으로 정의될 수 있다.

[0190] 본 발명의 항체-메이텐시노이드 접합체의 시험관 내에서의 독성 및 표적 특이성은 도 4에 나타난다. 연결물질로 SMCC를 사용하는 huC242 와 DM1 접합체는 항원 양성 SKBR3 셀을 파괴함에 있어서  $3.5 \times 10^{-12}$  M의 IC<sub>50</sub> 값의 상당한 독성을 나타낸다. 반대로 항원 음성 A375 셀은 본 발명의 메이텐시노이드 접합체가 매우 강력하고 특이적임을 보여주면서 약 800배 정도 낮은 민감도를 나타낸다.

[0191] 집락형성분석 (도 6a-6c) 및 간접 세포독성 분석 (도 7)에서 huC242-SMCC-DM1 접합체는 이황화기-함유 링커로 제조된 접합체와 비교할 때 동일하거나 더 강한 독성을 나타냈다. 이러한 결과는 SMCC를 통해 메이텐시노이드에 접합된 항-Her2 항체가 아무런 특이성을 보여 주지 않음을 기재한 종래 공개된 데이터에 기초할 때 예상치 못한 것이었다(Chari et al., 52 Cancer Res. 127-133 (1992)).

[0192] SMCC 비절단성 링커로 제조된 접합체의 활성은 huC242 접합체에 한정되지 않는다. 시험관 내 특이성 또한 트라스투주맵, 항-Her2 항체; My9-6, 항-CD33 항체; KS77, 항-EGFR 항체; 및 N901, 항-CD56 항체의 SMCC-DM1 접합체에서 관찰되었다 (도 8a-8d 및 도 25).

[0193] 추가적으로, 시험관 내 특이성을 보여주는 비절단성 링커를 가진 접합체들은 SMCC 링커에 한정되지 않는다. 비절단성 링커 SIAB로 합성된 DM1의 huC242 접합체는 시험관 내 집락형성분석에서 강력하고 항원 특이적인 세포독성을 나타냈다(도 9). 또한 SIAB로 합성된 DM1의 트라스투주맵 접합체 또한 집락형성분석에서 세포독성을 나타냈다(도 28). 또한, huC242-항을 함유하지 않는 비절단성 링커-DM1 접합체 또한 시험관 내 집락형성분석에서 강력하고 항원 특이적인 세포독성을 나타냈다(도 22).

[0194] SMCC 링커를 사용하는 DM1 포함 항체 접합체는 생쥐에 대한 인간 종양 이종이식에 있어서 항 종양 효능을 보여 준다 (도 10a-10c). 먼저, 도 10A에 나타난 바와 같이, 종양 성장의 상당한 억제가 COLO 205 결장 종양 이종이식을 huC242-SMCC-DM1을 가지고 치료할 때 관찰되었다. 이 실험에서, 피하선암을 가진 5마리 동물 중 한 그룹이 huC242-SMCC-DM1 150 $\mu$ g/kg를 투약하여 치료되었다. 종양 크기는 주기적으로 측정되었으며, 종양 접종시간 경과 대비 도표가 만들어졌다. 치료받은 5마리 모두가 종양의 완전한 축소를 보였는데, 3마리는 비록 다른 시점에서 재발하였지만 2마리는 실험 종료시점까지 종양이 사라진 상태가 지속되었다(도 10A). 또한 도 10B에 나타난 바와 같이, 이러한 항 종양 활성은 생쥐 체중에 영향을 주지 않는 접합체를 투여할 때 관찰된다. 이 실험에서 피하선 SNU 종양을 가진 5마리 동물 중 세 그룹이 huC242-SMCC-DM1 15 $\mu$ g/kg, 30 $\mu$ g/kg, 및 60 $\mu$ g/kg를 각각 투여하여 치료되었다. 종양 크기는 주기적으로 측정되었으며 종양 접종시간 경과 대비 도표가 만들어졌다. huC242-SMCC-DM1은 투약 의존성 항종양 효과를 나타냈다. 그 결과, L0205 결장암세포 종양 이종이식을 낳는 생쥐를 huC242-SMCC-DM1 접합체로 치료한 결과 종양의 완전한 축소를 가져왔으며, 몇몇 생쥐는 2달에 걸쳐 사후 치료하면서 가시적인 종양이 남아 있지 않게 되었다 (도 10A). 이러한 활성은 생쥐 체중에 영향을 주지 않는 접합체에서 또다시 획득되었다. 트라스투주맵-SMCC-DM1 접합체 또한 MCF-7 유방암세포 종양 셀 라인을 가진 생쥐 종양 이종이식 실험에서 상당한 종양 축소를 나타냈다 (도 10C).

[0195] 비절단성 링커 SMCC로 합성된 항체-메이텐시노이드 접합체의 플라즈마 제거속도는 매우 느리며 항체 단독으로 제거할 때와 상당하다. 이는 huC242-SPP-DM1 같은 상대적으로 불안정한 이황화결합으로 제조된 접합체의 플라즈마 제거와 완전히 대조적이다. 예를 들면, SMCC 접합체의 제거에 걸리는 반감기는 약 320 시간인데 반해, SPP 접합체의 제거에 걸리는 반감기는 40-50 시간이다 (도 11). 하지만 각 접합체 종류에 따른 항체 부분의 제거는 동일하며, 측정된 접합체 제거 속도의 차이는 SPP-DM1 접합체의 경우 항체 접합체로부터 메이텐시노이드의 손실에 따른 것이다. 따라서 비절단성 SMCC 링커는 SPP-DM1 접합체보다 생체 내에서의 메이텐시노이드-링커 절단 작용에 훨씬 더 저항성이 있다. 또한 SMCC 연결된 접합체에 대한 감소된 제거 속도는 SPP-DM1과 비교할 때 곡선아래영역(AUC)에 의해 측정된 대로 동물의 총 메이텐시노이드 노출에 있어서 거의 5배 증가를 가져온다. 이러한 증가된 노출은 몇몇 경우에 약물 효능에 상당한 효과를 가질 수 있다.

[0196] SMCC와 같은 비절단성 링커로 제조된 메이텐시노이드 접합체는 절단성 이황화결합 링커로 제조된 접합체와 비교할 때 생쥐에서 예상치 못하게 증가된 내성을 보여준다. 급성 독성 검사가 1회 혈관내 투약으로 암컷 CD-1 생쥐



에서 실시되었다. huC242-SMCC-DM1 접합체(비절단성)와 절단성 이황화결합을 포함하는 링커로 제조된 huC242 접합체의 내성에 대한 비교가 각 접합체 당 4회에 걸쳐 실시된 투약 결과 생쥐의 사멸(도 12a 및 12b) 및 독성 표시(도 12c 및 12d)를 관찰하는 것으로 행해졌다. 이황화결합 연결된 접합체 SPP-DM1에 대한 MTD가 45-90 mg/kg 인 반면, SMCC-DM1 접합체에 대한 최대투약내성(MTD)은 검사한 최대 투약(150 mg/kg)보다도 더 컸다. 150 mg/kg 투약시, SMCC-DM1 치료받은 집단 내의 모든 생쥐가 생존한 반면, 96시간 사후 치료에 의해 SPP-DM1 치료 받은 집단 내의 모든 생쥐에 대해 치명적 독성이 관찰되었다. 메이텐시노이드 접합체는 미세소관 중합화 억제를 통해 세포파괴 능력을 부여하는 것으로 판단된다. 미세소관 중합화 억제는 세포 주기, 주되게는 G2/M기의 정지를 유도한다. 항체-메이텐시노이드 접합체에 의한 항원 의존성 G2/M기 세포 주기의 정지는 유세포 분석으로 관찰 가능하다 (도 13). huC242-SPP-DM1 또는 huC242-SMCC-DM1 접합체로 COLO205 세포를 치료하는 것은 6-10 시간 만에 완전한 G2/M 정지를 가져온다. 그렇지만 30 시간의 사후치료가 지나면 이황화결합으로 연결된 huC242-SPP-DM1 접합체 치료로 정지된 일부 세포들은 세포 주기 정지로부터 벗어나서 세포 분열을 재시작한다. 놀랍게도 비절단성 접합체로 치료한 세포들은 상기 사후치료 시점에서도 세포 주기 정지로부터 이탈하지 않는다. 이들 두 접합체 활성의 지속성에 있어서의 차이는 트립토판 블루를 사용한 염색 배제 실험에서 판단된 바와 같이 또한 30시간 시점에서의 사멸된 세포의 핵분열에도 반영된다. 이들 결과는 비절단성 SMCC 링커 접합체 치료로 유발된 예상치 못한 지속적인 분자 활동을 설명한다.

[0197] 절단성 이황화결합 링커를 갖는 접합체와 비교할 때 비절단성 링커로 제조된 접합체의 또 다른 측면은 항원-양성 세포에 매우 근접한 경우에 항원 음성 세포에 대한 활성이 없다는 것으로, 여기서는 이것을 구경꾼 작용이라고 부른다. 즉, 비절단성 링커로 제조된 접합체는 최소한의 구경꾼 작용을 가진다. 분리 배양시에는 huC242-SPP-DM1 (절단성) 및 huC242-SMCC (비절단성) 접합체 모두가 항원-양성 COLO205 셀 라인에 강력한 세포 파괴 활성을 보여주며, 항원-음성 셀 라인, Namalwa에 대하여 아무런 활성도 갖지 않는다(도 14a-14c). 그러나, COLO205 와 Namalwa 세포를 huC242-SPP-DM1로 공동 배양 치료하면 항원-음성 Namalwa 셀에 대해서조차도 엄청난 세포 파괴 작용을 보인다. 반대로 huC242-SMCC-DM1 접합체는 동일 조건 하에서 그러한 구경꾼 작용을 나타내지 않는다. 항원-음성 COLO205 셀과 공동 배양하더라도 Namalwa 셀에 대해 huC242-SMCC-DM1 접합체의 아무런 세포 파괴 작용도 관찰되지 않는다. 비절단성 접합체의 이러한 최소한의 구경꾼 작용이 급성 독성 연구에서 비절단성 링커를 가진 접합체의 증가된 내성에 기여하는 것이다.

[0198] 상기 실험으로부터의 결과는 종래 기술된 세포결합물질 메이텐시노이드 접합체와 비교할 때 본 발명의 비절단성 링커를 가지는 메이텐시노이드 접합체가 항종양 활성을 상당히 개선시켰음을 설명한다.

# [0199] 사용방법

[0200] 상기 접합체들은 메이텐시노이드를 선택된 세포집단에 표적화하기 위한 방법에서 사용될 수 있는데, 당해 방법은 세포집단이나 선택된 세포집단을 포함하는 것으로 추정되는 조직에 세포결합물질 메이텐시노이드 접합체를 연결하는 것을 포함하고 하나 또는 그 이상의 메이텐시노이드가 비절단성 링커를 통해 세포결합물질에 공유결합되고 세포결합물질이 선택된 세포집단 중의 세포에 결합하는 것이다.

[0201] 상기 접합체들은 또한 세포 파괴 방법에서 사용될 수 있는데, 당해 방법은 세포를 세포결합물질 메이텐시노이드 접합체로 연결하는 것을 포함하고, 하나 또는 그 이상의 메이텐시노이드가 비절단성 링커를 통해 세포결합물질에 공유결합되고 세포결합물질이 세포에 결합하는 것이다.

[0202] 상기 접합체들은 또한 악성종양, 자가면역질환, 이식거부, 이식편대숙주질환, 바이러스 감염, 미생물 감염, 및 기생충 감염을 포함하지만 이들에만 한정하지 않고 그밖의 통증 치료 방법에서 사용될 수 있는데, 당해 방법은 충분한 양의 세포결합물질 메이텐시노이드 접합체를 치료가 필요한 환자에게 투여하는 것을 포함하고, 하나 또는 그 이상의 메이텐시노이드가 비절단성 링커를 통해 세포결합물질에 공유결합되고 세포결합물질이 질환을 가지거나 감염된 통증 세포에 결합하는 것이다.

[0203] 본 발명의 상기 방법에 따라 치료될 수 있는 의학적 조건의 예에는 당업계 통상의 기술을 가진 자에 의해 정해진 바와 같이 예를 들어 폐, 유방, 결장, 전립선, 신장, 췌장, 난소, 및 림프 기관 암; 조직 루푸스, 류머티스 관절염, 및 다발성 경화증 등의 자가면역 질환; 신장이식 거부, 간이식 거부, 폐이식 거부, 심장이식 거부, 및 골수이식 거부 등의 이식거부; 이식편대숙주질환; CMV 감염, HIV 감염, AIDS, 등의 바이러스 감염; 및 람블편모충증(giardiasis), 아메바증(amoebiasis) 및 주혈흡충증(schistosomiasis), 및 기타의 기생충 감염을 포함하는 악성질환이 포함되지만 이들에만 한정되는 것은 아니다.

- [0204] 본 방법들은 시험관 내에서나 생체 내에서 실시 가능하다.
- [0205] 상기 기술된 접합체들은 치료 목적의 시험관 내 사용 방법에서 사용될 수 있는데, 예를 들면, 질환을 가지거나 악성 세포를 파괴하기 위해 자기 환자 내로의 이식 전의 자가골수세포; T 세포와 다른 림프세포들을 파괴하고 이식편대숙주질환 (GVHD)을 예방하기 위한 이식 전의 골수세포 또는 다른조직; 표적 항원들을 발현하지 않는 바람직한 변종들을 제외한 모든 세포들을 파괴하기 위한 세포 배양; 또는 바람직하지 않은 항원을 발현하는 변종 세포들을 파괴하기 위한 세포 배양에서 사용되며, 본 방법은 효과적인 양의 세포결합물질 메이텐시노이드 접합체로 세포들을 치료하는 것을 포함하고 하나 또는 그 이상의 메이텐시노이드가 비절단성 링커를 통해 세포결합 물질에 공유결합되고 세포결합물질이 파괴 대상 세포에 결합하는 것이다.
- [0206] 시험관 내 사용에서의 임상 및 비임상 조건들은 당업계 통상의 기술을 가진 자에 의해 쉽게 결정된다.
- [0207] 예를 들면 치료는 다음과 같이 실시 가능하다. 골수는 환자나 다른 개체로부터 채취된 다음, 본 발명의 세포결합물질이 첨가되는 혈청을 포함하며, 약 10 pM 내지 1 nM 농도 범위인 배지에서 약 37℃, 약 30분에서 약 48시간 동안 배양될 수 있다. 농도 및 배양 시간의 정확한 조건은 당업계 통상의 기술을 가진 자에 의해 쉽게 결정될 수 있다. 배양 후 골수세포는 알려진 방법에 따라 혈청을 함유한 배지로 세척되고 환자 혈관내로 되돌려질 수 있다. 환자가 골수 채취 시간과 치료된 세포의 재주입 사이에 박피 화학요법이나 옴몬 방사선 등의 다른 치료를 받는 조건에서는 치료된 골수 세포들은 표준 의학 장비를 사용하여 액화 질소 내에서 냉동 상태로 보관이 가능하다.
- [0208] 생체 내에서의 임상적 사용을 위해 세포결합물질은 용액이나 냉동건조된 분말로 공급되어 살균성과 내독소 수치를 검증받는다. 적절한 접합체 사용의 예는 다음과 같다. 접합체들은 매주 혈관내로 알약 형태로 4시간 동안 공급된다. 알약은 일반적인 염의 50 내지 500 ml로 공급될 수 있으며 거기에 인간 혈청 알부민 5 내지 10 ml가 첨가될 수 있다. 투약량은 1회당 10 mg 내지 2000 mg일 혈관내로 주입될 것이다 (하루에 100 ng 내지 20 mg/kg). 치료한지 4주가 지나면 환자는 주간 단위로 치료를 계속 받을 수 있다.
- [0209] 투약경로, 첨가물, 희석액, 투약량, 시간, 등등의 특정한 생체 내 임상 형태는 당업계 통상의 기술을 가진 자에 의해 결정될 수 있다.
- [0210] 바람직하다면 다른 활성 물질들, 예를 들면 다른 항 종양 물질들이 접합체를 따라 사용될 수 있다.
- [0211] **새로운 접합체, 조성물 및 접합체 제조방법**
- [0212] 비절단성 링커에 연결된 몇몇 항체 및 메이텐시노이드 접합체들이 알려져 있고, 다른 것들은 신규하다. 따라서 적어도 하나의 비절단성 링커를 통해 세포결합물질에 연결된 메이텐시노이드를 가지는 세포결합물질 메이텐시노이드 접합체가 제공되는데, 여기서 링커는 다음을 포함하는 그룹에서 선택된 연결물질에서 유도된 그룹을 포함하지 않는 경우이다: 세포결합물질이 항체인 경우에 숙시니미딜 4-(N-말레이미도메틸)-사이클로헥산-1-카르복실레이트(SMCC), 술포-SMCC, m-말레이미도벤조일-N-하이드록시숙수니미드 에스테르(MBS), 술포-MBS, 및 숙시니미딜-아이오도아세테이트임.
- [0213] 신규 접합체들은 상기 설명된 대로 제조되고 사용될 수 있다.
- [0214] 조성물은 세포결합물질 메이텐시노이드 접합체 및 전달자를 포함한다.
- [0215] 전달자는 약학적으로 수용가능한 전달자, 희석액 또는 첨가제가 가능하다.
- [0216] 적절한 약학적으로 수용가능한 전달자, 희석액, 및 첨가제는 주지하고 당업계 통상의 기술을 가진 자에 의해 결정될 수 있다.
- [0217] 적절한 전달자, 희석액, 및 첨가제의 예에는 : (1) Dulbecco's 인산염 완충액, pH 약 7.4, 약 1 mg/ml 내지 25 mg/ml 인간 혈청 알부민을 포함하거나 불포함함, (2) 0.9% 염 (0.9% w/v NaCl), 및 (3) 5% (w/v) 텍스트로스; 및 또한 트립타민과 Tween 20 같은 안정화제 등의 항산화제를 포함할 수 있다.
- [0218] 세포결합물질 메이텐시노이드 접합체를 제조하는 공정에는 다음이 포함된다:
- [0219] (a) 세포결합물질을 제공하는 단계
- [0220] (b) 연결물질로 세포결합물질을 변형하는 단계, 및

- [0221] (c) 변형된 세포결합물질을 메이텐시노이드 또는 티올 함유 메이텐시노이드로 접합하고 비결단성 링커를 세포결합물질과 메이텐시노이드 또는 티올 함유 메이텐시노이드 사이에 제공하여 접합체를 생산하는 단계.
- [0222] 또다른 세포결합물질 메이텐시노이드 접합체를 제조하는 공정에는 다음이 포함된다:
- [0223] (a) 메이텐시노이드 또는 티올 함유 메이텐시노이드를 제공하는 단계
- [0224] (b) 연결물질로 메이텐시노이드 또는 티올 함유 메이텐시노이드를 변형하여 비결단성 링커를 형성하는 단계, 및
- [0225] (c) 변형된 메이텐시노이드 또는 티올 함유 메이텐시노이드를 세포결합물질로 접합하고 비결단성 링커를 세포결합물질과 메이텐시노이드 또는 티올 함유 메이텐시노이드 사이에 제공하여 접합체를 생산하는 단계.
- [0226] 또다른 세포결합물질 메이텐시노이드 접합체를 제조하는 공정에는 다음이 포함된다:
- [0227] (a) 메이텐시노이드를 제공하는 단계
- [0228] (b) 연결물질로 메이텐시노이드를 변형하여 활성 에스테르를 갖는 황 불포함 메이텐시놀을 제공하는 단계, 및
- [0229] (c) 변형된 메이텐시노이드를 세포결합물질로 접합하고 황-불포함 비결단성 링커를 세포결합물질과 메이텐시놀 사이에 제공하여 접합체를 생산하는 단계.
- [0230] 이들 방법은 상기 상세한 설명 및 여기서 인용한 미국 특허들 및 참조문헌들에 기재되어 있다.

### 실시예 1

- [0231] 본 발명은 비한정적인 실시예를 참조하여 설명될 것이다. 달리 언급되지 않는다면 모든 백분율, 비율, 부분 등은 중량 단위이다. 하기 실험에서 사용된 완충액은 다음과 같다: 50 mM 인산칼륨(KPi)/50 mM 염화나트륨(NaCl)/2 mM 에틸렌디아민테트라아세트산(EDTA), pH 6.5 (버퍼 A); 1x 인산 완충 염(PBS), pH 6.5 (버퍼 B); 및 0.1 M KPi 버퍼/2 mM EDTA, pH 7.5 (Assay Buffer).
- [0232] SMCC (제품번호 22360, M.W. 334.33 g/몰) 및 SIAB (제품번호 22329, M.W. 402.15 g/몰)는 Pierce에서 구입하였다. huC242 항체는 단일클론항체 C242의 인간화된 유형이며, 미국특허번호 5,552,293에 기재되어 있고, 그 하이드로마가 ECACC 식별번호 90012601로 추적된다). 트라스투주맙 항체는 Genentech에서 구입하였다. DM1 (자유 티올 형태; M.W. 737.5 g/몰)은 종래 미국특허번호 5,208,020 및 6,333,410 B1에서 기재된 대로 제조되었다.
- [0233] 크로마토그래피가 Amersham Biosciences에서 구입한 크로마토그래피 칼럼을 사용하여 실시되었다(Sephadex G25 NAP-25 프리팩트 칼럼(Amersham 17-0852-02); HiPrep 26/10 탈염 칼럼, Sephadex G25 파인 레진, 3 개가 일련지어 연결됨 (Amersham 17-5087-01)). TSK-GEL G3000SWXL 크로마토그래피 칼럼 (TOSOH Bioscience, 08541) 또한 TSK 칼럼 가드 SWxl (TOSOH Bioscience 08543)와 함께 사용되었다.
- [0234] 다음 실험에서 사용된 용매는 디메틸설폭사이드 (DMSO), 디메틸아세트아미드 (DMA), 에탄올 (EtOH), 및 DMSO 내의 100mM Ellman's Reagent (DTNB, Cayman Chemical에서 구입가능)이었다

[0235] [실시예 1A]

[0236] huC242-SMCC-DM1 접합체의 제조

[0237] a. huC242 항체의 제조 및 측정

[0238] 항체의 농도는 280 nm에서 흡광계수  $1.48 \text{ (mg/mL)}^{-1}$  및 몰중량 147,000 g/몰 을 사용하여 측정되었다.

[0239] b. SMCC Stock Solution의 제조 및 측정

[0240] SMCC의 20 mM 용액 (6.69 mg/mL)이 디메틸설폭사이드(DMSO) 내에서 제조되었다. 용액은 실험 버퍼(Assay buffer) 내에서 1/40 희석되었으며 샘플의 흡광도는 302 nm에서 측정되었다. 스탁 용액의 농도는  $602 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ 의 몰흡광계수를 사용하여 산출되었다.

[0241] c. DM1 Stock Solution의 제조 및 측정

[0242] DM1의 10 mM 용액 (자유 티올 형태)이 디메틸아세트아미드(DMA) 내에서 제조되었다 (7.37 mg/mL) (도 2). 에탄



올(EtOH) 내에서 스타크 용액의 희석 흡광도는 280 nm에서 측정되었다. 스타크 DM1의 농도는 280 nm에서  $5700 \text{ M}^{-1}$ 의 흡광계수를 사용하여 산출되었다. 스타크 DM1 제조에 있어서 자유 설프하이드릴기 또는 티올기(-SH)의 농도는 Ellman's reagent (DTNB)를 사용하여 측정되었다. 스타크 용액의 희석은 3% (v/v) DMA로 만들어진 실험 버퍼 내에서 준비된 다음 DMSO 내에서 100 mM DTNB (1/100th volume)가 첨가되었다. 시약 blank에 대하여 412 nm에서 흡광도의 증가가 측정되었으며 농도는 흡광계수  $14150 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ 을 사용하여 산출되었다. the Ellman's assay 으로부터 나온 -SH의 농도는 접합체 조건을 결정할 때 DM1 스타크 농도를 표현하기 위해 사용되었다.

**d. SMCC 연결 링커를 가진 huC242 의 변형**

항체는 두가지 샘플로 분할되었다; 하나는 7.5 배 물 초과분의 SMCC 연결 링커를 사용하여 변형되었고, 다른 하나는 8.5 배 물 초과분의 SMCC 연결 링커를 사용하여 변형되었다. 샘플들은 8 mg/mL 항체와 반응하였다. 반응은 DMSO (5% v/v)를 가진 버퍼 A(95% v/v)에서 실온에서 2시간 동안 휘저으며 실시되었다.

**e. 초과 SMCC를 제거하기 위한 G25 크로마토그래피**

huC242-SMCC 반응 혼합물은 버퍼 A에서 평형상태인  $1.5 \times 4.9 \text{ cm}$  Sephadex G25 레진 프리팩트 칼럼을 통해 겔 여과되었다. 탑재(load) 및 용리(elution) 부피는 제조자의 지시에 따랐다. 변형된 항체의 용리는 상기 기재된 흡광 계수를 사용하여 항체 농도를 결정하기 위해 검사되었다. 변형된 항체의 수율은 7.5배 물 초과분 SMCC 반응에 대해서는 74.6%이었으며, 8.5 배 물 초과분 SMCC 반응에 대해서는 81.6%이었다.

**f. DM1과 huC242-SMCC의 접합**

변형된 항체 샘플은 링커에 대해 1.7 배 초과분 DM1과 반응하였다(항체당 5개 링커). 반응은 DMA (3% v/v)을 가진 버퍼 A (97% v/v)내에서 2.5 mg/mL 항체 농도에서 실시되었다. DM1 첨가 후 반응물은 실온에서 약 20시간 동안 휘저으면서 배양되었다.

**g. G25 크로마토그래피에 의한 접합물 정제**

접합 반응 혼합물은 버퍼 B 내에서 평형상태인  $1.5 \times 4.9 \text{ cm}$  Sephadex G25 레진의 프리팩트 칼럼 겔 여과되었다. 탑재(load) 및 용리(elution) 부피는 제조자의 지시에 따랐다. huC242 몰당 연결된 DM1 분자 수는 252nm 및 280nm 모두에서 용리된 물질의 흡광도를 측정함으로써 결정되었다. 7.5배 물 초과분의 SMCC 샘플에 대한 DM1/항체 비율은 3.54로 밝혀졌으며 8.5배 물 초과분의 SMCC 샘플에 대한 DM1/항체 비율은 3.65로 밝혀졌다. 접합 단계 수율은 각각 83.7%, 75.4%이었다. 양 접합체는 공동 수집되었으며, 멸균 여과되고 약물과 항체 농도가 재검사되었다. 수집된 샘플은 로트 번호 1713-146C로 지정되고, 결합능력, 세포독성, 특이성, 결합 정도 및 자유 약물 함량이 분석되었다.

**표 1**

huC242-SMCC-DM1의 특성

참조번호	최종 단백질 농도 (mg/ml)	최종 DM1 농도 (ug/ml)	DM1/Ab
1713-146C	1.77	26.96	3.05

**[실시예 1B]**

**huC242-SMCC-DM1의 시험관 내 검사**

**a. 결합능력**

huC242 항체와 huC242-SMCC-DM1의 결합 친화도가 COLO205 상에서 간접 방법을 사용하여 비교되었고, 얼음위에서 3시간동안 일차 배양으로 웰마다  $5 \times 10^3$ 개의 세포가 사용되었다. 그 결과는 도 3에서 보여진다. 단독 항체는 KD 값  $5.1 \times 10^{-10} \text{ M}$  로 결합되고 접합 상태 항체는 KD 값  $5.52 \times 10^{-10} \text{ M}$ 로 결합되었다. 따라서, DM1을 가진 접합체가 huC242의 결합친화도를 변경하는 것 같지는 않다.

**b. 세포독성 및 특이성**

huC242-SMCC-DM1 접합체의 시험관 내 세포독성 및 특이성은 지속적인 노출 집락형성분석에 의해 측정되었다. 그

결과는 도 4에 나타난다. HuC242-SMCC-DM1은 항원 양성 SKBR3 셀 ( $IC_{50} = 3.5 \times 10^{-12}$  M)를 파괴하는데 효과적이었다. 특이성은 목표 SKBR3 셀의  $IC_{50}$  값을 항원 음성 셀 라인, A375,의 것(당해 접합체의  $IC_{50}$  는  $3.0 \times 10^{-9}$  M 이상이었다)과 비교하여 나타났다.

**c. 크기 배제 크로마토그래피 분석**

접합체는 TSK3000 크기 배제 칼럼을 사용하여 분석되었다(도 5). 피크 4는 접합체의 단량체 조각을 나타내는 반면 이전 피크는 복합체이고 이후 피크는 조각을 나타낸다. 총 피크 영역에 의해 나누어진 각 곡선 아래 영역은 피크가 샘플에 분배된 것을 표시한다. 그 접합체 샘플은 96.0% 단량체로 밝혀졌다.

**d. 자유 약물**

자유 약물의 백분율은 ELISA에 의해 측정되고 4.4%인 것으로 밝혀졌다.

**[실시예 2A]**

**트라스투주맙-SMCC-DM1 접합체의 제조**

트라스투주맙 항체는 비결단성 헤테로이거능성 연결 물질 SMCC를 사용하여 DM1에 접합하기 위해 Genentech로부터 구입하였다. 항체는 50 mM 인산칼륨/2 mM EDTA, pH 6.0 에서 50 mM 인산칼륨/50 mM 염화나트륨/2 mM EDTA, pH 6.5 (버퍼 A)로 완충액이 교환되었다. 그런 다음 항체는 7.5배 물 초과분 SMCC 링커와 반응하고 DM1과 접합하기 전에 Sephadex G25 레진으로 정제되었다. 최종 접합체는 Sephadex G25 레진으로 재정제되었다. 그 결과 접합체는 항체 몰당 3.1몰의 DM1을 포함하였다.

**a. 트라스투주맙 항체의 제조 및 측정**

50 mM 인산칼륨/2 mM EDTA, pH 6.0 버퍼 내의 트라스투주맙 항체는 버퍼 A에 의해 평형상태인 Sephadex G25 칼럼을 통과하고 버퍼 A 속으로 용리되었다. 본 실험에서 사용된 모든 버퍼는 발색성 Lymulus amoebocyte lysate (LAL) 방법을 사용하여 내독소가 제거되는지 검사되었다(Cambrex). 항체의 농도가 280 nm에서 흡광 계수 1.45  $\text{mL mg}^{-1} \text{cm}^{-1}$  및 분자량 145,423 g를 사용하여 측정되었다.

**b. SMCC Stock Solution의 제조 및 측정**

SMCC의 20 mM 용액 (6.69 mg/mL)이 DMSO 내에서 제조되었다. 용액은 실험 버퍼(Assay buffer) 내에서 1/40 희석되었으며 샘플의 흡광도는 302 nm에서 측정되었다. 스탁 용액의 농도는  $602 \text{ M}^{-1} \text{cm}^{-1}$ 의 몰흡광계수를 사용하여 산출되었다.

**c. DM1 Stock Solution의 제조 및 측정**

DM1의 10 mM 용액 (자유 티올 형태)이 디메틸아세트아미드(DMA) 내에서 제조되었다 (7.37 mg/mL) (도 2). 에탄올(EtOH) 내에서 스탁 용액의 희석 흡광도는 280 nm에서 측정되었다. 스탁 DM1의 농도는 280 nm에서  $5700 \text{ M}^{-1}$ 의 흡광계수를 사용하여 산출되었다. 스탁 DM1 제조에 있어서 자유 -SH의 농도는 Ellman's reagent (DTNB)를 사용하여 측정되었다. 스탁 용액의 희석은 3% (v/v) DMA로 만들어진 실험 버퍼 내에서 준비된 다음 DMSO 내에서 100 mM DTNB (1/100th volume)가 첨가되었다. 시약 blank에 대하여 412 nm에서 흡광도의 증가가 측정되었으며 농도는 흡광계수  $14150 \text{ M}^{-1} \text{cm}^{-1}$ 을 사용하여 산출되었다. Ellman's 실험으로부터 나온 -SH의 농도는 접합체 조건을 결정할 때 DM1 스탁 농도를 표현하기 위해 사용되었다.

**d. SMCC 연결 링커를 가진 트라스투주맙의 변형**

20 mg/mL 항체에서 항체는 7.5 배 물 초과분의 SMCC를 사용하여 변형되었다. 반응은 DMSO (5% v/v)를 가진 버퍼 A(95% v/v)에서 실온에서 2시간 동안 휘저으면서 실시되었다.

**e. SMCC 초과분을 제거하기 위한 G25 크로마토그래피**

트라스투주맙-SMCC 반응 혼합물은 버퍼 A에서 평형상태인 1.5 x 4.9 cm Sephadex G25 레진 프리팩트 칼럼을 통해 겔 여과되었다. 탑재(load) 및 용리(elution) 부피는 제조자의 지시에 따랐다(Amersham Biosciences). 변형

된 항체 용액의 농도는 상기 기재된 흡광 계수를 사용하여 분광기로 검사되었다. 변형된 항체의 수율은 단백질 농도를 기초로 88%이었다.

**f. DM1을 가진 트라스투주맙-SMCC의 접합**

변형된 항체는 링커에 대해 1.7 배 초과분 DM1과 반응하였다(항체당 5개 링커). 반응은 DMA (6% v/v)을 가진 버퍼 A (94% v/v)내에서 10 mg/mL 항체 농도에서 실시되었다. DM1 첨가 후 반응물은 실온에서 16.5 시간 동안 휘저으면서 배양되었다.

**g. G25 크로마토그래피에 의한 접합체 정제**

접합 반응 혼합물은 버퍼 B 내에서 평형상태인 1.5 x 4.9 cm Sephadex G25 레진의 프리펙트 칼럼 겔 여과되었다. 탑재(load) 및 용리(elution) 부피는 제조자의 지시에 따랐다(Amersham Biosciences). 트라스투주맙 몰당 연결된 DM1 분자 수는 252nm 및 280nm 모두에서 용리된 물질의 흡광도를 측정함으로써 결정되었다. DM1/항체 비율은 3.13로 밝혀졌으며 접합 단계 수율은 95.7%이었다. 접합된 트라스투주맙의 총 수율은 출발 항체를 기초로 84%이었다. 결과 접합체는 결합능력, 세포독성, 특이성, 결집 정도 및 자유 약물 함량이 분석되었다.

**표 2**

트라스투주맙-SMCC-DM1의 특성

참조번호	최종 단백질 농도 (mg/ml)	최종 DM1 농도 (ug/ml)	DM1/Ab
1762-14	6.71	106.	3.13

**[실시예 2B]**

**트라스투주맙-SMCC-DM1의 시험관 내 검사**

결합 연구에 의하면 항체를 DM1에 접합시키는 것은 적정  $K_D$ 에 영향을 주지 않았다; 트라스투주맙 단독 항체와 트라스투주맙-SMCC-DM1 접합체 모두가 ECD 판에 대해 동일한 결합 친화도를 가졌다( $5.5 \times 10^{-11}$  M). 샘플의 시험관 내 세포독성 평가는 트라스투주맙-SMCC-DM1 접합체가 높은 독성(항원 양성 셀 라인에 대해  $3.6 \times 10^{-12}$  M의  $IC_{50}$ )과 특이성(항원 음성 셀 라인에 대해  $3.0 \times 10^{-9}$  M 이상의  $IC_{50}$ )을 가짐을 보여 주었다.

**a. 결합능력**

트라스투주맙 항체와 트라스투주맙-SMCC-DM1의 결합 친화도가 Genentech에서 습득된 HER2 ECD 판-결합분석법을 사용하여 비교되었다. 그 결과는 도 24에서 보여진다. 단독 항체와 접합 상태 항체는 모두 적정  $K_D$ 값  $5.5 \times 10^{-11}$  M로 결합한다. 따라서, DM1을 가진 접합체가 트라스투주맙의 결합친화도를 변경하는 것 같지는 않다.

**b. 세포독성 및 특이성**

트라스투주맙-SMCC-DM1 접합체의 시험관 내 세포독성 및 특이성은 지속적인 노출 집락형성분석에 의해 측정되었다. 그 결과는 도 25에 나타난다. 트라스투주맙-SMCC-DM1은 항원 양성 SKBR3 셀 ( $IC_{50} = 3.6 \times 10^{-12}$  M)를 파괴하는데 효과적이었다. 특이성은 목표 SKBR3 셀의  $IC_{50}$  값을 항원 음성 셀 라인, A375,의 것(당해 접합체의  $IC_{50}$ 는  $3.0 \times 10^{-9}$  M 이상이었다)과 비교하여 나타났다.

**c. 크기 배제 크로마토그래피 분석**

접합체는 TSK3000 크기 배제 칼럼을 사용하여 분석되었다(도 26). 피크1은 중합체, 피크2는 이합체, 피크3은 단량체를 나타낸다. 전 피크 영역에 의해 나누어진 각 곡선 아래의 영역은 피크가 샘플에 기여한 바를 나타낸다. 접합체 샘플은 95.3% 단량체로 밝혀졌다(도 26).

**d. 자유 약물 분석**

자유 약물의 백분율은 ELISA에 의해 측정되고 3.4%인 것으로 밝혀졌다.

- [0291] **e. 내독소 수치**
- [0292] 접합체는 크로마토그래피 LAL 테스트를 사용하여 검사되고 0.03 EU/mg을 함유하는 것으로 밝혀졌다.
- [0293] **[실시예 3A]**
- [0294] **트라스투주맙-SIAB-DM1 접합체의 제조**
- [0295] 트라스투주맙 항체는 비절단성 헤테로이거능성 연결 물질 SIAB를 사용하여 DM1에 접합하기 위해 Genentech로부터 구입하였다. 항체는 pH 6.5에서 7.0배 물 초과분 SIAB 링커와 반응하고 Sephadex G25F 레진으로 정제되었다. 항체를 포함하는 조각들이 모집되고 어두운 장소에서 실온에서 pH 6.5인 표준 접합 환경에서 하루 밤 동안 DM1과 반응시켰다. 분취액(aliquot)은 반응 용기에서 제거되고 DM1의 결합을 결정하기 위해 분석되었다. 분취액은 NAP 5 여과 후에 1.4 drugs/Ab 만을 가지는 것으로 측정되었다. 부가적인 8배 초과분 SIAB가 2시간 동안 반응물에 첨가된 다음 부가적인 1.5배 초과분 DM1/SIAB의 첨가 직전에 pH가 8로 상승했다. 반응이 촉진되고 Sephadex G25 레진으로 정제되었다. 그 결과 접합체는 항체 몰당 3.42몰의 DM1을 포함하였다.
- [0296] **a. 트라스투주맙 항체의 측정**
- [0297] 항체의 농도가 280 nm에서 흡광 계수  $1.45 \text{ mL mg}^{-1} \text{ cm}^{-1}$  및 분자량 145,423 g를 사용하여 측정되었다.
- [0298] **b. SIAB Stock Solution의 제조 및 측정**
- [0299] SIAB의 18 mM 용액 (7.2 mg/mL)이 DMSO 내에서 제조되었다. pH 4 완충액에 희석된 용액의 파장 스캔은 정보 목적으로만 기록되었다.
- [0300] **c. DM1 Stock Solution의 제조 및 측정**
- [0301] DM1의 약 30 mM 용액 (자유 티올 형태)이 DMA 내에서 제조되었다. 스타크 DM1 제조에 있어서 자유 -SH의 농도는 Ellman's reagent (DTNB)를 사용하여 측정되었다. 스타크 용액의 희석은 3% (v/v) DMA로 만들어진 실험 버퍼 내에서 준비된 다음 DMSO 내에서 100 mM DTNB ( $1/100^{\text{th}}$  volume)가 첨가되었다. 시약 blank에 대하여 412 nm에서 흡광도의 증가가 측정되었으며 농도는 흡광계수  $14150 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ 을 사용하여 산출되었다. Ellman's 실험으로부터 나온 -SH의 농도는 접합 조건을 결정할 때 DM1 스타크 농도를 표현하기 위해 사용되었다.
- [0302] **d. SIAB 연결 링커를 가진 트라스투주맙의 변형**
- [0303] 20 mg/mL 항체에서 항체는 7.0 배 물 초과분의 SIAB를 사용하여 변형되었다. 반응은 DMSO (5% v/v)를 가진 버퍼 A(95% v/v)에서 어두운 장소에서 실온에서 2시간 동안 휘저으면서 실시되었다.
- [0304] **e. 초과분 SIAB을 제거하기 위한 G25 크로마토그래피**
- [0305] 트라스투주맙-SIAB 반응 혼합물은 버퍼 A에서 평형상태인 HiPrep 26/10 탈염화 칼럼을 통해 겔 여과되었다. SIAB 제제로부터 280 nm에서 방해가 있었던 것으로 보이며, 변형된 항체의 수율은 100%인 것으로 확인되고 5 링커/항체의 변형이 접합 반응에서 DM1의 양을 결정하기 위한 것으로 확인되었다.
- [0306] **f. DM1을 가진 트라스투주맙-SIAB의 접합**
- [0307] 변형된 항체는 링커에 대해 1.7 배 초과분 DM1과 반응하여 상기 언급된 바와 같이 100% 수율과 항체당 5개 연결 링커가 확인되었다. 반응에서 항체의 농도는 12.5 mg/mL 인 것으로 측정되었고 반응은 DMA (3% v/v)을 가진 버퍼 A (97% v/v)내에서 실시되었다. DM1 첨가 후 반응물은 어두운 장소에서 실온에서 16.5 시간 동안 휘저으면서 배양되었다.
- [0308] **g. 접합 반응 분석**
- [0309] 반응 혼합물의 0.25 mL 분취액은 제거되고 버퍼 B에서 평형상태인 G25 Sephadex 프리펙트 칼럼 상에서 겔 여과되었다. 트라스투주맙 몰당 연결된 DM1 분자 수는 252 nm 과 280 nm 모두에서 용리 물질의 흡광도를 측정함으로써 결정되었다. DM1/항체 비율은 겨우 1.4였다.
- [0310] **h. 추가적인 변형/접합 반응**
- [0311] 추가적인 8배 물 초과분의 SIAB이 첨가되고 실온에서 2시간 동안 배양시켰다. SIAB에 대해 1.5배 물 초과분 DM1

이 첨가되고 1 N NaOH 첨가로 인해 반응 pH가 8로 상승했다. 반응물은 어두운 곳에서 실온에서 배양되고 버퍼 B에서 평형상태인 G25F 레진 칼럼 상에서 겔 여과되었다.

**i. 접합체의 집합 및 특성**

단백질을 포함하는 조각들이 모집되고, 여과되고, 252 및 280 nm에서 흡광도가 측정되었다. 접합체 샘플들은 내독소 수치, 결합, 특이적 및 비특이적 세포독성, % 단량체 및 자유 약물 검사가 행해졌다.

**표 3**

트라스투주맙-SIAB-DM1의 특성

참조번호	최종 단백질 농도 (mg/ml)	최종 DM1 농도 (ug/ml)	DM1/Ab
1806-32	5.62	97.3	3.42

**[실시예 3B]**

**트라스투주맙-SIAB-DM1의 시험관 내 검사**

결합 연구에 의하면 항체를 DM1에 접합시키는 것은 적정  $K_D$ 에 영향을 주지 않았다; 트라스투주맙 단독 항체와 트라스투주맙-SIAB-DM1 접합체 모두가 유사한 결합 친화도를 가졌다( $1.2 \times 10^{-10}$  M Ab 및  $1.9 \times 10^{-10}$  M의 적정  $K_D$  값 접합체). 샘플의 시험관 내 세포독성 평가는 트라스투주맙-SIAB-DM1 접합체가 높은 독성(항원 양성 셀 라인 SKBR3에 대해  $5 \times 10^{-12}$  M의  $IC_{50}$ )과 특이성(항원 음성 셀 라인 A375에 대해  $3.0 \times 10^{-9}$  M 이상의  $IC_{50}$ )을 가짐을 보여 주었다.

**a. 결합능력**

트라스투주맙 항체와 트라스투주맙-SIAB-DM1의 결합 친화도가 Genentech에서 습득된 HER2 ECD 판-결합분석법을 이용하여 비교되었다. 그 결과는 도 27에서 보여진다. 단독 트라스투주맙 항체와 트라스투주맙-SIAB-DM1은 모두 유사한 결합 친화도를 가졌다 (항체 경우  $1.2 \times 10^{-10}$  M, 접합체 경우  $1.9 \times 10^{-10}$  M의 적정  $K_D$  값).

**b. 세포독성 및 특이성**

트라스투주맙-SIAB-DM1 접합체 샘플의 시험관 내 세포독성 평가는 트라스투주맙-SIAB-DM1 접합체가 매우 독성이 강하고 (항원 양성 SKBR3 셀 라인에 대해  $IC_{50} = 5 \times 10^{-12}$  M) 또한 특이적 (항원 음성 셀 라인 A375에 대해  $IC_{50}$ 는  $3.0 \times 10^{-9}$  M 이상이었다)임을 보여주었다. 도 28를 참조한다.

**c. 크기 배제 크로마토그래피 분석**

접합체는 TSK3000 크기 배제 칼럼을 사용하여 분석되었다(도 29). 피크1은 이합체를 나타내고, 피크2는 단량체를 나타낸다. 전체 피크 영역에 의해 분할된 각 곡선하의 영역은 전체 피크 영역이 샘플에 기여도를 나타낸다. 접합체 샘플은 96.4% 단량체로 밝혀졌다.

**sd. 자유 약물 분석**

자유 약물의 백분율은 ELISA에 의해 측정되고 0.35%인 것으로 밝혀졌다.

**e. 내독소 수치**

접합체는 크로마토그래피 LAL 테스트를 사용하여 검사되고 0.04 EU/mg 이하를 함유하는 것으로 밝혀졌다.

**[실시예 4]**

**huC242를 황을 포함하지 않는 비절단성 링커를 형성하는 연결물질로 접합하는 것**

**a. 합성**

연결물질의 스타크 용액 (도 21 구조 참조)은 DMA 내에서 준비되었으며, 불용성 침전물이 나왔으며, 잔존 용액의

농도는 당해 과정에서 DM1에 대한 절멸을 의미하는 흡광 계수  $e^{280} = 5700 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$  를 사용하여 결정되었다. 본 물질에 대한 실제 흡광계수는 측정되지 않기 때문에 이것은 추정된 농도일 뿐이다. 다른 절멸이나 불순도도 나타내지 않으면서 연결물질 용액에 대한  $e^{252}/e^{280}$  비율(pH 7.5 버퍼에서)은 1.42인 반면, DM1에 대한  $e^{252}/e^{280}$  비율은 4.7 (에탄올에서)이다. 접합반응은 pH 7.5인 버퍼 E (Buffer E = 50 mM 인산나트륨, 150 mM NaCl, 10 mM EDTA) 내 16% DMA 속에서 2.8 mg/ml huC242 항체를 사용하여 2 mg 규모로 실시되었다. 스택 용액의 연결물질 추정 농도에 기초하여 링커/항체의 30개 등가물이 사용되었다 (링커/항체의 10개 등가물이 사용된 초기 실험에서는 단지 0.9 DM1/항체를 생산했을 뿐이다). 반응은 3시간 동안 허용되었으며, 그 후 접합체는 Nap 10 (G25) 칼럼 상을 거치면서 정제되었다. 여과된 다음 (Millex GV 필터, 0.2  $\mu\text{m}$  막공 크기), 접합체는 2.56 DM1/항체 (롯트 번호 1749-119A, 항체 회복율 = 78%)를 가졌다. 접합체의 분취액은 자유 DM1을 위해 HPLC (HiPrep 칼럼)로 검사되었으며 높은 DM1 기동이 12.09'에서 관찰되었다. 그리하여 샘플은 이러한 기동을 제거하기 위해 버퍼 B에서 투석되고 나서 재검사되었다. 최종 접합체 샘플(롯트 번호 1749-124A)은 아무런 자유 DM1을 갖지 않았으며 1.84 DM1/항체를 가졌다. SEC HPLC는 접합체 상에서 97% 단량체 항체임을 나타내기 위해 실시되었다.

[0332]

#### b. 세포독성 및 결합능력

[0333]

발명자들은 huC242-황 불포함 비절단성 링커-DM1 접합체에 대해서 결합능력 및 세포독성을 연구하였다. 첫째, huC242항체, huC242-SMNP-DM3, 및 huC242-황 불포함 비절단성 링커-DM1의 결합 친화도가 COLO205세포상에서 간접적인 방법을 사용하여 비교되었다. 웰마다  $5 \times 10^3$  세포들이 얼음위에서 3시간 동안 일차 배양하여 사용되었다. 그 결과는 도 23에 나타나 있는데, 도 23은 huC242-황 불포함 비절단성 링커-DM1 접합체가 자유 항체보다 약 2배 더 높은 적정 분리상수를 가지는 것을 보여준다(도 23 참조). 또, huC242-황 불포함 비절단성 링커-DM1 접합체는 huC242-SMCC-DM1에 대비할 만한 시험관 내 세포독성(황 불포함 비절단성 링커 접합체의  $\text{IC}_{50} = 7.0 \times 10^{-12} \text{ M}$ )을 가졌음을 보여준다(도 22 참조).

[0334]

본 발명이 상세한 설명과 특정 실시예에 의해 기재되는 한편, 당업계 기술자라면 본 발명의 기술사상과 범위 내에서 다양한 변화와 변형을 만들 수 있을 것이 분명하다.

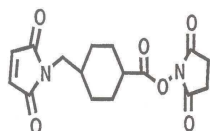
[0335]

여기서 인용된 모든 특허권, 공개문헌, 및 다른 참조 자료들은 그 전문이 참조문헌으로 통합되어 있다.

## 도면

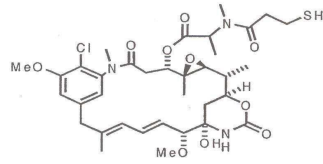
### 도면1

SMCC(숙시니미딜 4-(N-말레이미도메틸 사이클로헥산 카르복실레이트)



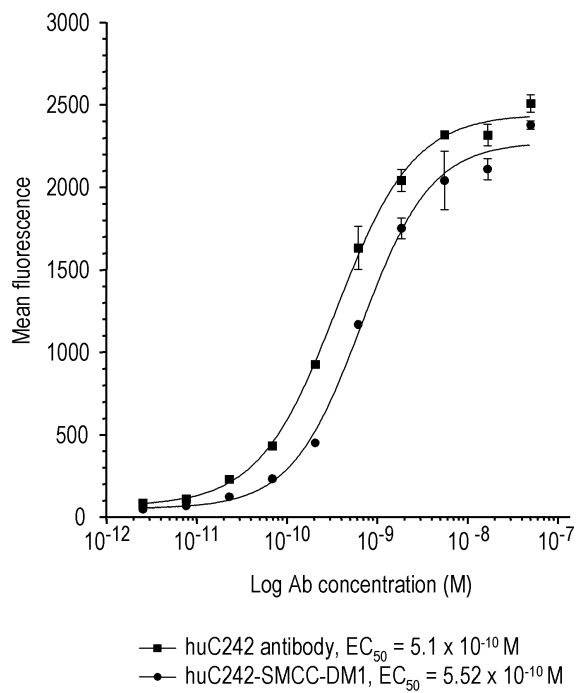
도면2

DM1 (티올화된 메이텐시노이드)



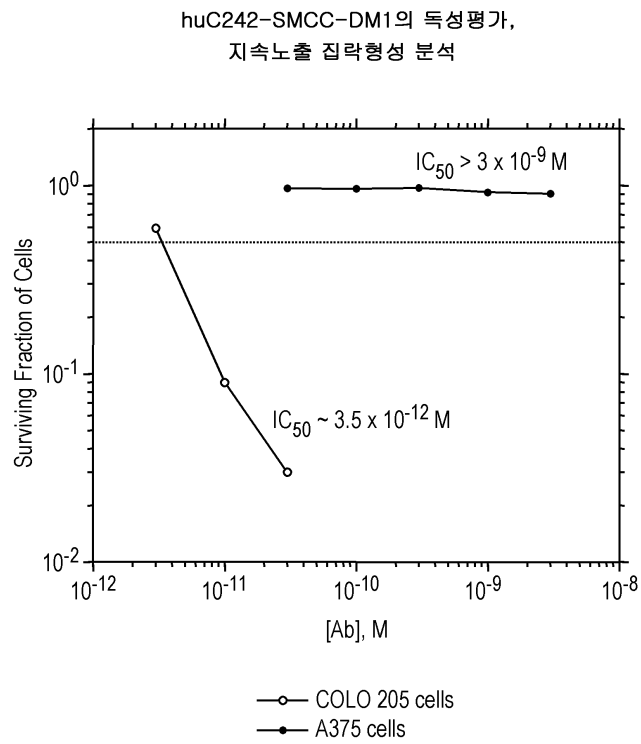
도면3

COLO205셀에 대한 huC242 항체와 huC242 접합체의  
FACS 결합분석

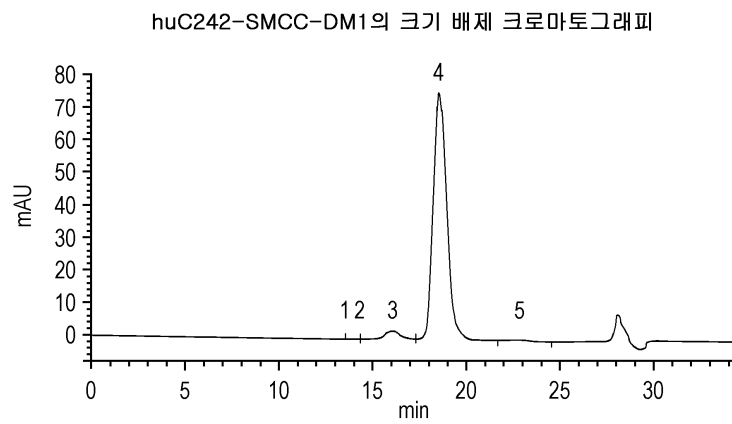




도면4

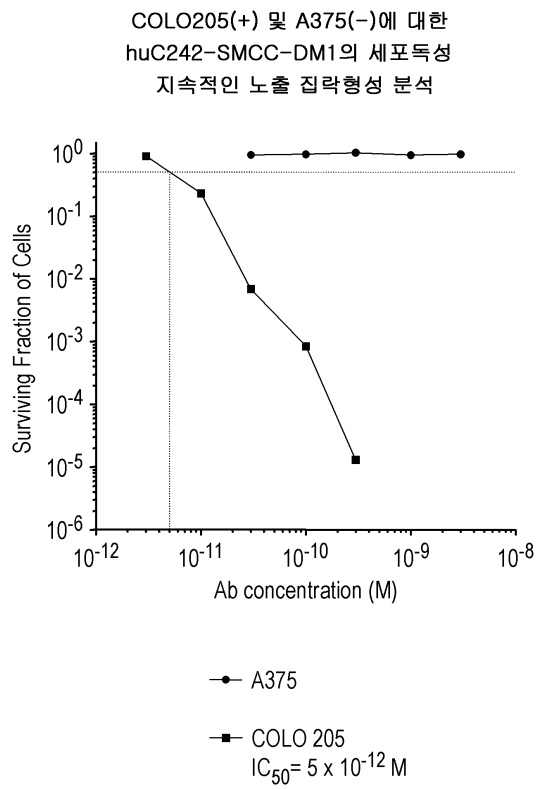


도면5



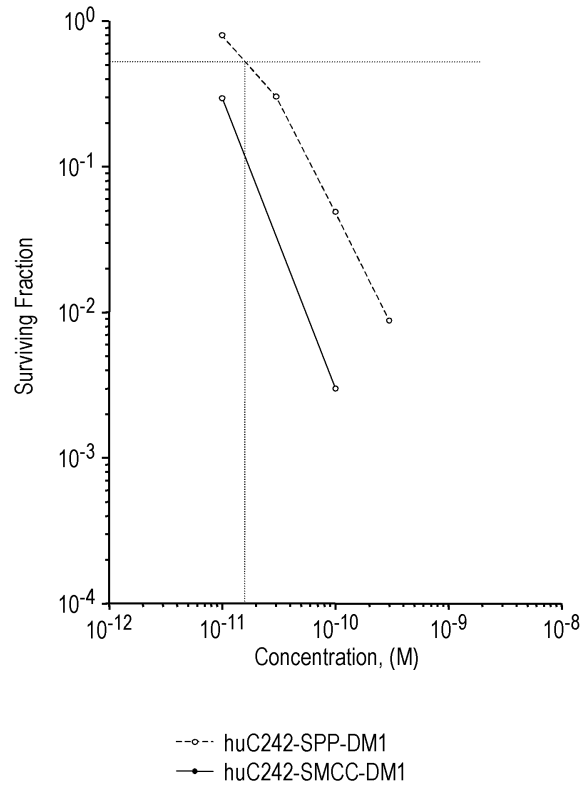


도면6a

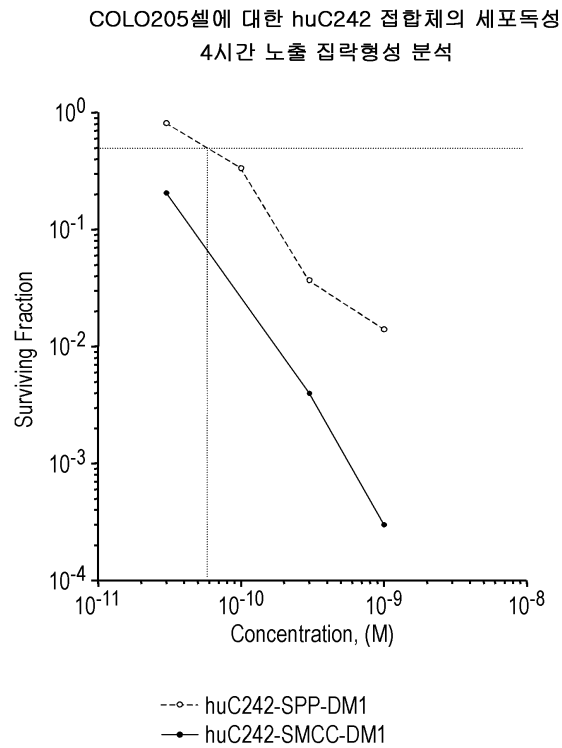


도면6b

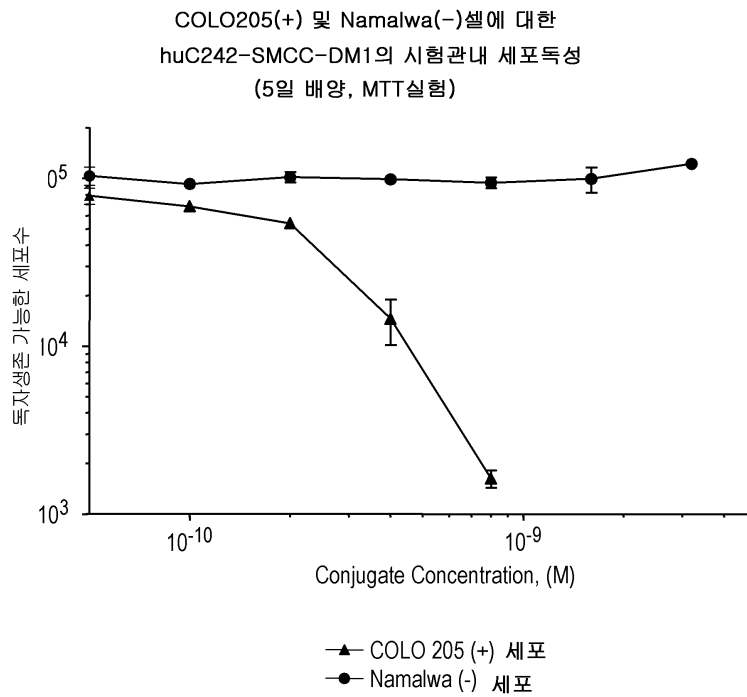
COLO205셀에 대한 huC242 접합체의 세포독성  
24시간 노출 집락형성 분석



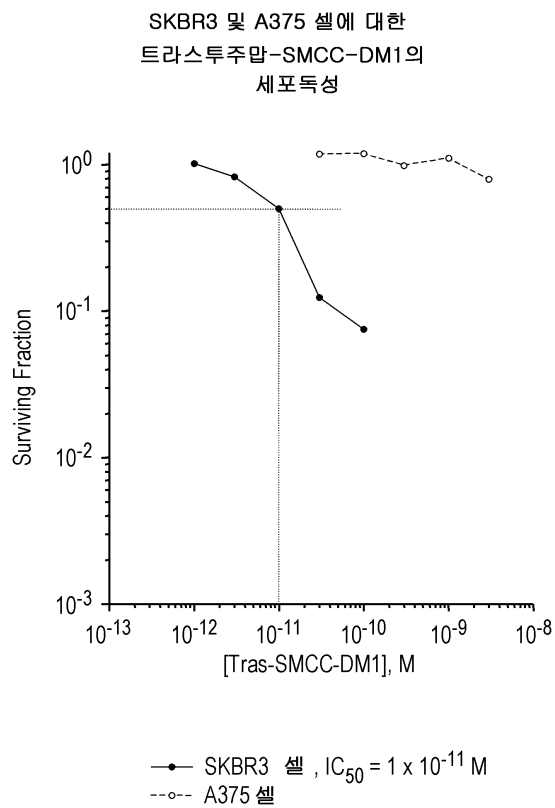
도면6c



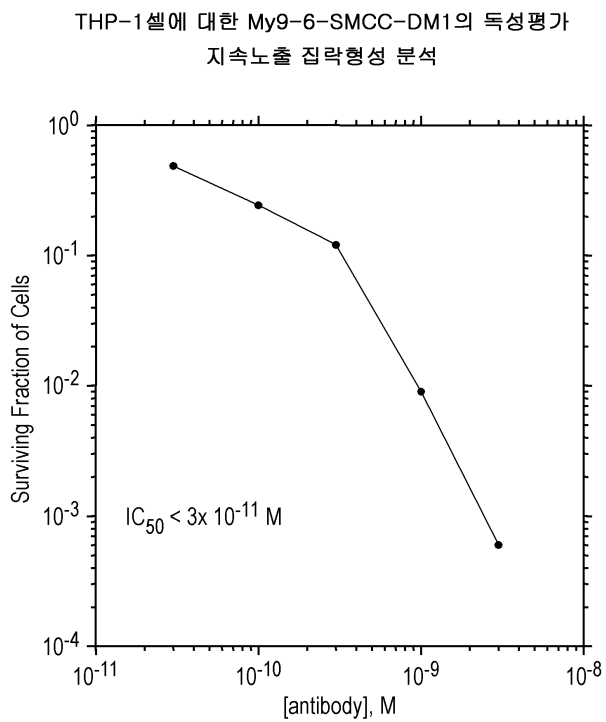
도면7



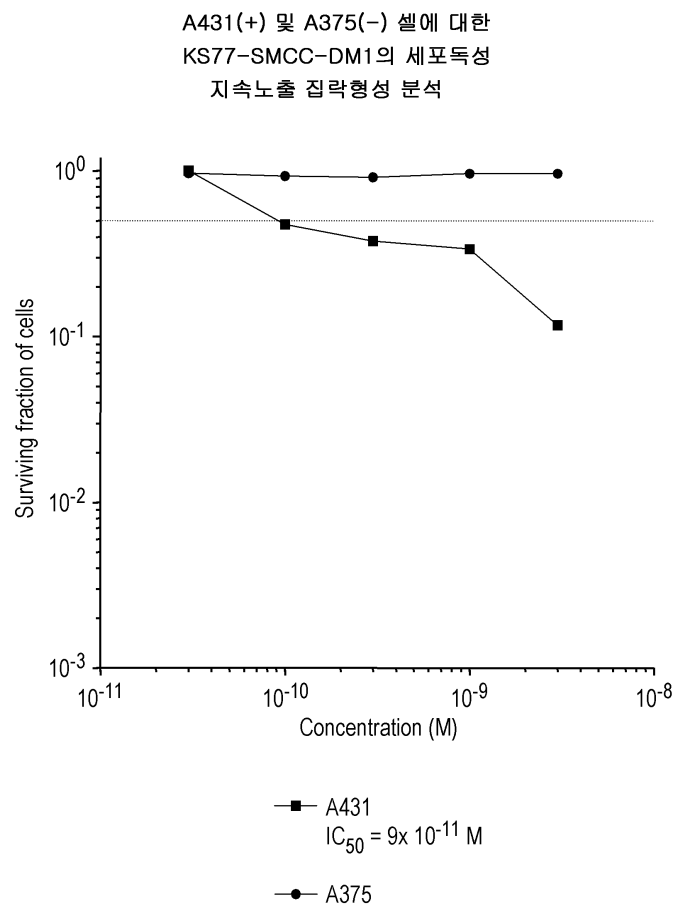
도면8a



도면8b

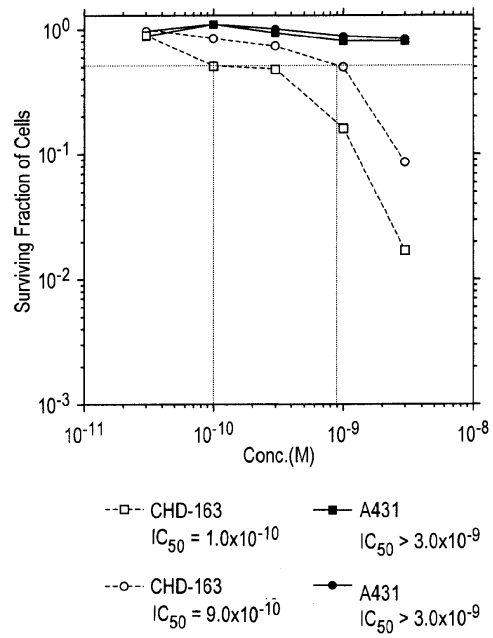


도면8c



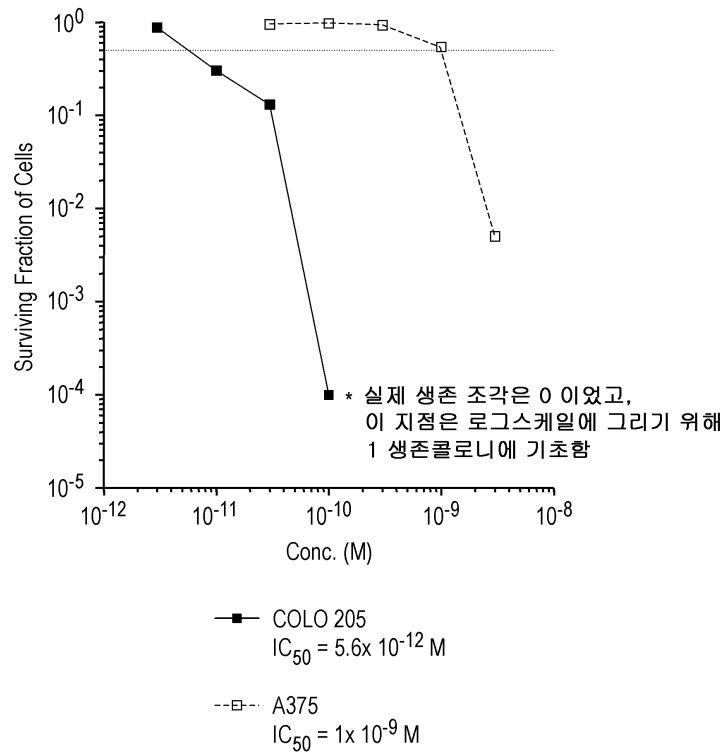
도면8d

CHD-163(+) 및 A431(-)에 대한  
N901-SMCC-DM1의 세포독성  
지속노출 집락형성 분석



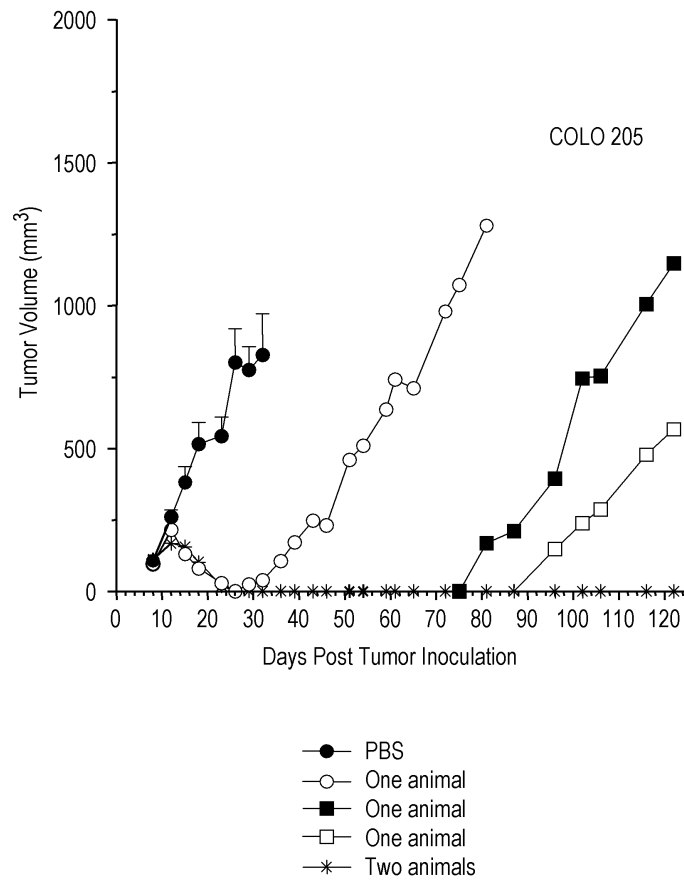
도면9

COLO205(+) 및 A375(-)셀에 대한  
huC242-SIAB-DM1의 독성평가  
지속노출 집락형성 실험



도면10a

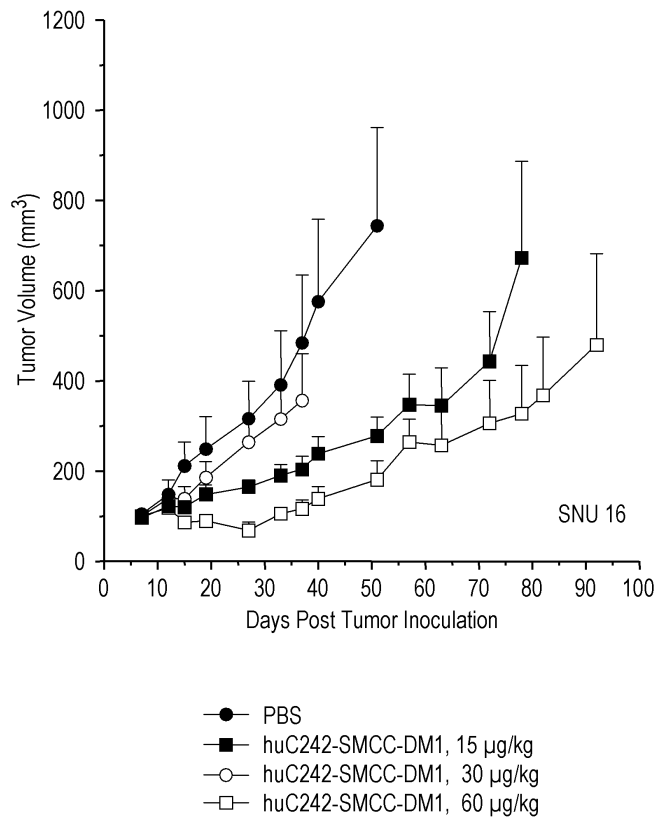
SCID 생쥐에서 COLO205 인간 결장암 이종이식에 대응한  
huC242-SMMC-DM1의 항종양 활성.





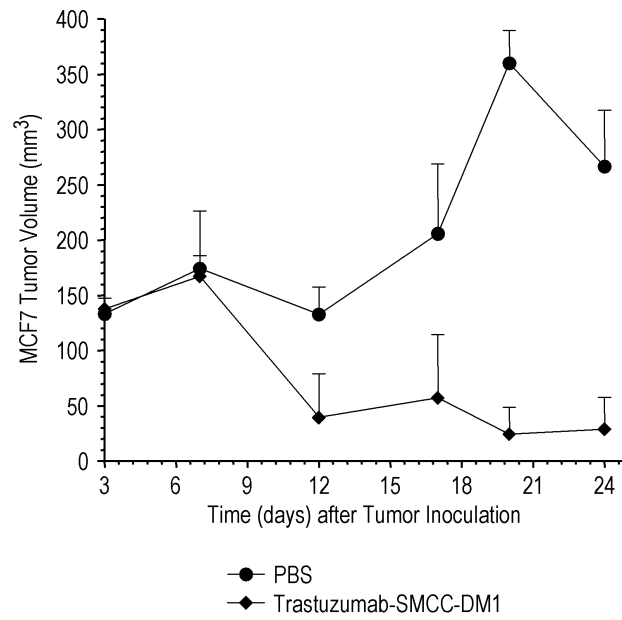
도면10b

SCID 생쥐에서 SNU 16 인간 위 종양 이종이식시  
huC242-SMCC-DM1의 항종양 활성



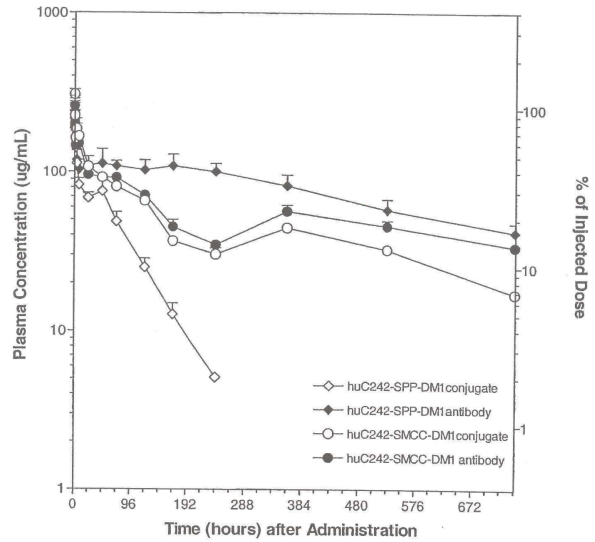
도면10c

CB.17 SCID 생쥐에서 MCF7 이종 이식시  
트라스투주맙-SMCC-DM1의 항종양 활성



도면11

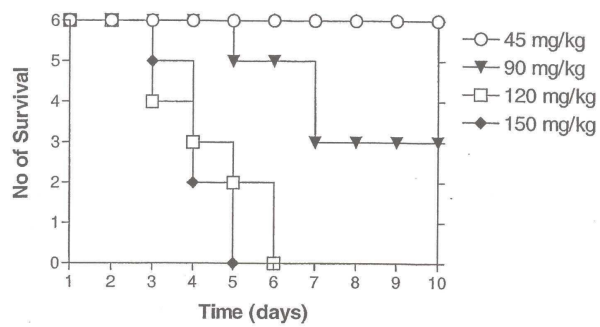
CD-1 생쥐에서 huC242-SPP-DM1 및 huC242-SMCC-DM1 접합체의  
약품역학 연구 - 플라즈마 제거 곡선 및 약품역학 계수



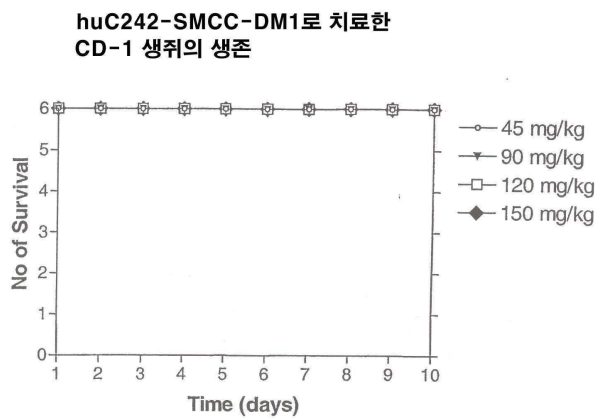
Immun conjugate	DM1/AB	Cmax	t 1/2	AUC	CL	Vss
		ug/mL	hour	Hour.ug/mL	mL/hour/kg	mL/kg
huC242-SMCC-DM1	3.17	312.2	318.3	40374.2	0.3	112.5
huC242-SMCC		262.9	533.7	65953.9	0.2	119.6
huC242-SPP-DM1	3.26	191.4	49.8	9205.7	1.1	92.6
huC242-SPP		212.5	499.2	89345.7	0.1	78.2

도면12a

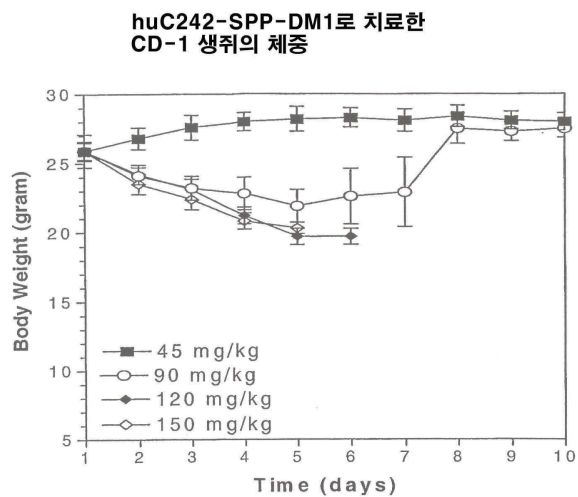
huC242-SPP-DM1 로 치료한  
CD-1 생쥐의 생존



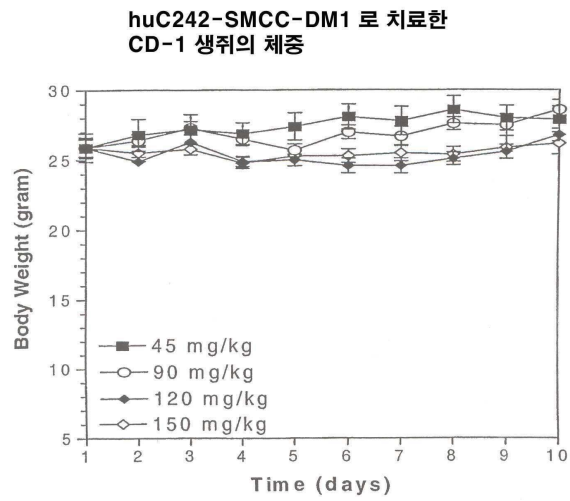
도면12b



도면12c



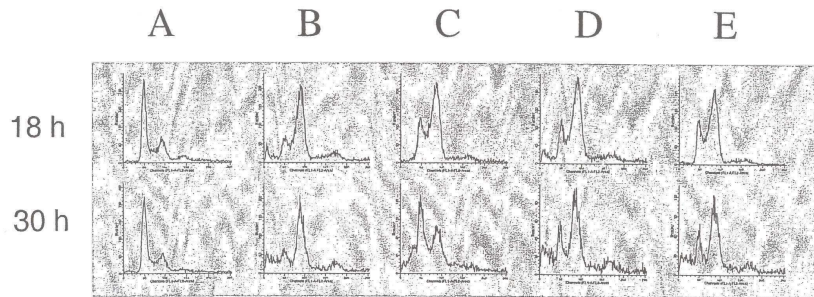
도면12d



도면13

**huC242-SPP-DM1 및 huC242-SMCC-DM1 접합체의  
시험관내 세포주기 정지 활성의 비교**

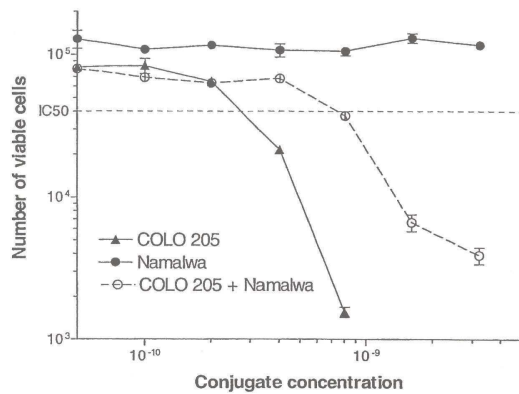
- A. Control  
B. huC242-SPP-DM1,  $10^{-8}$ M  
C. huC242-SPP-DM1,  $10^{-9}$ M  
D. huC242-SMCC-DM1,  $10^{-8}$ M  
E. huC242-SMCC-DM1,  $10^{-9}$ M



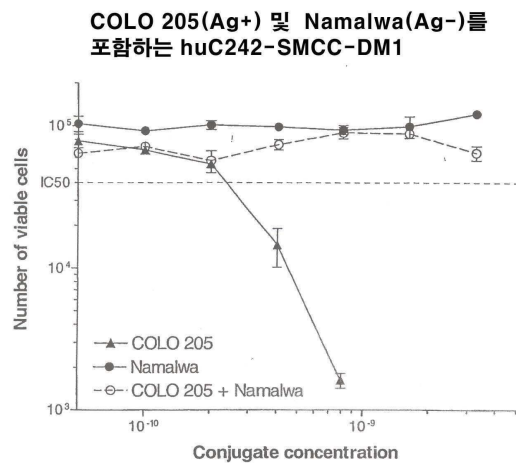
			세포 정지 활성		세포사멸
접합체	농도	셀라인	18 hours	30 hours	30 hours
C242-SPP-DM1	$1 \times 10^{-8}$ M	Colo205	+++	+++	
	$1 \times 10^{-9}$ M	Colo205	+++	++	25%
C242-SMCC-	$1 \times 10^{-8}$ M	Colo205	+++	+++	
	$1 \times 10^{-9}$ M	Colo205	+++	+++	33-37%

도면14a

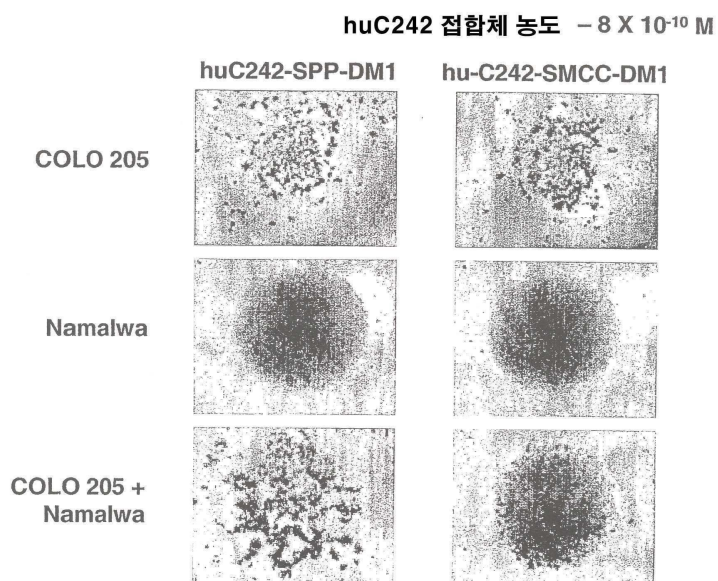
**COLO 205(Ag+) 및 Namalwa(Ag-)를  
포함하는 huC242-SPP-DM1**



도면14b

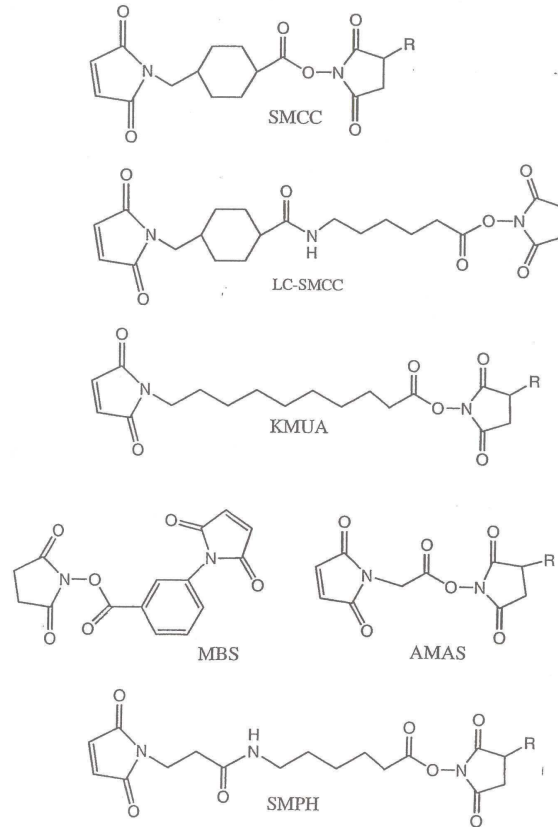


도면14c



도면15

말레이미도를 주성분으로 하는 연결물질의 대표구조

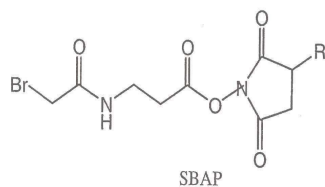
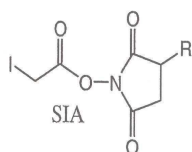
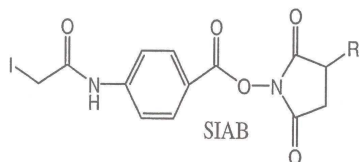


In all cases R = H or  $\text{SO}_3^-$



도면16

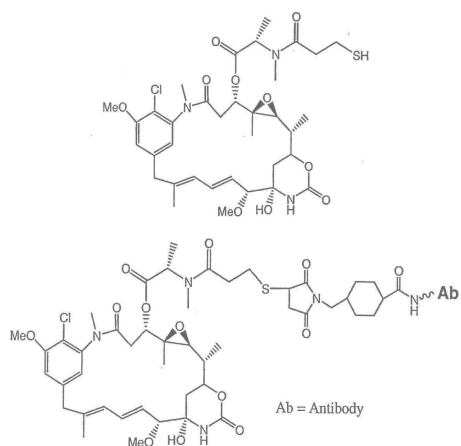
할로아세틸을 주성분으로 하는 연결물질의 대표구조



In all cases R = H or SO<sub>3</sub><sup>-</sup>

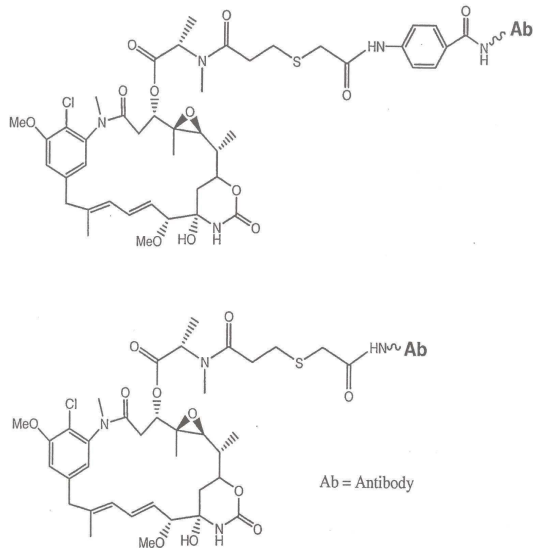
도면17

DM1 및 말레이미도에서 유도된 항체로부터의  
항체-DM1 접합체의 구조. 예로써 SMCC 연결물질이 사용되었다.



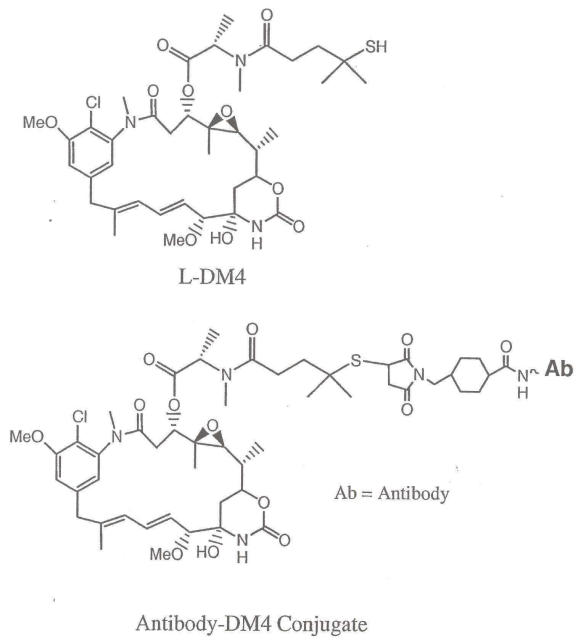
도면18

할로아세틸에서 유도된 항체로부터의 항체-DM1 접합체의 구조.  
예로써 SIAB 연결물질 및 SIA 연결물질이 사용되었다.



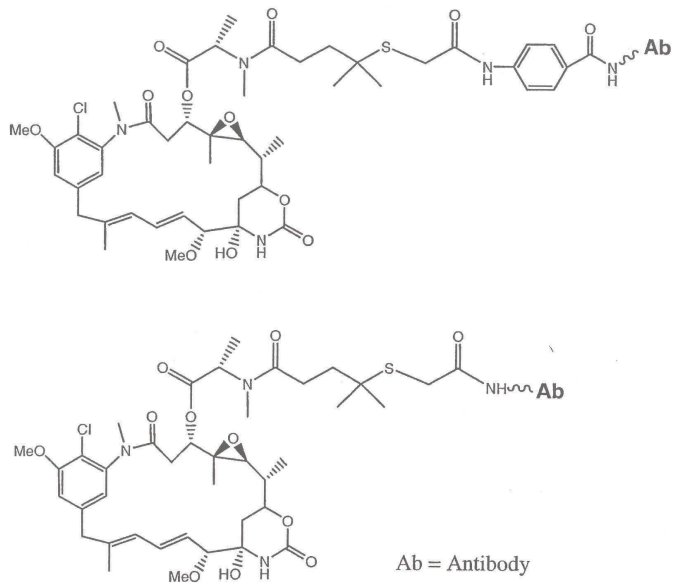
도면19

DM4 및 말레이미도에서 유도된 항체로부터의  
항체-DM4 접합체의 구조. 예로써 SMCC 연결물질이 사용되었다.



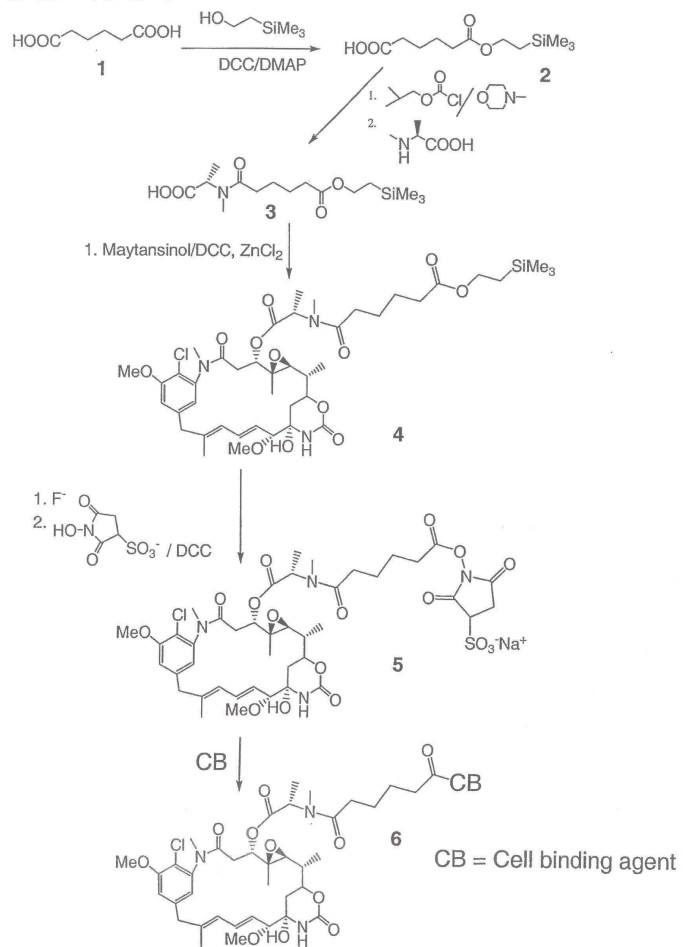
도면20

할로아세틸에서 유도된 항체로부터의 항체-DM4 접합체의 구조.  
예로써 SIAB 연결물질 및 SIA 연결물질이 사용되었다.



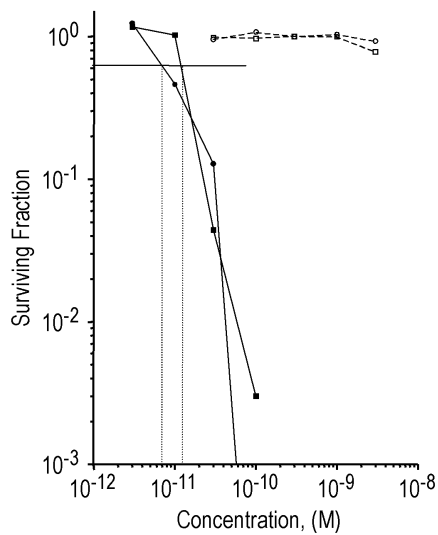
도면21

항 불포함 링커



도면22

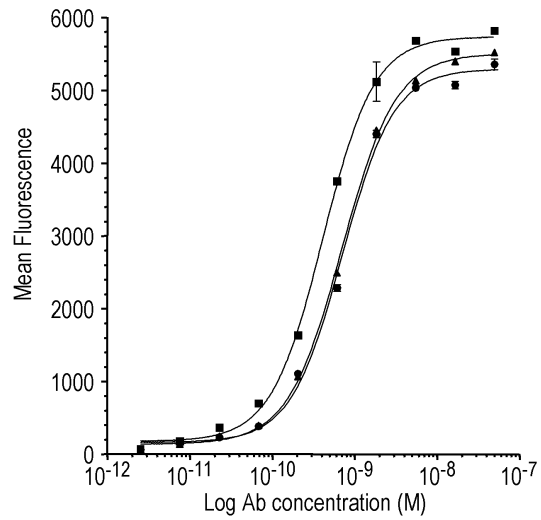
COLO205 및 A375셀에 대한 huC242-황 불포함 비절단성 링커-DM1의  
세포독성 지속노출 집락형성 분석



- huC242-황 불포함 비절단성 링커-DM1/  
COLO 205,  $IC_{50} = 7.0 \times 10^{-12}$  M
- huC24-SMNP-DM3 / COLO 205,  $IC_{50} = 1.3 \times 10^{-11}$  M
- -○- huC242-황 불포함 비절단성 링커-DM1/  
A375,  $IC_{50} > 3 \times 10^{-9}$  M
- -□- huC24-SMNP-DM3 / A 375,  $IC_{50} > 3 \times 10^{-9}$  M

도면23

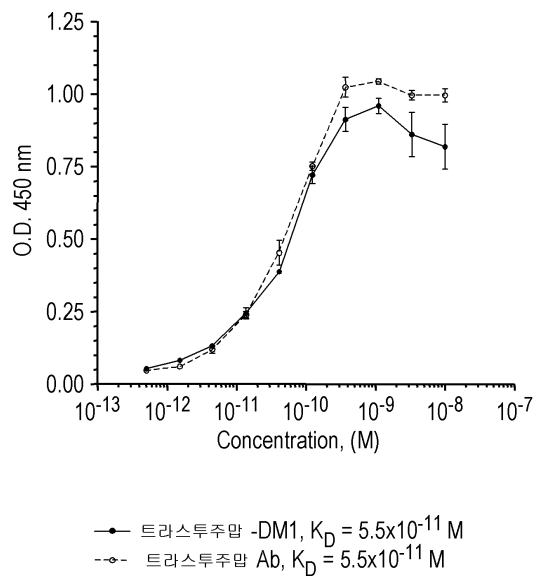
COLO205셀에 대한 huC242-황 불포함 비절단성 링커-DM1 및  
huC242-SMNP-DM3의 FACS 결합 분석



- huC242  
EC<sub>50</sub> = 4.12 x 10<sup>-10</sup> M
- ▲ huC242-황 불포함 비절단성 링커-DM1  
EC<sub>50</sub> = 7.04 x 10<sup>-10</sup> M
- huC242-SMNP-DM3  
EC<sub>50</sub> = 7.08 x 10<sup>-10</sup> M

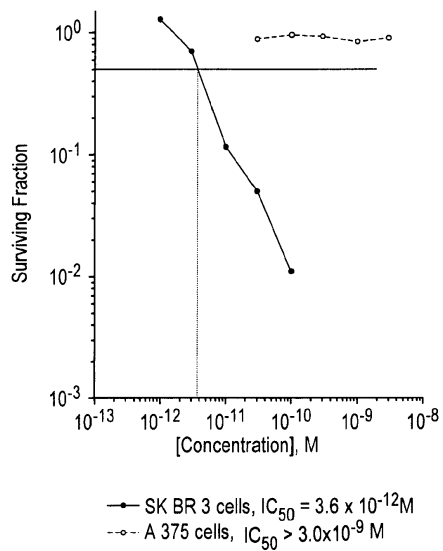
도면24

ELISA : 트라스투주맵-SMCC-DM1 및  
트라스투주맵 항체의 0.3ng/웰에서  
코팅된 ECD 평판에 대한 결합



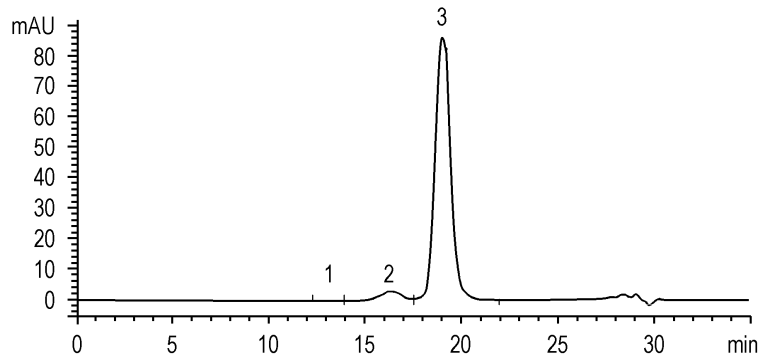
도면25

SKBR3 및 A375셀에 대한 트라스투주맵-SMCC-DM1의 세포독성  
지속노출 집락형성 분석



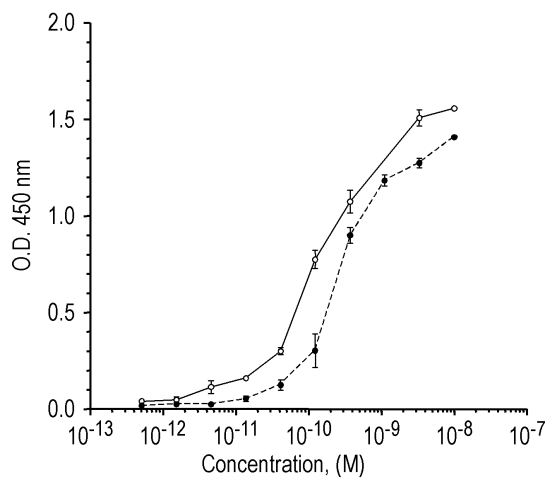
도면26

트라스투주맵-SMCC-DM1에 대한 크기 배제 크로마토그래피



도면27

ELISA : 트라스투주맵-SIAB-DM-1 및  
트라스투주맵 항체의 0.3ng/웰에서  
코팅된 ECD평판에 대한 결합

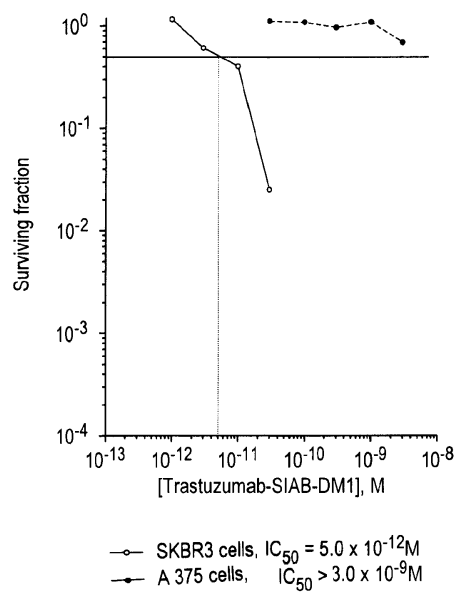


● 트라스투주맵 -SIAB-DM1,  $K_D = 1.9 \times 10^{-10}$  M  
○ 트라스투주맵 Antibody,  $K_D = 1.2 \times 10^{-10}$  M



도면28

SKBR3 & A375 세포에 대한  
트라스투주맙-SIAB-DM1의 세포독성  
(지속노출 집락형성 실험)



도면29

트라스투주맙-SIAB-DM1에 대한 크기 배제 크로마토그래피

