



**(19) 대한민국특허청(KR)**  
**(12) 공개특허공보(A)**

(11) 공개번호 10-2024-0139086  
(43) 공개일자 2024년09월20일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.) <b>A61K 47/68</b> (2017.01) <b>A61P 35/00</b> (2006.01) (52) CPC특허분류 <b>A61K 47/6851</b> (2017.08) <b>A61K 47/6803</b> (2023.08) (21) 출원번호 10-2024-7029749 (22) 출원일자(국제) 2023년02월08일 심사청구일자 없음 (85) 번역문제출일자 2024년09월04일 (86) 국제출원번호 PCT/US2023/012576 (87) 국제공개번호 WO 2023/154307 국제공개일자 2023년08월17일 (30) 우선권주장 63/308,275 2022년02월09일 미국(US)	(71) 출원인 <b>볼트 바이오테라퓨틱스 인코퍼레이티드</b> 미국 캘리포니아 94063 레드우드 시티 체사피크 드라이브 900 (72) 발명자 <b>애커먼, 셸리 에린</b> 미국 94063 캘리포니아 레드우드 시티 체사피크 드라이브 900 <b>알론소, 마이클 엔.</b> 미국 94063 캘리포니아 레드우드 시티 체사피크 드라이브 900 (뒷면에 계속) (74) 대리인 <b>양영준, 이상남</b>
---	--

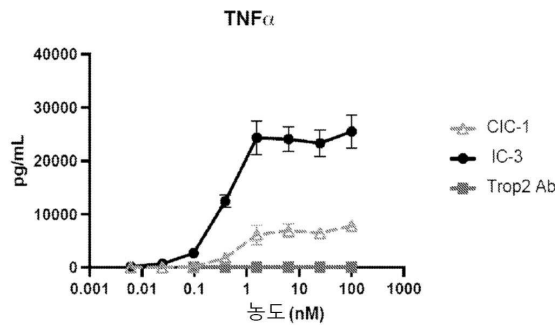
전체 청구항 수 : 총 49 항

(54) 발명의 명칭 **항체-접합된 8-설폰닐-벤자제핀 화합물 및 이의 용도**

**(57) 요약**

본 발명은 하나 이상의 8-설폰닐-2-아미노벤자제핀 유도체에 대한 접합에 의해 연결된 항체를 포함하는 화학식 (I)의 면역접합체를 제공한다. 본 발명은 또한 반응성 작용기를 포함하는 8-설폰닐-2-아미노벤자제핀 유도체 중간체 조성물을 제공한다. 이러한 중간 조성물은 링커 또는 연결 모이어티를 통한 면역접합체의 형성에 적합한 기질이다. 본 발명은 추가로 면역접합체에 의해 암을 치료하는 방법을 제공한다.

**대표도**



(52) CPC특허분류

**A61P 35/00** (2018.01)

(72) 발명자

**쿠디르카, 로마스**

미국 94063 캘리포니아 레드우드 시티 체사피크 드  
라이브 900

**사피나, 브라이언**

미국 94063 캘리포니아 레드우드 시티 체사피크 드  
라이브 900

---

**사르마, 가나파시**

미국 94063 캘리포니아 레드우드 시티 체사피크 드  
라이브 900

명세서

청구범위

청구항 1

링커에 의해 하나 이상의 8-설포닐-2-아미노벤자제핀 모이어티에 공유 부착된 항체를 포함하고, 화학식 I 또는 이의 약제학적으로 허용 가능한 염을 갖는 면역접합체:



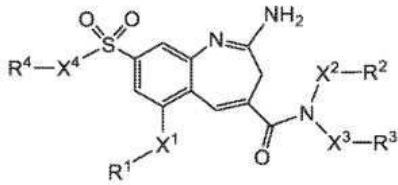
상기 식 중,

Ab는 항체이고, 여기서 항체는 PD-L1, HER2, CEA; 및 TROP2로부터 선택된 표적에 결합하고,

p는 1 내지 8의 정수이고;

L은 링커이고;

D는 하기 화학식을 갖는 8-설포닐-2-아미노벤자제핀 모이어티이고;



R<sup>1</sup>, R<sup>2</sup>, R<sup>3</sup>, 및 R<sup>4</sup>는 H, C<sub>1</sub>-C<sub>12</sub> 알킬, C<sub>2</sub>-C<sub>6</sub> 알케닐, C<sub>2</sub>-C<sub>6</sub> 알킬닐, C<sub>3</sub>-C<sub>12</sub> 카보사이클릴, C<sub>6</sub>-C<sub>20</sub> 아릴, C<sub>2</sub>-C<sub>9</sub> 헤테로 사이클릴, 및 C<sub>1</sub>-C<sub>20</sub> 헤테로아릴로 이루어진 군으로부터 독립적으로 선택되고, 각각은 독립적으로 및 선택적으로

-(C<sub>1</sub>-C<sub>12</sub> 알킬디일)-N(R<sup>5</sup>)<sup>-\*</sup>;

-(C<sub>1</sub>-C<sub>12</sub> 알킬디일)-N(R<sup>5</sup>)<sub>2</sub>;

-(C<sub>1</sub>-C<sub>12</sub> 알킬디일)-OR<sup>5</sup>;

-(C<sub>3</sub>-C<sub>12</sub> 카보사이클릴);

-(C<sub>3</sub>-C<sub>12</sub> 카보사이클릴)<sup>-\*</sup>;

-(C<sub>3</sub>-C<sub>12</sub> 카보사이클릴)-(C<sub>1</sub>-C<sub>12</sub> 알킬디일)-NR<sup>5</sup><sup>-\*</sup>;

-(C<sub>3</sub>-C<sub>12</sub> 카보사이클릴)-(C<sub>1</sub>-C<sub>12</sub> 알킬디일)-N(R<sup>5</sup>)<sub>2</sub>;

-(C<sub>3</sub>-C<sub>12</sub> 카보사이클릴)-NR<sup>5</sup>-C(=NR<sup>5</sup>)NR<sup>5</sup><sup>-\*</sup>;

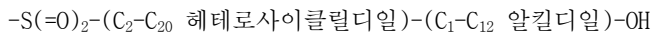
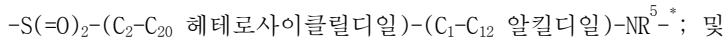
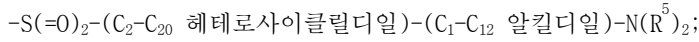
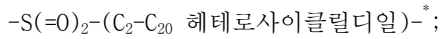
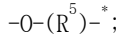
-(C<sub>6</sub>-C<sub>20</sub> 아릴);

-(C<sub>6</sub>-C<sub>20</sub> 아릴디일)<sup>-\*</sup>;

-(C<sub>6</sub>-C<sub>20</sub> 아릴디일)-N(R<sup>5</sup>)<sup>-\*</sup>;

- (C<sub>6</sub>-C<sub>20</sub> 아릴디일)-(C<sub>1</sub>-C<sub>12</sub> 알킬디일)-N(R<sup>5</sup>)<sup>-\*</sup>;
- (C<sub>6</sub>-C<sub>20</sub> 아릴디일)-(C<sub>1</sub>-C<sub>12</sub> 알킬디일)-(C<sub>2</sub>-C<sub>20</sub> 헤테로사이클릴디일)<sup>-\*</sup>;
- (C<sub>6</sub>-C<sub>20</sub> 아릴디일)-(C<sub>1</sub>-C<sub>12</sub> 알킬디일)-N(R<sup>5</sup>)<sub>2</sub>;
- (C<sub>6</sub>-C<sub>20</sub> 아릴디일)-(C<sub>1</sub>-C<sub>12</sub> 알킬디일)-NR<sup>5</sup>-C(=NR<sup>5a</sup>)N(R<sup>5</sup>)<sup>-\*</sup>;
- (C<sub>2</sub>-C<sub>20</sub> 헤테로사이클릴);
- (C<sub>2</sub>-C<sub>20</sub> 헤테로사이클릴)<sup>-\*</sup>;
- (C<sub>2</sub>-C<sub>9</sub> 헤테로사이클릴)-(C<sub>1</sub>-C<sub>12</sub> 알킬디일)-NR<sup>5</sup><sup>-\*</sup>;
- (C<sub>2</sub>-C<sub>9</sub> 헤테로사이클릴)-(C<sub>1</sub>-C<sub>12</sub> 알킬디일)-N(R<sup>5</sup>)<sub>2</sub>;
- (C<sub>2</sub>-C<sub>9</sub> 헤테로사이클릴)-C(=O)-(C<sub>1</sub>-C<sub>12</sub> 알킬디일)-N(R<sup>5</sup>)<sup>-\*</sup>;
- (C<sub>2</sub>-C<sub>9</sub> 헤테로사이클릴)-NR<sup>5</sup>-C(=NR<sup>5a</sup>)NR<sup>5</sup><sup>-\*</sup>;
- (C<sub>2</sub>-C<sub>9</sub> 헤테로사이클릴)-NR<sup>5</sup>-(C<sub>6</sub>-C<sub>20</sub> 아릴디일)-(C<sub>1</sub>-C<sub>12</sub> 알킬디일)-N(R<sup>5</sup>)<sup>-\*</sup>;
- (C<sub>2</sub>-C<sub>9</sub> 헤테로사이클릴)-(C<sub>6</sub>-C<sub>20</sub> 아릴디일)<sup>-\*</sup>;
- (C<sub>1</sub>-C<sub>20</sub> 헤테로아릴);
- (C<sub>1</sub>-C<sub>20</sub> 헤테로아릴)<sup>-\*</sup>;
- (C<sub>1</sub>-C<sub>20</sub> 헤테로아릴)-(C<sub>1</sub>-C<sub>12</sub> 알킬디일)-N(R<sup>5</sup>)<sup>-\*</sup>;
- (C<sub>1</sub>-C<sub>20</sub> 헤테로아릴)-(C<sub>1</sub>-C<sub>12</sub> 알킬디일)-N(R<sup>5</sup>)<sub>2</sub>;
- (C<sub>1</sub>-C<sub>20</sub> 헤테로아릴)-NR<sup>5</sup>-C(=NR<sup>5a</sup>)N(R<sup>5</sup>)<sup>-\*</sup>;
- (C<sub>1</sub>-C<sub>20</sub> 헤테로아릴)-N(R<sup>5</sup>)C(=O)-(C<sub>1</sub>-C<sub>12</sub> 알킬디일)-N(R<sup>5</sup>)<sup>-\*</sup>;
- C(=O)<sup>-\*</sup>;
- C(=O)-(C<sub>1</sub>-C<sub>12</sub> 알킬디일)-N(R<sup>5</sup>)<sup>-\*</sup>;
- C(=O)-(C<sub>2</sub>-C<sub>20</sub> 헤테로사이클릴디일)<sup>-\*</sup>;
- C(=O)N(R<sup>5</sup>)<sub>2</sub>;
- C(=O)N(R<sup>5</sup>)<sup>-\*</sup>;
- C(=O)N(R<sup>5</sup>)-(C<sub>1</sub>-C<sub>12</sub> 알킬디일)-N(R<sup>5</sup>)C(=O)R<sup>5</sup>;
- C(=O)N(R<sup>5</sup>)-(C<sub>1</sub>-C<sub>12</sub> 알킬디일)-N(R<sup>5</sup>)C(=O)N(R<sup>5</sup>)<sub>2</sub>;

- C(=O)NR<sup>5</sup>-(C<sub>1</sub>-C<sub>12</sub> 알킬디일)-N(R<sup>5</sup>)CO<sub>2</sub>R<sup>5</sup>;
- C(=O)NR<sup>5</sup>-(C<sub>1</sub>-C<sub>12</sub> 알킬디일)-N(R<sup>5</sup>)C(=NR<sup>5a</sup>)N(R<sup>5</sup>)<sub>2</sub>;
- C(=O)NR<sup>5</sup>-(C<sub>1</sub>-C<sub>12</sub> 알킬디일)-NR<sup>5</sup>C(=NR<sup>5a</sup>)R<sup>5</sup>;
- C(=O)NR<sup>5</sup>-(C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub> 알킬디일)-NR<sup>5</sup>(C<sub>2</sub>-C<sub>5</sub> 헤테로아릴);
- C(=O)NR<sup>5</sup>-(C<sub>1</sub>-C<sub>20</sub> 헤테로아릴디일)-N(R<sup>5</sup>)-\*;
- C(=O)NR<sup>5</sup>-(C<sub>1</sub>-C<sub>20</sub> 헤테로아릴디일)-\*;
- C(=O)NR<sup>5</sup>-(C<sub>1</sub>-C<sub>20</sub> 헤테로아릴디일)-(C<sub>1</sub>-C<sub>12</sub> 알킬디일)-N(R<sup>5</sup>)<sub>2</sub>;
- C(=O)NR<sup>5</sup>-(C<sub>1</sub>-C<sub>20</sub> 헤테로아릴디일)-(C<sub>2</sub>-C<sub>20</sub> 헤테로사이클릴디일)-C(=O)NR<sup>5</sup>-(C<sub>1</sub>-C<sub>12</sub> 알킬디일)-NR<sup>5</sup>-\*;
- N(R<sup>5</sup>)<sub>2</sub>;
- N(R<sup>5</sup>)-\*;
- N(R<sup>5</sup>)C(=O)R<sup>5</sup>;
- N(R<sup>5</sup>)C(=O)-\*;
- N(R<sup>5</sup>)C(=O)N(R<sup>5</sup>)<sub>2</sub>;
- N(R<sup>5</sup>)C(=O)N(R<sup>5</sup>)-\*;
- N(R<sup>5</sup>)CO<sub>2</sub>R<sup>5</sup>;
- NR<sup>5</sup>C(=NR<sup>5a</sup>)N(R<sup>5</sup>)<sub>2</sub>;
- NR<sup>5</sup>C(=NR<sup>5a</sup>)N(R<sup>5</sup>)-\*;
- NR<sup>5</sup>C(=NR<sup>5a</sup>)R<sup>5</sup>;
- N(R<sup>5</sup>)C(=O)-(C<sub>1</sub>-C<sub>12</sub> 알킬디일)-N(R<sup>5</sup>)-\*;
- N(R<sup>5</sup>)-(C<sub>2</sub>-C<sub>5</sub> 헤테로아릴);
- N(R<sup>5</sup>)-S(=O)<sub>2</sub>-(C<sub>1</sub>-C<sub>12</sub> 알킬);
- O-(C<sub>1</sub>-C<sub>12</sub> 알킬);
- O-(C<sub>1</sub>-C<sub>12</sub> 알킬디일)-N(R<sup>5</sup>)<sub>2</sub>;
- O-(C<sub>1</sub>-C<sub>12</sub> 알킬디일)-N(R<sup>5</sup>)-\*;
- O-C(=O)N(R<sup>5</sup>)<sub>2</sub>;
- O-C(=O)N(R<sup>5</sup>)-\*;



로부터 선택된 하나 이상의 기로 치환되거나;

$R^2$  및  $R^3$ 은 함께 5원 또는 6원 헤테로사이클릴 고리를 형성하고;

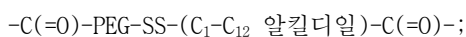
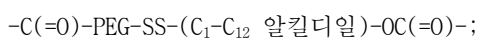
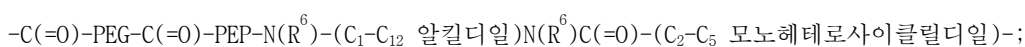
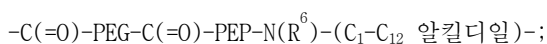
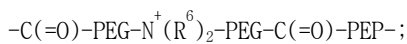
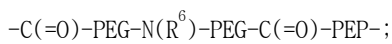
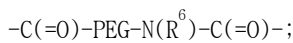
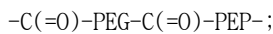
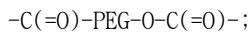
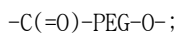
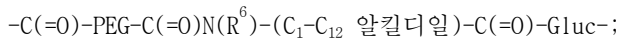
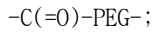
$X^1$ ,  $X^2$ ,  $X^3$  및  $X^4$ 는 결합,  $C(=O)$ ,  $C(=O)N(R^5)$ ,  $O$ ,  $N(R^5)$ ,  $S$ ,  $S(O)_2$  및  $S(O)_2N(R^5)$ 로 이루어진 군으로부터 독립적으로 선택되고;

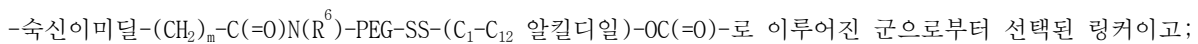
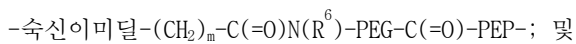
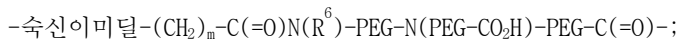
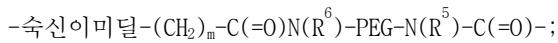
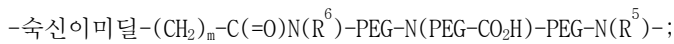
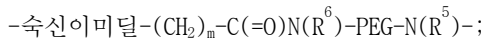
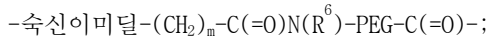
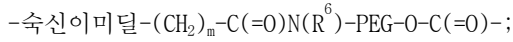
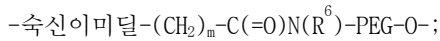
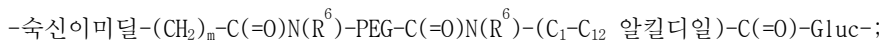
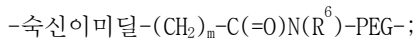
$R^5$ 는 H,  $C_6-C_{20}$  아릴,  $C_3-C_{12}$  카보사이클릴,  $C_6-C_{20}$  아릴디일,  $C_1-C_{12}$  알킬 및  $C_1-C_{12}$  알킬디일로 이루어진 군으로부터 독립적으로 선택되거나, 2개의  $R^5$  기는 함께 5원 또는 6원 헤테로사이클릴 고리를 형성하고;

$R^{5a}$ 는  $C_6-C_{20}$  아릴 및  $C_1-C_{20}$  헤테로아릴로 이루어진 군으로부터 선택되고;

별표 \*는 L의 부착 부위를 나타내고,  $R^1$ ,  $R^2$ ,  $R^3$  및  $R^4$  중 하나는 L에 부착되고;

L은

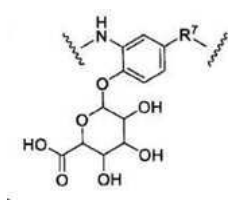




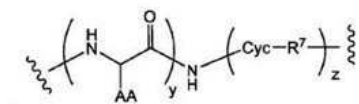
R<sup>6</sup>은 독립적으로 H 또는 C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub> 알킬이고;

PEG는 화학식 -(CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O)<sub>n</sub>-(CH<sub>2</sub>)<sub>m</sub>-을 갖고; m은 1 내지 5의 정수이고, n은 2 내지 50의 정수이고;

Gluc는 하기 화학식을 갖고

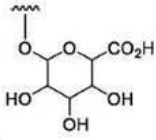


PEP는 하기 화학식을 갖고



여기서 AA는 천연 또는 비천연 아미노산 측쇄로부터 독립적으로 선택되거나, AA 중 하나 이상 및 인접한 질소 원자는 5원 고리 프롤린 아미노산을 형성하고, 물결선은 부착점을 나타내고;

Cyc는 F, Cl, NO<sub>2</sub>, -OH, -OCH<sub>3</sub> 및 하기 구조를 갖는 글루쿠론산으로부터 선택된 하나 이상의 기로 선택적으로 치환된 C<sub>6</sub>-C<sub>20</sub> 아릴디일 및 C<sub>1</sub>-C<sub>20</sub> 헤테로아릴디일로부터 선택되고;



$R^7$ 은  $-\text{CH}(\text{R}^8)\text{O}-$ ,  $-\text{CH}_2-$ ,  $-\text{CH}_2\text{N}(\text{R}^8)-$  및  $-\text{CH}(\text{R}^8)\text{O}-\text{C}(=\text{O})-$ 로 이루어진 군으로부터 선택되고, 여기서  $\text{R}^8$ 은 H,  $\text{C}_1-\text{C}_6$  알킬,  $\text{C}(=\text{O})-\text{C}_1-\text{C}_6$  알킬 및  $-\text{C}(=\text{O})\text{N}(\text{R}^9)_2$ 로부터 선택되고, 여기서  $\text{R}^9$ 는 H,  $\text{C}_1-\text{C}_{12}$  알킬 및  $-(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_n-(\text{CH}_2)_m-\text{OH}$ 로 이루어진 군으로부터 독립적으로 선택되고, 여기서  $m$ 은 1 내지 5의 정수이고,  $n$ 은 2 내지 50의 정수이거나, 2개의  $\text{R}^9$  기는 함께 5원 또는 6원 헤테로사이클릴 고리를 형성하고;

$y$ 는 2 내지 12의 정수이고;

$z$ 는 0 또는 1이고;

알킬, 알킬디일, 알케닐, 알케닐디일, 알키닐, 알키닐디일, 아릴, 아릴디일, 카보사이클릴, 카보사이클릴디일, 헤테로사이클릴, 헤테로사이클릴디일, 헤테로아릴 및 헤테로아릴디일은 F, Cl, Br, I,  $-\text{CN}$ ,  $-\text{CH}_3$ ,  $-\text{CH}_2\text{CH}_3$ ,  $-\text{CH}=\text{CH}_2$ ,  $-\text{C}\equiv\text{CH}$ ,  $-\text{C}\equiv\text{CCH}_3$ ,  $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$ ,  $-\text{CH}(\text{CH}_3)_2$ ,  $-\text{CH}_2\text{CH}(\text{CH}_3)_2$ ,  $-\text{CH}_2\text{OH}$ ,  $-\text{CH}_2\text{OCH}_3$ ,  $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{OH}$ ,  $-\text{C}(\text{CH}_3)_2\text{OH}$ ,  $-\text{CH}(\text{OH})\text{CH}(\text{CH}_3)_2$ ,  $-\text{C}(\text{CH}_3)_2\text{CH}_2\text{OH}$ ,  $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{SO}_2\text{CH}_3$ ,  $-\text{CH}_2\text{OP}(\text{O})(\text{OH})_2$ ,  $-\text{CH}_2\text{F}$ ,  $-\text{CHF}_2$ ,  $-\text{CF}_3$ ,  $-\text{CH}_2\text{CF}_3$ ,  $-\text{CH}_2\text{CHF}_2$ ,  $-\text{CH}(\text{CH}_3)\text{CN}$ ,  $-\text{C}(\text{CH}_3)_2\text{CN}$ ,  $-\text{CH}_2\text{CN}$ ,  $-\text{CH}_2\text{NH}_2$ ,  $-\text{CH}_2\text{NHSO}_2\text{CH}_3$ ,  $-\text{CH}_2\text{NHCH}_3$ ,  $-\text{CH}_2\text{N}(\text{CH}_3)_2$ ,  $-\text{CO}_2\text{H}$ ,  $-\text{COCH}_3$ ,  $-\text{CO}_2\text{CH}_3$ ,  $-\text{CO}_2\text{C}(\text{CH}_3)_3$ ,  $-\text{COCH}(\text{OH})\text{CH}_3$ ,  $-\text{CONH}_2$ ,  $-\text{CONHCH}_3$ ,  $-\text{CON}(\text{CH}_3)_2$ ,  $-\text{C}(\text{CH}_3)_2\text{CONH}_2$ ,  $-\text{NH}_2$ ,  $-\text{NHCH}_3$ ,  $-\text{N}(\text{CH}_3)_2$ ,  $-\text{NHCOCH}_3$ ,  $-\text{N}(\text{CH}_3)\text{COCH}_3$ ,  $-\text{NHS}(\text{O})_2\text{CH}_3$ ,  $-\text{N}(\text{CH}_3)\text{C}(\text{CH}_3)_2\text{CONH}_2$ ,  $-\text{N}(\text{CH}_3)\text{CH}_2\text{CH}_2\text{S}(\text{O})_2\text{CH}_3$ ,  $-\text{NHC}(=\text{NH})\text{H}$ ,  $-\text{NHC}(=\text{NH})\text{CH}_3$ ,  $-\text{NHC}(=\text{NH})\text{NH}_2$ ,  $-\text{NHC}(=\text{O})\text{NH}_2$ ,  $-\text{NO}_2$ ,  $=\text{O}$ ,  $-\text{OH}$ ,  $-\text{OCH}_3$ ,  $-\text{OCH}_2\text{CH}_3$ ,  $-\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{OCH}_3$ ,  $-\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{OH}$ ,  $-\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{N}(\text{CH}_3)_2$ ,  $-\text{O}(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_n-(\text{CH}_2)_m\text{CO}_2\text{H}$ ,  $-\text{O}(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_n\text{H}$ ,  $-\text{OCH}_2\text{F}$ ,  $-\text{OCHF}_2$ ,  $-\text{OCF}_3$ ,  $-\text{OP}(\text{O})(\text{OH})_2$ ,  $-\text{S}(\text{O})_2\text{N}(\text{CH}_3)_2$ ,  $-\text{SCH}_3$ ,  $-\text{S}(\text{O})_2\text{CH}_3$ , 및  $-\text{S}(\text{O})_3\text{H}$ 로부터 독립적으로 선택된 하나 이상의 기로 독립적으로 및 선택적으로 치환됨.

**청구항 2**

제1항에 있어서, 항체는 PD-L1에 결합하는 항원 결합 도메인을 갖는 항체 작제물인, 면역접합체.

**청구항 3**

제2항에 있어서, 항체는 아테졸리주맙, 두르발루맙, 및 아벨루맙, 또는 이들의 바이오시밀러 또는 바이오베터로 이루어진 군으로부터 선택되는, 면역접합체.

**청구항 4**

제1항에 있어서, 항체는 HER2에 결합하는 항원 결합 도메인을 갖는 항체 작제물인, 면역접합체.

**청구항 5**

제4항에 있어서, 항체는 트라스투주맙, 퍼투주맙, 마르케톡시맙, 및 HT-19, 또는 이들의 바이오시밀러 또는 바이오베터로 이루어진 군으로부터 선택되는, 면역접합체.

**청구항 6**

제1항에 있어서, 항체는 CEA에 결합하는 항원 결합 도메인을 갖는 항체 작제물인, 면역접합체.

**청구항 7**

제6항에 있어서, 항체는 라베투주맙, 또는 이의 바이오시밀러 또는 바이오베터인, 면역접합체.

**청구항 8**

제1항에 있어서, 항체는 TROP2에 결합하는 항원 결합 도메인을 갖는 항체 작제물인, 면역접합체.

**청구항 9**

제8항에 있어서, 항체는 사시투주맵, 또는 이의 바이오시밀러 또는 바이오베터인, 면역접합체.

**청구항 10**

제1항 내지 제9항 중 어느 한 항에 있어서,  $X^1$ 은 결합이고,  $R^1$ 은 H인, 면역접합체.

**청구항 11**

제1항 내지 제9항 중 어느 한 항에 있어서,  $X^2$ 는 결합이고,  $R^2$ 는  $C_1-C_8$  알킬인, 면역접합체.

**청구항 12**

제1항 내지 제9항 중 어느 한 항에 있어서,  $X^2$  및  $X^3$ 은 각각 결합이고,  $R^2$  및  $R^3$ 은  $C_1-C_8$  알킬,  $-O-(C_1-C_{12}$  알킬),  $-(C_1-C_{12}$  알킬디일)-OR<sup>5</sup>,  $-(C_1-C_8$  알킬디일)-N(R<sup>5</sup>)CO<sub>2</sub>R<sup>5</sup>,  $-(C_1-C_{12}$  알킬)-OC(O)N(R<sup>5</sup>)<sub>2</sub>,  $-O-(C_1-C_{12}$  알킬)-N(R<sup>5</sup>)CO<sub>2</sub>R<sup>5</sup> 및  $-O-(C_1-C_{12}$  알킬)-OC(O)N(R<sup>5</sup>)<sub>2</sub>로부터 독립적으로 선택되는, 면역접합체.

**청구항 13**

제12항에 있어서,  $R^2$ 는  $C_1-C_8$  알킬이고,  $R^3$ 은  $-(C_1-C_8$  알킬디일)-N(R<sup>5</sup>)CO<sub>2</sub>R<sup>4</sup>인, 면역접합체.

**청구항 14**

제12항에 있어서,  $R^2$ 는  $-CH_2CH_2CH_3$ 이고,  $R^3$ 은  $-CH_2CH_2CH_2NHCO_2(t-Bu)$ ,  $-OCH_2CH_2NHCO_2$ (사이클로부틸), 및  $-CH_2CH_2CH_2NHCO_2$ (사이클로부틸)로부터 선택되는, 면역접합체.

**청구항 15**

제12항에 있어서,  $R^2$  및  $R^3$ 은 각각  $-CH_2CH_2CH_3$ ,  $-OCH_2CH_3$ ,  $-OCH_2CF_3$ ,  $-CH_2CH_2CF_3$ ,  $-OCH_2CH_2OH$ , 및  $-CH_2CH_2CH_2OH$ 로부터 독립적으로 선택되는, 면역접합체.

**청구항 16**

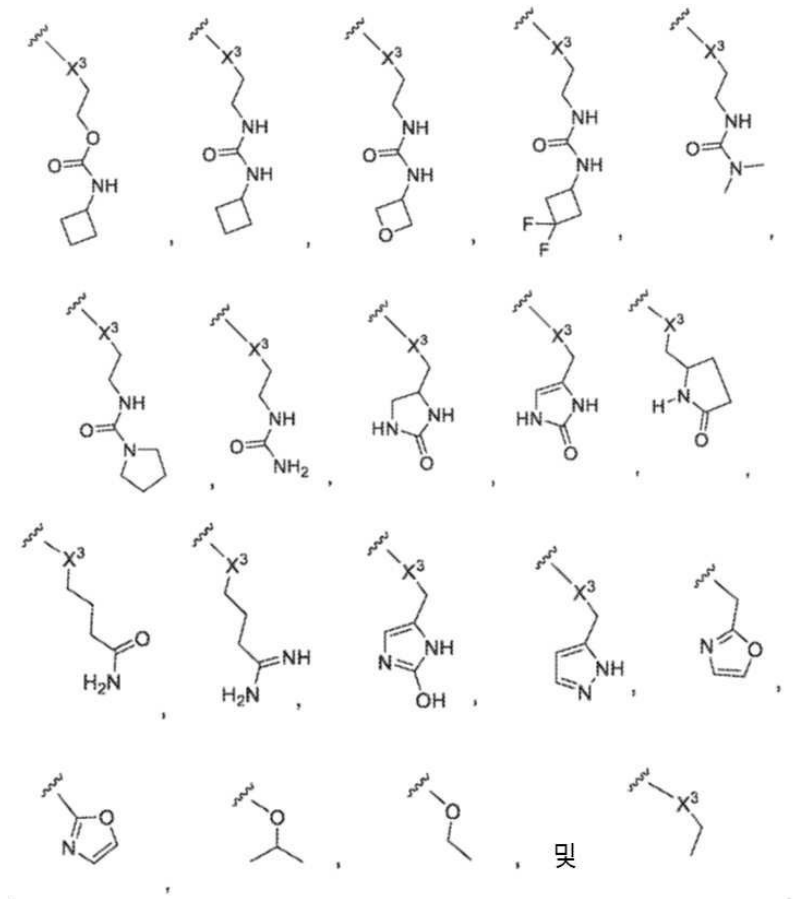
제12항에 있어서,  $R^2$  및  $R^3$ 은 각각  $-CH_2CH_2CH_3$ 인, 면역접합체.

**청구항 17**

제12항에 있어서,  $R^2$ 는  $-CH_2CH_2CH_3$ 이고,  $R^3$ 은  $-OCH_2CH_3$ 인, 면역접합체.

**청구항 18**

제1항 내지 제9항 중 어느 한 항에 있어서,  $X^3-R^3$ 은 하기로 이루어진 군으로부터 선택되는, 면역접합체:



**청구항 19**

제1항 내지 제9항 중 어느 한 항에 있어서, X<sup>4</sup>는 결합이고, R<sup>4</sup>는 H인, 면역접합체.

**청구항 20**

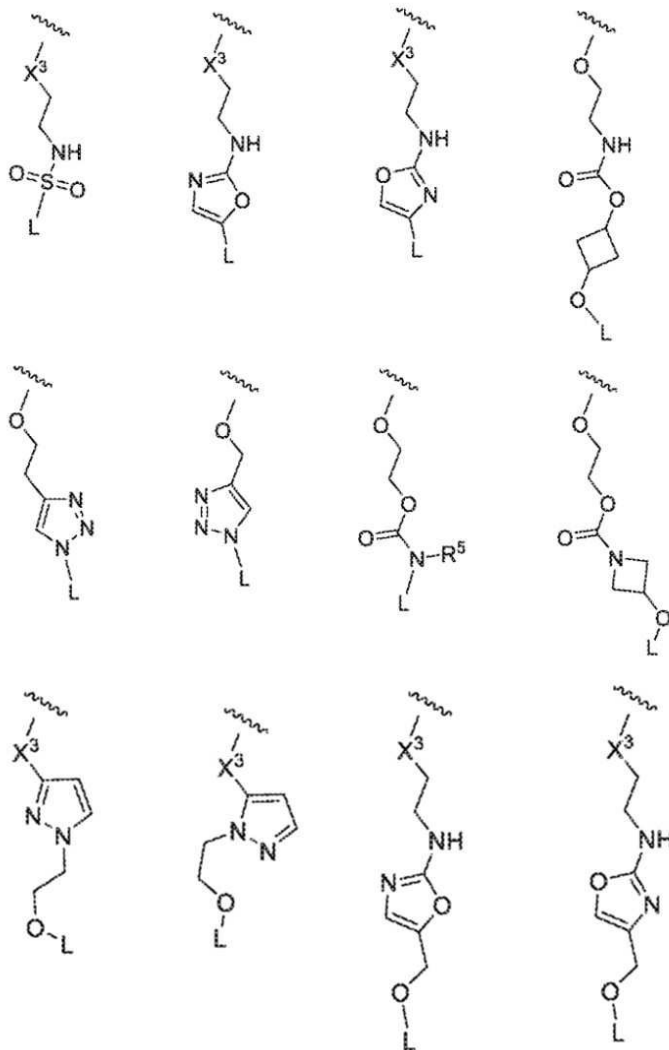
제1항 내지 제9항 중 어느 한 항에 있어서, R<sup>1</sup>은 L에 부착된, 면역접합체.

**청구항 21**

제1항 내지 제9항 중 어느 한 항에 있어서, R<sup>2</sup> 또는 R<sup>3</sup>은 L에 부착된, 면역접합체.

청구항 22

제21항에 있어서,  $X^3-R^3-L$ 은 하기로 이루어진 군으로부터 선택되는, 면역접합체:



상기 식 중, 물결선은 N에 대한 부착점을 나타냄.

청구항 23

제1항 내지 제9항 중 어느 한 항에 있어서,  $R^4$ 는  $C_1-C_{12}$  알킬인, 면역접합체.

청구항 24

제1항 내지 제9항 중 어느 한 항에 있어서,  $R^4$ 는  $-(C_1-C_{12}$  알킬디일)- $N(R^5)-^*$ 이고; 별표 \*는 L의 부착 부위를 나타내는, 면역접합체.

청구항 25

제1항 내지 제9항 중 어느 한 항에 있어서, L은  $-C(=O)-PEG-$  또는  $-C(=O)-PEG-C(=O)-$ 인, 면역접합체.

청구항 26

제1항 내지 제9항 중 어느 한 항에 있어서, L은 항체의 시스테인 티올에 부착된, 면역접합체.

청구항 27

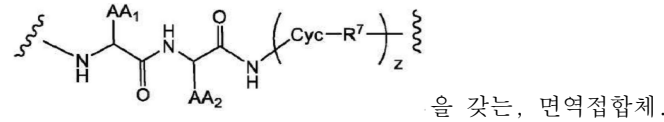
제1항 내지 제9항 중 어느 한 항에 있어서, PEG에 대해 m은 1 또는 2이고, n은 2 내지 10의 정수인, 면역접합체.

**청구항 28**

제27항에 있어서, n은 10인, 면역접합체.

**청구항 29**

제1항 내지 제9항 중 어느 한 항에 있어서, L은 PEP를 포함하고, PEP는 디펩타이드이고, 화학식



**청구항 30**

제29항에 있어서, AA<sub>1</sub> 및 AA<sub>2</sub>는 H, -CH<sub>3</sub>, -CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>, -CH<sub>2</sub>(C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>), -CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>NH<sub>2</sub>, -CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>NHC(NH)NH<sub>2</sub>, -CHCH(CH<sub>3</sub>)CH<sub>3</sub>, -CH<sub>2</sub>SO<sub>3</sub>H, 및 -CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>NHC(O)NH<sub>2</sub>로부터 독립적으로 선택되거나; AA<sub>1</sub> 및 AA<sub>2</sub>는 5원 고리 프롤린 아미노산을 형성하는, 면역접합체.

**청구항 31**

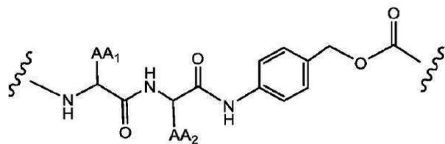
제29항에 있어서, AA<sub>1</sub>은 -CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>이고, AA<sub>2</sub>는 -CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>NHC(O)NH<sub>2</sub>인, 면역접합체.

**청구항 32**

제29항에 있어서, AA<sub>1</sub> 및 AA<sub>2</sub>는 GlcNAc 아스파르트산, -CH<sub>2</sub>SO<sub>3</sub>H, 및 -CH<sub>2</sub>OPO<sub>3</sub>H로부터 독립적으로 선택되는, 면역접합체.

**청구항 33**

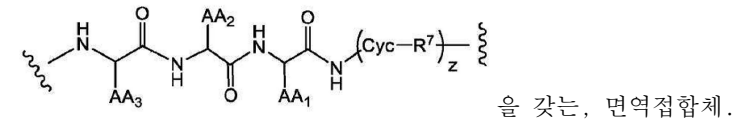
제29항에 있어서, PEP는 하기 화학식을 갖는, 면역접합체:



상기 식 중, AA<sub>1</sub> 및 AA<sub>2</sub>는 천연-발생 아미노산의 측쇄로부터 독립적으로 선택됨.

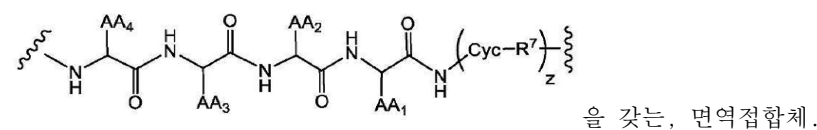
**청구항 34**

제1항 내지 제9항 중 어느 한 항에 있어서, L은 PEP를 포함하고, PEP는 트리펩타이드이고, 화학식



**청구항 35**

제1항 내지 제9항 중 어느 한 항에 있어서, L은 PEP를 포함하고, PEP는 테트라펩타이드이고, 화학식



**청구항 36**

제35항에 있어서,

AA<sub>1</sub>은 Abu, Ala, 및 Val로 이루어진 군으로부터 선택되고;

AA<sub>2</sub>는 Nle(O-Bzl), Oic 및 Pro로 이루어진 군으로부터 선택되고;

AA<sub>3</sub>은 Ala 및 Met(O)<sub>2</sub>로 이루어진 군으로부터 선택되고;

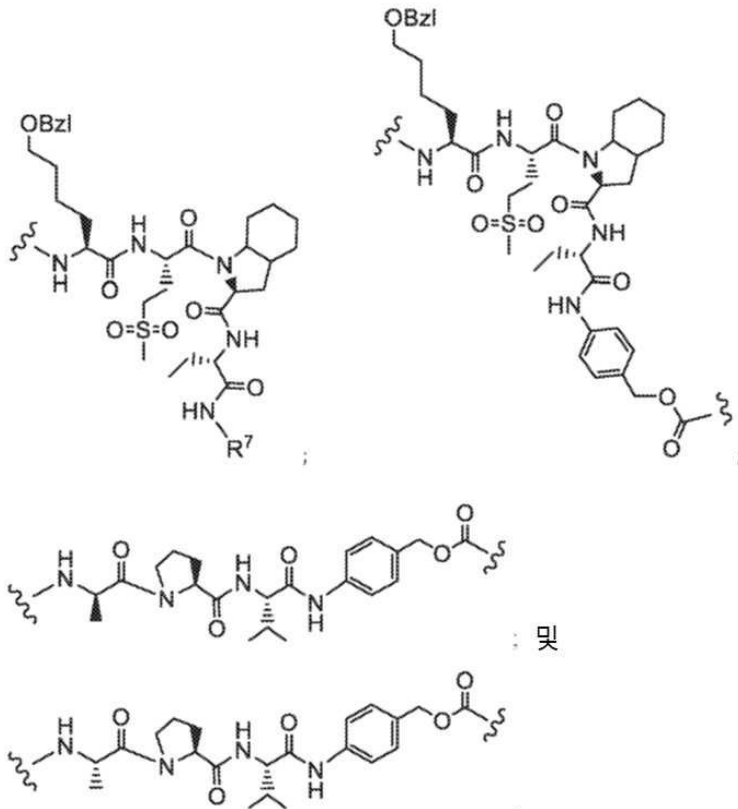
AA<sub>4</sub>는 Oic, Arg(NO<sub>2</sub>), Bpa, 및 Nle(O-Bzl)로 이루어진 군으로부터 선택되는, 면역접합체.

**청구항 37**

제1항 내지 제9항 중 어느 한 항에 있어서, L은 PEP를 포함하고, PEP는 Ala-Pro-Val, Asn-Pro-Val, Ala-Ala-Val, Ala-Ala-Pro-Ala, Ala-Ala-Pro-Val, 및 Ala-Ala-Pro-Nva로 이루어진 군으로부터 선택되는, 면역접합체.

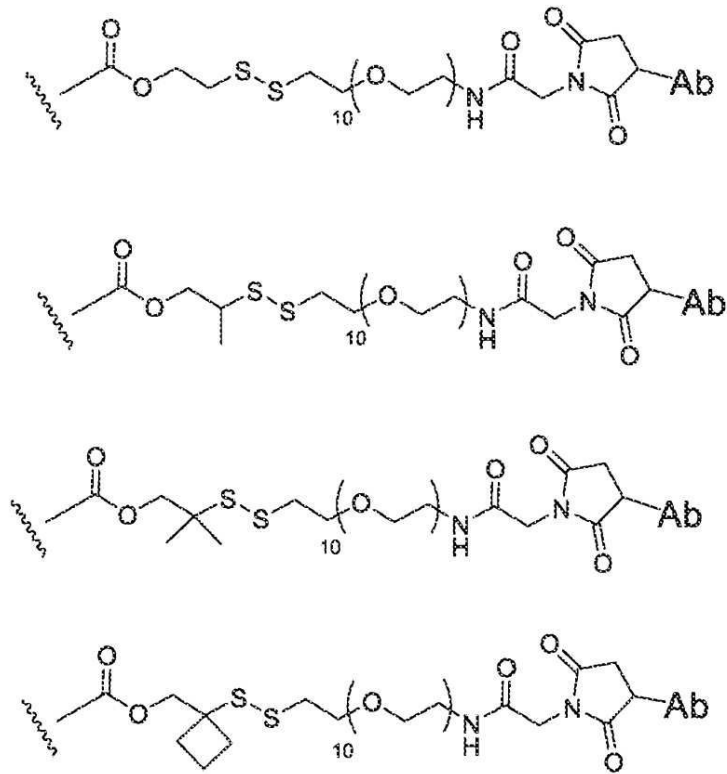
**청구항 38**

제1항 내지 제9항 중 어느 한 항에 있어서, L은 PEP를 포함하고, PEP는 하기 구조로부터 선택되는, 면역접합체:



**청구항 39**

제1항 내지 제9항 중 어느 한 항에 있어서, L은 하기 구조로부터 선택되는, 면역접합체:



상기 식 중, 물결선은 R<sup>5</sup>에 대한 부착을 나타냄.

**청구항 40**

표 2a로부터 선택된 8-설포닐-2-아미노벤자제핀-링커 화합물.

**청구항 41**

표 2a로부터 선택된 8-설포닐-2-아미노벤자제핀-링커 화합물과 항체의 접합에 의해 제조된 면역접합체.

**청구항 42**

치료학적 유효량의 제1항 내지 제39항 중 어느 한 항에 따른 면역접합체, 및 하나 이상의 약제학적으로 허용 가능한 희석제, 비히클, 담체 또는 부형제를 포함하는, 약제학적 조성물.

**청구항 43**

치료를 필요로 하는 환자에게 치료학적 유효량의 제1항 내지 제39항 중 어느 한 항에 따른 면역접합체를 투여하는 단계를 포함하는 암을 치료하는 방법으로서, 암은 자궁경부암, 자궁내막암, 난소암, 전립선암, 췌장암, 식도암, 방광암, 요로암, 요로상피 암종, 폐암, 비소세포 폐암, 메르켈 세포 암종, 결장암, 결장직장암, 위암, 및 유방암으로부터 선택되는, 방법.

**청구항 44**

제43항에 있어서, 암은 TLR7 및/또는 TLR8 효능작용에 의해 유도된 전염증성 반응에 민감한, 방법.

**청구항 45**

제43항에 있어서, 암은 삼중-음성 유방암, 전이성 메르켈 세포 암종, 및 위식도 연결부 선암으로부터 선택되는, 방법.

**청구항 46**

제43항에 있어서, 면역접합체는 정맥내로, 종양내로, 또는 피하로 환자에게 투여되는, 방법.

**청구항 47**

제43항에 있어서, 면역접합체는 체중 kg당 약 0.01 내지 20 mg의 용량으로 환자에게 투여되는, 방법.

**청구항 48**

암을 치료하기 위한 제1항 내지 제39항 중 어느 한 항에 따른 면역접합체의 용도로서, 암은 자궁경부암, 자궁내막암, 난소암, 전립선암, 췌장암, 식도암, 방광암, 요로암, 요로상피 암종, 폐암, 비소세포 폐암, 메르켈 세포 암종, 결장암, 결장직장암, 위암, 및 유방암으로부터 선택되는, 용도.

**청구항 49**

제1항의 화학식 I의 면역접합체를 제조하는 방법으로서, 제40항의 8-설포닐-2-아미노-티에노아제핀-링커 화합물은 항체와 접합되는, 방법.

**발명의 설명**

**기술 분야**

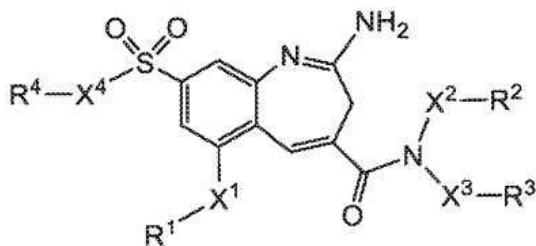
- [0001] 관련 출원에 대한 상호 참조
- [0002] 본 비-가출원은 2022년 2월 9일자로 출원된 미국 특허 가출원 제63/308,275호에 대한 우선권을 주장하며, 이의 전문은 참조로 포함된다.
- [0003] 서열 목록
- [0004] 본 출원에는 XML 형식으로 제출된 서열 목록이 함유되어 있으며, 이의 전문은 본원에 참조로 포함된다. 2023년 1월 24일에 생성된 상기 XML 사본의 명칭은 17019.023W01-TW1이고 크기는 13,070바이트이다.
- [0005] 본 발명은 일반적으로 하나 이상의 8-설포닐-벤자제핀 분자에 접합된 항체를 포함하는 면역접합체에 관한 것이다.

**배경 기술**

- [0006] 항체 및 면역 아주반트의 전달을 위한 새로운 조성물 및 방법은 접근 불가능한 종양에 도달하고/하거나 암 환자 및 다른 대상체에 대한 치료 옵션을 확장하기 위해 필요하다. 본 발명은 이러한 조성물 및 방법을 제공한다.

**발명의 내용**

- [0007] 본 발명은 일반적으로 하기 화학식을 갖는 하나 이상의 8-설포닐-벤자제핀 TLR 효능제 모이어티에 링커에 의해 공유 부착된 항-PD-L1, 항-HER2, 항-CEA, 및 항-TROP2로부터 선택된 항체를 포함하는 면역접합체에 관한 것이다:



- [0008]
- [0009] 상기 식 중, R<sup>1</sup>, R<sup>2</sup>, R<sup>3</sup> 및 R<sup>4</sup> 중 하나는 L에 부착됨. 다양한 치환체는 본원에 정의된다.
- [0010] 본 발명의 또 다른 양태는 항-PD-L1, 항-HER2, 항-CEA, 및 항-TROP2로부터 선택된 항체와 하나 이상의 8-설포닐-벤자제핀-링커 화합물의 접합에 의해 면역접합체를 제조하는 방법이다.

[0011] 본 발명의 또 다른 양태는 하나 이상의 8-설포닐-벤자제핀 모이어티에 링커에 의해 공유 부착된 항-PD-L1, 항-HER2, 항-CEA, 및 항-TROP2로부터 선택된 항체, 및 하나 이상의 약제학적으로 허용 가능한 희석제, 비히클, 담체, 또는 부형제를 포함하는 치료학적 유효량의 면역접합체를 포함하는 약제학적 조성물이다.

[0012] 본 발명의 또 다른 양태는 8-설포닐-벤자제핀-링커 화합물이다.

[0013] 본 발명의 또 다른 양태는 암을 치료하기 위한 방법이며, 이는 링커에 의해 하나 이상의 8-설포닐-벤자제핀 모이어티에 공유 부착된 항-PD-L1, 항-HER2, 항-CEA, 및 항-TROP2로부터 선택된 항체를 포함하는 치료학적 유효량의 면역접합체를 투여하는 단계를 포함한다.

[0014] 본 발명의 또 다른 양태는 면역접합체의 용도이며, 이는 질병, 특히 암의 치료에서 링커에 의해 하나 이상의 8-설포닐-벤자제핀 모이어티에 공유 부착된 항-PD-L1, 항-HER2, 항-CEA, 및 항-TROP2로부터 선택된 항체를 포함한다.

**도면의 간단한 설명**

[0015] 도 1은 cDC-농후화된 1차 세포 단리물과 공동-배양에 의한 다양한 농도의 면역접합체 IC-3, 비교기 CIC-1, 및 네이키드 항체 TROP2를 항온처리한 후 분비된 TNF α (종양 괴사 인자 알파) 사이토카인 수준의 그래프를 보여준다.

도 2는 cDC-농후화된 1차 세포 단리물과 공동-배양에 의한 다양한 농도의 면역접합체 IC-3, 비교기 CIC-2, 및 네이키드 항체 TROP2를 항온처리한 후 분비된 TNFα (종양 괴사 인자 알파) 사이토카인 수준의 그래프를 보여준다.

**발명을 실시하기 위한 구체적인 내용**

[0016] 본 발명의 특정 구현예에 대해 상세히 기재될 것이고 이의 예는 수반된 구조 및 화학식에서 예시된다. 본 발명은 열거된 구현예와 관련하여 기재될 것이지만, 이들은 본 발명을 이들 구현예로 한정하려는 의도가 아니라는 것이 이해될 것이다. 반대로, 본 발명은 모든 대안, 변형 및 균등물을 다루도록 의도되고, 이들은 청구항에 의해 정의된 것과 같이 본 발명의 범위 내에 포함될 수 있다.

[0017] 당업자는 본원에서 기재된 것들에 유사한 또는 대등한 많은 방법 및 재료를 인지할 것이며, 이는 본 발명의 실시예에 이용될 수 있다. 본 발명은 어떠한 방식으로든 기재된 방법 및 재료로 제한되지 않는다.

[0018] 정의

[0019] 용어 "면역접합체" 또는 "면역-자극 항체 접합체"는 링커를 통해 아류반트 모이어티에 공유 결합된 항체 작제물을 지칭한다. 용어 "아류반트"는 아류반트에 노출된 대상체에서 면역 반응을 일으킬 수 있는 물질을 지칭한다.

[0020] "아류반트 모이어티"는 본원에서 기재된 것과 같이 예를 들면 링커를 통해 항체 작제물에 공유 결합된 아류반트를 지칭한다. 아류반트 모이어티는 항체 작제물에 결합되면서 또는 대상체에 대한 면역접합체의 투여 후 항체 작제물로부터의 절단(예를 들면, 효소 절단) 후 면역 반응을 일으킬 수 있다.

[0021] "아류반트"는 아류반트에 노출된 대상체에서 면역 반응을 일으킬 수 있는 물질을 지칭한다.

[0022] 용어 "톨-유사 수용체" 및 "TLR"은 병원균-연관된 분자 패턴을 인식하고 선천성 면역에서 핵심 신호전달 요소로서 작용하는 고도로 보존된 포유류 단백질의 패밀리의 임의의 구성원을 지칭한다. TLR 폴리펩타이드는 류신-농후 반복부를 갖는 세포외 도메인, 막관통 도메인 및 TLR 신호전달에 관련된 세포내 도메인을 포함하는 특징적인 구조를 공유한다.

[0023] 용어 "톨-유사 수용체 7" 및 "TLR7"은 공중에게 이용 가능한 TLR7 서열, 예를 들면 인간 TLR7 폴리펩타이드에 대해 GenBank 수탁 번호 AAZ99026 또는 쥐와 TLR7 폴리펩타이드에 대해 GenBank 수탁 번호 AAK62676과 적어도 약 70%, 약 80%, 약 90%, 약 95%, 약 96%, 약 97%, 약 98%, 약 99% 이상의 서열 동일성을 공유하는 핵산 또는 폴리펩타이드를 지칭한다.

[0024] 용어 "톨-유사 수용체 8" 및 "TLR8"은 공중에게 이용 가능한 TLR7 서열, 예를 들면 인간 TLR8 폴리펩타이드에 대해 GenBank 수탁 번호 AAZ95441 또는 쥐와 TLR8 폴리펩타이드에 대해 GenBank 수탁 번호 AAK62677과 적어도 약 70%, 약 80%, 약 90%, 약 95%, 약 96%, 약 97%, 약 98%, 약 99% 이상의 서열 동일성을 공유하는 핵산 또는 폴리펩타이드를 지칭한다.

- [0025] "TLR 효능제"는 TLR 신호전달을 유도하기 위해 TLR(예를 들면, TLR7 및/또는 TLR8)에 직접적으로 또는 간접적으로 결합하는 화합물이다. TLR 신호전달에서의 임의의 검출 가능한 차이는 효능제가 TLR을 자극하거나 활성화한다는 것을 나타낼 수 있다. 신호전달 차이는 예를 들면 표적 유전자의 발현, 신호 전달 성분의 인산화, 핵 인자- $\kappa$ B(NF- $\kappa$ B)와 같은 하류 요소의 세포내 국재화, 소정의 성분(예컨대, IL-1 수용체 연관된 키나아제(IRAK))과 다른 단백질 또는 세포내 구조의 회합 또는 키나아제(예컨대, 미토젠-활성화된 단백질 키나아제(MAPK))와 같은 성분의 생화학적 활성의 변화로서 표시될 수 있다.
- [0026] "항체"는 면역글로불린 유전자로부터의 항원 결합 영역(상보성 결정 영역(CDR)을 포함함) 또는 이의 단편을 포함하는 폴리펩타이드를 지칭한다. 용어 "항체"는 구체적으로 단일클론 항체(전장 단일클론 항체를 포함함), 다중클론 항체, 다중특이적 항체(예를 들면, 이중특이적 항체) 및 원하는 생물학적 활성을 나타내는 항체 단편을 포함한다. 예시적인 면역글로불린(항체) 구조 단위는 사합체를 포함한다. 각각의 사합체는 폴리펩타이드 사슬의 2개의 동일한 쌍으로 구성되고, 각각의 쌍은 디설파이드 결합에 의해 연결된 1개의 "경"쇄(약 25 kDa) 및 1개의 "중"쇄(약 50-70 kDa)를 갖는다. 각각의 사슬은 면역글로불린 도메인이라 지칭되는 구조 도메인으로 구성된다. 이 도메인은 크기 및 기능에 의해 상이한 카테고리, 예를 들면 경쇄 및 중쇄에서의 가변 도메인 또는 영역(각각  $V_L$  및  $V_H$ ) 및 경쇄 및 중쇄에서의 불변 도메인 또는 영역(각각  $C_L$  및  $C_H$ )으로 분류된다. 각각의 사슬의 N-말단은 항원 인식을 주로 담당하는 파라토프라고 지칭되는 약 100개 내지 110개 또는 초과 아미노산의 가변 영역, 즉 항원 결합 도메인을 정의한다. 경쇄는 카파 또는 람다로서 분류된다. 중쇄는 감마, 뮤, 알파, 델타 또는 엡실론으로 분류되고, 이것은 결국 각각 면역글로불린 종류, IgG, IgM, IgA, IgD 및 IgE를 정의한다. IgG 항체는 4개의 펩타이드 사슬로 구성된 약 150 kDa의 큰 분자이다. IgG 항체는 약 50 kDa의 2개의 동일한 종류  $\gamma$  중쇄 및 약 25 kDa의 2개의 동일한 경쇄, 이에 따라 사합체 4차 구조를 함유한다. 2개의 중쇄는 디설파이드 결합에 의해 각각 서로에 연결되고 경쇄에 연결된다. 생성된 사합체는 Y-유사 형상을 함께 형성하는 2개의 동일한 절반을 갖는다. 포크의 각각의 끝은 동일한 항원 결합 도메인을 함유한다. 인간에서의 4개의 IgG 하위종류(IgG1, IgG2, IgG3 및 IgG4)가 있는데, 혈청에서의 풍부도의 순서로 명명된다(즉, IgG1은 가장 풍부함). 전형적으로, 항체의 항원 결합 도메인은 암세포에 대한 결합의 특이성 및 친화성에 가장 중요할 것이다.
- [0027] "이중특이적" 항체(bsAb)는 2개의 별개의 에피토프를 암에 결합시키는 항체이다(Suurs F.V. 등 (2019) *Pharmacology & Therapeutics* 201: 103-119). 이중특이적 항체는 면역 세포와 결합하여 종양 세포를 파괴하고, 종양에 페이로드를 전달하고/하거나 종양 신호전달 경로를 차단할 수 있다. 특정 항원을 표적화하는 항체는 특정 항원을 표적화하는 적어도 하나의 항원 결합 영역을 갖는 이중특이적 또는 다중특이적 항체를 포함한다. 일부 구현예에서, 표적화된 단일클론 항체는 종양 세포를 표적화하는 적어도 하나의 항원 결합 영역을 갖는 이중특이적 항체이다. 이러한 항원은 메소텔린, 전립선 특이적 막 항원(PSMA), HER2, TROP2, CEA, EGFR, 5T4, 벡틴 4, CD19, CD20, CD22, CD30, CD70, B7H3, B7H4(08E로도 알려져 있음), 단백질 타이로신 키나아제 7(PTK7), 글리피칸-3, RG1, 퓨코실-GM1, CTLA-4, 및 CD44(WO 2017/196598)를 포함하지만 이에 제한되지 않는다.
- [0028] 일부 구현예에서, 항체 작제물은 항체의 적어도 항원-결합 영역을 단독으로 또는 항체 작제물을 함께 구성하는 다른 성분을 포함하는 작제물인 항원-결합 항체 "단편"이다. 예를 들면, (i)  $V_L$ ,  $V_H$ ,  $C_L$  및  $CH_1$  도메인으로 이루어진 1가 단편인 Fab 단편; (ii) 힌지 영역에서 디설파이드 브릿지에 의해 연결된 2개의 Fab 단편을 포함하는 2가 단편인  $F(ab')_2$  단편; (iii) 항체의 단일 아암의  $V_L$  도메인 및  $V_H$  도메인으로 이루어진 Fv 단편; (iv) 온화한 환원 조건을 사용하여  $F(ab')_2$  단편의 디설파이드 브릿지를 파괴하여 생긴 Fab' 단편, (v) 디설파이드-안정화된 Fv 단편(dsFv) 및 (vi) 2개의 도메인이 단일 폴리펩타이드 사슬로서 합성되게 하는 합성 링커에 의해 연결된 Fv 단편의 2개의 도메인(즉,  $V_L$  및  $V_H$ )으로 이루어진 1가 분자인 단일 사슬 Fv(scFv)를 포함하는 많은 상이한 유형의 항체 "단편"이 당해 분야에 알려져 있다. 일부 구현예에서, 항체 작제물은 (i) 항원 결합 도메인 및 (ii) Fc 도메인을 포함하는 항체 또는 융합 단백질이다.
- [0029] 항체 또는 항체 단편은 더 큰 작제물의 부분, 예를 들면 추가 영역에 대한 항체 단편의 접합체 또는 융합 작제물일 수 있다. 예를 들면, 일부 구현예에서, 항체 단편은 본원에 기재된 것과 같은 Fc 영역에 융합될 수 있다. 다른 구현예에서, 항체 단편(예를 들어, Fab 또는 scFv)은, 예를 들어, 막관통 도메인(선택적으로 개체 링커 또는 "줄기(stalk)"(예를 들어, 힌지 영역)와 함께) 및 선택적 세포내 신호전달 도메인에 융합함으로써 키메라 항원 수용체 또는 키메라 T-세포 수용체의 일부일 수 있다. 예를 들어, 항체 단편은 PD-L1에 결합하는 T-세포 수용체 유사 작제물을 제공하기 위해 t-세포 수용체의 감마 및/또는 델타 사슬에 융합될 수 있다. 또 다른 구현예에서, 항체 단편은 CD1 또는 CD3 결합 도메인 및 링커를 포함하는 이중특이적 T-세포 인계이저(BiTE)의 일부이

다.

- [0030] 일부 구현예에서, 항체 작제물은 Fc 도메인을 포함한다. 특정 구현예에서, 항체 작제물은 항체이다. 특정 구현예에서, 항체 작제물은 융합 단백질이다. 항원 결합 도메인은 단일-사슬 가변 영역 단편(scFv)일 수 있다. 합성 펩타이드를 통해 항체 경쇄의 V 도메인에 연결된 항체 중쇄의 가변(V) 도메인을 포함하는 절단된 Fab 단편인 단일-사슬 가변 영역 단편(scFv)은 일상적 재조합 DNA 기술 기법을 사용하여 생성될 수 있다. 유사하게, 디설파이드 안정화된 가변 영역 단편(dsFv)은 재조합 DNA 기술에 의해 제조될 수 있다. 항체 작제물 또는 항원 결합 도메인은 항-CEA 항체의 항원 결합 도메인의 하나 이상의 가변 영역(예를 들면, 2개의 가변 영역)을 포함할 수 있고, 각각의 가변 영역은 CDR1, CDR2, 및 CDR3을 포함한다.
- [0031] "시스테인-돌연변이 항체"는 항체의 하나 이상의 아미노산 잔기가 시스테인 잔기로 치환된 항체이다. 시스테인-돌연변이 항체는 항체 조작 방법에 의해 모 항체로부터 제조될 수 있다(Junutula, 등, (2008b) *Nature Biotech.*, 26(8):925-932; Dornan 등 (2009) *Blood* 114(13):2721-2729; US 7521541; US 7723485; US 2012/0121615; WO 2009/052249). 시스테인 잔기는 조작된 시스테인 부위에서 반응성 시스테인 티올 기를 통해 항체에 대한 TLR 효능제와 같은 아주반트의 부위-특이적 접합을 제공하지만, 면역글로불린 접합 및 조립을 교란하거나 또는 항원 결합 및 이펙터 기능을 변경하지 않는다. 시스테인-돌연변이 항체는 면역접합체의 균일한 화학량론으로 TLR 효능제-링커 화합물에 접합될 수 있다(예를 들어, 단일 조작된 돌연변이 시스테인 부위를 갖는 항체에서 항체당 최대 2개의 TLR 효능제 모이어티). TLR 효능제-링커 화합물은 시스테인-돌연변이 항체의 유리 시스테인 티올 기와 특이적으로 반응하는 반응성 친전자성 기를 갖는다.
- [0032] "에피토프"는 항원 결합 도메인이 결합하는(즉, 항원 결합 도메인의 파라토프에) 항원의 임의의 항원 결정기 또는 에피토프 결정기를 의미한다. 항원 결정부위는 보통 아미노산 또는 당 측쇄와 같은 분자의 화학적으로 활성인 표면 그룹화로 이루어지고, 보통 특정 3차원 구조 특징뿐만 아니라 특정 전하 특징을 갖는다.
- [0033] 용어 "Fc 수용체" 또는 "FcR"은 항체의 Fc 영역에 결합하는 수용체를 지칭한다. (1) IgG에 결합하는 Fc $\gamma$ R, (2) IgA에 결합하는 Fc $\alpha$ R, 및 (3) IgE에 결합하는 Fc $\epsilon$ R의 Fc 수용체의 3개의 주요 종류가 있다. Fc $\gamma$ R 패밀리는 몇몇 구성원, 예컨대 Fc $\gamma$ I(CD64), Fc $\gamma$ RIIA(CD32A), Fc $\gamma$ RIIB(CD32B), Fc $\gamma$ RIIA(CD16A), 및 Fc $\gamma$ RIIIB(CD16B)를 포함한다. Fc $\gamma$  수용체는 IgG에 대한 이의 친화도가 다르고, 또한 IgG 하위종류(예를 들면, IgG1, IgG2, IgG3 및 IgG4)에 대한 상이한 친화도를 갖는다.
- [0034] 본원에 언급된 것과 같은 핵산 또는 아미노산 서열 "동일성"은 관심 핵산 또는 아미노산 서열을 기준 핵산 또는 아미노산 서열과 비교함으로써 결정될 수 있다. 퍼센트 동일성은 가장 긴 서열의 길이(즉, 어떤 것이 더 길든 관심 서열 또는 참조 서열의 길이)에 의해 나눈 최적으로 정렬된 관심 서열과 기준 서열 사이와 동일한(same)(즉, 동일한(identical)) 뉴클레오타이드 또는 아미노산 잔기의 수이다. 서열의 정렬 및 퍼센트 동일성의 계산은 이용 가능한 소프트웨어 프로그램을 사용하여 수행될 수 있다. 이러한 프로그램의 예는 CLUSTAL-W, T-Coffee 및 ALIGN(핵산 및 아미노산 서열의 정렬을 위해), BLAST 프로그램(예를 들면, BLAST 2.1, BL2SEQ, BLASTp, BLASTn 및 기타) 및 FASTA 프로그램(예를 들면, FASTA3x, FASTM 및 SSEARCH)(서열 정렬 및 서열 유사성 조사를 위해)을 포함한다. 서열 정렬 알고리즘은 또한 예를 들면 Altschul 등, *J. Molecular Biol.*, 215(3): 403-410 (1990), Beigert 등, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 106(10): 3770-3775 (2009), Durbin 등, eds., *Biological Sequence Analysis: Probabilistic Models of Proteins and Nucleic Acids*, Cambridge University Press, Cambridge, UK (2009), Soding, *Bioinformatics*, 21(7): 951-960 (2005), Altschul 등, *Nucleic Acids Res.*, 25(17): 3389-3402 (1997), 및 Gusfield, *Algorithms on Strings, Trees and Sequences*, Cambridge University Press, Cambridge UK (1997)에 개시되어 있다. 서열의 퍼센트(%) 동일성은 또한 예를 들면  $100 \times [(동일한\ 위치)/\min(TG_A, TG_B)]$ 로서 또한 계산될 수 있고, TG<sub>A</sub> 및 TG<sub>B</sub>는 TG<sub>A</sub> 및 TG<sub>B</sub>를 최소화하는 정렬에서 펩타이드 서열 A 및 B에서의 잔기의 수와 내부 갭 위치의 합이다. 예를 들어, Russell 등, *J. Mol Biol.*, 244: 332-350 (1994)를 참조한다.
- [0035] "항체 작제물" 또는 "결합체"는 항원 결합 부위를 함께 형성하는 Ig 중쇄 및 경쇄 가변 영역 폴리펩타이드를 포함한다. 각각의 중쇄 및 경쇄 가변 영역은 프레임워크 영역에 의해 연결된 3개의 상보성 결정 영역(CDR1, CDR2, 및 CDR3)을 포함하는 폴리펩타이드이다. 항체 작제물은 Ig 중쇄 및 경쇄를 포함하는 당해 분야에 알려진 임의의 여러 가지의 유형의 결합제일 수 있다. 예를 들어, 결합제는 항체, 항원-결합 항체 "단편", 또는 T-세포 수용체일 수 있다.
- [0036] "바이오시밀러"는, 예를 들어, 아테졸리주맵(TECENTRIQ™, Genentech, Inc.), 더발루맵(IMFINZI™, AstraZeneca) 및 아벨루맵(BAVENCIO™, EMD Serono, Pfizer)과 같은 이전에 승인된 PD-L1-표적화 항체 작제물;

트라스투주맵(HERCEPTIN™, Genentech, Inc.), 및 퍼투주맵(PERJETA™, Genentech, Inc.)과 같은 이전에 승인된 HER2-표적화 항체 작제물; 또는 라베투주맵(CEA-CIDE™, MN-14, hMN14, Immunomedics) CAS 등록 번호 219649-07-7)과 같은 CEA 표적 항체와 유사한 특성을 갖는 승인된 항체 작제물을 지칭한다.

[0037] "바이오베터"는 아테졸리주맵, 더발루맵, 아벨루맵, 트라스투주맵, 퍼투주맵 및 라베투주맵과 같은 이전에 승인된 항체 작제물의 개선된 승인된 항체 작제물을 지칭한다. 바이오베터는 이전에 승인된 항체 작제물에 대해 하나 이상의 변형(예를 들어, 변경된 글리칸 프로필, 또는 고유한 에피토프)을 가질 수 있다.

[0038] "아미노산"은 펩타이드, 폴리펩타이드, 또는 단백질에 혼입될 수 있는 임의의 단량체 단위를 지칭한다. 아미노산은 천연-발생 α-아미노산 및 이의 입체이성질체뿐만 아니라 비천연(비-천연 발생) 아미노산 및 이의 입체이성질체를 포함한다. 주어진 아미노산의 "입체이성질체"는 동일한 분자식 및 분자내 결합을 갖지만 결합 및 원자의 상이한 3차원 배열을 갖는 이성질체(예를 들면, L-아미노산 및 상응하는 D-아미노산)를 지칭한다. 아미노산은 글리코실화되거나(예를 들면, N-연결된 글리칸, O-연결된 글리칸, 포스포글리칸, C-연결된 글리칸 또는 글리피케이션) 또는 탈글리코실화될 수 있다. 아미노산은 본원에서 흔히 알려진 3철자 기호 또는 IUPAC-IUB Biochemical Nomenclature Commission에 의해 추천된 1철자 기호에 의해 지칭될 수 있다.

[0039] 천연-발생 아미노산은 유전 코드에 의해 암호화된 것뿐만 아니라 나중에 변형된 아미노산, 예를 들어 하이드록시프롤린, γ-카복시글루타메이트 및 O-포스포세린이다. 천연-발생 α-아미노산은 제한 없이 알라닌(Ala), 시스테인(Cys), 아스파르트산(Asp), 글루탐산(Glu), 페닐알라닌(Phe), 글리신(Gly), 히스티딘(His), 이소류신(Ile), 아르기닌(Arg), 리신(Lys), 류신(Leu), 메티오닌(Met), 아스파라긴(Asn), 프롤린(Pro), 글루타민(Gln), 세린(Ser), 트레오닌(Thr), 발린(Val), 트립토판(Trp), 티로신(Tyr) 및 이들의 조합을 포함한다. 천연-발생 α-아미노산의 입체이성질체는 제한 없이 D-알라닌(D-Ala), D-시스테인(D-Cys), D-아스파르트산(D-Asp), D-글루탐산(D-Glu), D-페닐알라닌(D-Phe), D-히스티딘(D-His), D-이소류신(D-Ile), D-아르기닌(D-Arg), D-리신(D-Lys), D-류신(D-Leu), D-메티오닌(D-Met), D-아스파라긴(D-Asn), D-프롤린(D-Pro), D-글루타민(D-Gln), D-세린(D-Ser), D-트레오닌(D-Thr), D-발린(D-Val), D-트립토판(D-Trp), D-티로신(D-Tyr) 및 이들의 조합을 포함한다.

[0040] 천연-발생 아미노산은 번역후 변형에 의해 단백질에서 발견된 것, 예컨대 시트룰린(Cit)을 포함한다.



[0041] 비천연(비-천연 발생) 아미노산은 제한 없이 천연-발생 아미노산과 유사한 방식으로 기능하는 L-구성 또는 D-구성 중 어느 하나의 아미노산 유사체, 아미노산 모방체, 합성 아미노산, N-치환된 글리신 및 N-메틸 아미노산을 포함한다. 예를 들면, "아미노산 유사체"는 천연 발생 아미노산과 동일한 기본 화학 구조(즉, 수소, 카복실 기, 아미노산 기에 결합된 탄소)를 갖지만 변형된 측쇄 기 또는 변형된 펩타이드 골격을 갖는 비천연 아미노산, 예를 들면 호모세린, 노르류신, 메티오닌 설폭사이드 및 메티오닌 메틸 설포늄일 수 있다. "아미노산 모방체"는 아미노산의 일반 화학 구조와 다르지만, 천연-발생 아미노산과 유사한 방식으로 기능하는 화학 화합물을 지칭한다.

[0042] "링커"는 화합물 또는 물질에서 2개 이상의 모이어티를 공유 결합시키는 작용기를 지칭한다. 예를 들어, 연결 모이어티는 면역접합체에서 항체 작제물에 아류반트 모이어티를 공유 결합시키는 역할을 할 수 있다.

[0043] "연결 모이어티"는 화합물 또는 물질에서 2개 이상의 모이어티를 공유 결합시키는 작용기를 지칭한다. 예를 들어, 연결 모이어티는 면역접합체에서 항체에 아류반트 모이어티를 공유 결합시키는 역할을 할 수 있다. 연결 모이어티를 단백질 및 다른 재료에 연결하기 위해 유용한 결합은 아마이드, 아민, 에스테르, 카바메이트, 우레아, 티오에테르, 티오카바메이트, 티오카보네이트 및 티오우레아를 포함하지만, 이들로 제한되지는 않는다.

[0044] "2가"는 2개의 작용기를 연결하기 위한 2개의 부착점을 함유하는 화학 모이어티를 지칭하고; 다가 연결 모이어티는 추가의 작용기를 연결하기 위한 추가 부착점을 가질 수 있다. 2가 라디칼은 접미사 "디일"로 표시될 수 있다. 예를 들면, 2가 연결 모이어티는 2가 중합체 모이어티, 예컨대 2가 폴리(에틸렌 글리콜), 2가 사이클로알킬, 2가 헤테로사이클로알킬, 2가 아릴 및 2가 헤테로아릴 기를 포함한다. "2가 사이클로알킬, 헤테로사이클로알킬, 아릴 또는 헤테로아릴 기"는 분자 또는 재료에서 2개의 모이어티를 공유 연결하기 위한 2개의 부착점을 갖는 사이클로알킬, 헤테로사이클로알킬, 아릴 또는 헤테로아릴 기를 지칭한다. 사이클로알킬, 헤테로사이클로알킬, 아릴 또는 헤테로아릴 기는 치환되거나 비치환될 수 있다. 사이클로알킬, 헤테로사이클로알킬, 아릴 또는 헤테로아릴 기는 할로, 하이드록시, 아미노, 알킬아미노, 아미도, 아실, 니트로, 시아노 및 알콕시로부터 선택된 하나 이상의 기로 치환될 수 있다.

[0045] 물결선("~~~~")은 명시된 화학적 모이어티의 부착 지점을 나타낸다. 명시된 화학적 모이어티에 2개의 물결선

("  ")이 있는 경우, 화학적 모이어티는 양방향으로 사용될 수 있으며, 즉, 왼쪽에서 오른쪽으로 또는 오른쪽에서 왼쪽으로 읽을 수 있음이 이해될 것이다. 일부 구현예에서, 2개의 물결선("  ")이 있는 명시된 모이어티는 왼쪽에서 오른쪽으로 읽을 때 사용되는 것으로 간주된다.

[0046] "알킬"은 표시된 탄소 원자의 수를 갖는 직선(선형) 또는 분지형의 포화된 지방족 라디칼을 지칭한다. 알킬은 임의의 수, 예를 들면 1개 내지 12개의 탄소를 포함할 수 있다. 알킬 기의 예는 메틸 (Me, -CH<sub>3</sub>), 에틸(Et, -CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 1-프로필(n-Pr, n-프로필, -CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 2-프로필(i-Pr, i-프로필, -CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 1-부틸(n-Bu, n-부틸, -CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 2-메틸-1-프로필 (i-Bu, i-부틸, -CH<sub>2</sub>CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 2-부틸(s-Bu, s-부틸, -CH(CH<sub>3</sub>)CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 2-메틸-2-프로필 (t-Bu, t-부틸, -C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 1-펜틸 (n-펜틸, -CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 2-펜틸 (-CH(CH<sub>3</sub>)CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 3-펜틸 (-CH(CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 2-메틸-2-부틸 (-C(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 3-메틸-2-부틸 (-CH(CH<sub>3</sub>)CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 3-메틸-1-부틸 (-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 2-메틸-1-부틸 (-CH<sub>2</sub>CH(CH<sub>3</sub>)CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 1-헥실 (-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 2-헥실 (-CH(CH<sub>3</sub>)CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 3-헥실 (-CH(CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>)(CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>)), 2-메틸-2-펜틸 (-C(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 3-메틸-2-펜틸 (-CH(CH<sub>3</sub>)CH(CH<sub>3</sub>)CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 4-메틸-2-펜틸 (-CH(CH<sub>3</sub>)CH<sub>2</sub>CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 3-메틸-3-펜틸 (-C(CH<sub>3</sub>)(CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 2-메틸-3-펜틸 (-CH(CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>)CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 2,3-디메틸-2-부틸 (-C(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 3,3-디메틸-2-부틸 (-CH(CH<sub>3</sub>)C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 1-헵틸, 1-옥틸 등을 포함하지만, 이들로 제한되지는 않는다. 알킬 기는 치환되거나 비치환될 수 있다. "치환된 알킬" 기는 할로, 하이드록시, 아미노, 옥소(=O), 알킬아미노, 아미도, 아실, 니트로, 시아노, 및 알콕시로부터 선택된 하나 이상의 기로 치환될 수 있다.

[0047] 용어 "알킬디일"은 2가 알킬 라디칼을 지칭한다. 알킬디일 기의 예는 메틸렌(-CH<sub>2</sub>-), 에틸렌(-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-), 프로필렌(-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-) 등을 포함하지만, 이들로 제한되지는 않는다. 알킬디일 기는 또한 "알킬렌" 기로 지칭될 수 있다.

[0048] "알케닐"은 표시된 탄소 원자의 수 및 적어도 하나의 탄소-탄소 이중 결합, sp<sup>2</sup>를 갖는 직선형(선형) 또는 분지형, 불포화, 지방족, 라디칼을 지칭한다. 알케닐은 2개 내지 약 12개 이상의 탄소 원자를 포함할 수 있다. 알케닐 기는 "시스" 및 "트랜스" 배향 또는 대안적으로 "E" 및 "Z" 배향을 갖는 라디칼이다. 예는 에틸레닐 또는 비닐(-CH=CH<sub>2</sub>), 알릴(-CH<sub>2</sub>CH=CH<sub>2</sub>), 부테닐, 펜테닐, 및 이들의 이성질체를 포함하지만 이들로 제한되지는 않는다. 알케닐 기는 치환되거나 비치환될 수 있다. "치환된 알케닐" 기는 할로, 하이드록시, 아미노, 옥소(=O), 알킬아미노, 아미도, 아실, 니트로, 시아노 및 알콕시로부터 선택된 하나 이상의 기로 치환될 수 있다.

[0049] 용어 "알케닐렌" 또는 "알케닐디일"은 선형 또는 분지쇄 2가 탄화수소 라디칼을 지칭한다. 예는 에틸레닐렌 또는 비닐렌(-CH=CH-), 알릴(-CH<sub>2</sub>CH=CH-) 등을 포함하지만, 이들로 제한되지는 않는다.

[0050] "알키닐"은 표시된 탄소 원자의 수 및 적어도 하나의 탄소-탄소 삼중 결합, sp를 갖는 직선형(선형) 또는 분지형, 불포화, 지방족, 라디칼을 지칭한다. 알키닐은 2개 내지 약 12개 이상의 탄소 원자를 포함할 수 있다. 예를 들면, C<sub>2</sub>-C<sub>6</sub> 알키닐은 에티닐(-C≡CH), 프로피닐(프로파길, -CH<sub>2</sub>C≡CH), 부티닐, 펜티닐, 헥시닐 및 이들의 이성질체를 포함하지만, 이들로 제한되지는 않는다. 알키닐 기는 치환되거나 비치환될 수 있다. "치환된 알키닐" 기는 할로, 하이드록시, 아미노, 옥소(=O), 알킬아미노, 아미도, 아실, 니트로, 시아노 및 알콕시로부터 선택된 하나 이상의 기로 치환될 수 있다.

[0051] 용어 "알키닐렌" 또는 "알키닐디일"은 2가 알키닐 라디칼을 지칭한다.

[0052] 용어 "카보사이클", "카보사이클릴", "탄소고리형 고리" 및 "사이클로알킬"은 3개 내지 12개의 고리 원자 또는 표시된 원자의 수를 포함하는 포화 또는 부분적 불포화된, 단일고리형, 융합된 이중고리형 또는 브리지된 다중고리형 고리 어셈블리를 지칭한다. 포화 단일고리형 탄소고리형 고리는, 예를 들어, 사이클로프로필, 사이클로부틸, 사이클로펜틸, 사이클로헥실 및 사이클로옥틸을 포함한다. 포화 이중고리형 및 다중고리형 탄소고리형 고리는 예를 들면 노르보르난, [2.2.2] 바이사이클로옥탄, 데카하이드로나프탈렌 및 아다만탄을 포함한다. 탄소고리형 기는 또한 고리에서 하나 이상의 이중 또는 삼중 결합을 가지며 부분적으로 불포화될 수 있다. 부분 불포화된 대표적인 탄소고리형 기는 사이클로부텐, 사이클로펜텐, 사이클로헥센, 사이클로헥사디엔(1,3- 및 1,4-이성질체), 사이클로헵텐, 사이클로헵타디엔, 사이클로옥텐, 사이클로옥타디엔(1,3-, 1,4- 및 1,5-이성질체), 노

르보르넨 및 노르보르나디엔을 포함하지만, 이들로 제한되지는 않는다.

- [0053] 용어 "사이클로알킬디일"은 2가 사이클로알킬 라디칼을 지칭한다.
- [0054] "아릴"은 모 방향족 고리 시스템의 단일 탄소 원자로부터 하나의 수소 원자의 제거에 의해 유래된 6개 내지 20개의 탄소 원자( $C_6-C_{20}$ )의 1가 방향족 탄화수소 라디칼을 지칭한다. 아릴 기는 이중고리형 또는 삼중고리형 기를 형성하기 위해 융합되거나 또는 바이아릴 기를 형성하기 위해 결합에 의해 연결되는 단일고리형일 수 있다. 대표적인 아릴 기는 페닐, 나프틸 및 바이페닐을 포함한다. 다른 아릴 기는 메틸렌 연결 기를 갖는 벤질을 포함한다. 일부 아릴 기는 페닐, 나프틸 또는 바이페닐과 같이 6개 내지 12개의 고리 구성원을 갖는다. 다른 아릴 기는 페닐 또는 나프틸과 같이 6개 내지 10개의 고리 구성원을 갖는다.
- [0055] 용어 "아릴렌" 또는 "아릴디일"은 모 방향족 고리 시스템의 2개의 탄소 원자로부터 2개의 수소 원자의 제거에 의해 유래된 6개 내지 20개의 탄소 원자( $C_6-C_{20}$ )의 2가 방향족 탄화수소 라디칼을 의미한다. 일부 아릴디일 기는 예시적인 구조에서 "Ar"로 표시된다. 아릴디일은 포화, 부분적 불포화된 고리 또는 방향족 탄소고리형 고리에 융합된 방향족 고리를 포함하는 이중고리형 라디칼을 포함한다. 전형적인 아릴디일 기는 벤젠(페닐디일), 치환된 벤젠, 나프탈렌, 안트라센, 바이페닐렌, 인덴일렌, 인단일렌, 1,2-디하이드로나프탈렌, 1,2,3,4-테트라하이드로나프틸 등으로부터 유래된 라디칼을 포함하지만, 이들로 제한되지 않는다. 아릴디일 기는 또한 "아릴렌"으로도 지칭되며, 본원에 기재된 하나 이상의 치환체로 선택적으로 치환된다.
- [0056] 용어 "헤테로사이클", "헤테로사이클릴" 및 "헤테로고리형 고리"는 본원에서 상호교환적으로 사용되고, 3개 내지 약 20개의 고리 원자의 포화 또는 부분적 불포화(즉, 고리 내에 하나 이상의 이중 및/또는 삼중 결합을 가짐) 탄소고리형 라디칼을 지칭하며, 여기서 적어도 하나의 고리 원자는 질소, 산소, 인 및 황으로부터 선택되는 헤테로원자이고, 나머지 고리 원자는 C이고, 하나 이상의 고리 원자는 아래 기재된 하나 이상의 치환체로 독립적으로 선택적으로 치환된다. 헤테로사이클은 3개 내지 7개의 고리 구성원(2개 내지 6개의 탄소 원자 및 N, O, P 및 S로부터 선택된 1개 내지 4개의 이중원자)을 갖는 단환 또는 7개 내지 10개의 고리 구성원(4개 내지 9개의 탄소 원자 및 N, O, P 및 S로부터 선택된 1개 내지 6개의 이중원자)을 갖는 이환, 예를 들면 바이사이클로 [4,5], [5,5], [5,6] 또는 [6,6] 시스템일 수 있다. 헤테로사이클은 Paquette, Leo A.; "Principles of Modern Heterocyclic Chemistry" (W.A. Benjamin, New York, 1968), particularly Chapters 1, 3, 4, 6, 7, and 9; "The Chemistry of Heterocyclic Compounds, A series of Monographs" (John Wiley & Sons, New York, 1950 to present), in particular Volumes 13, 14, 16, 19, and 28; 및 J. Am. Chem. Soc. (1960) 82:5566에 기재되어 있다. "헤테로사이클릴"은 또한 헤테로사이클 라디칼이 포화, 부분적 불포화 고리 또는 방향족 탄소고리형 또는 헤테로고리형 고리와 융합된 라디칼을 포함한다. 헤테로고리형 고리의 예는 모폴린-4-일, 피페리딘-1-일, 피페라진일, 피페라진-4-일-2-온, 피페라진-4-일-3-온, 피롤리딘-1-일, 티오모폴린-4-일, S-디옥스티오모폴린-4-일, 아조칸-1-일, 아제티딘-1-일, 옥타하이드로피리도[1,2-a]피라진-2-일, [1,4]디아제판-1-일, 피롤리딘일, 테트라하이드로퓨란일, 디하이드로퓨란일, 테트라하이드로티엔일, 테트라하이드로피란일, 디하이드로피란일, 테트라하이드로티오피란일, 피페리디노, 모폴리노, 티오모폴리노, 티옥산일, 피페라진일, 호모피페라진일, 아제티딘일, 옥세탄일, 티에탄일, 호모피페리딘일, 옥세판일, 티에판일, 옥사제핀일, 디아제핀일, 티아제핀일, 2-피롤린일, 3-피롤린일, 인돌린일, 2H-피란일, 4H-피란일, 디옥산일, 1,3-디옥소란일, 피라졸린일, 디티안일, 디티오퐼란일, 디하이드로피란일, 디하이드로티엔일, 디하이드로퓨란일, 피라졸리딘일이미다졸린일, 이미다졸리딘일, 3-아자바이사이클로[3.1.0]헥산일, 3-아자바이사이클로[4.1.0]헥탄일, 아자바이사이클로[2.2.2]헥산일, 3H-인돌일 퀴놀리진일 및 N-피리딜 우레아를 포함하지만, 이들로 제한되지 않는다. 스피로 헤테로사이클릴 모이어티는 또한 이 정의의 범위 내에 포함된다. 스피로 헤테로사이클릴 모이어티의 예는 아자스피로[2.5]옥타닐 및 아자스피로[2.4]헥타닐을 포함한다. 2개의 고리 원자가 옥소(=O) 모이어티로 치환된 헤테로고리형 기의 예는 피리미디노닐 및 1,1-디옥소-티오모르폴리닐이다. 본원에서 헤테로사이클 기는 본원에 기재된 하나 이상의 치환체로 독립적으로 선택적으로 치환된다.
- [0057] 용어 "헤테로사이클릴디일"은 3 내지 약 20개의 고리 원자의 2가, 포화 또는 부분 불포화(즉, 고리 내에 하나 이상의 이중 및/또는 삼중 결합을 가짐) 탄소고리형 라디칼을 지칭하며, 이는 적어도 하나의 고리 원자는 질소, 산소, 인 및 황으로부터 선택된 헤테로원자이고, 나머지 고리 원자는 C이고, 여기서 하나 이상의 고리 원자는 기재된 바와 같은 하나 이상의 치환체로 독립적으로 선택적으로 치환된다. 5원 및 6원 헤테로사이클릴디일의 예는 모르폴리닐디일, 피페리디닐디일, 피페라지닐디일, 피롤리디닐디일, 디옥사닐디일, 티오모르폴리닐디일 및 S-디옥스티오모르폴리닐디일을 포함한다.
- [0058] 용어 "헤테로아릴"은 5원, 6원 또는 7원 고리의 1가 방향족 라디칼을 지칭하고, 질소, 산소 및 황으로부터 독립

적으로 선택된 하나 이상의 이종원자를 함유하는 5개 내지 20개의 원자의 융합된 고리계(이들의 적어도 하나는 방향족임)를 포함한다. 헤테로아릴 기의 예는 피리디닐(예를 들면, 2-하이드록시피리디닐을 포함함), 이미다졸릴, 이미다조피리디닐, 피리미디닐(예를 들면, 4-하이드록시피리미디닐을 포함함), 피라졸릴, 트리아졸릴, 피라지닐, 테트라졸릴, 푸릴, 티에닐, 이속사졸릴, 티아졸릴, 옥사디아졸릴, 옥사졸릴, 이소티아졸릴, 피롤릴, 퀴놀리닐, 이소퀴놀리닐, 테트라하이드로이소퀴놀리닐, 인돌릴, 벤즈이미다졸릴, 벤조푸라닐, 신놀리닐, 인다졸릴, 인돌리지닐, 프탈라지닐, 피리다지닐, 트리아지닐, 이소인돌릴, 프테리디닐, 푸리닐, 옥사디아졸릴, 티아디아졸릴, 티아디아졸릴, 푸라자닐, 벤조푸라자닐, 벤조티오펜닐, 벤조티아졸릴, 벤족사졸릴, 키나졸리닐, 퀴녹살리닐, 나프티리디닐 및 푸로피리디닐이다. 헤테로아릴 기는 본원에 기재된 하나 이상의 치환체로 선택적으로 독립적으로 치환된다.

[0059] 용어 "헤테로아릴디일"은 5원, 6원 또는 7원 고리의 2가 방향족 라디칼을 지칭하고, 질소, 산소 및 황으로부터 독립적으로 선택된 하나 이상의 이종원자를 함유하는 5-20개의 원자의 융합된 고리계(이들의 적어도 하나는 방향족임)를 포함한다. 5-원 및 6-원 헤테로아릴디일의 예는 피리디디일, 이미다졸일디일, 피리미딘일디일, 피라졸일디일, 트리아졸일디일, 피라진일디일, 테트라졸일디일, 푸릴디일, 티엔일디일, 이속사졸일디일디일, 티아졸일디일, 옥사디아졸일디일, 옥사졸일디일, 아이소티아졸일디일 및 피롤일디일을 포함한다.

[0060] 헤테로사이클 또는 헤테로아릴 기는 이것이 가능하면 탄소 결합(탄소-연결된) 또는 질소(질소-연결된) 결합될 수 있다. 비제한적으로 예를 들면, 탄소 결합된 헤테로사이클 또는 헤테로아릴은 피리딘의 위치 2, 3, 4, 5 또는 6, 피리다진의 위치 3, 4, 5 또는 6, 피리미딘의 위치 2, 4, 5 또는 6, 피라진의 위치 2, 3, 5 또는 6, 푸란, 테트라하이드로푸란, 티오푸란, 티오펜, 피롤 또는 테트라하이드로피롤의 위치 2, 3, 4 또는 5, 옥사졸, 이미다졸 또는 티아졸의 위치 2, 4 또는 5, 이속사졸, 피라졸 또는 이소티아졸의 위치 3, 4 또는 5, 아지리딘의 위치 2 또는 3, 아제티딘의 위치 2, 3 또는 4, 퀴놀린의 위치 2, 3, 4, 5, 6, 7 또는 8 또는 이소퀴놀린의 위치 1, 3, 4, 5, 6, 7 또는 8에서 결합된다.

[0061] 비제한적으로 예를 들면, 질소 결합된 헤테로사이클 또는 헤테로아릴은 아지리딘, 아제티딘, 피롤, 피롤리딘, 2-피롤린, 3-피롤린, 이미다졸, 이미다졸리딘, 2-이미다졸린, 3-이미다졸린, 피라졸, 피라졸린, 2-피라졸린, 3-피라졸린, 피페리딘, 피페라진, 인돌, 인돌린, 1H-인다졸의 위치 1, 이소인돌 또는 이소인돌린의 위치 2, 모르폴린의 위치 4 및 카바졸의 위치 9 또는 β-카볼린에서 결합된다.

[0062] 용어 "할로" 및 "할로젠"은 홀로 또는 또 다른 치환체의 일부로서 불소, 염소, 브롬 또는 요오드 원자를 지칭한다.

[0063] 용어 "카보닐"은 홀로 또는 또 다른 치환체의 일부로서 C(=O) 또는 -C(=O)-, 즉 산소에 이중-결합되고 카보닐을 갖는 모이어티에서 2개의 다른 기에 결합된 탄소 원자를 지칭한다.

[0064] 본원에 사용된 것과 같이, "4차 암모늄염"이라는 구절은 알킬 치환기(예를 들면, C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub> 알킬, 예컨대 메틸, 에틸, 프로필 또는 부틸)로 4급화된 3차 아민을 지칭한다.

[0065] 용어 "치료한다", "치료" 및 "치료하는"은 임의의 객관적 또는 주관적 매개변수를 포함하는 손상, 병리학, 병태(예를 들면, 암) 또는 증상(예를 들면, 인지 장애)의 치료 또는 완화의 임의의 연속 표지, 예컨대 감소; 관해; 증상의 감소 또는 증상, 손상, 병리학 또는 병태가 환자에게 더 관용적이게 하는 것; 증상 진행 속도의 감소; 증상 또는 병태의 빈도 또는 지속기간의 감소; 또는 일부 경우에 증상의 발생의 예방을 지칭한다. 증상의 치료 또는 완화는 예를 들면 신체 검사의 결과를 포함하는 임의의 객관적 또는 주관적 매개변수에 기초할 수 있다.

[0066] 용어 "암", "신생물" 및 "종양"은, 세포가 세포 증식에 대한 유의한 제어 손실을 특징으로 하는 비정상 성장 표현형을 나타내도록, 자율적 비조절된 성장을 나타내는 세포를 지칭하도록 본원에서 사용된다. 본 발명의 맥락에서 검출, 분석 및/또는 치료를 위한 관심 있는 세포는 암 세포(예를 들면, 암을 갖는 개체로부터의 암 세포), 악성 암 세포, 전전이성 암 세포, 전이성 암 세포 및 비전이성 암 세포를 포함한다. 실제로 모든 조직의 암이 알려져 있다. "암 부담"이라는 구절은 대상체에서의 암 세포 또는 암 부피의 양자를 지칭한다. 암 부피를 감소시키는 것은 따라서 대상체에서 암 세포 또는 암 세포 부피의 수를 감소시키는 것을 지칭한다. 본원에 사용된 것과 같은 용어 "암 세포"는 암 세포이거나(예를 들면, 개체가 치료될 수 있는 임의의 암으로부터의, 예를 들면 암을 갖는 개체로부터 단리된), 암 세포, 예를 들면 암 세포의 클론으로부터 유래된 임의의 세포를 지칭한다. 예를 들면, 암 세포는 확립된 암 세포주 유래일 수 있거나, 암을 갖는 개체로부터 단리된 1차 세포일 수 있거나, 암을 갖는 개체로부터 단리된 1차 세포로부터의 자손 세포 및 기타일 수 있다. 일부 구현예에서, 용어는 또한 암 세포의 부분, 예컨대 세포이하 부분, 세포막 부분 또는 암 세포의 세포 용해물을 지칭할 수 있다.

고형 종양, 예컨대 암종, 육종, 교모세포종, 흑색종, 림프종 및 골수종 및 순환 암, 예컨대 백혈병을 포함하는 많은 유형의 암이 당업자에게 알려져 있다.

- [0067] 본원에 사용된 것과 같이, 용어 "암"은 비제한적인 예로서 고형 종양 암(예를 들면, 피부, 폐, 전립선, 유방, 위, 방광, 결장, 난소, 췌장, 신장, 간, 교모세포종, 수모세포종, 평활근육종, 두경부 편평 세포 암종, 흑색종 및 신경내분비) 및 액체 암(예를 들면, 조혈 암); 암종; 연조직 종양; 육종; 기형종; 흑색종; 백혈병; 림프종; 및 최소 잔류 질환을 포함하고 원발성 종양 및 전이성 종양 둘 다를 포함하는 뇌암을 포함하는 임의의 형태의 암을 포함한다.
- [0068] "PD-L1 발현"은 세포의 표면에 PD-L1 수용체를 갖는 세포를 지칭한다. 본원에서 사용되는 "PD-L1 과발현"은 상응하는 비-암세포와 비교하여 더 많은 PD-L1 수용체를 갖는 세포를 지칭한다.
- [0069] "HER2"는 단백질 인간 상피 성장 인자 수용체 2를 지칭한다.
- [0070] "HER2 발현"은 세포의 표면에 HER2 수용체를 갖는 세포를 지칭한다. 예를 들어, 세포는 세포의 표면에 약 20,000개 내지 약 50,000개의 HER2 수용체를 가질 수 있다. 본원에서 사용되는 "HER2 과발현"은 약 50,000개 초과 HER2 수용체를 갖는 세포를 지칭한다. 예를 들어, 세포는 상응하는 비-암세포(예를 들어, 약 1 또는 2백만 개의 HER2 수용체)와 비교하여 HER2 수용체의 수의 2배, 5배, 10배, 100배, 1,000배, 10,000배, 100,000배 또는 1,000,000배이다. HER2는 유방암의 약 25% 내지 약 30%에서 과발현되는 것으로 추정된다.
- [0071] 암의 "병원균"은 환자의 웰빙을 손상시키는 모든 현상을 포함한다. 이것은 제한 없이 비정상 또는 제어되지 않는 세포 성장, 전이, 이웃하는 세포의 정상 기능의 방해, 비정상 수준의 사이토카인 또는 다른 분비 생성물의 방출, 염증성 또는 면역학적 반응의 억제 또는 악화, 신생물, 전악성상태, 악성상태 및 둘러싼 또는 먼 조직 또는 장기, 예컨대 림프절의 침윤을 포함한다.
- [0072] 본원에 사용된 것과 같이, 구절 "암 재발" 및 "종양 재발" 및 이의 문법적 변형어는 암의 진단 후 신생물 세포 또는 암성 세포의 추가의 성장을 지칭한다. 특히, 재발은 암성 조직에서의 추가의 암성 세포 성장이 발생할 때 발생할 수 있다. "종양 분산"은 유사하게 종양의 세포가 국소 또는 먼 조직 및 장기로 퍼질 때 발생하고, 따라서, 종양 분산은 종양 전이를 포함한다. "종양 침윤"은 정상 장기 기능의 압축, 파괴 또는 예방에 의해 관여된 조직의 기능을 손상시키도록 종양 성장이 국소로 분산할 때 발생한다.
- [0073] 본원에 사용된 것과 같이, 용어 "전이"는 원래의 암성 종양의 장기와 직접 연결되지 않은 장기 또는 신체 부분에서의 암성 종양의 성장을 지칭한다. 전이는 원래의 암성 종양의 장기와 직접 연결되지 않은 장기 또는 신체 부분에서의 암성 세포의 검출 불가능한 양의 존재인 미세전이를 포함하는 것으로 이해될 것이다. 전이는 또한 몇몇 과정 단계, 예컨대 원래의 종양 부위로부터의 암 세포의 출발 및 암 세포의 다른 신체 부분으로의 이동 및 /또는 침윤으로서 정의될 수 있다.
- [0074] 구절 "유효량" 및 "치료학적 유효량"은 이것이 투여되는 치료학적 효과를 생성하는 면역접합체와 같은 물질의 용량 또는 양을 지칭한다. 정확한 용량은 치료의 목적에 따라 달라질 것이고, 알려진 기법을 사용하여 당업자에 의해 확인될 것이다(예를 들어, Lieberman, *Pharmaceutical Dosage Forms* (vols. 1-3, 1992); Lloyd, *The Art, Science and Technology of Pharmaceutical Compounding* (1999); Pickar, *Dosage Calculations* (1999); Goodman & Gilman's *The Pharmacological Basis of Therapeutics*, 11<sup>th</sup> Edition (McGraw-Hill, 2006); 및 Remington: *The Science and Practice of Pharmacy*, 22<sup>nd</sup> Edition, (Pharmaceutical Press, London, 2012) 참조). 암의 경우에, 면역접합체의 치료학적 유효량은 암 세포의 수를 감소시키고/시키거나; 종양 크기를 감소시키고/시키거나; 말초 장기로의 암 세포 침윤을 억제하고/하거나(즉, 약간의 정도로 느리게 하고 바람직하게는 중단시키고/시키거나); 종양 전이를 억제하고/하거나(즉, 약간의 정도로 느리게 하고 바람직하게는 중단시키고/시키거나); 어느 정도로 종양 성장을 억제시키고/시키거나, 어느 정도로 암과 연관된 증상의 하나 이상을 완화시킬 수 있다. 면역접합체가 성장을 예방하고/하거나 이미 있는 암 세포를 사멸할 수 있는 정도로, 이것은 세포 증식억제 및/또는 세포독성일 수 있다. 암 치료를 위해, 효능은 예를 들면 질환 진행에 대한 시간(TTP)을 평가하고/하거나 반응률(RR)을 결정함으로써 측정될 수 있다.
- [0075] "수혜자", "개체", "대상체", "숙주" 및 "환자"는 상호교환 가능하게 사용되고, 진단, 치료 또는 치료법이 원하는 임의의 포유동물 대상체(예를 들면, 인간)를 지칭한다. 치료학적 목적을 위해 "포유동물"은 인간, 가축 및 농장 동물 및 동물원, 스포츠 또는 애완 동물, 예컨대 개, 말, 고양이, 소, 양, 염소, 돼지, 낙타 등을 포함하는 포유동물로서 분류된 임의의 동물을 지칭한다. 특정 구현예에서, 포유동물은 인간이다.

- [0076] 본 발명의 맥락에서 "상승적 아류반트" 또는 "상승적 조합"은 2개의 면역 조절제, 예컨대 수용체 효능제, 사이토카인 및 아류반트 폴리펩타이드의 조합을 포함하고, 조합으로 단독으로 투여되는 것에 비해 면역력에 대한 상승 효력을 일으킨다. 특히, 본원에 개시된 면역접합체는 청구된 아류반트 및 항체 작제물의 상승적 조합을 포함한다. 투여 시 이 상승적 조합은 예를 들면 항체 작제물 또는 아류반트가 다른 모이어티의 부재 하에 투여될 때에 비해 면역력에 대한 더 큰 효과를 일으킨다. 추가로, 감소된 양의 면역접합체는 항체 작제물 또는 아류반트 중 어느 하나가 단독으로 투여될 때와 비교하여 (항체 작제물의 총 수 또는 면역접합체의 일부로서 투여된 아류반트의 총 수에 의해 측정된 것과 같이) 투여될 수 있다.
- [0077] 본원에 사용된 것과 같이, 용어 "투여하는"은 대상체에 대한 비경구, 정맥내, 복강내, 근육내, 종양내, 병변내, 비강내 또는 피하 투여, 경구 투여, 좌제로서의 투여, 국소 접촉, 척추강내 투여 또는 서방 장치, 예를 들면 미니-삼투압 펌프의 이식을 지칭한다.
- [0078] 숫자 값을 수식하기 위해 본원에 사용된 것과 같은 용어 "약" 및 "대략"은 숫자 값을 둘러싼 가까운 범위를 나타낸다. 따라서, "X"가 값이면, "약 X" 또는 "대략 X"는 0.9X 내지 1.1X, 예를 들면 0.95X 내지 1.05X 또는 0.99X 내지 1.01X의 값을 나타낸다. "약 X" 또는 "대략 X"의 언급은 구체적으로 적어도 값 X, 0.95X, 0.96X, 0.97X, 0.98X, 0.99X, 1.01X, 1.02X, 1.03X, 1.04X 및 1.05X를 나타낸다. "약 X" 및 "대략 X"는 예를 들어 "0.98X"의 청구 제한에 대한 서술된 설명 뒷받침을 교시하고 제공하도록 의도된다.
- [0079] 항체
- [0080] 예시적인 구현예에서, 본 발명의 면역접합체는 PD-L1을 특이적으로 인식하고 이에 결합하는 항원 결합 도메인을 포함하는 항체 작제물을 포함한다.
- [0081] 예정사-리간드 1(Programmed Death-Ligand 1: PD-L1, 분화 클러스터 274, CD274, B7-상동체 1 또는 B7-H1)은 B7 단백질 슈퍼패밀리에 속하며, 예정 세포사 단백질 1(programmed cell death protein 1: PD-1, PDCD1, 분화 클러스터 279 또는 CD279)의 리간드이다. PD-L1은 또한 B7.1(CD80)과 상호작용할 수 있으며, 이러한 상호작용은 T 세포 프라임링(priming)을 저해하는 것으로 여겨진다. PD-L1/PD-1 축은 적응성 면역 반응을 억제하는 데 큰 역할을 한다. 보다 구체적으로, PD-L1과 이의 수용체 PD-1의 결합은 T-세포의 활성화 및 증식을 억제하는 신호를 전달하는 것으로 여겨진다. PD-L1에 결합하고 리간드가 PD-1 수용체에 결합하는 것을 예방하는 작용제는 이러한 면역억제를 예방하므로, 암 또는 감염의 치료와 같이 원하는 경우 면역 반응을 향상시킬 수 있다. PD-L1/PD-1 경로는 또한 자가면역을 예방하는 데 기여하므로, 면역 억제성 페이로드를 전달하는 PD-L1에 대한 효능제 또는 작용제는 자가면역 장애의 치료에 도움이 될 수 있다.
- [0082] 아테졸리주맵(TECENTRIQ™), 더발루맵(IMFINZI™) 및 아벨루맵(BAVENCIO™)을 포함하여 PD-L1을 표적화하는 여러 항체가 암의 치료를 위해 개발되었다. 그럼에도 불구하고, 높은 친화도로 PD-L1에 결합하고 PD-L1/PD-1 신호전달을 효과적으로 예방하는 작용제 및 PD-L1 발현 세포에 치료학적 페이로드를 전달할 수 있는 작용제를 포함하는 새로운 PD-L1 항체 작제물이 계속 필요하다. 또한, 자가면역 장애 및 감염을 치료하기 위한 새로운 PD-L1-결합제가 필요하다.
- [0083] PD-L1을 발현하는 세포에 TLR 작용제 페이로드를 전달하는 방법이 제공되며, 이는 하나 이상의 TLR 효능제 모이어티에 공유 부착된 링커에 공유 부착된 항-PD-L1 항체를 포함하는 면역접합체를 세포 또는 세포를 포함하는 포유동물에 투여하는 단계를 포함한다.
- [0084] 또한, 포유동물에서 면역 반응을 향상 또는 감소 또는 억제하는 방법 및 PD-L1 억제에 반응성인 포유동물에서 질환, 장애 또는 병태를 치료하는 방법이 제공되며, 상기 방법은 이의 PD-L1 면역접합체를 포유동물에 투여하는 단계를 포함한다.
- [0085] 본 발명은 면역글로불린 중쇄 가변 영역 폴리펩타이드 및 면역글로불린 경쇄 가변 영역 폴리펩타이드를 포함하는 PD-L1 항체를 제공한다. PD-L1 항체는 PD-L1에 특이적으로 결합한다. 항체의 결합 특이성은, 예를 들어, 치료학적 페이로드를 이러한 세포에 전달하기 위해 PD-L1 발현 세포를 표적화할 수 있게 한다. 일부 구현예에서, PD-L1 항체는 인간 PD-L1에 결합한다. 그러나, 임의의 PD-L1 단편, 상동체 또는 이원체에 결합하는 항체가 또한 포함된다.
- [0086] 일부 구현예에서, PD-L1 항체는 PD-L1이 이의 수용체인 PD-1에 결합하는 것을 실질적으로 억제 또는 예방하지 않고 PD-L1과 결합한다. 그러나, 다른 구현예에서, PD-L1 항체는 PD-L1이 이의 수용체인 PD-1에 결합하는 것을 완전히 또는 부분적으로 차단(저해 또는 방지)할 수 있으므로, 항체는 PD-L1/PD-1 신호전달을 억제하는 데 사용

될 수 있다(예를 들어, 치료학적 목적을 위해). 항체 또는 항원-결합 항체 단편은 PD-L1에 대해 단일특이적일 수 있거나, 또는 이중특이적 또는 다중특이적일 수 있다. 예를 들어, 2가 또는 다가 항체 또는 항체 단편에서, 결합 도메인은 동일한 항원의 상이한 에피토프를 표적화하거나 또는 상이한 항원을 표적화하는 것이 다를 수 있다. 다가 결합 작제물을 구축하는 방법은 당업계에 공지되어 있다. 이중특이적 및 다중특이적 항체는 당업계에 공지되어 있다. 또한, 너무 짧아서 동일한 폴리펩타이드 사슬 상의  $V_H$ 와  $V_L$  사이에서 페어링할 수 없는 펩타이드 링커에 의해  $V_L$ 에 연결된  $V_H$ 를 각각 포함하는 폴리펩타이드 사슬의 이량체, 삼량체 또는 사량체인 디아바디, 트리아바디 또는 테트라바디가 제공될 수 있으며, 이에 의해 상이한  $V_H$ - $V_L$  폴리펩타이드 사슬 상의 상보적 도메인 사이에 페어링을 유도하여 2개, 3개 또는 4개의 기능적 항원 결합 부위를 갖는 다량체 분자를 생성한다. 또한, 2개의 상이한 가변 도메인을 갖는 작은 scFv 단편인 비스-scFv 단편이 생성되어 2개의 상이한 에피토프에 결합할 수 있는 이중특이성 비스-scFv 단편을 생성할 수 있다. Fab 단편을 기반으로 하는 다중특이성 작제물을 생성하기 위해 Fab 이량체(Fab2) 및 Fab 삼량체(Fab3)가 유전자 조작 방법을 사용하여 생산될 수 있다.

- [0087] PD-L1 항체는 인간 항체, 비-인간 항체, 인간화 항체 또는 키메라 항체 또는 상응하는 항체 단편일 수 있거나 이들로부터 수득될 수 있다. "키메라" 항체는 전형적으로 인간 불변 영역 및 비-인간 가변 영역을 포함하는 항체 또는 이의 단편이다. "인간화" 항체는 전형적으로 인간 항체 스키토프를 포함하지만 적어도 하나의 CDR(예를 들어, 1개, 2개, 3개, 4개, 5개 또는 6개의 CDR 모두)에 비-인간 기원 아미노산 또는 서열을 포함하는 단일클론 항체이다.
- [0088] PD-L1 항체는 WO 2021/150701에 기재되고 참조에 의해 본원에 원용되어 있는 바와 같이 내재화될 수 있거나, 또는 PD-L1 항체는 WO 2021/150702에 기재되고 참조에 의해 본원에 원용되어 있는 바와 같이 비-내재화될 수 있다.
- [0089] 예시적인 구현예에서, 본 발명의 면역접합체는 HER2를 특이적으로 인식하고 이에 결합하는 항원 결합 도메인을 포함하는 항체 작제물을 포함한다.
- [0090] 다수의 항-HER2 단일클론 항체가 승인되어 임상 개발 중에 있다(Costa, RLB 등 (2020) *Breast Cancer* 6(10):1-11).
- [0091] 특정 구현예에서, 본 발명의 면역접합체는 실시예 201의 방법에 의해 제조된 것과 같은 항-HER2 항체를 포함한다. 본 발명의 일 구현예에서, 본 발명의 면역접합체의 항-HER2 항체는 참조 본원에 구체적으로 원용되는 US 5821337의 표 3에 기재되어 있는 바와 같은 인간화된 항-HER2 항체, 예를 들어, huMab4D5-1, huMab4D5-2, huMab4D5-3, huMab4D5-4, huMab4D5-5, huMab4D5-6, huMab4D5-7 및 huMab4D5-8을 포함한다. 이러한 항체는 HER2에 결합하는 쥐과 항체(4D5)의 상보성-결정 영역을 갖는 인간 프레임워크 영역을 포함한다. 인간화 항체 huMab4D5-8은 또한 상표명 HERCEPTIN™(Genentech, Inc.)으로 상업적으로 입수 가능한 트라스투주맵으로 지칭된다.
- [0092] 트라스투주맵(CAS 180288-69-1, huMab4D5-8, rhuMab HER2, HERCEPTIN®, Genentech, Inc.)은 세포-기반 검정 ( $K_d = 5nM$ )에서 HER2의 세포외 도메인에 높은 친화성으로 선택적으로 결합하는 무린 항-HER2 항체(4D5)의 인간화된 버전인 재조합 DNA-유래, IgG1 카파, 단일클론 항체이다(US 5677171; US 5821337; US 6054297; US 6165464; US 6339142; US 6407213; US 6639055; US 6719971; US 6800738; US 7074404; Coussens 등 (1985) *Science* 230:1132-9; Slamon 등 (1989) *Science* 244:707-12; Slamon 등 (2001) *New Engl. J. Med.* 344:783-792]).
- [0093] 본 발명의 구현예에서, 항체 작제물 또는 항원 결합 도메인은 트라스투주맵의 CDR 영역을 포함한다. 본 발명의 구현예에서, 항-HER2 항체는 트라스투주맵의 프레임워크 영역을 추가로 포함한다. 본 발명의 구현예에서, 항-HER2 항체는 트라스투주맵의 가변 영역 중 하나 또는 둘 모두를 추가로 포함한다.
- [0094] 본 발명의 또 다른 구현예에서, 본 발명의 면역접합체의 항-HER2 항체는 US 7862817에 기재된 바와 같은 인간화 항-HER2 항체, 예를 들어 인간화 2C4를 포함한다. 예시적인 인간화 2C4 항체는 퍼투주맵(CAS 등록 번호 380610-27-5), PERJETA™(Genentech, Inc.)이다. 퍼투주맵은 HER 이량체화 억제제(HDI)이며, 다른 HER 수용체(예컨대, EGFR/HER1, HER2, HER3 및 HER4)와 활성인 이중이량체 또는 동종이량체를 형성하는 HER2의 능력을 억제하는 기능을 한다. 예를 들어, Harari 및 Yarden, *Oncogene* 19:6102-14 (2000); Yarden 및 Sliwkowski. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2:127-37 (2001); Sliwkowski *Nat Struct Biol* 10:158-9 (2003); Cho 등 *Nature* 421:756-60 (2003); 및 Malik 등 *Pro Am Soc Cancer Res* 44:176-7 (2003). PERJETA™은 유방암의 치료제로 승인되었다. 본 발명의 구현예에서, 항체 작제물 또는 항원 결합 도메인은 퍼투주맵의 CDR 영역을 포함한다. 본 발명의 구현예

에서, 항-HER2 항체는 퍼투주맙의 프레임워크 영역을 추가로 포함한다. 본 발명의 구현예에서, 항-HER2 항체는 퍼투주맙의 가변 영역 중 하나 또는 둘 모두를 추가로 포함한다.

- [0095] 마르케특시맙(MGAH22, MARGENZA™, MacroGenics, Inc.), CAS 등록 번호 1350624-75-7은 FDA 승인을 받은 항-HER2 단일클론 항체이다. 마르케특시맙의 Fc 영역은 활성화 Fc.감마.R에 대한 결합은 증가하지만 면역 이펙터 세포 상의 억제성 Fc.감마.Rs에 대한 결합은 감소하도록 최적화되었다(Nordstrom, JL, 등 (2011) *Breast Cancer Res.* 13(6):R123; Rugo, HS, 등 (2021) *JAMA Oncol.*;7(4):573-584; Markham, A. (2021) *Drugs* 81:599-604). 마르케특시맙은 종양이 면역조직화학에 의해 2+ 수준에서 HER2를 발현하고 FISH에 의한 HER2 유전자 증폭의 증거가 부족한 재발성 또는 불응성 진행성 유방암 환자의 치료를 위해 FDA에 의해 승인을 받았다.
- [0096] HT-19는 트라스투주맙 또는 퍼투주맙의 에피토프와는 다른 인간 HER2의 에피토프에 결합하는 또 다른 항-HER2 단일클론 항체이다. HT-19는 트라스투주맙과 비슷하게 HER2 신호전달을 억제하고 트라스투주맙 및 퍼투주맙과 함께 HER2 분해를 향상시키는 것으로 나타났다. XMT-1522는 HT-19 항체를 포함하는 항체-약물 접합체이다 (Bergstrom D. A. 등, (2015) *Cancer Res.*; 75:LB-231).
- [0097] 예시적인 구현예에서, 본 발명의 면역접합체는 CEA를 특이적으로 인식하고 이에 결합하는 항원 결합 도메인을 포함하는 항체 작제물을 포함한다. CD66e(분화 클러스터 66e)로도 알려져 있는 암배아 항원-관련 세포 부착 분자 5(CEACAM5)는 암배아 항원(CEA) 유전자 패밀리의 구성원이다.
- [0098] 암배아 항원(CEA, CD66e, CEACAM5)의 상승된 발현은 종양 형성의 다양한 생물학적 양태, 특히 종양 세포 부착, 전이, 세포면역 메커니즘의 차단 및 항-세포자멸사 기능과 관련이 있다. CEA는 또한 많은 암종에 대한 혈액 마커로서 사용된다. MN-14 및 hMN14로도 알려진 라베투주맙(CEA-CIDE™, Immunomedics, CAS 등록 번호 219649-07-7)은 인간화 IgG1 단일클론 항체이고, 결장직장암의 치료에 대해 연구되었다(Blumenthal, R. 등 (2005) *Cancer Immunology Immunotherapy* 54(4):315-327). 캄프토테신 유사체에 접합된 라베투주맙(라베투주맙 고비테칸, IMMU-130)은 암배아 항원-관련 세포 부착 mol. 5(CEACAM5)를 표적화하며 재발 또는 불응성 전이성 결장직장암 환자에서 연구되고 있다(Sharkey, R. 등, (2018), *Molecular Cancer Therapeutics* 17(1):196-203; Cardillo, T. 등 (2018) *Molecular Cancer Therapeutics* 17(1):150-160). 본 발명의 구현예에서, CEA-표적화 항체 작제물 또는 항원 결합 도메인은 US 6676924(본원에 이 목적을 위해 참고로 포함됨)에 개시된 것과 같은 hMN-14/라베투주맙의 가변 경쇄(VL 카파)를 포함한다.
- [0099] 예시적인 구현예에서, 본 발명의 면역접합체는 TROP2를 특이적으로 인식하고 이에 결합하는 항원 결합 도메인을 포함하는 항체 작제물이다. 종양-연관 칼슘 신호 변환기 2(TROP2)는 TACSTD2 유전자에 의해 암호화되는 막관통 당단백질이다(Linnenbach AJ, 등 (1993) *Mol Cell Biol.* 13(3): 1507-15; Calabrese G, 등 (2001) *Cytogenet Cell Genet.* 92(1-2): 164-5). TROP2는 많은 암에서 차등적으로 발현되고 자가-재생, 증식, 침입 및 생존을 위해 세포에 신호를 보내는 세포내 칼슘 신호 변환기이다. TROP2는 줄기 세포 마커로 간주되며 많은 정상 조직에서 발현되지만 대조적으로 많은 암에서 과발현된다(Ohmachi T, 등, (2006) *Clin. Cancer Res.*, 12(10), 3057-3063; Muhlmann G, 등, (2009) *J. Clin. Pathol.*, 62(2), 152-158; Fong D, 등, (2008) *Br. J. Cancer*, 99(8), 1290-1295; Fong D, 등, (2008) *Mod. Pathol.*, 21(2), 186-191; Ning S, 등, (2013) *Neurol. Sci.*, 34(10), 1745-1750). TROP2의 과발현은 예후적으로 유의하다. TROP2와 상호작용하는 여러 리간드가 제안되었다. TROP2는 상이한 경로를 통해 세포에 신호를 전달하고, 여러 전사 인자의 복잡한 네트워크에 의해 전사적으로 조절된다.
- [0100] 인간 TROP2(TACSTD2: 종양-연관 칼슘 신호 변환기 2, GA733-1, EGP-1, MIS1; 이하 hTROP2로 지칭됨)는 323개의 아미노산 잔기로 이루어진 단일-통과 막관통 유형 1 세포막 단백질이다. 인간 영양막 세포 및 암세포에 공통적으로 존재하는 면역 저항성에 관여하는 세포막 단백질의 존재가 이전에 제시되어 왔지만(Faulk W P, 등, *Proc. Natl. Acad. Sci.* 75(4):1947-1951 (1978)), 인간 용모막암종 세포주에서 세포막 단백질에 대한 단일클론 항체에 의해 인식되는 항원 분자가 확인되었으며 인간 영양막 세포에서 발현되는 분자 중 하나로서 TROP2로 지정되었다(Lipinski M, 등, *Proc. Natl. Acad. Sci.* 78(8), 5147-5150 (1981)). 이 분자는 위암 세포주로 면역화하여 얻은 마우스 단일클론 항체 GA733에 의해 인식되는 종양 항원 GA733-1(Linnenbach A J, 등, *Proc. Natl. Acad. Sci.* 86(1), 27-31 (1989)) 또는 비소세포 폐암 세포로 면역화하여 얻은 마우스 단일클론 항체 RS7-3G11에 의해 인식되는 상피 당단백질(EGP-1; Basu A, 등, *Int. J. Cancer*, 62 (4), 472-479 (1995))로도 지정되었다. 그러나, 1995년 TROP2 유전자가 클로닝되면서 이들 분자가 모두 동일한 분자임이 확인되었다(Fornaro M, 등, *Int. J. Cancer*, 62(5), 610-618 (1995)). hTROP2의 DNA 서열 및 아미노산 서열은 공개 데이터베이스에서 이용 가능하며, 예를 들어, 수탁 번호 NM\_002353 및 NP\_002344(NCBI)로 언급될 수 있다.

- [0101] 이러한 암과의 연관성을 시사하는 정보에 대응하여, 지금까지 다수의 항-hTROP2 항체가 확립되어 항종양 효과에 대한 연구가 진행되고 있다. 이들 항체 중에는, 예를 들어, 누드 마우스 이종이식 모델에서 그 자체로 항종양 활성을 나타내는 비접합된 항체(WO 2008/144891; WO 2011/145744; WO 2011/155579; WO 2013/077458)뿐만 아니라 세포독성 약물과 함께 ADC로서 항종양 활성을 나타내는 항체(WO 2003/074566; WO 2011/068845; WO 2013/068946; US 7999083)가 개시되어 있다. 그러나, 이들의 활성 강도 또는 적용 범위는 아직 충분하지 않으며 치료 표적으로서 hTROP2에 대한 의학적 요구도 충족되지 않는다.
- [0102] 암세포에서 TROP2 발현은 약물 저항성과 상관관계가 있다. 여러 전략이 항체, 항체 융합 단백질, 화학적 억제제, 나노입자 등을 포함하는 암세포의 TROP2를 표적화한다. 이러한 다양한 치료학적 치료법을 사용한 시험관내 연구 및 전임상 연구에서는 시험관내 및 마우스의 생체내에서 모두 종양 세포 성장이 유의하게 억제되는 것으로 나타났다. 임상 연구에서는 예후예측 바이오마커 및 저항성을 역전시키기 위한 치료 표적 모두로서 TROP2의 잠재적인 적용을 조사하였다.
- [0103] 토포이소머라아제 억제제 약물에 연결된 TROP2-유도 항체를 포함하는 항체-약물 접합체인 사시투주맙 고비테칸 (TRODELVY®, Immunomedics, IMMU-132)은 적어도 두 번의 이전 요법을 받은 성인 환자의 전이성 삼중-음성 유방암(mTNBC) 치료를 위해 표시된다. 사시투주맙 고비테칸의 TROP2 항체는 이리노테칸의 활성 대사산물인 SN-38에 접합된다(US 2016/0297890; WO 2015/098099).
- [0104] 본 발명의 일 구현예에서, TROP2-표적화 항체 작제물 또는 항원 결합 도메인은 hRS7(인간화 RS7)(본원에 참조로 포함되는 US 7238785)의 경쇄 CDR(상보성 결정 영역)을 포함한다.
- [0105] 본 발명의 일 구현예에서, TROP2-표적화 항체 작제물 또는 항원 결합 도메인은 서열번호 1-7로부터 선택된 경쇄 CDR(상보성 결정 영역) 또는 경쇄 프레임워크(LFR) 서열을 포함한다.

영역	서열	잔기 (Kabat)	길이	서열번호
LFR1	DIQMTQSPSSLSASVGDRTITC	1-23	23	1
CDR-L1	KASQDVSTAVA	24-34	11	2
LFR2	WYQQKPGKAPKLLIY	35-49	15	3
CDR-L2	SASYRYT	50-56	7	4
LFR3	GVPSRFGSGSGTDFLTISLQPEDFAVYYC	57-88	32	5
CDR-L3	QQHYITPLT	89-97	9	6
LFR4	FGQGTKLEIK	98-107	10	7

- [0106]
- [0107] 본 발명의 일 구현예에서, TROP2-표적화 항체 작제물 또는 항원 결합 도메인은 서열번호 8-14로부터 선택된 중쇄 CDR(상보성 결정 영역) 또는 중쇄 프레임워크(HFR) 서열을 포함한다.

영역	서열	잔기 (Kabat)	길이	서열번호
HFR1	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSKASGYTFT	1-30	30	8
CDR-H1	TAGMQ	31-35	5	9
HFR2	WVRQAPGQGLEWMG	36-49	14	10
CDR-H2	WINTHSGVPKYAEDFKG	50-66	17	11
HFR3	RVTISADTSTSTAYLQLSSLKSEDTAVYYCAR	67-98	32	12
CDR-H3	SGFGSSYWYFDV	99-110	12	13
HFR4	WGQGLTVTVSS	111-121	11	14

[0108]

[0109]

일부 구현예에서, 면역접합체 내의 항체는 변형된 Fc 영역을 함유하며, 여기서 변형은 하나 이상의 Fc 수용체에 대한 Fc 영역의 결합을 조절한다.

[0110]

일부 구현예에서, Fc 영역은 TGFβ1에 결합할 수 있는 형질전환 성장 인자 베타 1(TGFβ1) 수용체 또는 이의 단편의 포함에 의해 변형된다. 예를 들면, 수용체는 TGFβ 수용체 II(TGFβRII)일 수 있다. 일부 구현예에서, TGFβ 수용체는 인간 TGFβ 수용체이다. 일부 구현예에서, IgG는 본원에 포함된 US 9676863에 기재된 것과 같은 TGFβRII 세포의 도메인(ECD)에 대한 C-말단 융합을 갖는다. "Fc 링커"는 IgG를 TGFβRII 세포의 도메인에 부착시키기 위해 사용될 수 있다. Fc 링커는 표적에 대한 결합 특이성을 유지시키면서 분자의 적절한 3차원 접합을 가능하게 하는 짧은 가요성 펩타이드일 수 있다. 일부 구현예에서, TGFβ 수용체의 N-말단은 (Fc 링커에 의해 또는 이것 없이) 항체 작제물의 Fc에 융합된다. 일부 구현예에서, 항체 작제물 중쇄의 C-말단은 (Fc 링커에 의해 또는 이것 없이) TGFβ 수용체에 융합된다. 일부 구현예에서, 항체 작제물 중쇄의 C-말단 리신 잔기는 알라닌으로 돌연변이된다.

[0111]

일부 구현예에서, 면역접합체 내의 항체는 글리코실화된다.

[0112]

일부 구현예에서, 면역접합체에서의 항체는 조작된 시스테인이 접합에 이용 가능하지만, 면역글로불린 접합 및 조립을 방해하지 않거나 항원 결합 및 이펙터 기능을 변경하지 않는 부위에서의 시스테인 치환을 통한 항체에 대한 아류반트, 라벨 또는 약물 모이어티의 부위 특이적 접합을 제공하는 시스테인-조작된 항체이다(Junutula, 등, 2008b *Nature Biotech.*, 26(8):925-932; Dornan 등 (2009) *Blood* 114(13):2721-2729; US 7521541; US 7723485; US 2012/0121615; WO 2009/052249). 시스테인-조작된 항체는 균일한 화학량론(예를 들어, 단일 조작된 시스테인 부위를 갖는 항체 내의 항체당 최대 2개의 8-설포닐-2-아미노벤자제핀 잔기)을 갖는 8-설포닐-2-아미노벤자제핀-링커 화합물로서 8-설포닐-2-아미노벤자제핀 아류반트 잔기에 접합될 수 있다.

[0113]

8-설포닐-2-아미노벤자제핀 아류반트 화합물

[0114]

본 발명의 면역접합체는 8-설포닐-2-아미노벤자제핀 아류반트 모이어티를 포함한다. 본원에 기재된 아류반트 모이어티는 면역 반응을 일으키는 화합물(즉, 면역자극제)이다. 일반적으로, 본원에 기재된 아류반트 모이어티는 TLR 효능제이다. TLR은 척추동물에서의 선천성 면역 반응의 개시를 담당하는 유형-I 막관통 단백질이다. TLR은 박테리아, 바이러스 및 진균으로부터의 여러 가지의 병원균-연관된 분자 패턴을 인식하고 침범 병원균에 대해 제1선 방어로서 작용한다. TLR은 세포 발현 및 이것이 개시시키는 신호전달 경로의 차이로 인해 중첩하지만 구별되는 생물학적 반응을 일으킨다. TLR은 (예를 들면, 천연 자극 또는 합성 TLR 효능제에 의해) 관여되면 신호전달 캐스케이드를 개시시키고, 이는 어댑터 단백질 골수성 분화 1차 반응 유전자 88(MyD88)을 통한 핵 인자-κB(NF-κB)의 활성화 및 IL-1 수용체 연관된 키나아제(IRAK)의 동원으로 이어진다. 이후, IRAK의 인산화는 TNF-수용체 연관된 인자 6(TRAF6)의 동원으로 이어지고, 이는 NF-κB 억제제 I-κB의 인산화를 생성시킨다. 그 결과, NF-κB는 세포 핵에 진입하고, 프로모터가 NF-κB 결합 부위, 예컨대 사이토카인을 함유하는 유전자의 전사를 개시시킨다. TLR 신호전달에 대한 추가 조절 방식은 TNF-수용체 연관된 인자 6(TRAF6)의 TIR-도메인 함유 어댑터 유도 인터페론-β(TRIF)-의존적 유도 및 TRIF 및 TRAF3을 통한 MyD88 독립적 경로의 활성화를 포함하여서 인터페론 반응 인자 3(IRF3)의 인산화로 이어진다. 유사하게, MyD88 의존적 경로는 또한 IRF5 및 IRF7을 포

함하는 몇몇 IRF 패밀러 구성원을 활성화하는 반면, TRIF 의존적 경로는 또한 NF-κB 경로를 활성화한다.

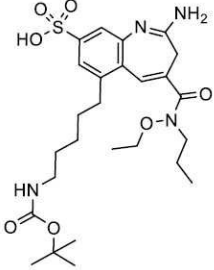

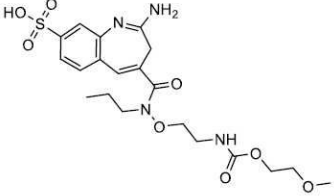
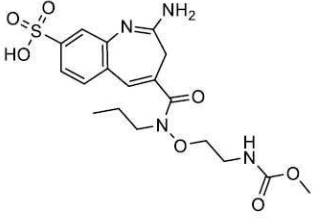
[0115] 통상적으로, 본원에 기재된 아류반트 모이어티는 TLR7 및/또는 TLR8 효능제이다. TLR7 및 TLR8은 둘 모두 단핵구 및 수지상 세포에서 발견된다. 인간에서, TLR7은 또한 형질세포양 수지상 세포(pDC) 및 B 세포에서 발견된다. TLR8은 대부분 골수성 기원의 세포, 즉, 단핵구, 과립구 및 골수성 수지상 세포에서 발견된다. TLR7 및 TLR8은 바이러스 침습에 반응하기 위한 수단으로서 세포 내의 "외래" 단일-가닥 RNA의 존재를 검출할 수 있다. TLR8 효능제에 의한 TLR8-발현 세포의 처리는 높은 수준의 IL-12, IFN-γ, IL-1, TNF-α, IL-6 및 다른 염증성 사이토카인을 생산시킬 수 있다. 유사하게, TLR7 효능제에 의한 TLR7-발현 세포, 예컨대 pDC의 자극은 높은 수준의 IFN-α 및 다른 염증성 사이토카인을 생산시킬 수 있다. TLR7/TLR8 결합 및 그 결과로 인한 사이토카인의 생성은 수지상 세포 및 다른 항원-제시 세포를 활성화하여, 다양한 선천성 및 후천성 면역 반응 메커니즘을 구동하여 종양 파괴를 유도할 수 있다.

[0116] 본 발명의 예시적인 8-설포닐-2-아미노벤자제핀 화합물(8SO2Bz)을 합성, 정제하고, 질량 분석법으로 특성화하고, 예상되는 질량을 갖는 것으로 나타내었다. 추가 실험 절차는 실시예에서 발견된다. 인간 TLR7 또는 인간 TLR8을 발현하는 HEK293 NFκB 리포터 세포에 대한 활성은 실시예 202에 따라 측정되었다. 특정 8-설포닐-2-아미노벤자제핀 화합물은 암 및 다른 장애를 치료하는 데 유용한 치료학적 활성을 예측할 수 있는 TLR8 효능제 선택성의 놀랍고 예상치 못한 특성을 입증한다.

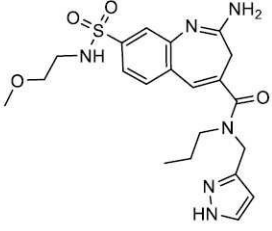
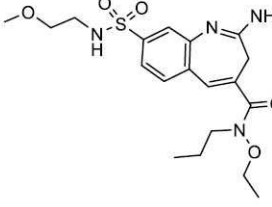
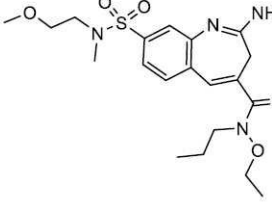
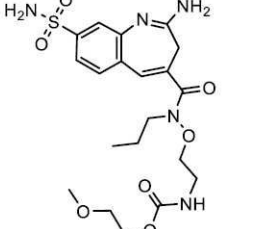
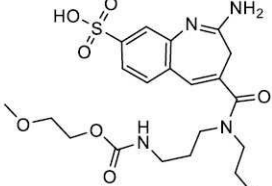
[0117] 표 1: 8-설포닐-2-아미노벤자제핀 화합물(8SO2Bz)

8SO2Bz 번호	구조	MW	HEK293 hTLR7 EC50(nM)	HEK293 hTLR8 EC50 (nM)
8SO2Bz-1		485.6	>9000	1056
8SO2Bz-2		509.6	395	<2.3
8SO2Bz-3		380.5	>5000	202
8SO2Bz-4		394.5		

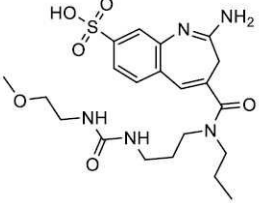
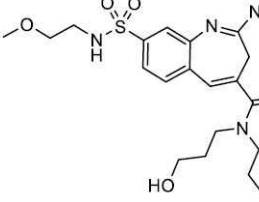
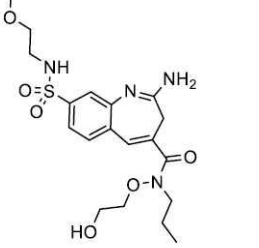
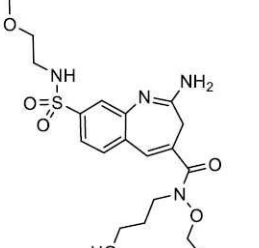
[0118]

8SO2Bz-5		552.7		
8SO2Bz-6		564.7		
8SO2Bz-7		484.5		
8SO2Bz-8		440.5		

[0119]

8SO2Bz-9		460.6		
8SO2Bz-10		424.5		
8SO2Bz-11		438.5		
8SO2Bz-12		483.5		
8SO2Bz-13		482.6		

[0120]

8SO2Bz-14		481.6		
8SO2Bz-15		438.5		
8SO2Bz-16		440.5		
8SO2Bz-17		440.5		

[0121]

[0122]

8-설포닐-2-아미노벤자제핀-링커 화합물

[0123]

본 발명의 면역접합체는 8-설포닐-2-아미노벤자제핀-링커 화합물, 8SO2Bz-L과 항체의 접합에 의해 제조된다. 8-설포닐-2-아미노벤자제핀-링커 화합물은 링커 유닛에 공유 결합된 8-설포닐-2-아미노벤자제핀(8SO2Bz) 모이어티를 포함한다. 링커 단위는 면역접합체의 안정성, 투과성, 용해도 및 다른 약동학, 안전성 및 효능 특성에 영향을 미치는 작용기 및 아단위를 포함한다. 링커 유닛은 폴리에틸렌옥시(PEG) 기를 포함한다. 링커 단위는 항체의 반응성 작용기와 반응, 즉 접합하는 반응성 작용기를 포함한다. 예를 들면, 항체의 친핵성 기, 예컨대 리신 측쇄 아미노는 8SO2Bz-L 화합물의 친전자성 반응성 작용기와 반응하여 면역접합체를 형성한다. 또한, 예를 들면 항체의 시스테인 티올은 8SO2Bz-L 링커 화합물의 말레이미드 또는 브로모아세타미드 기와 반응하여 면역접합체를 형성한다.

[0124]

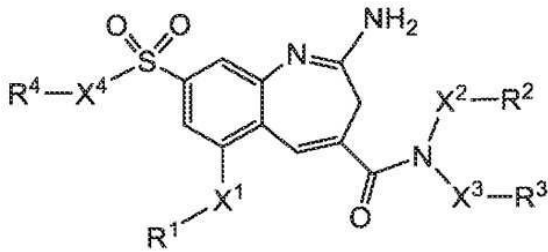
8SO2Bz-L 링커 화합물에 적합한 반응성 친전자성 작용기(화학식 II의 Q)는 N-하이드록시숙신이미딜(NHS) 에스테르 및 N-하이드록시설포숙신이미딜(설포닐-NHS) 에스테르(아민 반응성); 카보디이미드(아민 및 카복실 반응성); 하이드록시메틸 포스핀(아민 반응성); 말레이미드(티올 반응성); 할로젠화 아세타미드, 예컨대 N-요오도아세타미드(티올 반응성); 아릴 아지드(1차 아민 반응성); 불화 아릴 아지드(탄소-수소(C-H) 삽입을 통해 반응성); 펜타플루오로페닐(PFP) 에스테르(아민 반응성); 테트라플루오로페닐(TFP) 에스테르(아민 반응성); 이미도에스테르(아민 반응성); 이소시아네이트(하이드록실 반응성); 비닐 설포(티올, 아민 및 하이드록실 반응성); 피리딜 디설파이드(티올 반응성); 및 벤조페논 유도체(C-H 결합 삽입을 통해 반응성)를 포함하지만, 이들로 제한되지는 않는다. 추가 시약은 Hermanson, *Bioconjugate Techniques* 2<sup>nd</sup> Edition, Academic Press, 2008에 기재된 것을 포함하지만, 이들로 제한되지는 않는다.

[0125]

본 발명은 면역접합체의 설계, 제조 및 사용에 대한 제한 및 도전에 대한 해결책을 제시한다. 일부 링커는 혈류에서 불안정하여 표적 세포에서 내재화되기 전에 허용할 수 없는 양의 아주반트/약물을 방출할 수 있다(Khot,

A. 등 (2015) *Bioanalysis* 7(13):1633-1648). 다른 링커는 혈류에서의 안정성을 제공할 수 있지만, 세포내 방출 유효성은 부정적으로 영향을 받을 수 있다. 원하는 세포내 방출을 제공하는 링커는 통상적으로 혈류에서 불량한 안정성을 갖는다. 대안적으로 말하면, 혈류 안정성 및 세포내 방출은 통상적으로 역으로 관련된다. 게다가, 표준 접합 공정에서, 항체에 로딩된 아류반트/약물 모이어티의 양, 즉 약물 로딩, 접합 반응에서 형성된 응집체의 양 및 수득할 수 있는 최종 정제된 접합체의 수율이 상호관련된다. 예를 들면, 응집체 형성은 일반적으로 항체에 접합된 아류반트/약물 모이어티 및 이의 유도체의 당량의 수와 양으로 상관된다. 높은 약물 로딩 하에, 형성된 응집체는 치료 분야를 위해 제거되어야 한다. 그 결과, 약물 로딩-매개된 응집체 형성은 면역접합체 수율을 감소시키고 공정 확장이 어려워지게 할 수 있다.

[0126] 예시적인 구현에는 화학식 II의 8-설포닐-2-아미노벤자제핀-링커 화합물을 포함한다:



[0127]

식 중,

[0128]

[0129]  $R^1$ ,  $R^2$ ,  $R^3$  및  $R^4$ 는 H,  $C_1$ - $C_{12}$  알킬,  $C_2$ - $C_6$  알케닐,  $C_2$ - $C_6$  알킬닐,  $C_3$ - $C_{12}$  카보사이클릴,  $C_6$ - $C_{20}$  아릴,  $C_2$ - $C_9$  헤테로사이클릴 및  $C_1$ - $C_{20}$  헤테로아릴로 이루어진 군으로부터 독립적으로 선택되고, 알킬, 알케닐, 알킬닐, 카보사이클릴, 아릴, 헤테로사이클릴 및 헤테로아릴은 독립적으로 및 선택적으로

[0130]  $-(C_1-C_{12} \text{ 알킬디일})-N(R^5)-^*$ ;

[0131]  $-(C_1-C_{12} \text{ 알킬디일})-N(R^5)_2$ ;

[0132]  $-(C_1-C_{12} \text{ 알킬디일})-OR^5$ ;

[0133]  $-(C_3-C_{12} \text{ 카보사이클릴})$ ;

[0134]  $-(C_3-C_{12} \text{ 카보사이클릴})-^*$ ;

[0135]  $-(C_3-C_{12} \text{ 카보사이클릴})-(C_1-C_{12} \text{ 알킬디일})-NR^5-^*$ ;

[0136]  $-(C_3-C_{12} \text{ 카보사이클릴})-(C_1-C_{12} \text{ 알킬디일})-N(R^5)_2$ ;

[0137]  $-(C_3-C_{12} \text{ 카보사이클릴})-NR^5-C(=NR^5)NR^5-^*$ ;

[0138]  $-(C_6-C_{20} \text{ 아릴})$ ;

[0139]  $-(C_6-C_{20} \text{ 아릴디일})-^*$ ;

[0140]  $-(C_6-C_{20} \text{ 아릴디일})-N(R^5)-^*$ ;

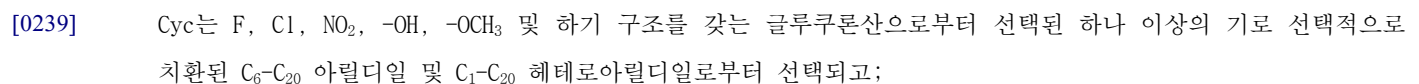
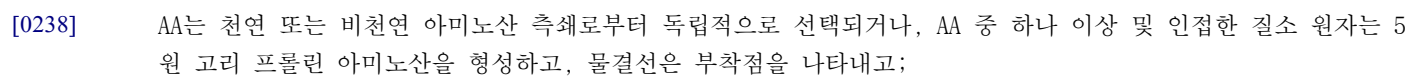
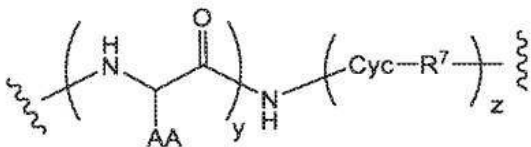
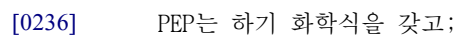
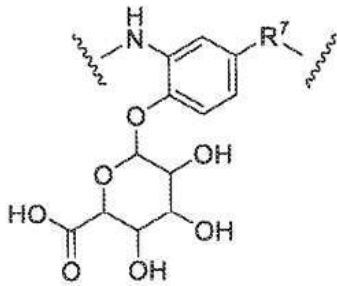
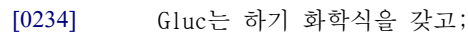
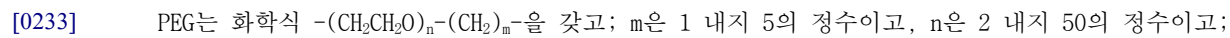
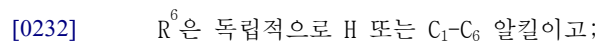
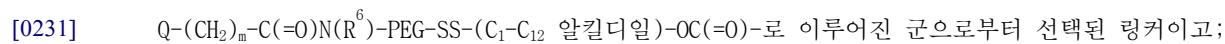
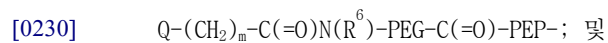
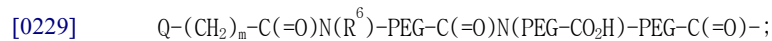
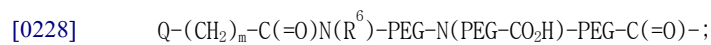
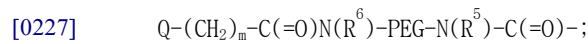
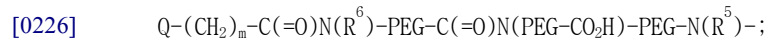
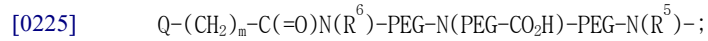
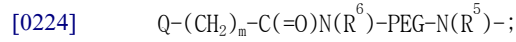
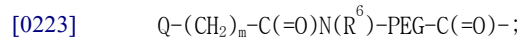
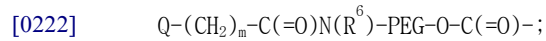
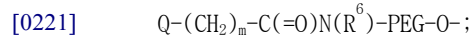
[0141]  $-(C_6-C_{20} \text{ 아릴디일})-(C_1-C_{12} \text{ 알킬디일})-N(R^5)-^*$ ;

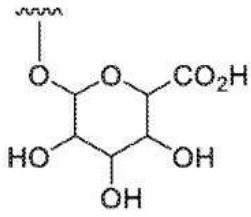
[0142]  $-(C_6-C_{20} \text{ 아릴디일})-(C_1-C_{12} \text{ 알킬디일})-(C_2-C_{20} \text{ 헤테로사이클릴디일})-^*$ ;

- [0143]  $-(C_6-C_{20} \text{ 아릴디일})-(C_1-C_{12} \text{ 알킬디일})-N(R^5)_2$ ;
- [0144]  $-(C_6-C_{20} \text{ 아릴디일})-(C_1-C_{12} \text{ 알킬디일})-NR^5-C(=NR^{5a})N(R^5)-^*$ ;
- [0145]  $-(C_2-C_{20} \text{ 헤테로사이클릴})$ ;
- [0146]  $-(C_2-C_{20} \text{ 헤테로사이클릴})-^*$ ;
- [0147]  $-(C_2-C_9 \text{ 헤테로사이클릴})-(C_1-C_{12} \text{ 알킬디일})-NR^5-^*$ ;
- [0148]  $-(C_2-C_9 \text{ 헤테로사이클릴})-(C_1-C_{12} \text{ 알킬디일})-N(R^5)_2$ ;
- [0149]  $-(C_2-C_9 \text{ 헤테로사이클릴})-C(=O)-(C_1-C_{12} \text{ 알킬디일})-N(R^5)-^*$ ;
- [0150]  $-(C_2-C_9 \text{ 헤테로사이클릴})-NR^5-C(=NR^{5a})NR^5-^*$ ;
- [0151]  $-(C_2-C_9 \text{ 헤테로사이클릴})-NR^5-(C_6-C_{20} \text{ 아릴디일})-(C_1-C_{12} \text{ 알킬디일})-N(R^5)-^*$ ;
- [0152]  $-(C_2-C_9 \text{ 헤테로사이클릴})-(C_6-C_{20} \text{ 아릴디일})-^*$ ;
- [0153]  $-(C_1-C_{20} \text{ 헤테로아릴})$ ;
- [0154]  $-(C_1-C_{20} \text{ 헤테로아릴디일})-^*$ ;
- [0155]  $-(C_1-C_{20} \text{ 헤테로아릴})-(C_1-C_{12} \text{ 알킬디일})-N(R^5)-^*$ ;
- [0156]  $-(C_1-C_{20} \text{ 헤테로아릴})-(C_1-C_{12} \text{ 알킬디일})-N(R^5)_2$ ;
- [0157]  $-(C_1-C_{20} \text{ 헤테로아릴})-NR^5-C(=NR^{5a})N(R^5)-^*$ ;
- [0158]  $-(C_1-C_{20} \text{ 헤테로아릴})-N(R^5)C(=O)-(C_1-C_{12} \text{ 알킬디일})-N(R^5)-^*$ ;
- [0159]  $-C(=O)-^*$ ;
- [0160]  $-C(=O)-(C_1-C_{12} \text{ 알킬디일})-N(R^5)-^*$ ;
- [0161]  $-C(=O)-(C_2-C_{20} \text{ 헤테로사이클릴디일})-^*$ ;
- [0162]  $-C(=O)N(R^5)_2$ ;
- [0163]  $-C(=O)N(R^5)-^*$ ;
- [0164]  $-C(=O)N(R^5)-(C_1-C_{12} \text{ 알킬디일})-N(R^5)C(=O)R^5$ ;
- [0165]  $-C(=O)N(R^5)-(C_1-C_{12} \text{ 알킬디일})-N(R^5)C(=O)N(R^5)_2$ ;
- [0166]  $-C(=O)NR^5-(C_1-C_{12} \text{ 알킬디일})-N(R^5)CO_2R^5$ ;
- [0167]  $-C(=O)NR^5-(C_1-C_{12} \text{ 알킬디일})-N(R^5)C(=NR^{5a})N(R^5)_2$ ;

- [0168]  $-C(=O)NR^5-(C_1-C_{12}$  알킬디일)- $NR^5C(=NR^{5a})R^5$ ;
- [0169]  $-C(=O)NR^5-(C_1-C_8$  알킬디일)- $NR^5(C_2-C_5$  헤테로아틸);
- [0170]  $-C(=O)NR^5-(C_1-C_{20}$  헤테로아틸)- $N(R^5)-^*$ ;
- [0171]  $-C(=O)NR^5-(C_1-C_{20}$  헤테로아틸)- $^*$ ;
- [0172]  $-C(=O)NR^5-(C_1-C_{20}$  헤테로아틸)- $(C_1-C_{12}$  알킬디일)- $N(R^5)_2$ ;
- [0173]  $-C(=O)NR^5-(C_1-C_{20}$  헤테로아틸)- $(C_2-C_{20}$  헤테로사이클릴디일)- $C(=O)NR^5-(C_1-C_{12}$  알킬디일)- $NR^5-^*$ ;
- [0174]  $-N(R^5)_2$ ;
- [0175]  $-N(R^5)-^*$ ;
- [0176]  $-N(R^5)C(=O)R^5$ ;
- [0177]  $-N(R^5)C(=O)-^*$ ;
- [0178]  $-N(R^5)C(=O)N(R^5)_2$ ;
- [0179]  $-N(R^5)C(=O)N(R^5)-^*$ ;
- [0180]  $-N(R^5)CO_2R^5$ ;
- [0181]  $-NR^5C(=NR^{5a})N(R^5)_2$ ;
- [0182]  $-NR^5C(=NR^{5a})N(R^5)-^*$ ;
- [0183]  $-NR^5C(=NR^{5a})R^5$ ;
- [0184]  $-N(R^5)C(=O)-(C_1-C_{12}$  알킬디일)- $N(R^5)-^*$ ;
- [0185]  $-N(R^5)-(C_2-C_5$  헤테로아틸);
- [0186]  $-N(R^5)-S(=O)_2-(C_1-C_{12}$  알킬);
- [0187]  $-O-(C_1-C_{12}$  알킬);
- [0188]  $-O-(C_1-C_{12}$  알킬디일)- $N(R^5)_2$ ;
- [0189]  $-O-(C_1-C_{12}$  알킬디일)- $N(R^5)-^*$ ;
- [0190]  $-O-C(=O)N(R^5)_2$ ;
- [0191]  $-O-C(=O)N(R^5)-^*$ ;
- [0192]  $-O-(R^5)-^*$ ;
- [0193]  $-OR^5$ ;

- [0194]  $-S(=O)_2-(C_2-C_{20}$  헤테로사이클릴디일) $-^*$ ;
- [0195]  $-S(=O)_2-(C_2-C_{20}$  헤테로사이클릴디일) $-(C_1-C_{12}$  알킬디일) $-N(R^5)_2$ ;
- [0196]  $-S(=O)_2-(C_2-C_{20}$  헤테로사이클릴디일) $-(C_1-C_{12}$  알킬디일) $-NR^5-^*$ ; 및
- [0197]  $-S(=O)_2-(C_2-C_{20}$  헤테로사이클릴디일) $-(C_1-C_{12}$  알킬디일) $-OH$
- [0198] 로부터 선택된 하나 이상의 기로 치환되거나;
- [0199]  $R^2$  및  $R^3$ 은 함께 5원 또는 6원 헤테로사이클릴 고리를 형성하고;
- [0200]  $X^1$ ,  $X^2$ ,  $X^3$  및  $X^4$ 는 결합,  $C(=O)$ ,  $C(=O)N(R^5)$ ,  $O$ ,  $N(R^5)$ ,  $S$ ,  $S(O)_2$  및  $S(O)_2N(R^5)$ 로 이루어진 군으로부터 독립적으로 선택되고;
- [0201]  $R^5$ 는  $H$ ,  $C_6-C_{20}$  아릴,  $C_3-C_{12}$  카보사이클릴,  $C_6-C_{20}$  아릴디일,  $C_1-C_{12}$  알킬 및  $C_1-C_{12}$  알킬디일로 이루어진 군으로부터 독립적으로 선택되거나, 2개의  $R^5$  기는 함께 5원 또는 6원 헤테로사이클릴 고리를 형성하고;
- [0202]  $R^{5a}$ 는  $C_6-C_{20}$  아릴 및  $C_1-C_{20}$  헤테로아릴로 이루어진 군으로부터 선택되고;
- [0203] 별표 \*는 L의 부착 부위를 나타내고,  $R^1$ ,  $R^2$ ,  $R^3$  및  $R^4$  중 하나는 L에 부착되고;
- [0204] L은
- [0205]  $Q-C(=O)-PEG-$ ;
- [0206]  $Q-C(=O)-PEG-C(=O)N(R^6)-(C_1-C_{12}$  알킬디일) $-C(=O)-Gluc-$ ;
- [0207]  $Q-C(=O)-PEG-O-$ ;
- [0208]  $Q-C(=O)-PEG-O-C(=O)-$ ;
- [0209]  $Q-C(=O)-PEG-C(=O)-$ ;
- [0210]  $Q-C(=O)-PEG-C(=O)-PEP-$ ;
- [0211]  $Q-C(=O)-PEG-N(R^6)-$ ;
- [0212]  $Q-C(=O)-PEG-N(R^6)-C(=O)-$ ;
- [0213]  $Q-C(=O)-PEG-N(R^6)-PEG-C(=O)-PEP-$ ;
- [0214]  $Q-C(=O)-PEG-N^+(R^6)_2-PEG-C(=O)-PEP-$ ;
- [0215]  $Q-C(=O)-PEG-C(=O)-PEP-N(R^6)-(C_1-C_{12}$  알킬디일) $-$ ;
- [0216]  $Q-C(=O)-PEG-C(=O)-PEP-N(R^6)-(C_1-C_{12}$  알킬디일) $N(R^6)C(=O)-(C_2-C_5$  모노헤테로사이클릴디일) $-$ ;
- [0217]  $Q-C(=O)-PEG-SS-(C_1-C_{12}$  알킬디일) $-OC(=O)-$ ;
- [0218]  $Q-C(=O)-PEG-SS-(C_1-C_{12}$  알킬디일) $-C(=O)-$ ;
- [0219]  $Q-(CH_2)_m-C(=O)N(R^6)-PEG-$ ;
- [0220]  $Q-(CH_2)_m-C(=O)N(R^6)-PEG-C(=O)N(R^6)-(C_1-C_{12}$  알킬디일) $-C(=O)-Gluc-$ ;





[0240]

[0241]

R<sup>7</sup>은 -CH(R<sup>8</sup>)O-, -CH<sub>2</sub>-, -CH<sub>2</sub>N(R<sup>8</sup>)- 및 -CH(R<sup>8</sup>)O-C(=O)-로 이루어진 군으로부터 선택되고, R<sup>8</sup>은 H, C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub> 알킬, C(=O)-C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub> 알킬 및 -C(=O)N(R<sup>9</sup>)<sub>2</sub>로부터 선택되고, R<sup>9</sup>는 H, C<sub>1</sub>-C<sub>12</sub> 알킬 및 -(CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O)<sub>n</sub>-(CH<sub>2</sub>)<sub>m</sub>-OH로 이루어진 군으로부터 독립적으로 선택되고, m은 1 내지 5의 정수이고, n은 2 내지 50의 정수이거나, 2개의 R<sup>9</sup> 기는 함께 5 원 또는 6원 헤테로사이클릴 고리를 형성하고;

[0242]

y는 2 내지 12의 정수이고;

[0243]

z는 0 또는 1이고;

[0244]

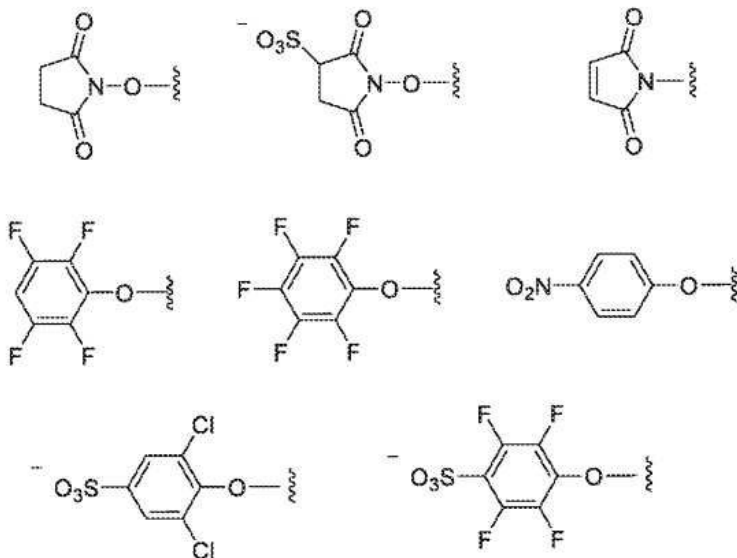
Q는 F, Cl, NO<sub>2</sub> 및 SO<sub>3</sub><sup>-</sup>로부터 독립적으로 선택된 하나 이상의 기로 치환된 N-하이드록시숙신이미딜, N-하이드록시설포숙신이미딜, 말레이미드 및 페녹시로 이루어진 군으로부터 선택되고;

[0245]

알킬, 알킬디일, 알케닐, 알케닐디일, 알킬닐, 알킬닐디일, 아릴, 아릴디일, 카보사이클릴, 카보사이클릴디일, 헤테로사이클릴, 헤테로사이클릴디일, 헤테로아릴 및 헤테로아릴디일은 F, Cl, Br, I, -CN, -CH<sub>3</sub>, -CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>, -CH=CH<sub>2</sub>, -C≡CH, -C≡CCH<sub>3</sub>, -CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>, -CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>, -CH<sub>2</sub>CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>, -CH<sub>2</sub>OH, -CH<sub>2</sub>OCH<sub>3</sub>, -CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>OH, -C(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>OH, -CH(OH)CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>, -C(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>OH, -CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>SO<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>, -CH<sub>2</sub>OP(O)(OH)<sub>2</sub>, -CH<sub>2</sub>F, -CHF<sub>2</sub>, -CF<sub>3</sub>, -CH<sub>2</sub>CF<sub>3</sub>, -CH<sub>2</sub>CHF<sub>2</sub>, -CH(CH<sub>3</sub>)CN, -C(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>CN, -CH<sub>2</sub>CN, -CH<sub>2</sub>NH<sub>2</sub>, -CH<sub>2</sub>NHSO<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>, -CH<sub>2</sub>NHCH<sub>3</sub>, -CH<sub>2</sub>N(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>, -CO<sub>2</sub>H, -COCH<sub>3</sub>, -CO<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>, -CO<sub>2</sub>C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>, -COCH(OH)CH<sub>3</sub>, -CONH<sub>2</sub>, -CONHCH<sub>3</sub>, -CON(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>, -C(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>CONH<sub>2</sub>, -NH<sub>2</sub>, -NHCH<sub>3</sub>, -N(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>, -NHC(O)CH<sub>3</sub>, -N(CH<sub>3</sub>)COCH<sub>3</sub>, -NHS(O)<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>, -N(CH<sub>3</sub>)C(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>CONH<sub>2</sub>, -N(CH<sub>3</sub>)CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>S(O)<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>, -NHC(=NH)H, -NHC(=NH)CH<sub>3</sub>, -NHC(=NH)NH<sub>2</sub>, -NHC(=O)NH<sub>2</sub>, -NO<sub>2</sub>, =O, -OH, -OCH<sub>3</sub>, -OCH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>, -OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>OCH<sub>3</sub>, -OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>OH, -OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>N(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>, -O(CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O)<sub>n</sub>-(CH<sub>2</sub>)<sub>m</sub>CO<sub>2</sub>H, -O(CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O)<sub>n</sub>H, -OCH<sub>2</sub>F, -OCHF<sub>2</sub>, -OCF<sub>3</sub>, -OP(O)(OH)<sub>2</sub>, -S(O)<sub>2</sub>N(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>, -SCH<sub>3</sub>, -S(O)<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>, 및 -S(O)<sub>3</sub>H로부터 독립적으로 선택된 하나 이상의 기로 독립적으로 및 선택적으로 치환된다.

[0246]

화학식 II의 8-설포닐-2-아미노벤자제핀-링커 화합물의 예시적인 구현에는 Q가 하기로부터 선택된 것을 포함한다:



[0247]

[0248]

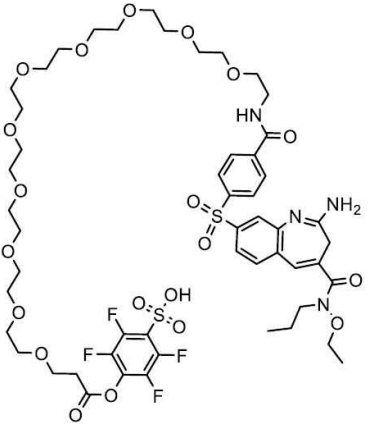
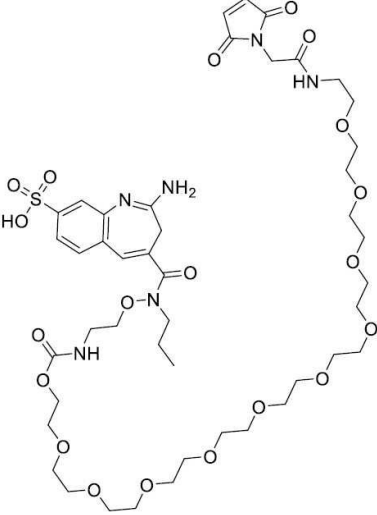
화학식 II의 8-설포닐-2-아미노벤자제핀-링커 화합물의 예시적인 구현에는 Q가 하나 이상의 F로 치환된 페녹시

인 것을 포함한다.

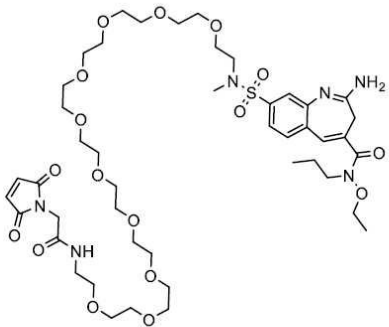
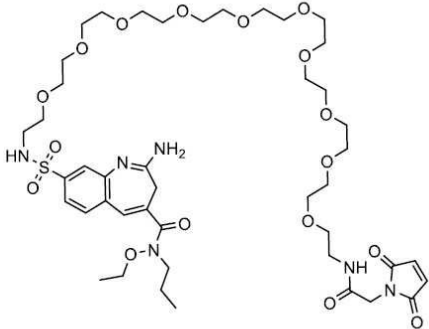
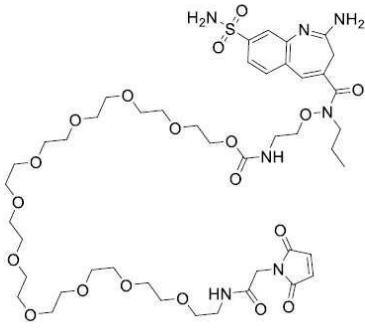
[0249] 화학식 II의 8-설포닐-2-아미노벤자제핀-링커 화합물의 예시적인 구현에는 Q가 2,3,5,6-테트라플루오로페녹시인 것을 포함한다.

[0250] 8-설포닐-2-아미노벤자제핀-링커(8SO2BzL) 화합물의 예시적인 구현에는 표 2a로부터 선택된다. 각각의 화합물은 합성되고 정제되고 질량 분광법에 의해 규명되었고, 표시된 질량을 갖는 것으로 나타났다. 추가 실험 절차는 실시예에서 발견된다. 표 2a의 8-설포닐-2-아미노벤자제핀-링커 화합물은 암 및 다른 장애를 치료하기 위해 유용한 치료 활성을 예측할 수 있는 TLR8 효능제 선택도의 놀랍고 예상치 못한 특성을 입증한다. 표 2a의 화학식 II 화합물인 8-설포닐-2-아미노벤자제핀-링커 중간체는 표 3a의 면역접합체를 형성하기 위해 실시예 201의 방법에 의해 항체와의 접합에 사용된다.

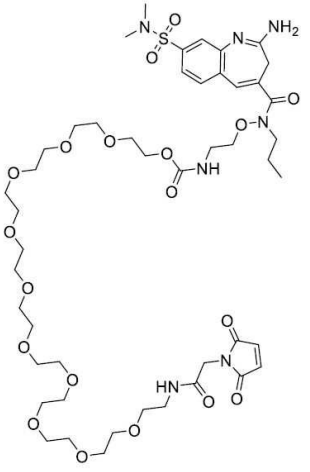
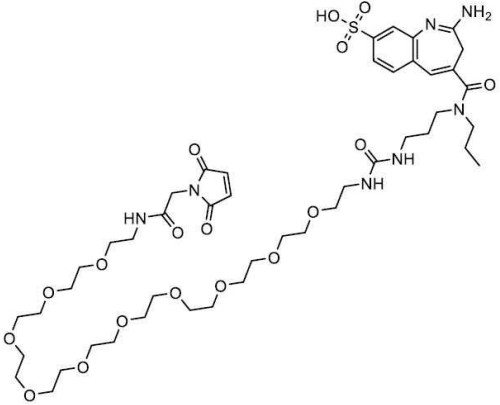
[0251] 표 2a 8-설포닐-벤자제핀-링커(8SO2BzL) 화합물

8SO2BzL 번호	구조	MW
8SO2BzL-1		1211.3
8SO2BzL-2		1047.1

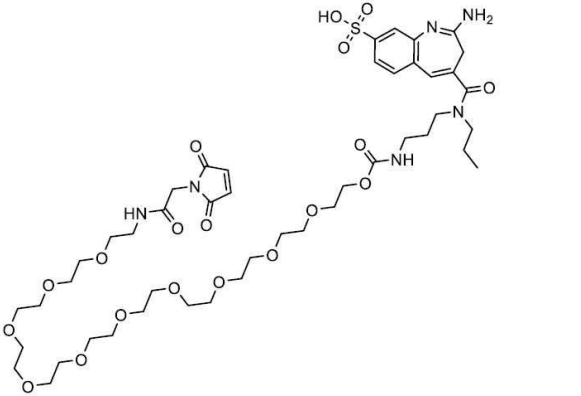
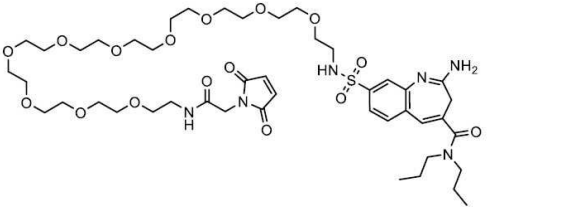
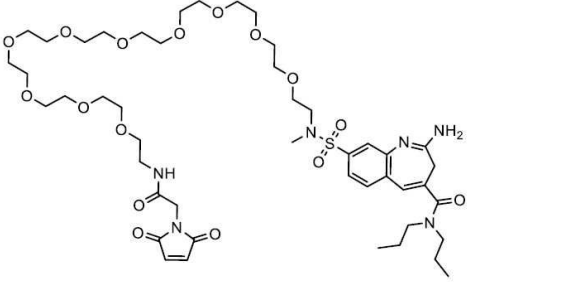
[0252]

<p>8SO2BzL-3</p>		<p>1001.2</p>
<p>8SO2BzL-4</p>		<p>987.1</p>
<p>8SO2BzL-5</p>		<p>1046.2</p>

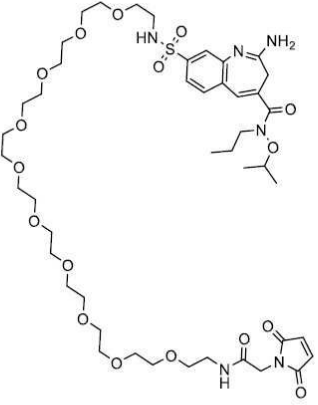
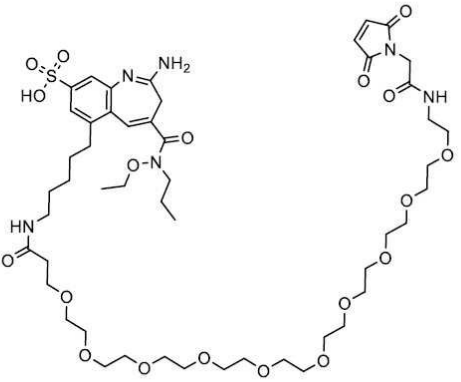
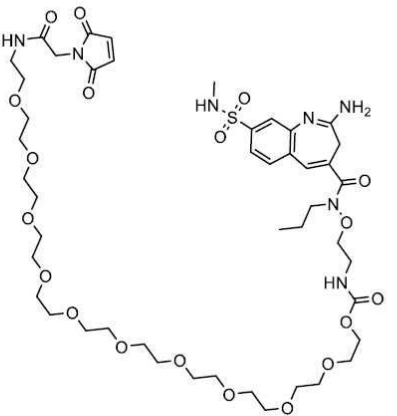
[0253]

<p>8SO2BzL-6</p>	 <p>The structure shows a central benzimidazole ring system. At position 2, there is an amino group (-NH<sub>2</sub>). At position 4, there is a carbonyl group (-C(=O)-) attached to a nitrogen atom, which is further substituted with a propyl group (-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>). At position 8, there is a dimethylsulfonamide group (-N(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>2</sub>-). A long, flexible polyether chain consisting of multiple repeating -CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-O- units is attached to the nitrogen atom at position 4 via an amide linkage (-NH-C(=O)-O-).</p>	<p>1074.2</p>
<p>8SO2BzL-7</p>	 <p>The structure is similar to 8SO2BzL-6, but the dimethylsulfonamide group at position 8 is replaced by a sulfonic acid group (-SO<sub>3</sub>H). The rest of the molecule, including the benzimidazole core, the amino group at position 2, the propyl-substituted nitrogen at position 4, and the long polyether chain, remains the same.</p>	<p>1044.2</p>

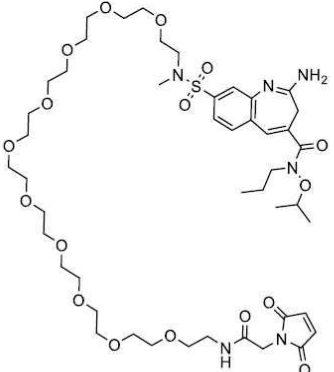
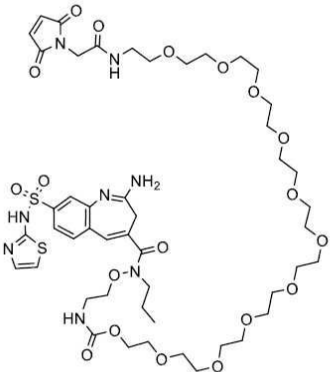
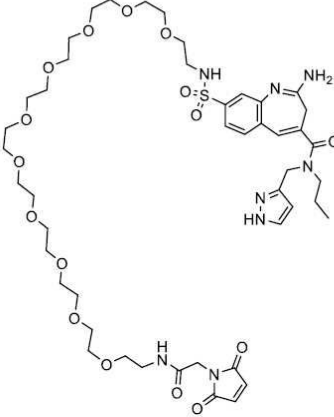
[0254]

<p>8SO2BzL-8</p>		<p>1045.2</p>
<p>8SO2BzL-9</p>		<p>985.2</p>
<p>8SO2BzL-10</p>		<p>999.2</p>

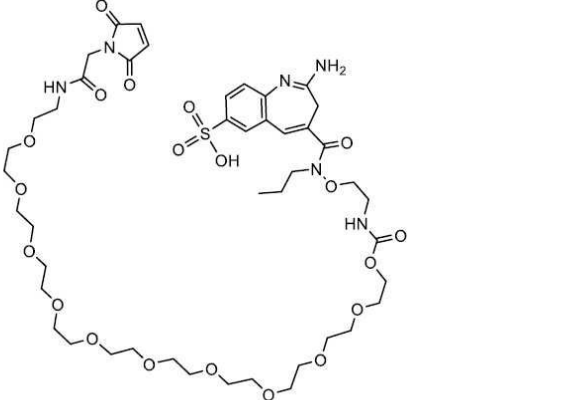
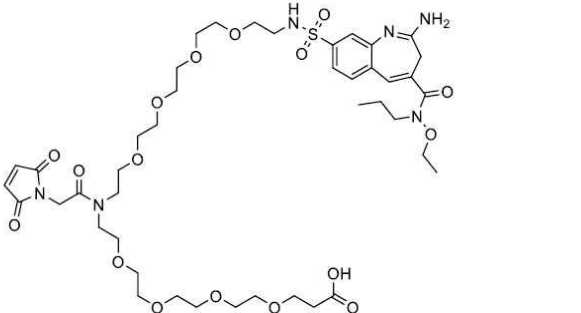
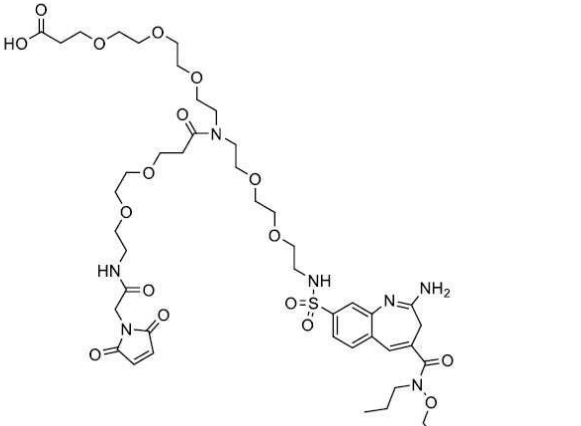
[0255]

<p>8SO2BzL-11</p>		<p>1001.2</p>
<p>8SO2BzL-12</p>		<p>1101.3</p>
<p>8SO2BzL-13</p>		<p>1060.2</p>

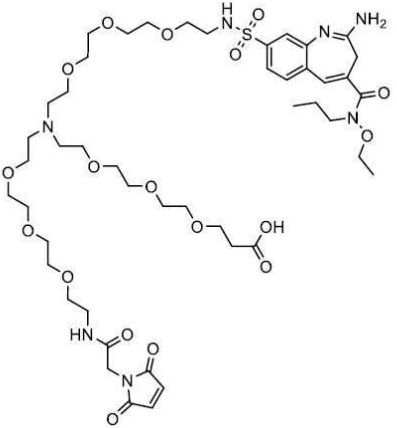
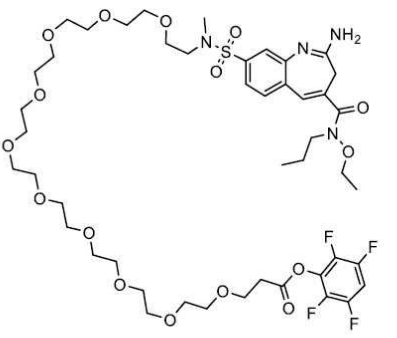
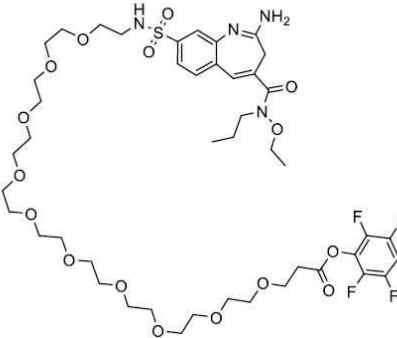
[0256]

<p>8SO2BzL-14</p>		<p>1015.2</p>
<p>8SO2BzL-15</p>		<p>1129.3</p>
<p>8SO2BzL-16</p>		<p>1023.2</p>

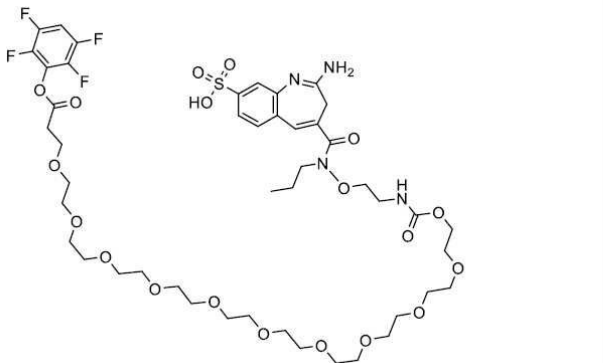
[0257]

<p>8SO2BzL-17</p>		<p>1047.1</p>
<p>8SO2BzL-18</p>		<p>971.1</p>
<p>8SO2BzL-19</p>		<p>998.1</p>

[0258]

8SO2BzL-20		1058.2
8SO2BzL-21		1041.1
8SO2BzL-22		1027.1

[0259]

8SO2BzL-23		1087.1
------------	---	--------

[0260]

[0261]

표 2b로부터의 비교기 화합물은 항체의 리신 잔기와 반응하여 항체와 실시예 201에 따른 TLR-효능제-링커 모이어티 사이에 아마이드 결합을 갖는 면역접합체를 형성하는 활성화된 에스테르, 테트라플루오로페닐 또는 설포테트라플루오로페닐기를 갖는다.

[0262] 표 2b TLR 효능제-링커 비교기 화합물

Comp	구조	MW
C-1		1163.2
C-2		1274.3

[0263]

[0264]

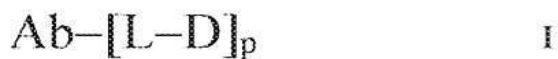
8-설포닐-벤자제핀 면역접합체

[0265]

면역-자극 항체 접합체, 즉 면역접합체는 중앙-침윤 골수성 세포를 활성화하고 넓은 선천성 및 적응성 항-중앙 면역 반응을 개시시키기 위해 TLR7/8 효능제를 중앙으로 지지한다(Ackerman, 등, (2021) *Nature Cancer* 2:18-33).

[0266]

면역접합체의 예시적인 구현에는 링커에 의해 하나 이상의 8-설포닐-2-아미노벤자제핀 모이어티에 공유 부착된 항체를 포함하고, 화학식 I 또는 이의 약제학적으로 허용 가능한 염을 갖는다:



[0267]

[0268]

상기 식 중,

[0269]

Ab는 항체이고;

[0270]

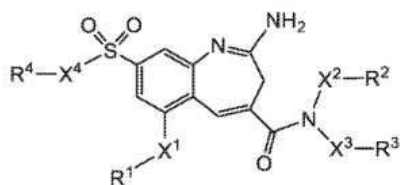
p는 1 내지 8의 정수이고;

[0271]

L은 링커이고;

[0272]

D는 하기 화학식을 갖는 8-설포닐-2-아미노벤자제핀 모이어티이고;



[0273]

- [0274]  $R^1$ ,  $R^2$ ,  $R^3$ , 및  $R^4$ 는 H,  $C_1$ - $C_{12}$  알킬,  $C_2$ - $C_6$  알케닐,  $C_2$ - $C_6$  알키닐,  $C_3$ - $C_{12}$  카보사이클릴,  $C_6$ - $C_{20}$  아릴,  $C_2$ - $C_9$  헤테로 사이클릴, 및  $C_1$ - $C_{20}$  헤테로아릴로 이루어진 군으로부터 독립적으로 선택되고, 알킬, 알케닐, 알키닐, 카보사이클릴, 아릴, 헤테로사이클릴 및 헤테로아릴은 각각은 독립적으로 및 선택적으로
- [0275]  $-(C_1-C_{12} \text{ 알킬디일})-N(R^5)-^*$ ;
- [0276]  $-(C_1-C_{12} \text{ 알킬디일})-N(R^5)_2$ ;
- [0277]  $-(C_1-C_{12} \text{ 알킬디일})-OR^5$ ;
- [0278]  $-(C_3-C_{12} \text{ 카보사이클릴})$ ;
- [0279]  $-(C_3-C_{12} \text{ 카보사이클릴})-^*$ ;
- [0280]  $-(C_3-C_{12} \text{ 카보사이클릴})-(C_1-C_{12} \text{ 알킬디일})-NR^5-^*$ ;
- [0281]  $-(C_3-C_{12} \text{ 카보사이클릴})-(C_1-C_{12} \text{ 알킬디일})-N(R^5)_2$ ;
- [0282]  $-(C_3-C_{12} \text{ 카보사이클릴})-NR^5-C(=NR^5)NR^5-^*$ ;
- [0283]  $-(C_6-C_{20} \text{ 아릴})$ ;
- [0284]  $-(C_6-C_{20} \text{ 아릴디일})-^*$ ;
- [0285]  $-(C_6-C_{20} \text{ 아릴디일})-N(R^5)-^*$ ;
- [0286]  $-(C_6-C_{20} \text{ 아릴디일})-(C_1-C_{12} \text{ 알킬디일})-N(R^5)-^*$ ;
- [0287]  $-(C_6-C_{20} \text{ 아릴디일})-(C_1-C_{12} \text{ 알킬디일})-(C_2-C_{20} \text{ 헤테로사이클릴디일})-^*$ ;
- [0288]  $-(C_6-C_{20} \text{ 아릴디일})-(C_1-C_{12} \text{ 알킬디일})-N(R^5)_2$ ;
- [0289]  $-(C_6-C_{20} \text{ 아릴디일})-(C_1-C_{12} \text{ 알킬디일})-NR^5-C(=NR^{5a})N(R^5)-^*$ ;
- [0290]  $-(C_2-C_{20} \text{ 헤테로사이클릴})$ ;
- [0291]  $-(C_2-C_{20} \text{ 헤테로사이클릴})-^*$ ;
- [0292]  $-(C_2-C_9 \text{ 헤테로사이클릴})-(C_1-C_{12} \text{ 알킬디일})-NR^5-^*$ ;
- [0293]  $-(C_2-C_9 \text{ 헤테로사이클릴})-(C_1-C_{12} \text{ 알킬디일})-N(R^5)_2$ ;
- [0294]  $-(C_2-C_9 \text{ 헤테로사이클릴})-C(=O)-(C_1-C_{12} \text{ 알킬디일})-N(R^5)-^*$ ;
- [0295]  $-(C_2-C_9 \text{ 헤테로사이클릴})-NR^5-C(=NR^{5a})NR^5-^*$ ;
- [0296]  $-(C_2-C_9 \text{ 헤테로사이클릴})-NR^5-(C_6-C_{20} \text{ 아릴디일})-(C_1-C_{12} \text{ 알킬디일})-N(R^5)-^*$ ;
- [0297]  $-(C_2-C_9 \text{ 헤테로사이클릴})-(C_6-C_{20} \text{ 아릴디일})-^*$ ;

- [0298]  $-(C_1-C_{20} \text{ 헤테로아릴})$ ;
- [0299]  $-(C_1-C_{20} \text{ 헤테로아릴})^*$ ;
- [0300]  $-(C_1-C_{20} \text{ 헤테로아릴})-(C_1-C_{12} \text{ 알킬디일})-N(R^5)^*$ ;
- [0301]  $-(C_1-C_{20} \text{ 헤테로아릴})-(C_1-C_{12} \text{ 알킬디일})-N(R^5)_2$ ;
- [0302]  $-(C_1-C_{20} \text{ 헤테로아릴})-NR^5-C(=NR^{5a})N(R^5)^*$ ;
- [0303]  $-(C_1-C_{20} \text{ 헤테로아릴})-N(R^5)C(=O)-(C_1-C_{12} \text{ 알킬디일})-N(R^5)^*$ ;
- [0304]  $-C(=O)^*$ ;
- [0305]  $-C(=O)-(C_1-C_{12} \text{ 알킬디일})-N(R^5)^*$ ;
- [0306]  $-C(=O)-(C_2-C_{20} \text{ 헤테로사이클릴디일})^*$ ;
- [0307]  $-C(=O)N(R^5)_2$ ;
- [0308]  $-C(=O)N(R^5)^*$ ;
- [0309]  $-C(=O)N(R^5)-(C_1-C_{12} \text{ 알킬디일})-N(R^5)C(=O)R^5$ ;
- [0310]  $-C(=O)N(R^5)-(C_1-C_{12} \text{ 알킬디일})-N(R^5)C(=O)N(R^5)_2$ ;
- [0311]  $-C(=O)NR^5-(C_1-C_{12} \text{ 알킬디일})-N(R^5)CO_2R^5$ ;
- [0312]  $-C(=O)NR^5-(C_1-C_{12} \text{ 알킬디일})-N(R^5)C(=NR^{5a})N(R^5)_2$ ;
- [0313]  $-C(=O)NR^5-(C_1-C_{12} \text{ 알킬디일})-N(R^5)CO_2R^5$ ;
- [0314]  $-C(=O)NR^5-(C_1-C_{12} \text{ 알킬디일})-N(R^5)C(=NR^{5a})N(R^5)_2$ ;
- [0315]  $-C(=O)NR^5-(C_1-C_{12} \text{ 알킬디일})-NR^5C(=NR^{5a})R^5$ ;
- [0316]  $-C(=O)NR^5-(C_1-C_8 \text{ 알킬디일})-NR^5(C_2-C_5 \text{ 헤테로아릴})$ ;
- [0317]  $-C(=O)NR^5-(C_1-C_{20} \text{ 헤테로아릴디일})-N(R^5)^*$ ;
- [0318]  $-C(=O)NR^5-(C_1-C_{20} \text{ 헤테로아릴디일})^*$ ;
- [0319]  $-C(=O)NR^5-(C_1-C_{20} \text{ 헤테로아릴디일})-(C_1-C_{12} \text{ 알킬디일})-N(R^5)_2$ ;
- [0320]  $-C(=O)NR^5-(C_1-C_{20} \text{ 헤테로아릴디일})-(C_2-C_{20} \text{ 헤테로사이클릴디일})-C(=O)NR^5-(C_1-C_{12} \text{ 알킬디일})-NR^5^*$ ;
- [0321]  $-N(R^5)_2$ ;
- [0322]  $-N(R^5)^*$ ;

- [0323]  $-N(R^5)C(=O)R^5$ ;
- [0324]  $-N(R^5)C(=O)^{-*}$ ;
- [0325]  $-N(R^5)C(=O)N(R^5)_2$ ;
- [0326]  $-N(R^5)C(=O)N(R^5)^{-*}$ ;
- [0327]  $-N(R^5)CO_2R^5$ ;
- [0328]  $-NR^5C(=NR^{5a})N(R^5)_2$ ;
- [0329]  $-NR^5C(=NR^{5a})N(R^5)^{-*}$ ;
- [0330]  $-NR^5C(=NR^{5a})R^5$ ;
- [0331]  $-N(R^5)C(=O)-(C_1-C_{12} \text{ 알킬디일})-N(R^5)^{-*}$ ;
- [0332]  $-N(R^5)-(C_2-C_5 \text{ 헤테로아릴})$ ;
- [0333]  $-N(R^5)-S(=O)_2-(C_1-C_{12} \text{ 알킬})$ ;
- [0334]  $-O-(C_1-C_{12} \text{ 알킬})$ ;
- [0335]  $-O-(C_1-C_{12} \text{ 알킬디일})-N(R^5)_2$ ;
- [0336]  $-O-(C_1-C_{12} \text{ 알킬디일})-N(R^5)^{-*}$ ;
- [0337]  $-O-C(=O)N(R^5)_2$ ;
- [0338]  $-O-C(=O)N(R^5)^{-*}$ ;
- [0339]  $-O-(R^5)^{-*}$ ;
- [0340]  $-OR^5$ ;
- [0341]  $-S(=O)_2-(C_2-C_{20} \text{ 헤테로사이클릴디일})^{-*}$ ;
- [0342]  $-S(=O)_2-(C_2-C_{20} \text{ 헤테로사이클릴디일})-(C_1-C_{12} \text{ 알킬디일})-N(R^5)_2$ ;
- [0343]  $-S(=O)_2-(C_2-C_{20} \text{ 헤테로사이클릴디일})-(C_1-C_{12} \text{ 알킬디일})-NR^{5-*}$ ; 및
- [0344]  $-S(=O)_2-(C_2-C_{20} \text{ 헤테로사이클릴디일})-(C_1-C_{12} \text{ 알킬디일})-OH$
- [0345] 로부터 선택된 하나 이상의 기로 치환되거나;
- [0346]  $R^2$  및  $R^3$ 은 함께 5원 또는 6원 헤테로사이클릴 고리를 형성하고;
- [0347]  $X^1$ ,  $X^2$ ,  $X^3$  및  $X^4$ 는 결합,  $C(=O)$ ,  $C(=O)N(R^5)$ ,  $O$ ,  $N(R^5)$ ,  $S$ ,  $S(O)_2$  및  $S(O)_2N(R^5)$ 로 이루어진 군으로부터 독립적으로 선택되고;
- [0348]  $R^5$ 는 H,  $C_6-C_{20}$  아릴,  $C_3-C_{12}$  카보사이클릴,  $C_6-C_{20}$  아릴디일,  $C_1-C_{12}$  알킬 및  $C_1-C_{12}$  알킬디일로 이루어진 군으로부터

터 독립적으로 선택되거나, 2개의  $R^5$  기는 함께 5원 또는 6원 헤테로사이클릭 고리를 형성하고;

- [0349]  $R^{5a}$ 는  $C_6-C_{20}$  아릴 및  $C_1-C_{20}$  헤테로아릴로 이루어진 군으로부터 선택되고;
- [0350] 별표 \*는 L의 부착 부위를 나타내고,  $R^1$ ,  $R^2$ ,  $R^3$  및  $R^4$  중 하나는 L에 부착되고;
- [0351] L은
- [0352]  $-C(=O)-PEG-$ ;
- [0353]  $-C(=O)-PEG-C(=O)N(R^6)-(C_1-C_{12}$  알킬디일)- $C(=O)-Gluc-$ ;
- [0354]  $-C(=O)-PEG-O-$ ;
- [0355]  $-C(=O)-PEG-O-C(=O)-$ ;
- [0356]  $-C(=O)-PEG-C(=O)-$ ;
- [0357]  $-C(=O)-PEG-C(=O)-PEP-$ ;
- [0358]  $-C(=O)-PEG-N(R^6)-$ ;
- [0359]  $-C(=O)-PEG-N(R^6)-C(=O)-$ ;
- [0360]  $-C(=O)-PEG-N(R^6)-PEG-C(=O)-PEP-$ ;
- [0361]  $-C(=O)-PEG-N^+(R^6)_2-PEG-C(=O)-PEP-$ ;
- [0362]  $-C(=O)-PEG-C(=O)-PEP-N(R^6)-(C_1-C_{12}$  알킬디일)-
- [0363]  $-C(=O)-PEG-C(=O)-PEP-N(R^6)-(C_1-C_{12}$  알킬디일) $N(R^6)C(=O)-(C_2-C_5$  모노헤테로사이클릭디일)-
- [0364]  $-C(=O)-PEG-SS-(C_1-C_{12}$  알킬디일)- $OC(=O)-$ ;
- [0365]  $-C(=O)-PEG-SS-(C_1-C_{12}$  알킬디일)- $C(=O)-$ ;
- [0366]  $-$ 숙신이미딜- $(CH_2)_m-C(=O)N(R^6)-PEG-$ ;
- [0367]  $-$ 숙신이미딜- $(CH_2)_m-C(=O)N(R^6)-PEG-C(=O)N(R^6)-(C_1-C_{12}$  알킬디일)- $C(=O)-Gluc-$ ;
- [0368]  $-$ 숙신이미딜- $(CH_2)_m-C(=O)N(R^6)-PEG-O-$ ;
- [0369]  $-$ 숙신이미딜- $(CH_2)_m-C(=O)N(R^6)-PEG-O-C(=O)-$ ;
- [0370]  $-$ 숙신이미딜- $(CH_2)_m-C(=O)N(R^6)-PEG-C(=O)-$ ;
- [0371]  $-$ 숙신이미딜- $(CH_2)_m-C(=O)N(R^6)-PEG-N(R^5)-$ ;
- [0372]  $-$ 숙신이미딜- $(CH_2)_m-C(=O)N(R^6)-PEG-N(PEG-CO_2H)-PEG-N(R^5)-$ ;
- [0373]  $-$ 숙신이미딜- $(CH_2)_m-C(=O)N(R^6)-PEG-C(=O)N(PEG-CO_2H)-PEG-N(R^5)-$ ;
- [0374]  $-$ 숙신이미딜- $(CH_2)_m-C(=O)N(R^6)-PEG-N(R^5)-C(=O)-$ ;

[0375] -숙신이미딜-(CH<sub>2</sub>)<sub>m</sub>-C(=O)N(R<sup>6</sup>)-PEG-N(PEG-CO<sub>2</sub>H)-PEG-C(=O)-;

[0376] -숙신이미딜-(CH<sub>2</sub>)<sub>m</sub>-C(=O)N(R<sup>6</sup>)-PEG-C(=O)N(PEG-CO<sub>2</sub>H)-PEG-C(=O)-;

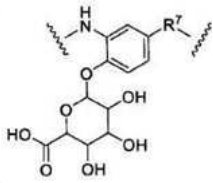
[0377] -숙신이미딜-(CH<sub>2</sub>)<sub>m</sub>-C(=O)N(R<sup>6</sup>)-PEG-C(=O)-PEP-; 및

[0378] -숙신이미딜-(CH<sub>2</sub>)<sub>m</sub>-C(=O)N(R<sup>6</sup>)-PEG-SS-(C<sub>1</sub>-C<sub>12</sub> 알킬디일)-OC(=O)-로 이루어진 군으로부터 선택된 링커이고;

[0379] R<sup>6</sup>은 독립적으로 H 또는 C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub> 알킬이고;

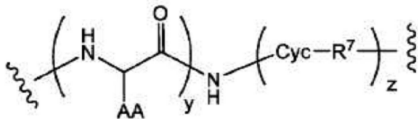
[0380] PEG는 화학식 -(CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O)<sub>n</sub>-(CH<sub>2</sub>)<sub>m</sub>-을 갖고; m은 1 내지 5의 정수이고, n은 2 내지 50의 정수이고;

[0381] Gluc는 하기 화학식을 갖고



[0382]

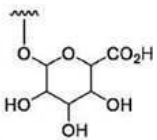
[0383] PEP는 하기 화학식을 갖고



[0384]

[0385] 여기서 AA는 천연 또는 비천연 아미노산 측쇄로부터 독립적으로 선택되거나, AA 중 하나 이상 및 인접한 질소 원자는 5원 고리 프롤린 아미노산을 형성하고, 물결선은 부착점을 나타내고;

[0386] Cyc는 F, Cl, NO<sub>2</sub>, -OH, -OCH<sub>3</sub> 및 하기 구조를 갖는 글루쿠론산으로부터 선택된 하나 이상의 기로 선택적으로 치환된 C<sub>6</sub>-C<sub>20</sub> 아릴디일 및 C<sub>1</sub>-C<sub>20</sub> 헤테로아릴디일로부터 선택되고;



[0387]

[0388] R<sup>7</sup>은 -CH(R<sup>8</sup>)O-, -CH<sub>2</sub>-, -CH<sub>2</sub>N(R<sup>8</sup>)- 및 -CH(R<sup>8</sup>)O-C(=O)-로 이루어진 군으로부터 선택되고, 여기서 R<sup>8</sup>은 H, C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub> 알킬, C(=O)-C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub> 알킬 및 -C(=O)N(R<sup>9</sup>)<sub>2</sub>로부터 선택되고, 여기서 R<sup>9</sup>는 H, C<sub>1</sub>-C<sub>12</sub> 알킬 및 -(CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O)<sub>n</sub>-(CH<sub>2</sub>)<sub>m</sub>-OH로 이루어진 군으로부터 독립적으로 선택되고, 여기서 m은 1 내지 5의 정수이고, n은 2 내지 50의 정수이거나, 2개의 R<sup>9</sup> 기는 함께 5원 또는 6원 헤테로사이클릴 고리를 형성하고;

[0389] y는 2 내지 12의 정수이고;

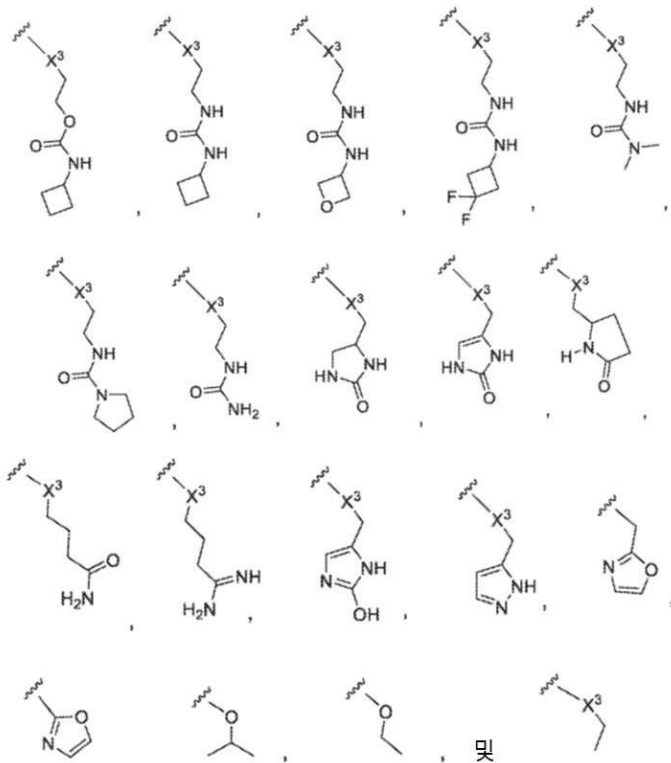
[0390] z는 0 또는 1이고;

[0391] 알킬, 알킬디일, 알케닐, 알케닐디일, 알킬닐, 알킬닐디일, 아릴, 아릴디일, 카보사이클릴, 카보사이클릴디일, 헤테로사이클릴, 헤테로사이클릴디일, 헤테로아릴 및 헤테로아릴디일은 F, Cl, Br, I, -CN, -CH<sub>3</sub>, -CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>, -CH=CH<sub>2</sub>, -C≡CH, -C≡CCH<sub>3</sub>, -CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>, -CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>, -CH<sub>2</sub>CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>, -CH<sub>2</sub>OH, -CH<sub>2</sub>OCH<sub>3</sub>, -CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>OH, -C(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>OH, -CH(OH)CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>, -C(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>OH, -CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>SO<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>, -CH<sub>2</sub>OP(O)(OH)<sub>2</sub>, -CH<sub>2</sub>F, -CHF<sub>2</sub>, -CF<sub>3</sub>, -CH<sub>2</sub>CF<sub>3</sub>, -CH<sub>2</sub>CHF<sub>2</sub>, -CH(CH<sub>3</sub>)CN, -C(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>CN, -CH<sub>2</sub>CN, -CH<sub>2</sub>NH<sub>2</sub>, -CH<sub>2</sub>NHSO<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>, -CH<sub>2</sub>NHCH<sub>3</sub>, -CH<sub>2</sub>N(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>, -CO<sub>2</sub>H, -COCH<sub>3</sub>, -CO<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>,

$-\text{CO}_2\text{C}(\text{CH}_3)_3$ ,  $-\text{COCH}(\text{OH})\text{CH}_3$ ,  $-\text{CONH}_2$ ,  $-\text{CONHCH}_3$ ,  $-\text{CON}(\text{CH}_3)_2$ ,  $-\text{C}(\text{CH}_3)_2\text{CONH}_2$ ,  $-\text{NH}_2$ ,  $-\text{NHCH}_3$ ,  $-\text{N}(\text{CH}_3)_2$ ,  $-\text{NHCOCH}_3$ ,  $-\text{N}(\text{CH}_3)\text{COCH}_3$ ,  $-\text{NHS}(\text{O})_2\text{CH}_3$ ,  $-\text{N}(\text{CH}_3)\text{C}(\text{CH}_3)_2\text{CONH}_2$ ,  $-\text{N}(\text{CH}_3)\text{CH}_2\text{CH}_2\text{S}(\text{O})_2\text{CH}_3$ ,  $-\text{NHC}(\text{=NH})\text{H}$ ,  $-\text{NHC}(\text{=NH})\text{CH}_3$ ,  $-\text{NHC}(\text{=NH})\text{NH}_2$ ,  $-\text{NHC}(\text{=O})\text{NH}_2$ ,  $-\text{NO}_2$ ,  $=\text{O}$ ,  $-\text{OH}$ ,  $-\text{OCH}_3$ ,  $-\text{OCH}_2\text{CH}_3$ ,  $-\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{OCH}_3$ ,  $-\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{OH}$ ,  $-\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{N}(\text{CH}_3)_2$ ,  $-\text{O}(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_n-(\text{CH}_2)_m\text{CO}_2\text{H}$ ,  $-\text{O}(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_n\text{H}$ ,  $-\text{OCH}_2\text{F}$ ,  $-\text{OCHF}_2$ ,  $-\text{OCF}_3$ ,  $-\text{OP}(\text{O})(\text{OH})_2$ ,  $-\text{S}(\text{O})_2\text{N}(\text{CH}_3)_2$ ,  $-\text{SCH}_3$ ,  $-\text{S}(\text{O})_2\text{CH}_3$ , 및  $-\text{S}(\text{O})_3\text{H}$ 로부터 독립적으로 선택된 하나 이상의 기로 독립적으로 및 선택적으로 치환된다.

- [0392] 화학식 I의 면역접합체의 예시적인 구현에는  $X^1$ 이 결합이고,  $R^1$ 이 H인 것을 포함한다.
- [0393] 화학식 I의 면역접합체의 예시적인 구현에는  $X^2$ 가 결합이고,  $R^2$ 가  $\text{C}_1$ - $\text{C}_8$  알킬인 것을 포함한다.
- [0394] 화학식 I의 면역접합체의 예시적인 구현에는  $X^2$  및  $X^3$ 이 각각 결합이고,  $R^2$  및  $R^3$ 이  $\text{C}_1$ - $\text{C}_8$  알킬,  $-\text{O}(\text{C}_1\text{-C}_{12}$  알킬),  $-(\text{C}_1\text{-C}_{12}$  알킬디일)- $\text{OR}^5$ ,  $-(\text{C}_1\text{-C}_8$  알킬디일)- $\text{N}(\text{R}^5)\text{CO}_2\text{R}^5$ ,  $-(\text{C}_1\text{-C}_{12}$  알킬)- $\text{OC}(\text{O})\text{N}(\text{R}^5)_2$ ,  $-\text{O}(\text{C}_1\text{-C}_{12}$  알킬)- $\text{N}(\text{R}^5)\text{CO}_2\text{R}^5$ , 및  $-\text{O}(\text{C}_1\text{-C}_{12}$  알킬)- $\text{OC}(\text{O})\text{N}(\text{R}^5)_2$ 로부터 독립적으로 선택된 것을 포함한다.
- [0395] 화학식 I의 면역접합체의 예시적인 구현에는  $R^2$ 가  $\text{C}_1$ - $\text{C}_8$  알킬이고,  $R^3$ 이  $-(\text{C}_1\text{-C}_8$  알킬디일)- $\text{N}(\text{R}^5)\text{CO}_2\text{R}^4$ 인 것을 포함한다.
- [0396] 화학식 I의 면역접합체의 예시적인 구현에는  $R^2$ 가  $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$ 이고,  $R^3$ 이  $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NHCO}_2(\text{t-Bu})$ ,  $-\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{NHCO}_2(\text{사이클로부틸})$ , 및  $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NHCO}_2(\text{사이클로부틸})$ 로부터 선택되는 것을 포함한다.
- [0397] 화학식 I의 면역접합체의 예시적인 구현에는  $R^2$  및  $R^3$ 이 각각 독립적으로  $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$ ,  $-\text{OCH}_2\text{CH}_3$ ,  $-\text{OCH}_2\text{CF}_3$ ,  $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CF}_3$ ,  $-\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{OH}$ , 및  $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{OH}$ 로부터 선택되는 것을 포함한다.
- [0398] 화학식 I의 면역접합체의 예시적인 구현에는  $R^2$  및  $R^3$ 이 각각  $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$ 인 것을 포함한다.
- [0399] 화학식 I의 면역접합체의 예시적인 구현에는  $R^2$ 가  $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$ 이고,  $R^3$ 이  $-\text{OCH}_2\text{CH}_3$ 인 것을 포함한다.

[0400] 화학식 I의 면역접합체의 예시적인 구현에는  $X^3-R^3$ 이 하기로 이루어진 군으로부터 선택되는 것을 포함한다:



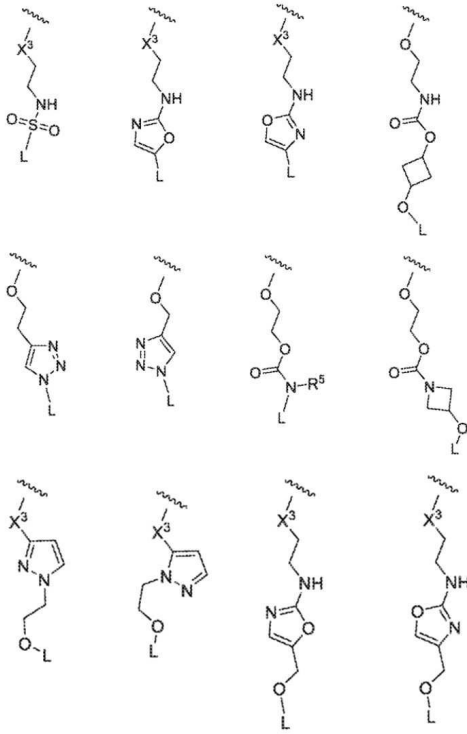
[0401]

[0402] 화학식 I의 면역접합체의 예시적인 구현에는  $X^4$ 가 결합이고,  $R^4$ 가 H인 것을 포함한다.

[0403] 화학식 I의 면역접합체의 예시적인 구현에는  $R^1$ 이 L에 부착된 것을 포함한다.

[0404] 화학식 I의 면역접합체의 예시적인 구현에는  $R^2$  또는  $R^3$ 이 L에 부착된 것을 포함한다.

[0405] 화학식 I의 면역접합체의 예시적인 구현에는  $X^3-R^3-L$ 이 하기로 이루어진 군으로부터 선택되는 것을 포함한다:



[0406]

[0407] 상기 식 중, 물결선은 N에 대한 부착점을 나타낸다.

[0408] 화학식 I의 면역접합체의 예시적인 구현에는  $R^4$ 가  $C_1-C_{12}$  알킬인 것을 포함한다.

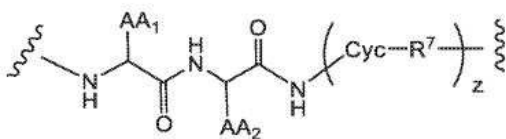
[0409] 화학식 I의 면역접합체의 예시적인 구현에는  $R^4$ 가  $-(C_1-C_{12} \text{ 알킬디일})-N(R^5)-^*$ 인 것을 포함하고; 별표 \*는 L의 부착 부위를 나타낸다.

[0410] 화학식 I의 면역접합체의 예시적인 구현에는 L이  $-C(=O)-PEG-$  또는  $-C(=O)-PEG-C(=O)-$ 인 것을 포함한다.

[0411] 화학식 I의 면역접합체의 예시적인 구현에는 L이 항체의 시스테인 티올에 부착된 것을 포함한다.

[0412] 화학식 I의 면역접합체의 예시적인 구현에는 PEG에 대해, m은 1 또는 2이고, n은 2 내지 10의 정수이거나; n은 10인 것을 포함한다.

[0413] 화학식 I의 면역접합체의 예시적인 구현에는 L이 PEP를 포함하고, PEP가 디펩타이드이고, 하기 화학식을 갖는 것을 포함한다:



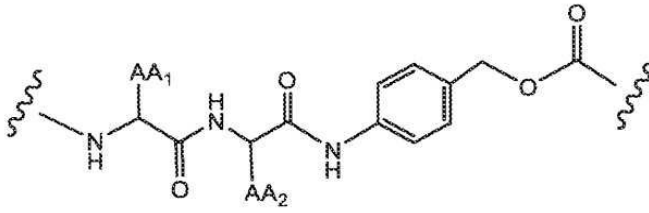
[0414]

[0415] 화학식 I의 면역접합체의 예시적인 구현에는  $AA_1$  및  $AA_2$ 가 H,  $-CH_3$ ,  $-CH(CH_3)_2$ ,  $-CH_2(C_6H_5)$ ,  $-CH_2CH_2CH_2CH_2NH_2$ ,  $-CH_2CH_2CH_2NHC(NH)NH_2$ ,  $-CHCH(CH_3)CH_3$ ,  $-CH_2SO_3H$ , 및  $-CH_2CH_2CH_2NHC(O)NH_2$ 로부터 독립적으로 선택되거나;  $AA_1$  및  $AA_2$ 가 5원 고리 프롤린 아미노산을 형성하는 것을 포함한다.

[0416] 화학식 I의 면역접합체의 예시적인 구현에는  $AA_1$ 이  $-CH(CH_3)_2$ 이고,  $AA_2$ 가  $-CH_2CH_2CH_2NHC(O)NH_2$ 인 것을 포함한다.

[0417] 화학식 I의 면역접합체의 예시적인 구현에는  $AA_1$  및  $AA_2$ 가 GlcNAc 아스파르트산,  $-CH_2SO_3H$  및  $-CH_2OPO_3H$ 로부터 독립적으로 선택된 것을 포함한다.

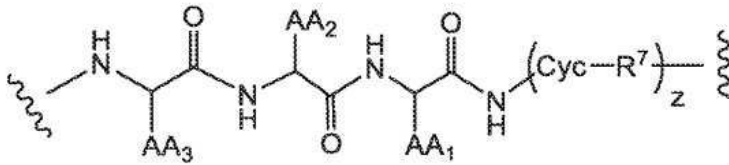
[0418] 화학식 I의 면역접합체의 예시적인 구현에는 PEP가 하기 화학식을 갖는 것을 포함한다:



[0419]

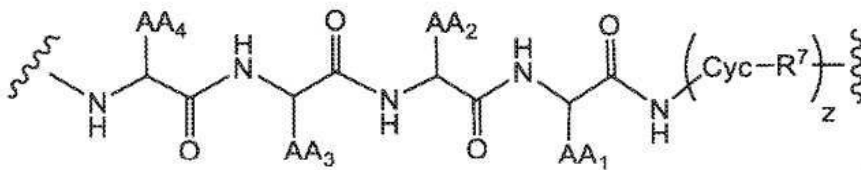
[0420] 상기 식 중, AA<sub>1</sub> 및 AA<sub>2</sub>는 천연 발생 아미노산의 측쇄로부터 독립적으로 선택된다.

[0421] 화학식 I의 면역접합체의 예시적인 구현에는 L이 PEP를 포함하고, PEP가 트리펩타이드이고, 하기 화학식을 갖는 것을 포함한다:



[0422]

[0423] 화학식 I의 면역접합체의 예시적인 구현에는 L이 PEP를 포함하고, PEP가 테트라펩타이드이고, 하기 화학식을 갖는 것을 포함한다:



[0424]

[0425] 화학식 I의 면역접합체의 예시적인 구현에는

[0426] AA<sub>1</sub>이 Abu, Ala 및 Val로 이루어진 군으로부터 선택되고;

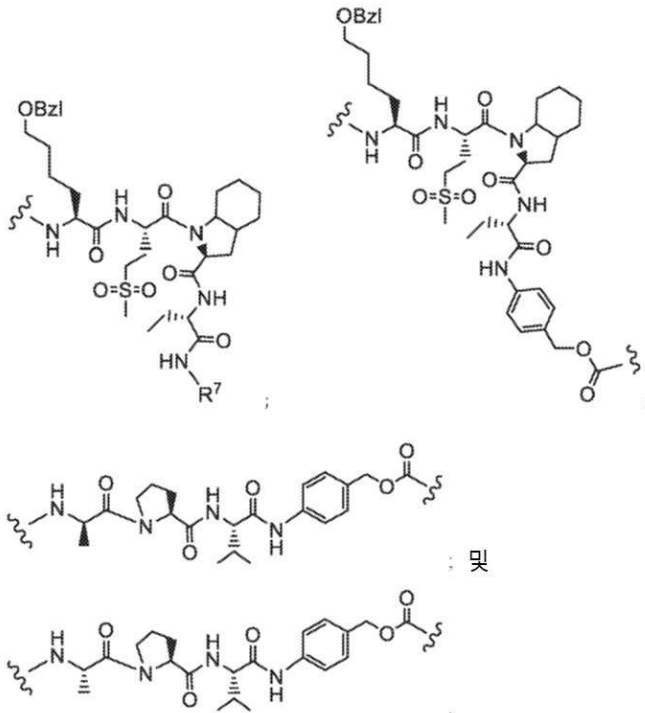
[0427] AA<sub>2</sub>는 Nle(O-Bzl), Oic 및 Pro로 이루어진 군으로부터 선택되고;

[0428] AA<sub>3</sub>은 Ala 및 Met(O)<sub>2</sub>로 이루어진 군으로부터 선택되고;

[0429] AA<sub>4</sub>가 Oic, Arg(NO<sub>2</sub>), Bpa 및 Nle(O-Bzl)로 이루어진 군으로부터 선택되는 것을 포함한다.

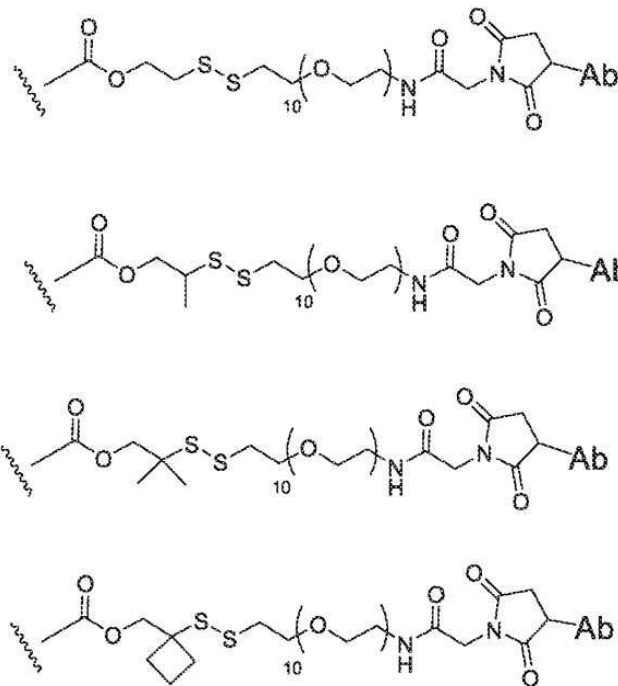
[0430] 화학식 I의 면역접합체의 예시적인 구현에는 L이 PEP를 포함하고, PEP가 Ala-Pro-Val, Asn-Pro-Val, Ala-Ala-Val, Ala-Ala-Pro-Ala, Ala-Ala-Pro-Val, 및 Ala-Ala-Pro-Nva로 이루어진 군으로부터 선택되는 것을 포함한다.

[0431] 화학식 I의 면역접합체의 예시적인 구현에는 L이 PEP를 포함하고, PEP가 하기 구조로부터 선택되는 것을 포함한다:



[0432]

[0433] 화학식 I의 면역접합체의 예시적인 구현에는 L이 하기 구조로부터 선택되는 것을 포함한다:



[0434]

[0435] 상기 식 중, 물결선은 R<sup>5</sup>에 대한 부착을 나타낸다.

[0436] 본 발명은 화학식 I 구현예의 특징의 모든 합당한 조합 및 순열을 포함한다.

[0437] 특정 구현예에서, 본 발명의 면역접합체 화합물은 면역자극 활성을 갖는 것을 포함한다. 본 발명의 면역접합체는 중앙 조직에 유효 용량의 8-설포닐-2-아미노벤자제핀(8SO<sub>2</sub>Bz) 약물을 선택적으로 전달하며, 이에 의해 비접합된 8SO<sub>2</sub>Bz에 비해 치료학적 지수("치료학적 윈도우")를 증가시키면서 더 큰 선택성(즉, 더 낮은 유효 용량)을 달성할 수 있다.

[0438] 표 3a 및 3b의 각각의 면역접합체를 실시예 201의 방법에 따라 제조하고, HPLC로 정제하고, 질량 분광법으로 특

성화하였다.

[0439] 표 3a 8-설포닐-2-아미노벤자제핀 면역접합체(IC)

면역접합체 번호	8SO2BzL 표 2a	항체 항원	DAR	cDC 활성화 (IL12p70 분비) – EC <sub>50</sub> (nM)
IC-1	8SO2BzL-1	트라스투주맙 HER2	2.5	
IC-2	8SO2BzL-2	TROP2	3.9	0.8
IC-3	8SO2BzL-3	TROP2	3.9	0.4
IC-4	8SO2BzL-4	TROP2	3.8	
IC-5	8SO2BzL-5	TROP2	3.7	0.4
IC-6	8SO2BzL-6	TROP2	2.6	0.6
IC-7	8SO2BzL-7	TROP2	3.9	27.3
IC-8	8SO2BzL-8	TROP2	3.6	4.2
IC-9	8SO2BzL-9	TROP2	4.0	2.4
IC-10	8SO2BzL-10	TROP2	4.3	1.5
IC-11	8SO2BzL-8	TROP2	3.8	마우스
IC-12	8SO2BzL-8	TROP2	3.8	마우스
IC-13	8SO2BzL-8	리톡시맙 CD20	3.2	
IC-14	8SO2BzL-8	TROP2	3.3	마우스
IC-15	8SO2BzL-7	아벨루맙 PD-L1	4.0	
IC-16	8SO2BzL-8	아벨루맙 PD-L1	3.8	

[0440]

IC-17	8SO2BzL-5	110-G1f PD-L1	3.1, 4.0	0.3
IC-18	8SO2BzL-4	110-G1f PD-L1	3.2, 3.4, 3.5, 3.9	0.4
IC-19	8SO2BzL-3	110-G1f PD-L1	3.1	0.4
IC-20	8SO2BzL-2	110-G1f PD-L1	3.5	0.2
IC-21	8SO2BzL-7	항-M PD-L1	3.3	
IC-22	8SO2BzL-7	랫트 IgG2b 아이소타입 대조군	3.3	
IC-23	8SO2BzL-11	트라스투주맙 HER2	3.3	
IC-24	8SO2BzL-12	트라스투주맙 HER2	3.8	
IC-25	8SO2BzL-14	트라스투주맙 HER2	3.4	
IC-26	8SO2BzL-15	트라스투주맙 HER2	3.5	1.5
IC-27	8SO2BzL-16	트라스투주맙 HER2	3.5, 3.6	1.6
IC-28	8SO2BzL-18	110-G1f PD-L1	3.5	0.4
IC-29	8SO2BzL-19	110-G1f	3.6	0.6

[0441]

		PD-L1		
IC-30	8SO2BzL-20	110-G1f PD-L1	3.5	1.3
IC-31	8SO2BzL-17	트라스투주맙 HER2	3.2	
IC-32	8SO2BzL-2	트라스투주맙 HER2	3.3	1.7
IC-33	8SO2BzL-3	트라스투주맙 HER2	3.5	0.5
IC-34	8SO2BzL-4	트라스투주맙 HER2	3.7	0.9
IC-35	8SO2BzL-5	트라스투주맙 HER2	3.5	0.9
IC-36	8SO2BzL-10	트라스투주맙 HER2	3.7	
IC-37	8SO2BzL-23	트라스투주맙 HER2	2.1	1.3
IC-38	8SO2BzL-22	트라스투주맙 HER2	1.9	1.8
IC-39	8SO2BzL-21	트라스투주맙 HER2	2.8	1.6
IC-40	8SO2BzL-9	트라스투주맙 HER2	4.0	
IC-41	8SO2BzL-7	트라스투주맙 HER2	4.0	

[0442]

IC-42	8SO2BzL-8	트라스투주맙 HER2	3.4, 4.0	
IC-43	8SO2BzL-6	트라스투주맙 HER2	3.8	
IC-44	8SO2BzL-7	h1gG1 아이소타입 대조군	3.8	

[0443]

[0444] 표 3b 비교기 면역접합체(CIC)

면역접합체 번호	비교기 화합물 표 2b	항체	DAR	cDC 활성화 (IL12p70 분비) - EC <sub>50</sub> (nM)
CIC-1	C-1	TROP2	2.4	0.8
CIC-2	C-2	TROP2	2.5	0.7

[0445]

[0446]

도 1은 cDC-농후화된 1차 세포 단리물과 공동-배양에 의한 다양한 농도의 면역접합체 IC-3, 비교기 CIC-1, 및 네이키드 항체 TROP2를 항온처리한 후 분비된 TNF α (종양 괴사 인자 알파) 사이토카인 수준의 그래프를 보여준다. 도 2는 cDC-농후화된 1차 세포 단리물과 공동-배양에 의한 다양한 농도의 면역접합체 IC-3, 비교기 CIC-2, 및 네이키드 항체 TROP2를 항온처리한 후 분비된 TNF α (종양 괴사 인자 알파) 사이토카인 수준의 그래프를 보여준다.

[0447]

상청액에서의 분비된 사이토카인 수준을 LegendPlex 사이토카인 비드 어레이 키트를 사용하여 결정하였다. TROP2-표적화된 면역접합체 IC-2, CIC-1 및 CIC-2는 암에 대한 면역 반응을 일으키는 것과 관련된 사이토카인 TNF α (알파)의 분비를 유도하고 TROP2-발현 종양 세포에 노출되었을 때 골수 세포의 활성화를 입증한다. 8-설포닐-2-아미노벤자제핀 면역접합체 IC-3은 비교 면역접합체 CIC-1 및 CIC-2보다 더 고수준의 TNF α를 자극했다. 특히, 8-설포닐-2-아미노벤자제핀 페이로드 분자량 및 소수성을 감소시키면서 증가된 활성을 제공하는 보다 효율적인 페이로드를 나타낸다. 네이키드 항체 TROP2는 골수 활성화를 유도하지 않아 TLR7/8 활성화 페이로드에 대한 의존성을 보여준다.

[0448]

약물 로딩은 p, 화학식 I의 면역접합체에서 항체당 8-설포닐-2-아미노벤자제핀(8SO2Bz) 모이어티의 수, 및 표 3a의 예시적인 면역접합체에서 측정된 바와 같은 (DAR)로 표시된다. 약물(8SO2Bz) 로딩은 항체당 1 내지 약 8개의 약물 모이어티(D) 범위일 수 있다. 화학식 I의 면역접합체는 1 내지 약 8의 약물 모이어티 범위와 접합된 항체의 혼합물 또는 집합체를 포함한다. 일부 구현예에서, 항체에 접합될 수 있는 약물 모이어티의 수는 리신 및 시스테인과 같은 반응성 또는 이용 가능한 아미노산 측쇄 잔기의 수에 의해 제한된다. 일부 구현예에서, 유리 시스테인 잔기는 본원에 기재된 방법에 의해 항체 아미노산 서열에 도입된다. 이러한 양태에서, p는 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 또는 8, 및 1 내지 8 또는 2 내지 5와 같은 이들의 범위일 수 있다. 임의의 이러한 양태에서, p 및 n은 동일하다(즉, p = n = 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 또는 8이거나, 그 사이의 일부 범위임). 화학식 I의 예시적인 면역접합체는 1, 2, 3 또는 4개의 조작된 시스테인 아미노산을 갖는 항체를 포함하지만, 이에 제한되지 않는다 (Lyon, R. 등 (2012) *Methods in Enzym.* 502:123-138). 일부 구현예에서, 하나 이상의 유리 시스테인 잔기는 조작의 사용 없이, 사슬내 및 사슬간 이황화 결합(천연 이황화 기)을 형성하는 항체에 이미 존재하며, 이 경우 기존의 유리, 환원된 시스테인 잔기는 항체를 약물에 접합시키는 데 사용될 수 있다. 일부 구현예에서, 항체는 하나 이상의 유리 시스테인 잔기를 생성하기 위해 항체의 접합에 앞서 환원 조건에 노출된다.

[0449]

일부 면역접합체에 대해, p는 항체에 대한 부착 부위의 수에 의해 제한될 수 있다. 예를 들어, 부착이 시스테인 티올인 경우, 본원에 기재된 특정 예시적인 구현예에서와 같이, 항체는 단지 하나 또는 제한된 수의 시스테인 티올기를 가질 수 있거나, 또는 단지 하나 또는 제한된 수의 약물이 부착될 수 있는 충분히 반응성인 티올기를 가질 수 있다. 다른 구현예에서, 항체 중의 하나 이상의 리신 아미노기는 화학식 II의 8SO2Bz-링커 화합물과의 접합에 이용 가능하고 반응성일 수 있다. 특정 구현예에서, 더 높은 약물 로딩, 예를 들면 p > 5는 특정 항체-약물 접합체의 응집, 불용성, 독성 또는 세포 투과성의 소실을 야기할 수 있다. 특정 구현예에서, 면역접합체에 대한 평균 약물 로딩은 1 내지 약 8; 약 2 내지 약 6; 또는 약 3 내지 약 5의 범위이다. 특정 구현예에서, 항체는 리신 또는 시스테인과 같은 반응성 친핵성기를 나타내기 위해 변성 조건에 적용된다.

[0450]

면역접합체의 로딩(약물/항체 비)은 상이한 방식으로 예를 들면 (i) 항체에 대한 8SO2Bz-링커 중간체 화합물의 몰 과량의 제한, (ii) 접합 반응 시간 또는 온도의 제한 및 (iii) 최적화된 항체 반응성에 대한 부분 또는 제한 환원 변성 조건에 의해 제어될 수 있다.

[0451]

항체의 하나 초과 친핵성 기가 약물과 반응하는 경우에, 생성된 생성물이 항체에 부착된 하나 이상의 약물 모이어티의 분포를 갖는 면역접합체 화합물의 혼합물이라는 것으로 이해되어야 한다. 항체당 약물의 평균 수는 항체에 특이적이고 약물에 특이적인 이중 ELISA 항체 검정에 의해 혼합물로부터 계산될 수 있다. 개별 면역접합체

분자는 질량 분광법에 의해 혼합물에서 확인되고 HPLC, 예를 들면 소수성 상호작용 크로마토그래피에 의해 분리될 수 있다(예를 들어, McDonagh 등 (2006) Prot. Engr. Design & Selection 19(7):299-307; Hamblett 등 (2004) Clin. Cancer Res. 10:7063-7070; Hamblett, K.J., 등 "Effect of drug loading on the pharmacology, pharmacokinetics, and toxicity of an anti-CD30 antibody-drug conjugate," Abstract No. 624, American Association for Cancer Research, 2004 Annual Meeting, March 27-31, 2004, Proceedings of the AACR, Volume 45, March 2004; Alley, S.C., 등 "Controlling the location of drug attachment in antibody-drug conjugates," Abstract No. 627, American Association for Cancer Research, 2004 Annual Meeting, March 27-31, 2004, Proceedings of the AACR, Volume 45, March 2004)을 참조한다. 특정 구현예에서, 단일 로딩 값을 갖는 균질한 면역접합체는 전기영동 또는 크로마토그래피에 의해 접합 혼합물로부터 분리될 수 있다.

[0452] 시험관내 면역접합체 활성의 평가를 실시예 203의 방법에 따라 수행할 수 있다.

[0453] 면역접합체의 조성물

[0454] 본 발명은 본원에 기재된 바와 같은 복수의 면역접합체 및 선택적으로 이를 위한 담체, 예를 들어, 약제학적으로 또는 약리학적으로 허용 가능한 담체를 포함하는 조성물, 예를 들어, 약제학적으로 또는 약리학적으로 허용 가능한 조성물 또는 제형을 제공한다. 면역접합체는 조성물에서 동일하거나 상이할 수 있고, 즉 조성물은 항체 작제물에서 동일한 위치에 연결된 동일한 수의 아주반트를 갖는 면역접합체 및/또는 항체 작제물에서 상이한 위치에 연결된 동일한 수의 8-설포닐-2-아미노벤자제핀(8SO2Bz) 아주반트를 갖거나, 항체 작제물에서 동일한 위치에 연결된 상이한 수의 8SO2Bz 아주반트를 갖거나, 항체 작제물에서 상이한 위치에 연결된 상이한 수의 8SO2Bz 아주반트를 갖는 면역접합체를 포함할 수 있다.

[0455] 예시적인 구현예에서, 면역접합체 화합물을 포함하는 조성물은 면역접합체 화합물의 혼합물을 포함하고, 면역접합체 화합물의 혼합물에서의 항체당 평균 약물(8SO2Bz) 로딩(DAR)은 약 2 내지 약 5이다.

[0456] 본 발명의 면역접합체의 조성물은 평균 아주반트 대 항체 작제물 비(DAR)가 약 0.4 내지 약 10일 수 있다. 당업자는 항체 작제물에 접합된 8-설포닐-2-아미노벤자제핀 아주반트의 수가 본 발명의 다수의 면역접합체를 포함하는 조성물에서 면역접합체마다 변할 수 있고, 이에 따라 아주반트 대 항체 작제물(예를 들면, 항체) 비가 약물 대 항체 비(DAR)라 지칭될 수 있는 평균으로서 측정될 수 있다는 것을 인식할 것이다. 아주반트 대 항체 작제물(예를 들어, 항체) 비는 임의의 적합한 수단에 의해 평가될 수 있으며, 이들 중 다수는 질량 분석법, ELISA 검정, 및 HPLC와 같은 통상적인 수단을 포함하여 당업계에 공지되어 있다. p의 면에서 조성물에서의 면역접합체의 정량적 분포가 또한 결정될 수 있다. 일부 경우에, 다른 약물 로딩을 갖는 면역접합체로부터의 p가 특정 값인 균질한 면역접합체의 분리, 정제 및 특성화는 역상 HPLC 또는 전기영동과 같은 수단에 의해 달성될 수 있다.

[0457] 일부 구현예에서, 조성물은 하나 이상의 약제학적으로 또는 약리학적으로 허용 가능한 부형제를 추가로 포함한다. 예를 들면, 본 발명의 면역접합체는 비경구 투여, 예컨대 IV 투여 또는 체강 또는 장기의 내강으로의 투여를 위해 제형화될 수 있다. 대안적으로, 면역접합체는 종양내로 주사될 수 있다. 주사용 조성물은 흔히 약제학적으로 허용 가능한 담체에 용해된 면역접합체의 용액을 포함할 것이다. 사용될 수 있는 허용 가능한 비히클 및 용매 중에는 물 및 하나 이상의 염, 예컨대 염화나트륨의 등장성 용액, 예를 들면 링거액이 있다. 게다가, 멸균 고정유는 용매 또는 현탁 매질로서 관습대로 사용될 수 있다. 이 목적을 위해, 합성 모노글리세라이드 또는 디글리세라이드를 포함하는 임의의 완하성 고정유를 사용할 수 있다. 게다가, 올레산과 같은 지방산이 주사제의 제조에서 마찬가지로 사용될 수 있다. 이 조성물은 바람직하게는 멸균이고 일반적으로 원치 않는 물질이 없다. 이 조성물은 종래의 잘 알려진 멸균화 기법에 의해 멸균될 수 있다. 조성물은 생리학적 조건을 근사화하는 데 필요한 약제학적으로 허용 가능한 보조 물질, 예컨대 pH 조정제 및 완충제, 독성 조정제, 예를 들면, 아세트산나트륨, 염화나트륨, 염화칼륨, 염화칼슘, 락트산나트륨 및 기타를 함유할 수 있다.

[0458] 조성물은 임의의 적합한 농도의 면역접합체를 함유할 수 있다. 조성물에서의 면역접합체의 농도는 널리 변할 수 있고, 선택된 특정 투여 방식 및 환자의 필요에 따라 주로 유체 부피, 점도, 체중 및 기타에 기반하여 선택될 것이다. 특정 구현예에서, 주사용 용액 제형 내 면역접합체의 농도는 약 0.1%(w/w) 내지 약 10%(w/w)의 범위일 것이다.

[0459] 면역접합체를 이용한 암 치료 방법

[0460] 본 발명은 암을 치료하는 방법을 제공한다. 상기 방법은 치료를 필요로 하는 대상체, 예를 들면 암을 갖고 암에 대한 치료를 필요로 하는 대상체에게 (예를 들면, 본원에 기재된 것과 같은 조성물로서) 치료학적 유효량의 본원에 기재된 것과 같은 면역접합체를 투여하는 단계를 포함한다. 상기 방법은 치료학적 유효량의 표 3a로부터

선택된 면역접합체(IC)를 투여하는 단계를 포함한다.

- [0461] 본 발명의 면역접합체가 예를 들면 종양 항원의 과발현을 특징으로 하는 다양한 과증식성 질환 또는 장애를 치료하기 위해 사용될 수 있다는 것이 고려된다. 예시적인 과증식성 장애는 양성 또는 악성 고형 종양 및 조혈 장애, 예컨대 백혈병 및 림프성 악성상태를 포함한다.
- [0462] 또 다른 양태에서, 약제로서 사용하기 위한 면역접합체가 제공된다. 특정 구현예에서, 본 발명은 개체를 치료하는 방법에 사용하기 위한 면역접합체를 제공하며, 이는 유효량의 면역접합체를 개체에게 투여하는 단계를 포함한다. 이러한 일 구현예에서, 상기 방법은 예를 들어 유효량의 본원에 기재된 것과 같은 적어도 하나의 추가 치료제를 개체에게 투여하는 단계를 추가로 포함한다.
- [0463] 추가의 양태에서, 본 발명은 약제의 제작 또는 제조에서의 면역접합체의 용도를 제공한다. 일 구현예에서, 약제는 암의 치료를 위한 것이며, 상기 방법은 유효량의 약제를 암을 갖는 개체에게 투여하는 단계를 포함한다. 이러한 일 구현예에서, 상기 방법은 예를 들어 본원에 기재된 것과 같은 적어도 하나의 추가 치료제의 유효량을 개체에게 투여하는 단계를 추가로 포함한다.
- [0464] 암종은 상피 조직에서 기원하는 악성상태이다. 상피 세포는 신체의 외부 표면을 덮고, 장 동공에 늘어서고, 신장 조직의 내벽을 형성한다. 암종의 예는 선암(선상(분비) 세포에서 시작하는 암, 예컨대 유방, 췌장, 폐, 전립선, 위, 위식도 연결부 및 결장의 암), 부신 암종; 간세포 암종; 신장 세포 암종; 난소 암종; 제자리 암종; 유관 암종; 유방의 암종; 기저 세포 암종; 편평 세포 암종; 이행성 세포 암종; 결장 암종; 비인두 암종; 다실 낭종성 신세포 암종; 오프 세포 암종; 대세포 폐 암종; 소세포 폐 암종; 비소세포 폐 암종; 및 기타를 포함하지만, 이들로 제한되지 않는다. 암종은 전립선, 췌장, 결장, 뇌(보통 속발성 전이로서), 폐, 유방 및 피부에서 발견될 수 있다. 일부 구현예에서, 비소세포 폐 암종을 치료하는 방법은 종양-연관 항원에 결합할 수 있는 항체 작제물을 함유하는 면역접합체를 투여하는 단계를 포함한다.
- [0465] 연조직 종양은 결합 조직으로부터 유래된 희귀 종양의 매우 다양한 그룹이다. 연조직 종양의 예는 포상 연부 육종; 혈관종형 섬유성 조직구종; 연골점액양 섬유종; 골격 연골육종; 골격외 점액양 연골육종; 투명 세포 육종; 결합조직성 소원형-세포 종양; 피부섬유육종 홍염; 자궁내막 기질 종양; 유잉 육종; 섬유종증(유건종); 연소성 섬유육종; 위장 기질 종양; 골 거대 세포 종양; 건활막 거대 세포 종양; 염증성 근섬유아세포 종양; 자궁 횡문종; 횡문근육종; 지방모세포종; 전형적 지방종; 방추 세포 또는 다형성 지방종; 비전형 지방종; 연골 지방종; 잘 분화된 지방육종; 점액양/원형 세포 지방육종; 다형성 지방육종; 점액양 악성 섬유성 조직구종; 고등급 악성 섬유성 조직구종; 점액섬유육종; 악성 말초 신경초 종양; 중피종; 신경모세포종; 골연골종; 골육종; 원시 신경 외배엽 종양; 폐포 횡문근육종; 배아 횡문근육종; 양성 또는 악성 신경초종; 활막 육종; 에반 종양; 결절성 근막염; 유건종-유형 섬유종증; 고립성 섬유성 종양; 피부섬유육종 홍염(DFSP); 혈관육종; 상피모양 혈관내피종; 건활막 거대 세포 종양(TGCT); 색소성 용모결절성 활막염(PVNS); 섬유이형성증; 점액섬유육종; 섬유육종; 활막 육종; 악성 말초 신경초 종양; 신경섬유종; 연조직의 다형성 선종; 및 섬유아세포, 근섬유아세포, 조직구, 혈관 세포/내피 세포 및 신경초 세포로부터 유래된 신생물을 포함하지만, 이들로 제한되지는 않는다.
- [0466] 육종은 중배엽 기원의 세포, 예를 들면 골에서 또는 연골, 지방, 근육, 혈관, 섬유성 조직 또는 다른 결합 또는 지지 조직을 포함하는 신체의 연조직에서 생기는 희귀 암 유형이다. 육종의 상이한 유형은 암이 형성하는 곳에 기반한다. 예를 들면, 골육종은 골에서 형성되고, 지방육종은 지방에서 형성되고, 횡문근육종은 근육에서 형성된다. 육종의 유형은 흉폐 부위의 원시 신경 외배엽 종양(primitive neuroectodermal tumor; PNET)(아스킨 종양); 포도상 육종; 연골육종; 악성 혈관내피종; 악성 신경초종; 골육종; 및 연조직 육종(예를 들면, 포상 연부 육종; 혈관육종; 낭상육종 엽상피부섬유육종 홍염(DFSP); 유건종 종양; 결합조직성 소원형-세포 종양; 상피모양 육종; 골격외 연골육종; 골격외 골육종; 섬유육종; 위장 기질 종양(GIST); 혈관주위세포종; 혈관 육종(더 흔히 "혈관육종"이라고 지칭됨); 카포시 육종; 횡문근육종; 지방육종; 림프관육종; 악성 말초 신경초 종양(MPNST); 신경섬유육종; 활막 육종; 및 미분화된 다형성 육종)을 포함하지만, 이들로 제한되지는 않는다.
- [0467] 기형종은 예를 들면, 모발, 근육 및 골을 포함하는 몇몇 상이한 유형의 조직을 함유할 수 있는(예를 들면, 내배엽, 중배엽 및 외배엽의 임의의 및/또는 모든 3개의 생식 층으로부터 유래된 조직을 포함할 수 있는) 생식 세포 종양의 유형이다. 기형종은 가장 흔하게는 여성에서는 난소에서 생기고, 남성에서는 고환에서 생기고, 아동에서는 꼬리뼈에서 생긴다.
- [0468] 흑색종은 멜라닌세포(멜라닌 색소를 만드는 세포)에서 시작하는 암의 유형이다. 흑색종은 점(피부 흑색종)에서 시작할 수 있지만, 또한 다른 색소침착된 조직, 예컨대 눈 또는 장에서 시작할 수 있다.

- [0469] 메르켈 세포 암종은 얼굴, 두부 또는 경부에서 살색 또는 멍든 붉은색의 결절로서 보통 보이는 희귀 피부암 유형이다. 메르켈 세포 암종은 또한 피부의 신경내분비 암종이라 칭한다. 일부 구현예에서, 메르켈 세포 암종을 치료하는 방법은 예를 들어, CEA(예를 들어, 라베투주맙 또는, 이의 바이오시밀러 또는 이의 바이오베타)에 결합할 수 있는 항체 작제물을 포함하는 면역접합체를 투여하는 단계를 포함한다. 일부 구현예에서, 메르켈 세포 암종은 투여가 발생할 때 전이된다.
- [0470] 백혈병은 혈액-형성 조직, 예컨대 골수에서 시작하고 많은 수의 비정상 혈액 세포가 생성되고 혈류로 진입하게 하는 암이다. 예를 들면, 백혈병은 보통 혈류에서 성숙하는 골수 유래된 세포에서 기원할 수 있다. 백혈병은 얼마나 빨리 질환이 발생하고 진행되는지(예를 들면, 급성 대 만성) 및 이환된 백혈구의 유형(예를 들면, 골수성 대 림프성)에 대해 명명된다. 골수성 백혈병은 또한 골수기원 또는 골수아구성 백혈병이라 칭해진다. 림프성 백혈병은 또한 림프아구성 또는 림프구성 백혈병이라 칭해진다. 림프성 백혈병 세포는 팽윤될 수 있는 림프절에서 수집될 수 있다. 백혈병의 예는 급성 골수성 백혈병(AML), 급성 림프아구성 백혈병(ALL), 만성 골수성 백혈병(CML) 및 만성 림프구성 백혈병(CLL)을 포함하지만, 이들로 제한되지는 않는다.
- [0471] 림프종은 면역계의 세포에서 시작하는 암이다. 예를 들면, 림프종은 보통 림프계에서 성숙하는 골수 유래된 세포에서 기원할 수 있다. 림프종의 2개의 기본적인 카테고리가 있다. 림프종의 하나의 카테고리는 리드-스텐베르크(Reed-Sternberg) 세포라 불리는 세포의 유형의 존재로 표시된 호지킨 림프종(HL)이다. 현재 HL의 6개의 인식된 유형이 있다. 호지킨 림프종의 예는 결절성 경화증 전통적 호지킨 림프종(CHL), 혼합 세포성 CHL, 림프구-결실 CHL, 림프구-농후 CHL 및 결절성 림프구 우세 HL을 포함한다.
- [0472] 림프종의 다른 카테고리는 면역계 세포의 큰 다양한 암 그룹을 포함하는 비호지킨 림프종(NHL)이다. 비호지킨 림프종은 게으른 (느리게 진행) 과정을 갖는 암 및 공격적 (빠르게 진행) 과정을 갖는 암으로 추가로 나뉘질 수 있다. 현재 NHL의 61개의 인식된 유형이 있다. 비-호지킨 림프종의 예는 AIDS-관련된 림프종, 역형성 대세포 림프종, 혈관면역모세포 림프종, 모세포 NK-세포 림프종, 버킷 림프종, 버킷 유사 림프종(작은 비절단 세포 림프종), 만성 림프구성 백혈병/작은 림프구성 림프종, 피부 T-세포 림프종, 미만성 대형 B-세포 림프종, 장병증-유형 T-세포 림프종, 소포성 림프종, 간비장 감마-델타 T-세포 림프종, T-세포 백혈병, 림프아구성 림프종, 외투 세포 림프종, 변연계 림프종, 비장 T-세포 림프종, 소아 림프종, 말초 T-세포 림프종, 원발성 중추 신경계 림프종, 형질전환된 림프종, 치료 관련된 T-세포 림프종 및 발덴스트롬 거대글로불린혈증을 포함하지만, 이들로 제한되지는 않는다.
- [0473] 뇌암은 뇌 조직의 임의의 암을 포함한다. 뇌암의 예는 신경교종(예를 들면, 교모세포종, 성상세포종, 핍지교종, 상의세포종 및 기타), 수막종, 뇌하수체 선종 및 전정 신경초종, 원시 신경 외배엽 종양(수모세포종)을 포함하지만, 이들로 제한되지는 않는다.
- [0474] 본 발명의 면역접합체는 단독으로 또는 치료에서 다른 제제와 조합되어 사용될 수 있다. 예를 들면, 면역접합체는 적어도 하나의 추가 치료제, 예컨대 화학치료제와 공동투여될 수 있다. 이러한 병용 치료는 조합된 투여(여기서 2개 또는 초과 치료제는 동일한 제형 또는 별개의 제형에 포함됨) 및 별개의 투여(이 경우에 면역접합체의 투여는 추가 치료제 및/또는 아쥬반트의 투여 전에, 동시에 및/또는 후에 발생할 수 있음)를 포함한다. 면역접합체는 또한 방사선 치료와 조합되어 사용될 수 있다.
- [0475] 본 발명의 면역접합체(및 임의의 추가 치료제)는 경구, 비경구, 폐내 및 비강내, 및 원하면 국소 치료에 대해 병변내 투여를 포함하는 임의의 적합한 수단에 의해 투여될 수 있다. 비경구 주입은 근육내, 정맥내, 동맥내, 복강내 또는 피하 투여를 포함한다. 투약은 부분적으로 투여가 짧거나 만성이든지 간에 따라, 어떤 적절한 경로로, 예를 들어, 정맥내 또는 피하 주사와 같은 주사에 의해 이루어질 수 있다. 다양한 시점 상에서 단일 또는 다중 투여를 포함하지만 이에 제한되지 않는 다양한 투여 스케줄, 볼러스 투여 및 펄스 주입이 본원에서 고려된다.
- [0476] 면역접합체는 임의의 적합한 투약 레지멘, 예컨대 라베투주맙, 이의 바이오시밀러 및 이의 바이오베타에 사용된 투약 레지멘을 사용하여 임의의 치료학적 유효량으로 이를 필요로 하는 대상체에게 투여된다. 예를 들면, 상기 방법은 대상체에게 약 100 ng/kg 내지 약 50 mg/kg의 용량을 제공하도록 면역접합체를 투여하는 것을 포함할 수 있다. 면역접합체 용량은 약 5 mg/kg 내지 약 50 mg/kg, 약 10 µg/kg 내지 약 5 mg/kg 또는 약 100 µg/kg 내지 약 1 mg/kg의 범위일 수 있다. 면역접합체 용량은 약 100, 200, 300, 400 또는 500 µg/kg일 수 있다. 면역접합체 용량은 약 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 또는 10 mg/kg일 수 있다. 면역접합체 용량은 또한 특정한 접합체뿐만 아니라 치료되는 암의 유형 및 중증도에 따라 이 범위 밖일 수 있다. 투여 빈도는 주마다 단일 용량 내지 다중 용량의 범위이거나 더 빈번할 수 있다. 일부 구현예에서, 면역접합체는 달마다 약 1회 내지 주마다 약

5회 투여된다. 일부 구현예에서, 면역접합체는 주마다 1회 투여된다.

[0477] 또 다른 양태에서, 본 발명은 암을 예방하는 방법을 제공한다. 상기 방법은 대상체에게 (예를 들면, 상기에 기재된 것과 같은 조성물로서) 면역접합체의 치료학적 유효량을 투여하는 단계를 포함한다. 특정 구현예에서, 대상체는 예방되는 특정 암에 민감하다.

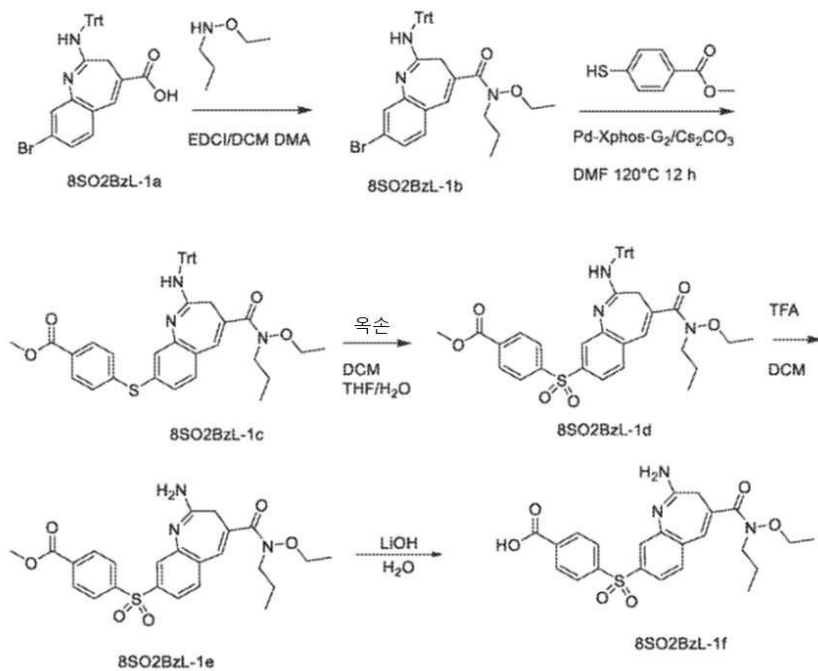
[0478] 본 발명의 일부 구현예는 상기에 기재된 것과 같은 암을 치료하는 방법을 제공하고, 암은 유방암이다. 유방암은 상이한 유방 부위에서 기원할 수 있고, 다수의 상이한 유형의 유방암이 특성화되었다. 예를 들어, 본 발명의 면역접합체는 도관 *제자리* 암종; 침윤성 도관 암종(예를 들어, 세관 암종; 수질 암종; 점액 암종; 유두상 암종; 또는 사상엽 유방 암종); 소엽 *제자리* 암종; 침윤성 소엽 암종; 염증성 유방암; 및 삼중 음성(에스트로겐 수용체, 프로게스테론 수용체 및 과잉 HER2 단백질에 대한 테스트 음성) 유방암과 같은 다른 형태의 유방암을 치료하는데 사용될 수 있다. 일부 구현예에서, 유방암을 치료하는 방법은 종양-연관 항원 (TAA)에 결합할 수 있는 항체 작제물, 또는 TAA를 과발현하는 종양을 함유하는 면역접합체를 투여하는 단계를 포함한다.

[0479] 일부 구현예에서, 암은 TLR7 및/또는 TLR8에 의해 유도된 전염증성 반응에 민감하다.

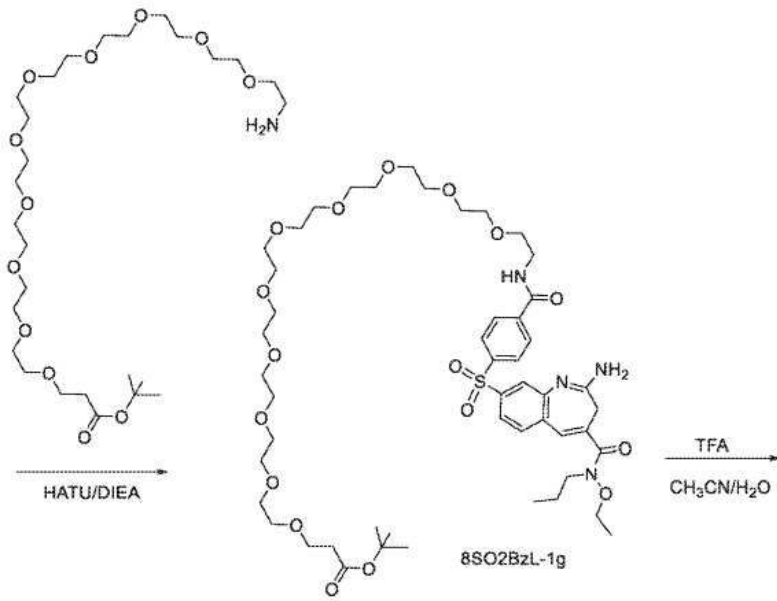
[0480] 일부 구현예에서, 치료학적 유효량의 면역접합체는 자궁경부암, 자궁내막암, 난소암, 전립선암, 췌장암, 식도암, 방광암, 요로암, 요로상피 암종, 폐암, 비소세포 폐암, 메르켈 세포 암종, 결장암, 결장직장암, 위암 또는 유방암을 치료하는 것을 필요로 하는 환자에게 투여된다. 메르켈 세포 암종 암은 전이성 메르켈 세포 암종일 수 있다. 유방암은 삼중-음성 유방암일 수 있다. 식도암은 위식도 연결부 선암종일 수 있다.

[0481] 실시예

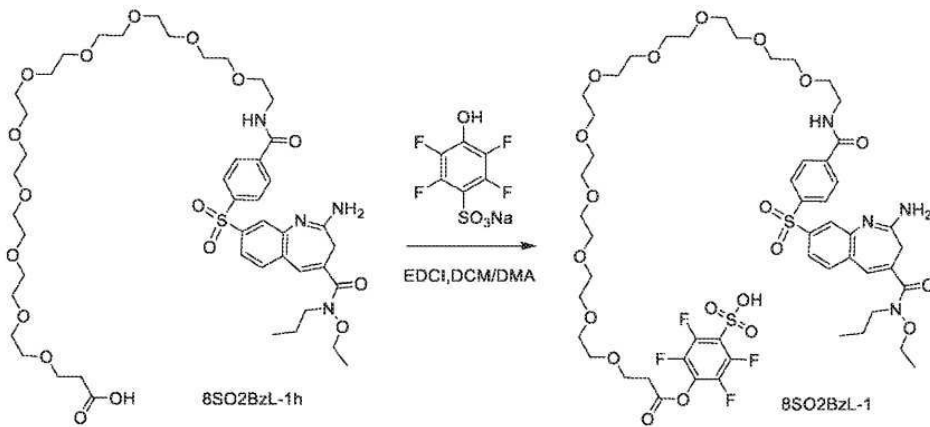
[0482] 실시예 L-1 4-[3-[2-[2-[2-[2-[2-[2-[2-[2-[2-[4-[2-아미노-4-[에톡시(프로필) 카바모일]-3H-1-벤자제핀-8-일]설포닐]벤조일]아미노]에톡시]에톡시]에톡시]에톡시]에톡시]에톡시]에톡시]에톡시]에톡시]프록사노일옥시]-2,3,5,6-테트라플루오로-벤젠설포닐산, 8SO2BzL-1의 합성



[0483]



[0484]



[0485]

[0486]

8-브로모-N-에톡시-N-프로필-2-(트리틸아미노)-3H-1-벤자제핀-4-카복사미드, 8SO2BzL-1b의 제조

[0487]

DCM(15 mL) 및 DMA(5 mL) 중 8-브로모-2-(트리틸아미노)-3H-1-벤자제핀-4-카복실산, 8SO2BzL-1a(1 g, 1.91 mmol, 1 eq) 및 N-에톡시프로판-1-아민(320 mg, 2.29 mmol, 1.2 eq, HCl)의 혼합물에 EDCI(1.10 g, 5.73 mmol, 3.0 eq)를 25°C에서 일 부분으로 첨가한 후, 25°C에서 0.5h 동안 교반하였다. 혼합물을 농축시켜 DCM을 제거하였다. 그런 다음, 잔류물을 pH가 8 내지 9가 될 때까지 수성 NaHCO<sub>3</sub>로 희석하였다. 혼합물을 EtOAc (30 mL x 3)로 추출하였다. 유기층을 염수로 세척하고, Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>로 건조시키고, 여과하고, 농축시켰다. 잔류물을 실리카 겔 크로마토그래피 (컬럼 높이: 250 mm, 직경: 100 mm, 100-200 메쉬 실리카 겔, 석유 에테르/에틸 아세테이트 = 1/0,3/1)로 정제하여 8SO2BzL-1b (0.7 g, 1.15 mmol, 60.21% 수율)를 백색 고체로서 수득하였다. <sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz) δ 7.38-7.15 (m, 15H), 7.06-6.94 (m, 2H), 6.72 (s, 1H), 6.16 (s, 1H), 4.03-3.83 (m, 2H), 3.73 (t, J=7.2 Hz, 2H), 2.78 (s, 2H), 1.89-1.64 (m, 2H), 1.25 (t, J = 7.2 Hz, 3H), 0.99 (t, J=7.2 Hz, 3H). LC/MS [M+H] 608.2 (계산치); LC/MS [M+H] 608.2 (관측치).

[0488]

메틸 4-[[4-[에톡시(프로필)카바모일]-2-(트리틸아미노)-3H-1-벤자제핀-8-일]설펜닐]벤조에이트, 8SO2BzL-1c의 제조

[0489]

DMF(4 mL) 중 8SO2BzL-1b (0.35 g, 575 umol, 1.0 eq) 및 메틸 4-설펜닐벤조에이트 (116 mg, 690 umol, 1.2 eq)의 혼합물에 디사이클로헥실[2',4',6'-tris(프로판-2-일)[1,1'-비페닐]포산, XPhos, CAS 등록 번호 564483-18-7, Huang, X., 등 (2003) J. Am. Chem. Soc. 125(22):6653-6655; Bruno, N.C. 등, (2013) Chemical Science, 4(3):916-920, (82.3 mg, 173 umol, 0.3 eq), Cs<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>(375 mg, 1.15 mmol, 2.0 eq) 및 [2-(2-아미노페닐)페닐]-클로로-팔라듐; 디사이클로헥실-[3-(2,4,6-트리아이소프로필 페닐)페닐]포스핀, Pd-Xphos-G2, CAS 등록

번호 1310584-14-5, (226 mg, 288  $\mu\text{mol}$ , 0.5 eq)을  $\text{N}_2$  하에 25°C에서 일 부분으로 첨가한 다음, 120°C에서 12h 동안 교반하였다. 혼합물을 물(20 mL)로 희석하고, EtOAc(10 mL x 3)로 추출하였다. 유기층을 염수로 세척하고,  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ 로 건조시키고, 여과하고, 농축시켰다. 잔류물을 실리카겔 크로마토그래피 (컬럼 높이: 250 mm, 직경: 100 mm, 100-200 메쉬 실리카겔, 석유 에테르/에틸 아세테이트 = 1/0, 3/1)로 정제하여 8SO2BzL-1c (0.25 g, 359.26  $\mu\text{mol}$ , 62.47% 수율)를 수득하였다. LC/MS [M+H] 696.3(계산치); LC/MS [M+H] 696.2(관측치).

[0490] 메틸 4-[[4-[에톡시(프로필)카바모일]-2-(트리틸아미노)-3H-1-벤자제핀-8-일]설포닐]벤조에이트, 8SO2BzL-1d의 제조

[0491] DCM(2 mL), THF(2 mL) 및  $\text{H}_2\text{O}$ (2 mL) 중 8SO2BzL-1c(0.25 g, 359  $\mu\text{mol}$ , 1.0 eq)의 혼합물에 과산화모노설페이트 칼륨,  $\text{KHSO}_5$ , 옥손(663 mg, 1.08 mmol, 3.0 eq)을 25°C에서 일 부분으로 첨가한 다음, 25°C에서 12h 동안 교반하였다. 혼합물을 물로 희석하고, EtOAc(20 mL x 3)로 추출하였다. 유기층을 염수로 세척하고,  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ 로 건조시키고, 여과하고, 농축시켰다. 잔류물을 실리카겔 크로마토그래피 (컬럼 높이: 250 mm, 직경: 100 mm, 100-200 메쉬 실리카겔, 석유 에테르/에틸 아세테이트 = 1/0, 1/1)로 정제하여 8SO2BzL-1d (0.2 g, 274.78  $\mu\text{mol}$ , 76.48% 수율)를 황색 오일로서 수득하였다. LC/MS [M+H] 728.27 (계산치); LC/MS [M+H] 728.2 (관측치).

[0492] 메틸 4-[[2-아미노-4-[에톡시(프로필)카바모일]-3H-1-벤자제핀-8-일]설포닐]벤조에이트, 8SO2BzL-1e의 제조

[0493] DCM(4 mL) 중 8SO2BzL-1d(0.1 g, 137  $\mu\text{mol}$ , 1.0 eq)의 혼합물에 TFA(313 mg, 2.75 mmol, 203  $\mu\text{L}$ , 20.0 eq)를 25°C에서 일 부분으로 첨가한 다음, 50°C에서 12h 동안 교반하였다. 혼합물을 진공에서 농축하여 잔류물을 수득하고, 잔류물을 분취용-HPLC(컬럼: Phenomenex Luna 80\*30mm\*3 $\mu\text{m}$ ; 이동상: [물(0.1%TFA)-아세트니트릴, ACN]; B%: 15%-35%, 8min)로 정제하여 8SO2BzL-1e(0.046 g, 94.74  $\mu\text{mol}$ , 68.96% 수율)를 백색 고체로서 수득하였다.  $^1\text{H}$  NMR ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz)  $\delta$  8.21 (d, J = 8.4 Hz, 2H), 8.10 (d, J = 8.4 Hz, 2H), 8.04 (s, 1H), 7.95-7.87 (m, 1H), 7.57 (d, J = 8.0 Hz, 1H), 7.49 (s, 1H), 6.97 (d, J = 1.2 Hz, 1H), 3.95 (s, 3H), 3.93-3.82 (m, 2H), 3.70 (t, J = 7.2 Hz, 2H), 3.23 (s, 2H), 1.82-1.66 (m, 2H), 1.21 (t, J = 7.2 Hz, 3H), 0.96 (t, J = 7.2 Hz, 3H). LC/MS [M+H] 485.16 (계산치); LC/MS [M+H] 486.1 (관측치).

[0494] 4-[[2-아미노-4-[에톡시(프로필)카바모일]-3H-1-벤자제핀-8-일]설포닐]벤조산, 8SO2BzL-1f의 제조

[0495] MeOH(2 mL),  $\text{H}_2\text{O}$ (2 mL) 및 THF(2 mL) 중 8SO2BzL-e (0.24 g, 494  $\mu\text{mol}$ , 1.0 eq)의 혼합물에 LiOH.H<sub>2</sub>O (62.2 mg, 1.48 mmol, 3.0 eq)를 25°C에서 일 부분으로 첨가한 다음, 25°C에서 2h 동안 교반하였다. 혼합물을 HCl (1 M)로 킨칭하여 pH를 6 내지 7로 조정하고, 수성상을 EtOAc (10 mL x 3)로 추출하였다. 조합된 유기층을 염수로 세척하고,  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  상에서 건조시키고, 여과하고, 농축시켜 8SO2BzL-1f (0.23 g, 조물질)를 황색 오일로서 수득하였다.  $^1\text{H}$  NMR (DMSO, 400 MHz)  $\delta$  8.16-8.06 (m, 4H), 7.61-7.54 (m, 2H), 7.49 (dd, J = 1.6, 8.0 Hz, 1H), 7.11 (s, 1H), 3.82 (q, J = 7.2 Hz, 2H), 3.59 (t, J = 7.2 Hz, 2H), 2.89 (s, 2H), 1.70-1.55 (m, 2H), 1.01 (t, J = 7.2 Hz, 3H), 0.89 (t, J = 7.2 Hz, 3H). LC/MS [M+H] 472.1 (계산치); LC/MS [M+H] 472.1 (관측치).

[0496] tert-부틸 3-[2-[2-[2-[2-[2-[2-[2-[2-[2-[4-[[2-아미노-4-[에톡시(프로필)카바모일]-3H-1-벤자제핀-8-일]설포닐]벤조일]아미노]에톡시]에톡시]에톡시]에톡시]에톡시]에톡시]에톡시]에톡시]에톡시]프로파노에이트, 8SO2BzL-1g의 제조

[0497] DMF (4 mL) 중 8SO2BzL-1f (0.2 g, 424  $\mu\text{mol}$ , 1.0 eq)의 혼합물에 tert-부틸 3-[2-[2-[2-[2-[2-[2-[2-[2-[2-(2-아미노에톡시]에톡시]에톡시]에톡시]에톡시]에톡시]에톡시]에톡시]에톡시] 프로파노에이트 (248 mg, 424  $\mu\text{mol}$ , 1.0 eq), DIEA (164 mg, 1.27 mmol, 222  $\mu\text{L}$ , 3.0 eq), 헥사플루오로포스페이트 아자벤조트리아졸 테트라메틸 우로늄, HATU, CAS 등록 번호 148893-10-1 (177 mg, 467  $\mu\text{mol}$ , 1.1 eq)를 25°C에서 일 부분으로 첨가한 다음, 25°C에서 0.5h 동안 교반하였다. 혼합물을 물로 희석하고 EtOAc(30 mL x 3)로 추출하였다. 유기층을 염수로 세척하고,  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ 로 건조한 후, 여과하고 농축하여 8SO2BzL-1g (0.5g, 조물질)을 황색 오일로서 얻었다. LC/MS [M+H] 1039.5 (계산치); LC/MS [M+H] 1039.5 (관측치).

[0498] 3-[2-[2-[2-[2-[2-[2-[2-[2-[2-[4-[[2-아미노-4-[에톡시(프로필) 카바모일]-3H-1-벤자제핀-8-일]설포닐]벤조일]아미노]에톡시]에톡시]에톡시]에톡시]에톡시]에톡시]에톡시]에톡시]에톡시]프로판산, 8SO2BzL-1h의 제조



23.83  $\mu\text{mol}$ , 8.34% 수율)를 황색 고체로서 수득하였다.  $^1\text{H NMR}$  (DMSO, 400 MHz)  $\delta$  11.87 (s, 1H), 9.78 (s, 1H), 8.81 (s, 1H), 7.66 (s, 1H), 7.55 (s, 2H), 7.34-7.27 (m, 1H), 3.92-3.78 (m, 2H), 3.63 (t, J = 7.2 Hz, 2H), 3.31 (s, 2H), 3.16-3.01 (m, 2H), 1.70-1.60 (m, 2H), 1.36 (s, 9H), 0.89(t, J = 7.2 Hz, 3H). LC/MS [M+H] 483.2(계산치); LC/MS [M+H] 483.1(관측치).

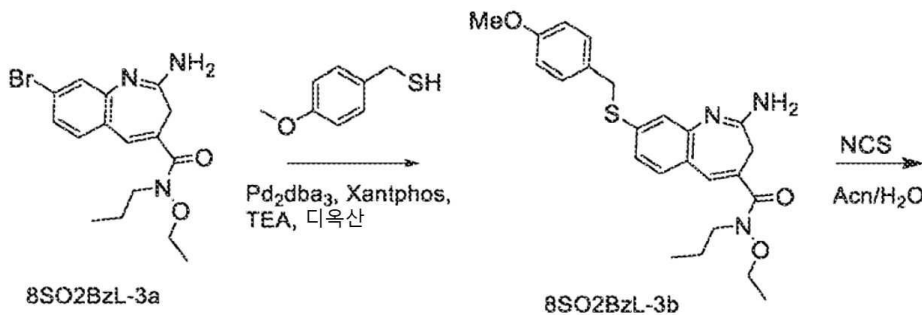
[0506] 2-아미노-4-[2-아미노에톡시(프로필)카바모일]-3H-1-벤자제핀-8-설포산, 8SO2BzL-2c의 제조

[0507] EtOAc (10.0 mL) 중 8SO2BzL-2b (150 mg, 310.85  $\mu\text{mol}$ , 1 eq)의 용액에 HCl/EtOAc (4 M, 20.0 mL, 257 eq)를 첨가한 다음, 25°C에서 1h 동안 교반하였다. 혼합물을 농축하여 8SO2BzL-2c (200 mg, 조물질)를 백색 고체로서 수득하였다. LC/MS [M+H] 383.1(계산치); LC/MS [M+H] 383.2 (관측치).

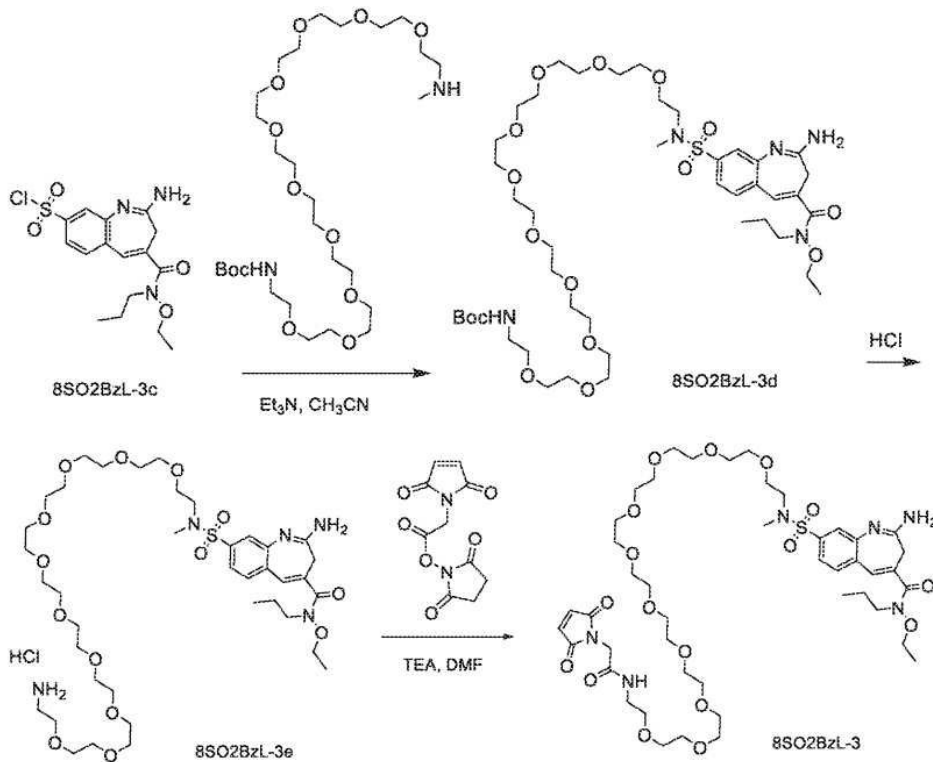
[0508] 8SO2BzL-2의 제조

[0509] DMF(1.00 mL) 중 8SO2BzL-2c(70.0 mg, 167.11  $\mu\text{mol}$ , 1 eq, HCl)의 용액에 DIEA(90.0 mg, 668  $\mu\text{mol}$ , 120  $\mu\text{L}$ , 4 eq) 및 2-[2-[2-[2-[2-[2-[2-[2-[2-[2-[2-(2,5-디옥소피롤-1-일)아세틸]아미노]에톡시]에톡시]에톡시]에톡시]에톡시]에톡시]에톡시]에톡시]에톡시]에틸 (4-니트로페닐)카보네이트(70.0 mg, 83.5  $\mu\text{mol}$ , 0.5 eq)를 첨가하고 0°C에서 1h 동안 교반하였다. 혼합물을 여과하고, 분취용-HPLC (컬럼: Phenomenex Luna 80\*30mm 3 $\mu\text{m}$ ; 이동상: [물(TFA)-ACN];B%: 1%-30%,8min)로 정제하여 8SO2BzL-2 (15 mg, 12.92  $\mu\text{mol}$ , 7.73% 수율, TFA)를 연황색 오일로서 수득하였다.  $^1\text{H NMR}$  (MeOD, 400 MHz)  $\delta$  7.89-7.77(m, 2H), 7.66 (d, J = 8.0 Hz, 1H), 7.42 (s, 1H), 6.89 (s, 2H), 4.17 (s, 2H), 3.97 (br t, J = 4.8 Hz, 2H), 3.86-3.79 (m, 2H), 3.75 (t, J = 7.2 Hz, 2H), 3.66-3.58 (m, 38H), 3.56-3.49 (m, 4H), 3.42-3.35 (m, 4H), 1.81-1.73 (m, 2H), 1.00 (t, J = 7.6 Hz, 3H). LC/MS [M+H] 1047.4(계산치); LC/MS [M+H] 1047.7 (관측치).

[0510] 실시예 L-3 2-아미노-8-(N-(1-(2,5-디옥소-2,5-디하이드로-1H-피롤-1-일)-2-옥소-6,9,12,15,18,21,24,27,30,33-데카옥사-3-아자펜타트리아콘탄-35-일)-N-메틸설포모일)-N-에톡시-N-프로필-3H-벤조[b]아제핀-4-카복사미드, 8SO2BzL-3의 합성



[0511]



[0512]

[0513]

2-아미노-N-에톡시-8-((4-메톡시벤질)티오)-N-프로필-3H-벤조[b]아제핀-4-카복사미드, 8SO2BzL-3b의 제조

[0514]

디옥산 (10 mL) 중 2-아미노-8-브로모-N-에톡시-N-프로필-3H-벤조[b]아제핀-4-카복사미드, 8SO2BzL-3a (0.96 g, 1.99 mmol) 및 4-메톡시- $\alpha$ -톨루엔티올 (0.37 g, 2.39 mmol)의 혼합물에 4,5-비스(디페닐포스포노)-9,9-디메틸크산텐, Xantphos, CAS 등록 번호 161265-03-8 (0.06 g, 0.10 mmol), Pd<sub>2</sub>(dba)<sub>3</sub> (0.05 g, 0.05 mmol), 이어서 트리에틸아민 (0.56 mL, 3.99 mmol)을 첨가하였다. 혼합물을 1h 동안 환류 가열한 다음 냉각시켰다. 용매를 증발에 의해 제거하고, 조 생성물을 12 컬럼 부피에 걸쳐 1-10% MeOH/DCM의 구배를 사용하는 실리카 겔 크로마토그래피에 의해 정제하여 8SO2BzL-3b (0.72 g, 82%)를 수득하였다.

[0515]

2-아미노-4-(에톡시(프로필)카바모일)-3H-벤조[b]아제핀-8-설포닐 클로라이드, 8SO2BzL-3c의 제조

[0516]

10°C에서 아세트니트릴/물(9:1) 중 8SO2BzL-3b (0.72 g, 1.64 mmol), 10 mL의 용액에 N-클로로숙신이미드(0.66 g, 4.91 mmol)를 부분적으로 첨가하였다. 첨가가 완료된 후, 추가로 20분 동안 교반하여 8SO2BzL-3c 조 생성물 용액을 수득하고, 다음 단계에서와 같이 사용하였다.

[0517]

tert-부틸 (2-((2-아미노-4-(에톡시(프로필)카바모일)-3H-벤조[b]아제핀-8-일)설포닐)-5,8,11,14,17,20,23,26,29,32-데카옥사-2-아자테트라트리아콘탄-34-일)카바메이트, 8SO2BzL-3d의 제조

[0518]

8SO2BzL-3c (1.00 mL, 0.16 mmol)의 분취량을 아세트니트릴 (3 mL) 중 tert-부틸 (5,8,11,14,17,20,23,26,29,32-데카옥사-2-아자테트라트리아콘탄-34-일)카바메이트 (0.12 g, 0.19 mmol) 및 트리에틸아민 (0.09 mL, 0.64 mmol)의 교반 혼합물에 적가하였다. 15 min 후, 반응물을 농축하고 10 min에 걸쳐 10-90% ACN/물(+0.1% TFA)의 구배를 사용하는 역상 크로마토그래피로 정제하여 8SO2BzL-3d (0.08 g, 51%)를 수득하였다.

[0519]

2-아미노-8-(N-(32-아미노-3,6,9,12,15,18,21,24,27,30-데카옥사도트리아콘틸)-N-메틸설포모일)-N-에톡시-N-프로필-3H-벤조[b]아제핀-4-카복사미드 클로라이드, 8SO2BzL-3e의 제조

[0520]

ACN(3 mL) 중 8SO2BzL-3d(0.08 g, 0.08 mmol)의 용액에 수성 HCl(6M, 3 mL)을 첨가하고, 혼합물을 실온에서 45 min 동안 교반하였다. 용매를 제거하고, 단리된 시럽을 ACN (3 mL)으로 공비반응시켜 8SO2BzL-3e (0.06 g, 85%)의 HCl 염을 탁한 백색 필름으로서 수득하였다.

[0521]

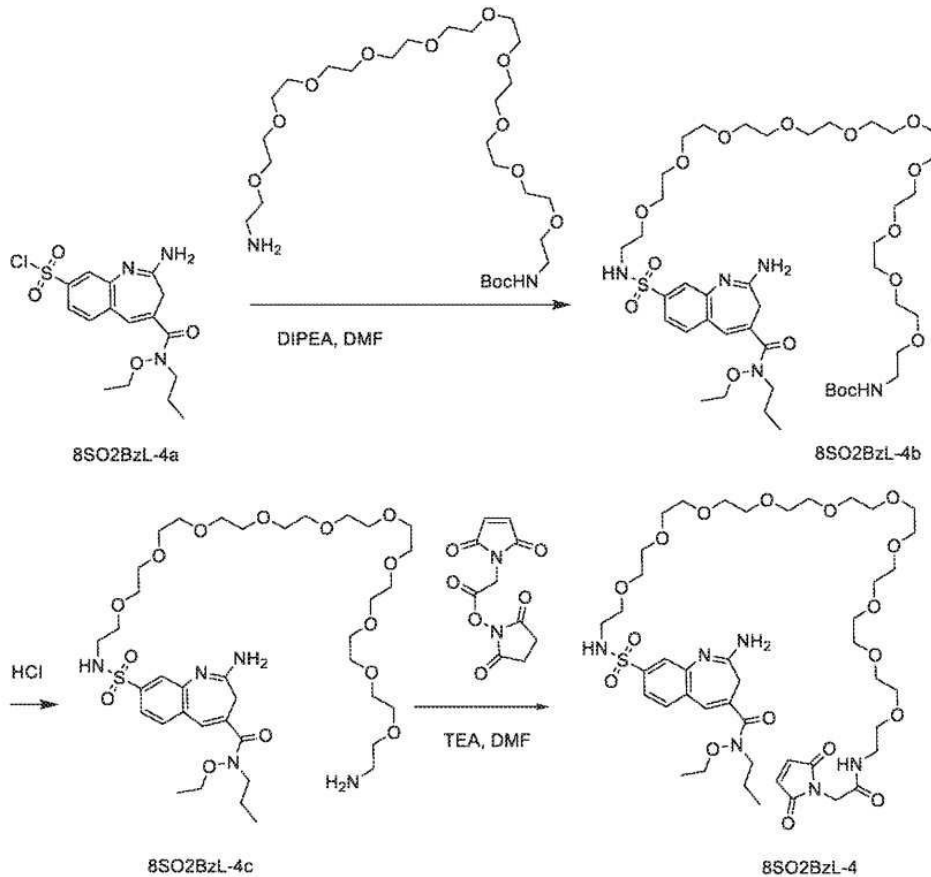
8SO2BzL-3의 제조

[0522]

DMF (3 mL) 중 8SO2BzL-3e HCl (0.06 g, 0.07 mmol)의 용액에 트리에틸아민 (0.04 mL, 0.28 mmol)을 첨가하였

다. 2,5-디옥소피롤리딘-1-일 2-(2,5-디옥소-2,5-디하이드로-1H-피롤-1-일)아세테이트 (0.02 g, 0.08 mmol)를 나누어 첨가하였다. 첨가 완료 후, 아세트산(9 uL)을 첨가하고 용매를 진공으로 제거하였다. 역상 HPLC로 정제한 후, 용매를 증발시킨 후 8SO2BzL-3 (0.03 g, 48%)을 투명한 오일로서 수득하였다. LC/MS [M+H] 1001.48 (계산치); LC/MS [M+H] 1074.88 (관측치).

[0523] 실시예 L-4 2-아미노-8-(N-(1-(2,5-디옥소-2,5-디하이드로-1H-피롤-1-일)-2-옥소-6,9,12,15,18,21,24,27,30,33-데카옥사-3-아자펜타트리아콘탄-35-일)설펜모일)-N-에톡시-N-프로필-3H-벤조[b]아제핀-4-카복사미드, 8SO2BzL-4의 합성



[0524]

[0525] tert-부틸 (32-((2-아미노-4-(에톡시(프로필)카바모일)-3H-벤조[b]아제핀)-8-설펜아미도)-3,6,9,12,15,18,21,24,27,30-데카옥사도트리아콘틸)카바메이트, 8SO2BzL-4b의 제조

[0526] DMF (4 mL) 중 tert-부틸 (32-아미노-3,6,9,12,15,18,21,24,27,30-데카옥사도트리아콘틸)카바메이트, Boc-아미노-PEG10-아민 (0.10 g, 0.16 mmol) 및 DIPEA (0.14 mL, 0.80 mmol)의 용액에 DMF 중 2-아미노-4-(에톡시(프로필)카바모일)-3H-벤조[b]아제핀-8-설펜아미드, 8SO2BzL-4a (0.16 M, 1.00 mL, 0.16 mmol)의 용액을 첨가하였다. 20분 후, 반응물을 농축시킨 다음, 10-90% ACN/물의 구배를 사용하여 10 min에 걸쳐 역상 HPLC 상에서 정제하여 용매 제거 후 8SO2BzL-4b (0.07 g, 47%)를 수득하였다.

[0527] 2-아미노-8-(N-(32-아미노-3,6,9,12,15,18,21,24,27,30-데카옥사도트리아콘틸)설펜모일)-N-에톡시-N-프로필-3H-벤조[b]아제핀-4-카복사미드, 8SO2BzL-4c의 제조

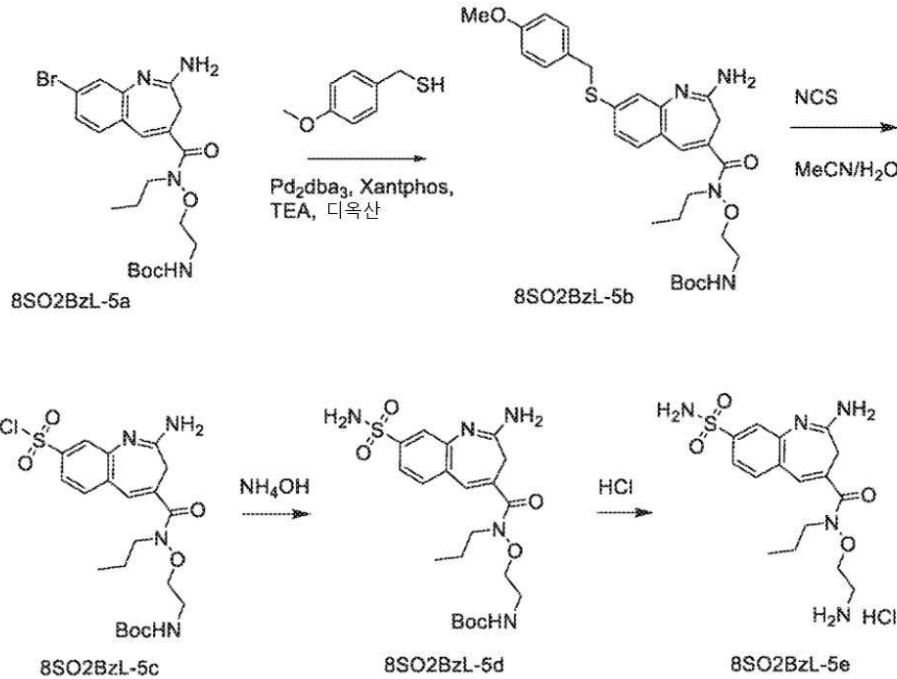
[0528] 아세트니트릴(3 mL) 중 8SO2BzL-4b(0.07 g, 0.07 mmol)의 용액에 수성 HCl(6M, 3 mL)을 첨가하고, 혼합물을 RT에서 45 min 동안 교반하였다. 용매를 제거하고, 단리된 시럽을 ACN (3 mL)으로 공비반응시켜 8SO2BzL-4c HCl염 (0.06 g, 82%)을 탁한 백색 필름으로서 수득하였다.

[0529] 8SO2BzL-4의 제조

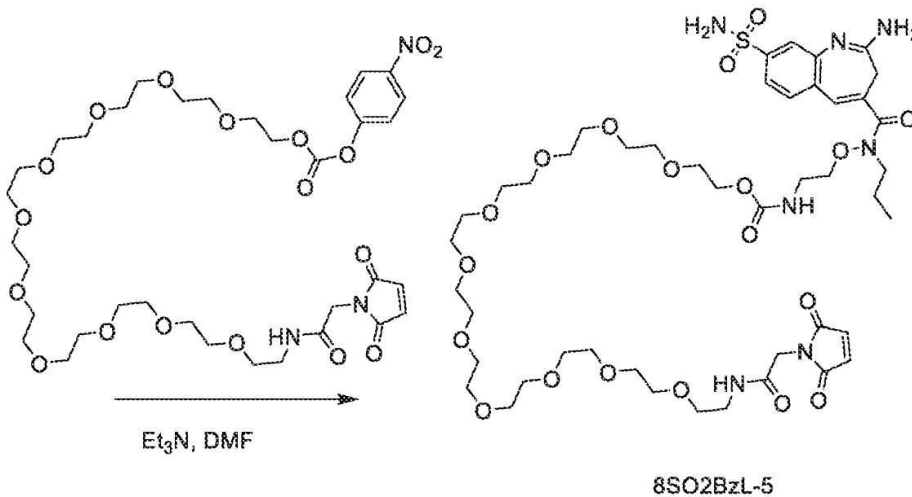
[0530] DMF (3 mL) 중 8SO2BzL-4c HCl (0.06 g, 0.06 mmol)의 용액에 트리에틸아민 (0.03 mL, 0.25 mmol)을 첨가하였다. 2,5-디옥소피롤리딘-1-일 2-(2,5-디옥소-2,5-디하이드로-1H-피롤-1-일)아세테이트 (0.02 g, 0.07 mmol)를 나누어 첨가하였다. 첨가 완료 후, 아세트산(9 uL)을 첨가하고 용매를 진공으로 제거하였다. 역상 HPLC로 정제

한 후 용매 제거 후 8SO2BzL-4 (0.04 g, 69%)를 수득하였다. LC/MS [M+H] 987.45(계산치); LC/MS [M+H] 987.86(관측치).

[0531] 실시예 L-5 1-(2,5-디옥소-2,5-디하이드로-1H-피롤-1-일)-2-옥소-6,9,12,15,18,21,24,27,30,33-데카옥사-3-아자펜타트리아콘탄-35-일 (2-((2-아미노-N-프로필-8-설파모일-3H-벤조[b]아제핀-4-카복사미도)옥시)에틸)카바메이트, 8SO2BzL-5의 합성



[0532]



[0533]

[0534] tert-부틸 (2-((2-아미노-8-((4-메톡시벤질)티오)-N-프로필-3H-벤조[b]아제핀-4-카복사미도)옥시)에틸)카바메이트, 8SO2BzL-b의 제조

[0535] 디옥산 (10 mL) 중 tert-부틸 (2-((2-아미노-8-브로모-N-프로필-3H-벤조[b]아제핀-4-카복사미도)옥시)에틸)카바메이트, 8SO2BzL-5a (0.96 g, 1.99 mmol) 및 4-메톡시- $\alpha$ -톨루엔티올 (0.37 g, 2.39 mmol)의 혼합물에 Xantphos (0.06 g, 0.10 mmol), Pd<sub>2</sub>(dba)<sub>3</sub> (0.05 g, 0.05 mmol), 이어서 트리에틸아민 (0.56 mL, 3.99 mmol)을 첨가하였다. 혼합물을 1h 동안 환류 가열한 다음 냉각시켰다. 용매를 증발에 의해 제거하고, 조 생성물을 12 컬럼 부피에 걸쳐 1-10% MeOH/DCM의 구배를 사용하는 실리카 겔 크로마토그래피에 의해 정제하여 8SO2BzL-5b (0.78 g, 71%)를 황색 고체로서 수득하였다.

[0536] tert-부틸 (2-((2-아미노-8-(클로로설포닐)-N-프로필-3H-벤조[b]아제핀-4-카복사미도)옥시)에틸)카바메이트,

8SO2BzL-5c의 제조

[0537] 0℃에서 아세트니트릴/물 (9:1, 10 mL) 중 8SO2BzL-5b (0.78 g, 1.41 mmol)의 용액에 N-클로로숙신이미드 (0.56 g, 4.22 mmol)를 3등분하여 첨가하였다. 첨가 완료 후, 생성물 8SO2BzL-5c를 추가 정제 없이 그대로 사용하였다.

[0538] tert-부틸 (2-((2-아미노-N-프로필-8-설펜모일-3H-벤조[b]아제핀-4-카복사미도)옥시)에틸)카바메이트, 8SO2BzL-5d의 제조

[0539] 0℃에서 아세트니트릴/물 (9:1) 중 8SO2BzL-5c (2.00 mL, 0.28 mmol)의 용액에 수산화암모늄 용액 (0.20 mL, 1.66 mmol)을 첨가하였다. 10분 후, 용매를 제거하고, 조 생성물을 10-90% 아세트니트릴/물의 구배를 사용하는 역상 HPLC에 의해 정제하여, 용매 증발 후 황색 필름으로서 8SO2BzL-5d (0.06 g, 41%)를 수득하였다.

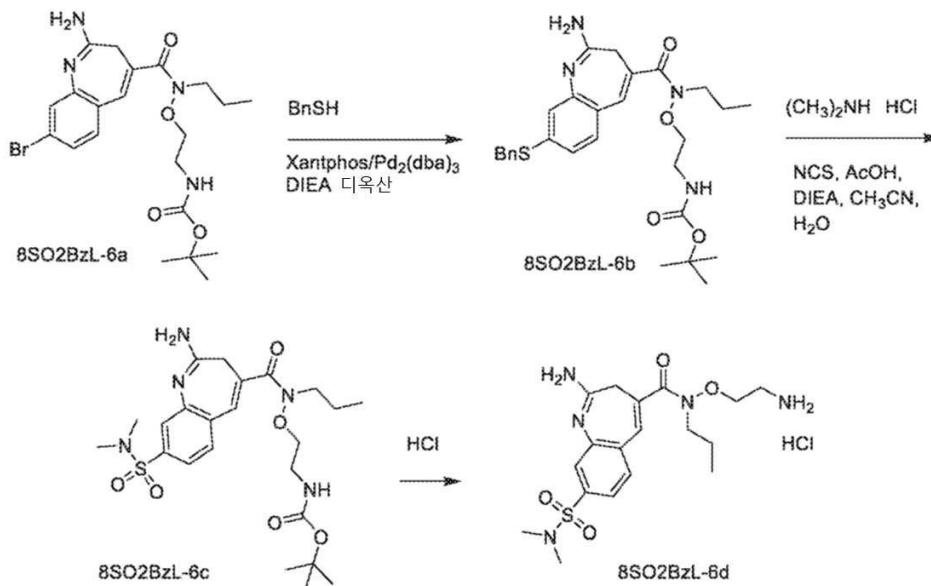
[0540] 8SO2BzL-5e의 제조

[0541] 아세트니트릴(2 mL) 및 6 N HCl(2.00 mL, 12.00 mmol) 중 8SO2BzL-5e(0.06 g, 0.11 mmol)의 용액을 실온에서 45분 동안 교반하였다. 용매를 진공에 의해 제거하여 HCl 염으로서 8SO2BzL-5e (0.05 g, 101%)를 수득하였다.

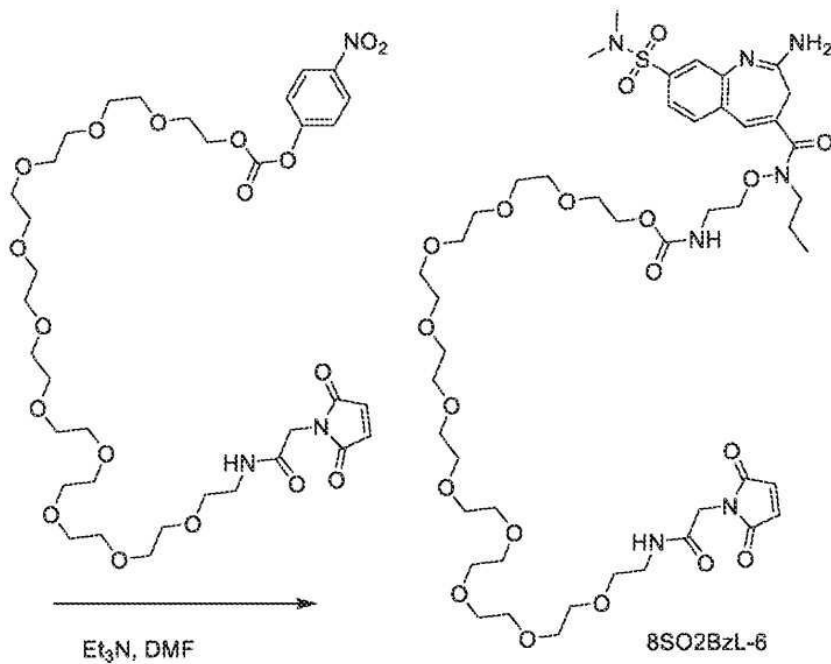
[0542] 8SO2BzL-5의 제조

[0543] 실온에서 DMF (4 mL) 중 8SO2BzL-5e (0.04 g, 0.10 mmol)의 용액에 트리에틸아민 (0.06 mL, 0.40 mmol)을 첨가하였다. 혼합물에 DMF (2 mL) 중 1-(2,5-디옥소-2,5-디하이드로-1H-피롤-1-일)-2-옥소-6,9,12,15,18,21,24,27,30,33-데카옥사-3-아자펜타트리아코탄-35-일 (4-니트로페닐) 카보네이트, PNPC-PEG10-Mal (0.08 g, 0.10 mmol)의 용액을 첨가하였다. 20 min 후 아세트산 (6 uL)을 첨가하고, 반응물을 진공 하에 농축시키고, 10 min에 걸쳐 10-90% ACN/물 (+0.1% TFA)의 구배를 사용하여 역상 HPLC에 의해 프라이밍하여, 순수한 분획물의 농축 후 8SO2BzL-5 (0.04 g, 37%)를 수득하였다. LC/MS [M+H] 1046.45 (계산치); LC/MS [M+H] 1046.88 (관측치).

[0544] 실시예 L-6 1-(2,5-디옥소-2,5-디하이드로-1H-피롤-1-일)-2-옥소-6,9,12,15,18,21,24,27,30,33-데카옥사-3-아자펜타트리아코탄-35-일 (2-((2-아미노-8-(N,N-디메틸설펜모일)-N-프로필-3H-벤조[b]아제핀-4-카복사미도)옥시)에틸)카바메이트, 8SO2BzL-6의 합성



[0545]



[0546]

[0547]

tert-부틸 N-[2-[(2-아미노-8-벤질설펜과닐-3H-1-벤자제핀-4-카보닐)-프로필-아미노]옥시에틸]카바메이트, 8SO2BzL-6b의 제조

[0548]

디옥산(15 mL) 중 tert-부틸 N-[2-[(2-아미노-8-브로모-3H-1-벤자제핀-4-카보닐)-프로필-아미노]옥시에틸]카바메이트, 8SO2BzL-6a (0.5 g, 1.04 mmol, 1.0 eq) 및 벤질티올, 벤질머캅탄, 페닐메탄티올, BnSH, CAS 등록 번호 100-53-8 (155 mg, 1.25 mmol, 146.05  $\mu$ L, 1.2 eq)의 혼합물에 4,5-비스(디페닐포스포도)-9,9-디메틸크산텐, Xantphos, CAS 등록 번호 161265-03-8(120 mg, 208  $\mu$ mol, 0.2 eq) tris(디벤질리덴아세톤)디팔라듐, Pd<sub>2</sub>(dba)<sub>3</sub>, CAS 등록 번호 51364-51-3(190 mg, 208  $\mu$ mol, 0.2 eq) 및 디이소프로필에틸아민, DIEA(268 mg, 2.08 mmol, 362  $\mu$ L, 2.0 eq)를 N<sub>2</sub> 하에 25°C에서 일 부분으로 첨가한 다음, 110°C에서 2h 동안 교반하였다. 혼합물을 물 (20 mL)로 희석하고, EtOAc (10 mL x 3)로 추출하였다. 유기층을 염수로 세척하고, Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>로 건조시키고, 여과하고, 농축시켰다. 혼합물을 분취용-HPLC (컬럼: Phenomenex Luna 80\*30mm\*3 $\mu$ m; 이동상: [물(TFA)-ACN];B%: 25%-55%,8min)에 의해 추가로 정제하여 8SO2BzL-6b (0.5 g, 952.97  $\mu$ mol, 91.75% 수율)를 황색 고체로서 수득하였다. <sup>1</sup>H NMR (MeOD, 400 MHz)  $\delta$  7.49 (d, J = 8.4 Hz, 1H), 7.43-7.38 (m, 3H), 7.36-7.22 (m, 5H), 4.30 (s, 2H), 3.91 (t, J = 5.2 Hz, 2H), 3.73 (t, J = 7.2 Hz, 2H), 3.32 (s, 2H), 3.24 (t, J = 5.2 Hz, 2H), 1.81-1.70 (m, 2H), 1.34 (s, 9H), 0.98 (t, J = 7.2 Hz, 3H). LC/MS [M+H]<sup>+</sup> 525.2 (계산치); LC/MS [M+H]<sup>+</sup> 525.2 (관측치).

[0549]

tert-부틸 N-[2-[[2-아미노-8-(디메틸설펜과모일)-3H-1-벤자제핀-4-카보닐]-프로필-아미노]옥시에틸]카바메이트, 8SO2BzL-6c의 제조

[0550]

CH<sub>3</sub>CN(1.00 mL) 및 H<sub>2</sub>O(0.10 mL) 중 8SO2BzL-6b(50.0 mg, 95.30  $\mu$ mol, 1 eq)의 용액에 AcOH(60.0 mg, 953  $\mu$ mol, 50.0  $\mu$ L, 10 eq), N-클로로숙신이미드, NCS(50.0 mg, 381  $\mu$ mol, 4 eq)를 25°C에서 첨가한 다음, 이 온도에서 10 min 동안 교반한 다음, N-메틸메탄아민;염산염, 디메틸아민 HCl(80.0 mg, 953  $\mu$ mol, 10 eq) 및 DIEA(250 mg, 1.91 mmol, 330  $\mu$ L, 20 eq)를 첨가하였다. 혼합물을 0°C에서 추가로 1h 동안 교반하였다. 혼합물을 여과하고, 분취용-HPLC (컬럼: Phenomenex Luna 80\*30mm\*3 $\mu$ m; 이동상: [물(TFA)-ACN];B%: 10%-40%,8min)로 정제하여 8SO2BzL-6c (12 mg, 23.55  $\mu$ mol, 24.71% 수율)를 백색 고체로서 수득하였다. <sup>1</sup>H NMR (MeOD, 400 MHz)  $\delta$  7.92-7.72(m, 3H), 7.50 (s, 1H), 3.94 (t, J = 5.2 Hz, 2H), 3.75 (t, J = 7.2 Hz, 2H), 3.44 (s, 2H), 3.26 (br t, J = 5.2 Hz, 2H), 2.77 (s, 6H), 1.77 (sxt, J = 7.2 Hz, 2H), 1.37 (s, 9H), 0.99 (t, J = 7.2 Hz, 3H). LC/MS [M+H]<sup>+</sup> 510.2 (계산치); LC/MS [M+H]<sup>+</sup> 510.3 (관측치).

[0551]

2-아미노-N-(2-아미노에톡시)-8-(N,N-디메틸설펜과모일)-N-프로필-3H-벤조[b]아제핀-4-카복사미드 클로라이드,

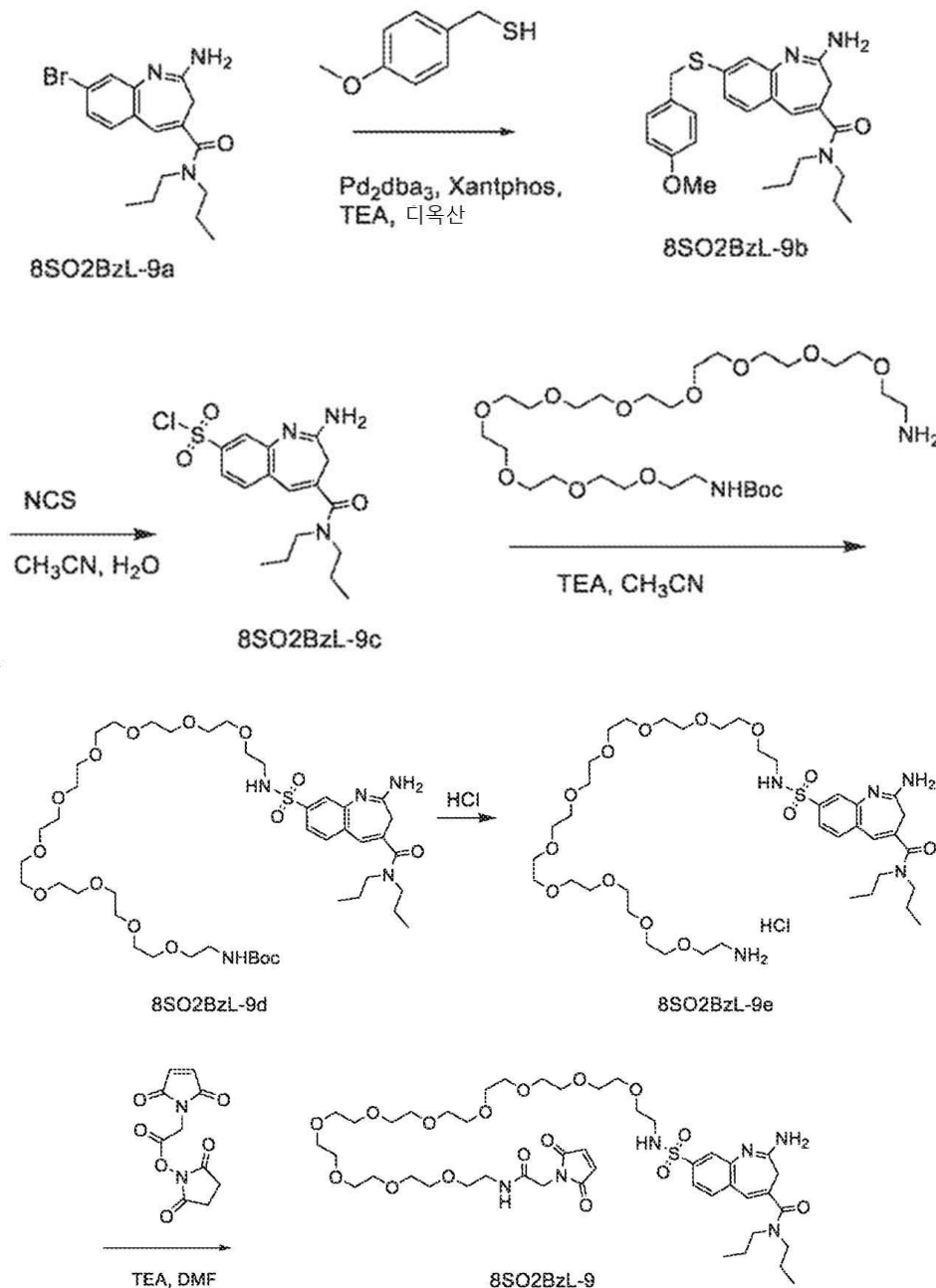
8SO2BzL-6d의 제조

[0552] 아세트니트릴(2 mL) 및 6 N HCl(1.41 mL, 8.46 mmol) 중 8SO2BzL-6c(0.04 g, 0.08 mmol)의 용액을 실온에서 45 분 동안 교반하였다. 용매를 진공에 의해 제거하여 8SO2BzL-6d (0.04 g, 100%)를 수득하였다.

[0553] 8SO2BzL-6의 제조

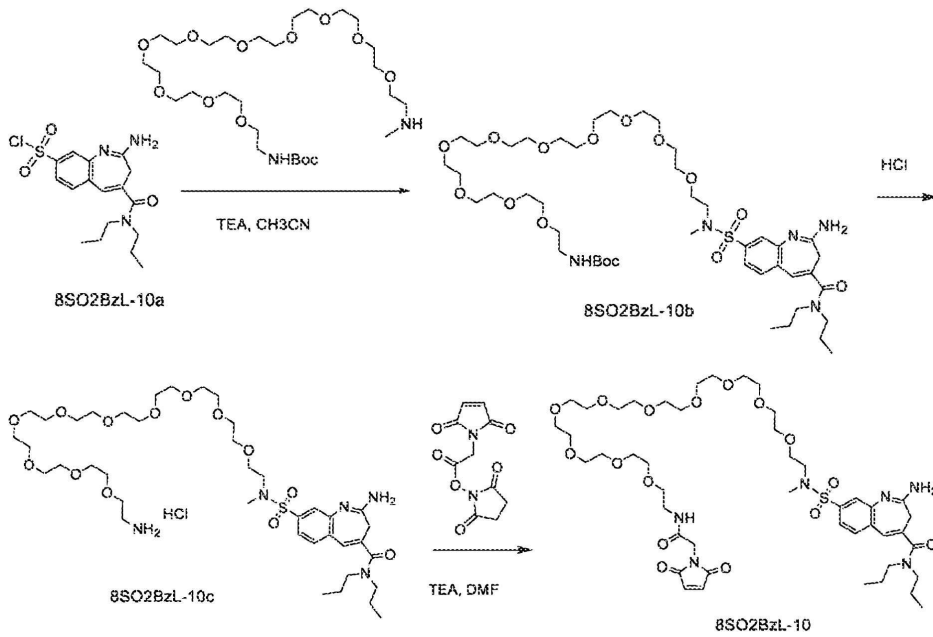
[0554] 실온에서 DMF (4 mL) 중 8SO2BzL-6d (0.04 g, 0.10 mmol)의 용액에 트리에틸아민 (0.04 mL, 0.28 mmol)을 첨가하였다. 혼합물에 DMF (2 mL) 중 용액 1-(2,5-디옥소-2,5-디하이드로-1H-피롤-1-일)-2-옥소-6,9,12,15,18,21,24,27,30,33-데카옥사-3-아자헨타트리아콘탄-35-일 (4-니트로페닐)카보네이트 (0.06 g, 0.07 mmol)를 첨가하였다. 20 min 후 아세트산 (6  $\mu$ L)을 첨가하고, 반응물을 진공 하에 농축시키고, 10 min에 걸쳐 10-90% ACB/물 (+0.1% TFA)의 구배를 사용하는 역상 HPLC에 의해 정제하여 순수한 분획물의 농축 후 8SO2BzL-6 (0.04 g, 51%)을 수득하였다. LC/MS [M+H] 1074.48 (계산치); LC/MS [M+H] 1074.90 (관측치).

[0555] 실시예 L-9 2-아미노-8-(N-(1-(2,5-디옥소-2,5-디하이드로-1H-피롤-1-일)-2-옥소-6,9,12,15,18,21,24,27,30,33-데카옥사-3-아자헨타트리아콘탄-35-일)설펜모일)-N,N-디프로필-3H-벤조[b]아제핀-4-카복사미드, 8SO2BzL-9의 합성



[0557]

- [0558] 2-아미노-8-((4-메톡시벤질)티오)-N,N-디프로필-3H-벤조[b]아제핀-4-카복사미드, 8S02BzL-9b의 제조
- [0559] 디옥산 (10 mL) 중 2-아미노-8-브로모-N,N-디프로필-3H-벤조[b]아제핀-4-카복사미드, 8S02BzL-9a (0.96 g, 1.99 mmol) 및 4-메톡시- $\alpha$ -톨루엔티올 (0.37 g, 2.39 mmol)의 혼합물에, Xantphos (0.06 g, 0.10 mmol), Pd<sub>2</sub>(dba)<sub>3</sub> (0.05 g, 0.05 mmol), 이어서 트리에틸아민 (0.56 mL, 3.99 mmol)을 첨가하였다. 혼합물을 1h 동안 환류 가열한 다음 냉각시켰다. 용매를 증발에 의해 제거하고, 조 생성물을 12 컬럼 부피에 걸쳐 1-10% MeOH/DCM의 구배를 사용하는 실리카 겔 크로마토그래피에 의해 정제하여 8S02BzL-9b (0.69 g, 79%)를 수득하였다.
- [0560] 2-아미노-4-(디프로필카바모일)-3H-벤조[b]아제핀-8-설포닐 클로라이드, 8S02BzL-9c의 제조
- [0561] 10°C에서 10 mL의 아세트니트릴/물(9:1) 중 8S02BzL-9b(0.68 g, 1.55 mmol)의 용액에 N-클로로숙신이미드, NCS를 3등분(0.62 g, 4.66 mmol)하여 첨가하였다. 첨가 완료 후, 추가로 20 min 동안 교반하여 8S02BzL-9c를 수득하였다.
- [0562] tert-부틸 (32-((2-아미노-4-(디프로필카바모일)-3H-벤조[b]아제핀)-8-설포나미도)-3,6,9,12,15,18,21,24,27,30-데카옥사도트리아콘틸)카바메이트, 8S02BzL-9d의 제조
- [0563] 앞서 수득된 8S02BzL-9c(1.00 mL, 0.15 mmol)의 분취량을 아세트니트릴(3 mL) 중 tert-부틸(32-아미노-3,6,9,12,15,18,21,24,27,30-데카옥사도트리아콘틸)카바메이트(0.11 g, 0.18 mmol) 및 트리에틸아민(0.08 mL, 0.60 mmol)의 교반 혼합물에 적가하였다. 15 min 후, 반응물을 농축시키고, 10 min에 걸쳐 10-90% ACN/물(+0.1% TFA)의 구배를 사용하여 역상 크로마토그래피에 의해 8S02BzL-9d(0.07 g, 51%)로 정제하였다.
- [0564] 2-아미노-8-(N-(32-아미노-3,6,9,12,15,18,21,24,27,30-데카옥사도트리아콘틸)설포아모일)-N,N-디프로필-3H-벤조[b]아제핀-4-카복사미드, 8S02BzL-9e의 제조
- [0565] 아세트니트릴 (3 mL) 중 8S02BzL-9d (0.07 g, 0.08 mmol)의 용액에 수성 HCl (6M, 3 mL)을 첨가하고, 혼합물을 RT에서 45 min 동안 교반하였다. 용매를 제거하고, 단리된 시럽을 아세트니트릴 (3 mL)로 공비반응시켜 8S02BzL-9e를 HCl 염 (0.06 g, 86%)으로서 탁한 백색 필름으로서 수득하였다.
- [0566] 8S02BzL-9의 제조
- [0567] DMF (3 mL) 중 8S02BzL-9e HCl (0.06 g, 0.06 mmol)의 용액에 트리에틸아민 (0.03 mL, 0.25 mmol)을 첨가하였다. 2,5-디옥소피롤리딘-1-일 2-(2,5-디옥소-2,5-디하이드로-1H-피롤-1-일)아세테이트 (0.02 g, 0.07 mmol)를 나누어 첨가하였다. 첨가 완료 후, 아세트산(9  $\mu$ L)을 첨가하고 용매를 진공으로 제거하였다. 역상 HPLC로 정제한 후 증발 후 8S02BzL-9 (0.03 g, 43%)를 수득하였다. LC/MS [M+H] 985.47 (계산치); LC/MS [M+H] = 985.88 (관측치).
- [0568] 실시예 L-10 2-아미노-8-(N-(1-(2,5-디옥소-2,5-디하이드로-1H-피롤-1-일)-2-옥소-6,9,12,15,18,21,24,27,30,33-데카옥사-3-아자헨타트리아콘탄-35-일)-N-메틸설포아모일)-N,N-디프로필-3H-벤조[b]아제핀-4-카복사미드, 8S02BzL-10의 합성



[0569]

[0570] tert-부틸 (2-((2-아미노-4-(디프로필카바모일)-3H-벤조[b]아제핀-8-일)설포닐)-5,8,11,14,17,20,23,26,29,32-테카옥사-2-아자테트라트리아콘탄-34-일)카바메이트, 8SO2BzL-10b의 제조

[0571] 아세트니트릴 중 2-아미노-4-(디프로필카바모일)-3H-벤조[b]아제핀-8-설포닐 클로라이드, 8SO2BzL-10a (1.00 mL, 0.15 mmol)의 용액을 아세트니트릴 (3 mL) 중 tert-부틸 (5,8,11,14,17,20,23,26,29,32-테카옥사-2-아자테트라트리아콘탄-34-일)카바메이트 (0.11 g, 0.18 mmol) 및 트리에틸아민 (0.08 mL, 0.60 mmol)의 교반 혼합물에 적가하였다. 15 min 후, 반응물을 농축하고 10 min에 걸쳐 10-90% ACN/물(+0.1% TFA)의 구배를 사용하는 역상 크로마토그래피로 정제하여 8SO2BzL-10b (0.05 g, 37%)를 수득하였다.

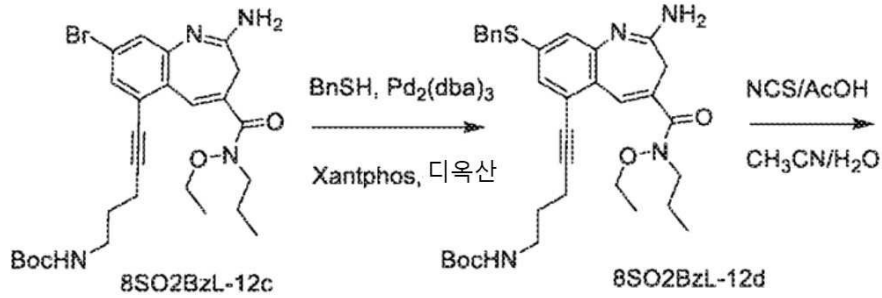
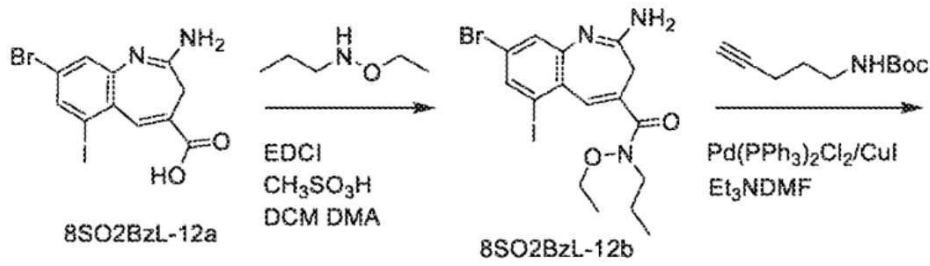
[0572] 2-아미노-8-(N-(32-아미노-3,6,9,12,15,18,21,24,27,30-테카옥사도트리아콘틸)-N-메틸설포아모일)-N,N-디프로필-3H-벤조[b]아제핀-4-카복사미드, 8SO2BzL-10c의 제조

[0573] 아세트니트릴 (3 mL) 중 8SO2BzL-10b (0.05 g, 0.05 mmol)의 용액에 수성 HCl (6M, 3 mL)을 첨가하고, 혼합물을 RT에서 45 min 동안 교반하였다. 용매를 제거하고, 단리된 시럽을 ACN (3 mL)으로 공비반응시켜 HCl 염 (0.04 g, 91%)으로 8SO2BzL-10c를 탁한 백색 필름으로서 수득하였다.

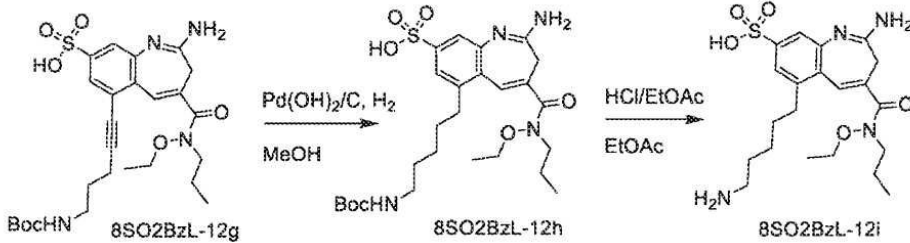
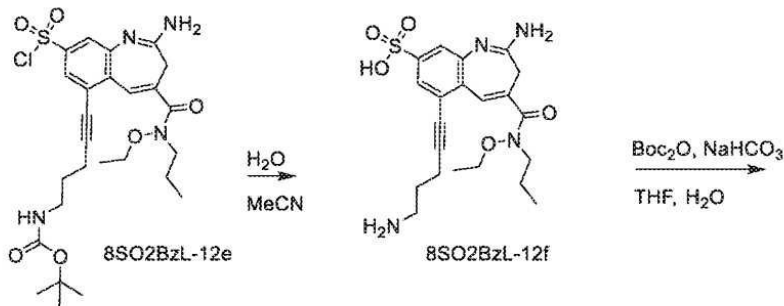
[0574] 8SO2BzL-10의 제조

[0575] DMF (3 mL) 중 8SO2BzL-10c HCl (0.04 g, 0.05 mmol)의 용액에 트리에틸아민 (0.03 mL, 0.20 mmol)을 첨가하였다. 2,5-디옥소피롤리딘-1-일 2-(2,5-디옥소-2,5-디하이드로-1H-피롤-1-일)아세테이트 (0.02 g, 0.06 mmol)를 나누어 첨가하였다. 첨가 완료 후, 아세트산(9 uL)을 첨가하고, 용매를 진공에 의해 제거하였다. 역상 HPLC로 정제한 후 증발 후 8SO2BzL-10 (0.02 g, 42%)을 수득하였다. LC/MS [M+H] 999.49 (계산치); LC/MS [M+H] 999.92 (관측치).

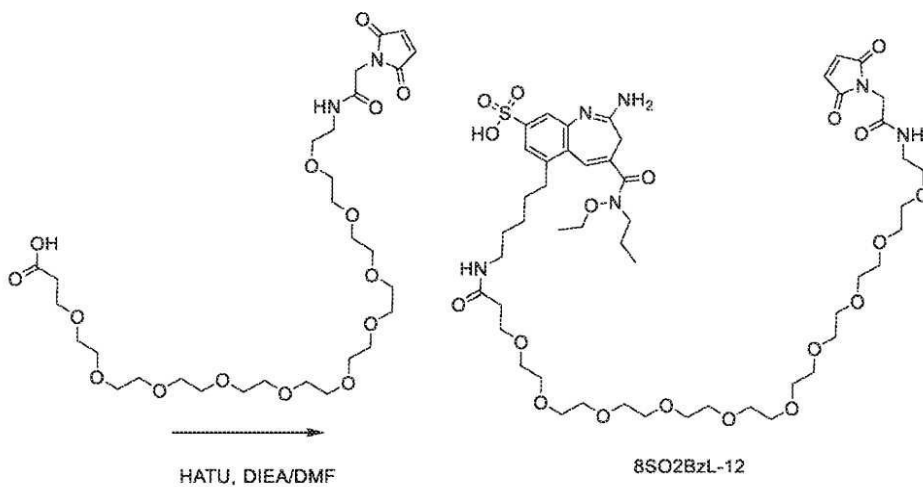
[0576] 실시예 L-12 2-아미노-6-[5-[3-[2-[2-[2-[2-[2-[2-[2-[2-[2-[2-[2-(2,5-디옥소피롤-1-일)아세틸]아미노]에톡시]에톡시]에톡시]에톡시]에톡시]에톡시]에톡시]에톡시]에톡시]에톡시]에톡시]프로파노일아미노]펜틸]-4-[에톡시(프로필)카바모일]-3H-1-벤자제핀-8-설포산, 8SO2BzL-12의 합성



[0577]



[0578]



[0579]

[0580]

2-아미노-8-브로모-N-에톡시-6-요오도-N-프로필-3H-1-벤자제핀-4-카복사미드, 8SO2BzL-12b의 제조

[0581]

DCM (20 mL) 및 DMA (10 mL) 중 2-아미노-8-브로모-6-요오도-3H-1-벤자제핀-4-카복실산, 8SO2BzL-12a (2.0 g,

4.91 mmol, 1.0 eq)의 용액에 메탄설폰산, CH<sub>3</sub>SO<sub>3</sub>H (472 mg, 4.91 mmol, 350 uL, 1.0 eq), N-에톡시프로판-1-아민 (823 mg, 5.90 mmol, 1.2 eq, HCl) 및 EDCI (3.77 g, 19.7 mmol, 4 eq)를 첨가하였다. 혼합물을 25°C에서 2 hr 동안 교반하였다. 반응 혼합물의 pH를 포화 Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>를 사용하여 ~9로 조정하였다. 수성상을 에틸 아세테이트 (50 mL x 3)로 추출하였다. 조합된 유기상을 염수 (20 mL x 2)로 세척하고, 무수 Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>로 건조시키고, 여과하고, 진공에서 농축시켰다. 조 생성물을 EtOAc로 25°C에서 10 min 동안 분쇄하여 8SO2BzL-12b (1.24 g, 2.52 mmol, 51.3% 수율)를 황색 고체로서 수득하였다. LC/MS [M+H] 491.97 (계산치); LC/MS [M+H] 491.9 (관측치).

[0582] tert-부틸 N-[5-[2-아미노-8-브로모-4-[에톡시(프로필)카바모일]-3H-1-벤자제핀-6-일]펜트-4-이닐]카바메이트, 8SO2BzL-12c의 제조

[0583] DMF(16 mL) 및 Et<sub>3</sub>N(6 mL) 중 8SO2BzL-12b(800 mg, 1.63 mmol, 1.0 eq), tert-부틸 N-펜트-4-이닐카바메이트 (328 mg, 1.79 mmol, 1.1 eq), Pd(PPh<sub>3</sub>)<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>(114 mg, 163 umol, 0.1 eq), 요오드화 제일구리, CuI(61.9 mg, 325 umol, 0.2 eq)의 혼합물을 탈기시키고, N<sub>2</sub>로 3회 퍼징한 후, 80°C에서 2 hr 동안 N<sub>2</sub> 분위기 하에서 교반하였다. 혼합물을 얼음물(w/w = 1/1)(20 mL)에 붓고, 10 min 동안 교반하였다. 수성 상을 에틸 아세테이트(30 mL x 3)로 추출하였다. 조합된 유기상을 염수 (20 mL x 2)로 세척하고, 무수 Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>로 건조시키고, 여과하고, 진공에서 농축시켰다. 잔류물을 실리카겔 크로마토그래피 (컬럼 높이: 250 mm, 직경: 100 mm, 100-200 메쉬 실리카겔, 석유 에테르/에틸 아세테이트 = 1/0, 2/1)로 정제하여 8SO2BzL-12c (690 mg, 1.26 mmol, 77.5% 수율)를 황색 오일로서 수득하였다. <sup>1</sup>H NMR (MeOD, 400MHz) δ 7.53 (s, 1H), 7.27 (s, 2H), 3.93 (q, J = 7.2 Hz, 2H), 3.74 (t, J = 7.2 Hz, 2H), 3.19 (t, J = 7.2 Hz, 2H), 2.90-2.83 (m, 2H), 2.51 (t, J = 7.2 Hz, 2H), 1.82-1.70 (m, 4H), 1.43 (s, 9H), 1.17 (t, J = 7.2 Hz, 3H), 0.98 (t, J = 7.2 Hz, 3H). LC/MS [M+H] 547.2 (계산치); LC/MS [M+H] 547.2 (관측치).

[0584] tert-부틸 N-[5-[2-아미노-8-벤질설파닐-4-[에톡시(프로필) 카바모일]-3H-1-벤자제핀-6-일]펜트-4-이닐]카바메이트, 8SO2BzL-12d의 제조

[0585] 디옥산(10 mL) 중 8SO2BzL-12c(350 mg, 639 umol, 1.0 eq), 페닐메탄티올, BnSH(0.25 g, 2.01 mmol, 236 uL, 3.15 eq), DIEA(165 mg, 1.28 mmol, 223 uL, 2.0 eq), Xantphos(74.0 mg, 128 umol, 0.2 eq) 및 Pd<sub>2</sub>(dba)<sub>3</sub>(117 mg, 128 umol, 0.2 eq)의 혼합물을 탈기시키고, N<sub>2</sub>로 3회 퍼징한 후, 110°C에서 1 hr 동안 N<sub>2</sub> 분위기 하에서 교반하였다. 잔류물을 얼음물(w/w = 1/1)(10mL)에 붓고, 5 min 동안 교반하였다. 수성상을 에틸 아세테이트(10 mL x 3)로 추출하였다. 조합된 유기상을 염수(10mL x 1)로 세척하고, 무수 Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>로 건조시키고, 여과시키고 진공에서 농축시켰다. 잔류물을 실리카 겔 크로마토그래피 (컬럼 높이: 250 mm, 직경: 100 mm, 100-200 메쉬 실리카겔, 석유 에테르/에틸 아세테이트 = 1/0, 0/1)로 정제하여 8SO2BzL-12d (300 mg, 508 umol, 79.4% 수율)를 황색 고체로서 수득하였다. <sup>1</sup>H NMR (MeOD, 400MHz) δ 7.56 (s, 1H), 7.37-7.34 (m, 2H), 7.30-7.19 (m, 3H), 7.09 (d, J = 1.6 Hz, 1H), 7.03 (d, J = 1.6 Hz, 1H), 4.20 (s, 2H), 3.93 (q, J = 7.2 Hz, 2H), 3.73 (t, J = 7.2 Hz, 2H), 3.30 (s, 2H), 3.19 (t, J = 6.8 Hz, 2H), 2.49 (t, J = 7.2 Hz, 2H), 1.81-1.72 (m, 4H), 1.43 (s, 9H), 1.16 (t, J = 7.2 Hz, 3H), 0.98 (t, J = 7.2 Hz, 3H). LC/MS [M+H] 591.3 (계산치); LC/MS [M+H] 591.3 (관측치).

[0586] tert-부틸 N-[5-[2-아미노-8-클로로설파닐-4-[에톡시(프로필) 카바모일]-3H-1-벤자제핀-6-일]펜트-4-이닐]카바메이트, 8SO2BzL-12e의 제조

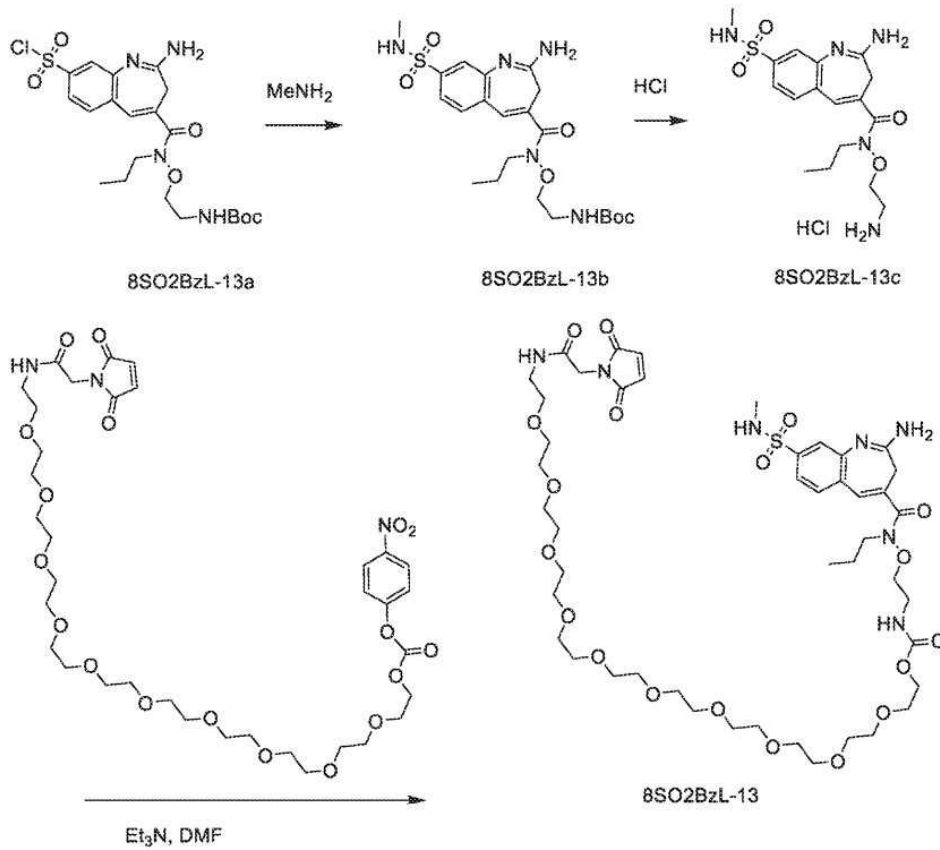
[0587] MeCN(6 mL) 및 H<sub>2</sub>O(0.6 mL) 중 8SO2BzL-12d(300 mg, 508 umol, 1.0 eq)의 용액에 AcOH(305 mg, 5.08 mmol, 290 uL, 10 eq) 및 NCS(271 mg, 2.03 mmol, 4.0 eq)를 첨가한 다음, 25°C에서 1 hr 동안 교반하였다. 반응 혼합물을 얼음물 (w/w = 1/1) (10 mL)에 붓고 5 min 동안 교반하였다. 수성상을 에틸 아세테이트 (10 mL x 3)로 추출하고, 조합된 유기상을 무수 Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>로 건조시키고, 여과하고, 진공에서 농축시켜 조 생성물 8SO2BzL-12e (250 mg, 441 umol, 86.8% 수율)를 황색 오일로서 수득하고, 이를 추가 정제 없이 다음 단계에서 사용하였다. LC/MS [M+H] 567.2(계산치); LC/MS [M+H] 567.3 (관측치).

[0588] 2-아미노-6-(5-아미노펜트-1-이닐)-4-[에톡시(프로필)카바모일]-3H-1-벤자제핀-8-설폰산, 8SO2BzL-12f의 제조

[0589] MeCN(2.5 mL) 및 H<sub>2</sub>O(13 mL) 중 8SO2BzL-12e(250 mg, 441 umol, 1.0 eq)의 용액을 100°C에서 1 hr 동안 교반하

였다. 혼합물을 진공에서 농축시켰다. 황색 고체로서의 조 생성물 8S02BzL-12f (200 mg, 412 umol, 93.5% 수율, HCl)를 추가 정제 없이 다음 단계에서 사용하였다. LC/MS [M+H] 449.18(계산치); LC/MS [M+H] 449.1 (관측치).

- [0590] 2-아미노-6-[5-(tert-부톡시카보닐아미노)펜트-1-이닐]-4-[에톡시(프로필)카바모일]-3H-1-벤자제핀-8-설폰산, 8S02BzL-12g의 제조
- [0591] THF(5 mL) 및 H<sub>2</sub>O(5 mL) 중 8S02BzL-12f(200 mg, 446 umol, 1.0 eq)의 용액에 NaHCO<sub>3</sub>(112 mg, 1.34 mmol, 52 uL, 3.0 eq) 및 Boc<sub>2</sub>O(146 mg, 669 umol, 154 uL, 1.5 eq)를 첨가한 다음, 25°C에서 1 hr 동안 교반하였다. 혼합물을 30°C에서 감압 하에 농축시켰다. 잔류물을 분취용-HPLC(컬럼: Phenomenex Luna 80\*30mm\*3um; 이동상: [물(TFA)-ACN];B%: 10%-40%,8min)로 정제하여 8S02BzL-12g (100 mg, 182 umol, 40.9% 수율)를 황색 고체로서 수득하였다. <sup>1</sup>H NMR (MeOD, 400MHz) δ 7.84 (d, J = 1.2 Hz, 1H), 7.71 (d, J = 1.2 Hz, 1H), 7.63 (s, 1H), 3.98 (d, J = 7.2 Hz, 2H), 3.76 (t, J = 6.8 Hz, 2H), 3.38 (s, 2H), 3.18 (t, J = 6.8 Hz, 2H), 2.54 (t, J = 7.2 Hz, 2H), 1.81-1.76 (m, 4H), 1.43 (s, 9H), 1.20 (t, J = 7.2 Hz, 3H), 1.00 (t, J = 7.2 Hz, 3H).LC/MS [M+H] 549.2 (계산치); LC/MS [M+H] 549.3 (관측치).
- [0592] 2-아미노-6-[5-(tert-부톡시카보닐아미노)펜틸]-4-[에톡시(프로필)카바모일]-3H-1-벤자제핀-8-설폰산, 8S02BzL-12h의 제조
- [0593] MeOH(10 mL) 중 8S02BzL-12g(100 mg, 182 umol, 1.0 eq), Pd(OH)<sub>2</sub>/C(64.0 mg, 91.1 umol, 20% 순도, 0.5 eq)의 혼합물을 탈기하고, H<sub>2</sub>(367 ug, 182 umol, 1 eq)로 3회 퍼징한 후, 25°C에서 1 hr 동안 H<sub>2</sub>(30 psi) 분위기 하에 교반하였다. 혼합물을 여과하였다. 잔류물을 분취용-HPLC(컬럼: Phenomenex Luna 80\*30mm\*3um; 이동상: [물(TFA)-ACN];B%: 5%-55%,8min)로 정제하여 8S02BzL-12h (72 mg, 130 umol, 71.5% 수율)를 백색 고체로서 수득하였다. <sup>1</sup>H NMR (MeOD, 400MHz) δ 7.70 (d, J = 1.2 Hz, 1H), 7.65 (d, J = 1.2 Hz, 1H), 7.46 (s, 1H), 3.98 (q, J = 7.2 Hz, 2H), 3.76 (t, J = 6.8 Hz, 2H), 3.36 (s, 2H), 3.02 (t, J = 6.8 Hz, 2H), 2.84 (t, J = 8.0 Hz, 2H), 1.83-1.74 (m, 2H), 1.71-1.59 (m, 2H), 1.52-1.34 (m, 13H), 1.20 (t, J = 7.2 Hz, 3H), 1.01 (t, J = 7.2 Hz, 3H). LC/MS [M+H] 553.26 (계산치); LC/MS [M+H] 553.2 (관측치).
- [0594] 2-아미노-6-(5-아미노펜틸)-4-[에톡시(프로필)카바모일]-3H-1-벤자제핀-8-설폰산, 8S02BzL-12i의 제조
- [0595] EtOAc (2 mL) 중 8S02BzL-12h (60 mg, 108 umol, 1 eq)의 용액에 HCl/EtOAc (4 M, 1 mL, 37 eq)를 첨가한 다음, 20°C에서 1 hr 동안 교반하였다. 혼합물을 진공에서 농축시켜 8S02BzL-12i (50 mg, 102 umol, 94.2% 수율, HCl)를 백색 고체로서 수득하였다. LC/MS [M+H] 453.2 (계산치); LC/MS [M+H] 453.2 (관측치).
- [0596] 8S02BzL-12의 제조
- [0597] DMF (1 mL) 중 3-[2-[2-[2-[2-[2-[2-[2-[2-[2-[2-(2,5-디옥소피롤-1-일)아세틸]아미노]에톡시]에톡시]에톡시]에톡시]에톡시]에톡시]에톡시]프로판산 (68.2 mg, 102 umol, 1.0 eq)의 용액에 DIEA (66.1 mg, 511 umol, 89 uL, 5.0 eq), 8S02BzL-12i (50 mg, 102 umol, 1 eq, HCl) 및 HATU (38.9 mg, 102 umol, 1.0 eq)를 첨가하였다. 그리고 이를 25°C에서 0.5 hr 동안 교반하였다. 혼합물을 여과하고, 분취용-HPLC(컬럼: Phenomenex Luna 80\*30mm\*3um; 이동상: [물(TFA)-ACN];B%: 5%-35%,8min)로 정제하여 8S02BzL-12 (14 mg, 12.7 umol, 12.43% 수율)를 황색 오일로서 수득하였다. <sup>1</sup>H NMR (MeOD, 400MHz) δ 7.72 (s, 1H), 7.68 (s, 1H), 7.48 (s, 1H), 6.91 (s, 2H), 4.19 (s, 2H), 4.01 (q, J = 7.2 Hz, 2H), 3.80-3.55 (m, 42H), 3.43-3.35 (m, 4H), 3.19 (t, J = 6.8 Hz, 2H), 2.88 (t, J = 8.0 Hz, 2H), 2.42 (t, J = 6.4 Hz, 2H), 1.80 (q, J = 7.2 Hz, 2H), 1.74-1.64 (m, 2H), 1.60-1.51 (m, 2H), 1.45-1.43 (m, 2H), 1.23 (t, J = 7.2 Hz, 3H), 1.02 (t, J = 7.2 Hz, 3H). LC/MS [M+H] 1101.5 (계산치); LC/MS [M+H] 1101.9 (관측치).
- [0598] 실시예 L-13 1-(2,5-디옥소-2,5-디하이드로-1H-피롤-1-일)-2-옥소-6,9,12,15,18,21,24,27,30,33-데카옥사-3-아자펜타트리아코탄-35-일 (2-((2-아미노-8-(N-메틸설포모일)-N-프로필-3H-벤조[b]아제핀-4-카복사미도)옥시)에틸)카바메이트, 8S02BzL-13의 합성



[0599]

[0600]

tert-부틸 2-((2-아미노-8-(N-메틸설파모일)-N-프로필-3H-벤조[b]아제핀-4-카복사미도)옥시)에틸)카바메이트, 8SO2BzL-13b의 제조

[0601]

0°C에서 아세트니트릴/물 (9:1) 중 tert-부틸 2-((2-아미노-8-(클로로설포닐)-N-프로필-3H-벤조[b]아제핀-4-카복사미도)옥시)에틸)카바메이트의 용액에 8SO2BzL-13a (0.14 M, 2.00 mL, 0.28 mmol)를 메틸아민 용액 (THF 중 2 M, 0.70 mL, 1.40 mmol)에 첨가하였다. 10분 후, 용매를 제거하고, 조 생성물을 10-90% 아세트니트릴/물의 구배를 사용하는 역상 HPLC에 의해 정제하여, 용매 증발 후 황색 필름으로서 8SO2BzL-13b (0.09 g, 68%)를 수득하였다.

[0602]

2-아미노-N-(2-아미노에톡시)-8-(N-메틸설파모일)-N-프로필-3H-벤조[b]아제핀-4-카복사미드, 8SO2BzL-13c의 제조

[0603]

아세트니트릴 (2 mL) 중 8SO2BzL-13b (0.09 g, 0.19 mmol)의 용액 및 6 N HCl (2.00 mL, 12.00 mmol)을 실온에서 45분 동안 교반하였다. 용매를 진공에 의해 제거하여 HCl 염으로서 8SO2BzL-13c (0.08 g, 99%)를 수득하였다.

[0604]

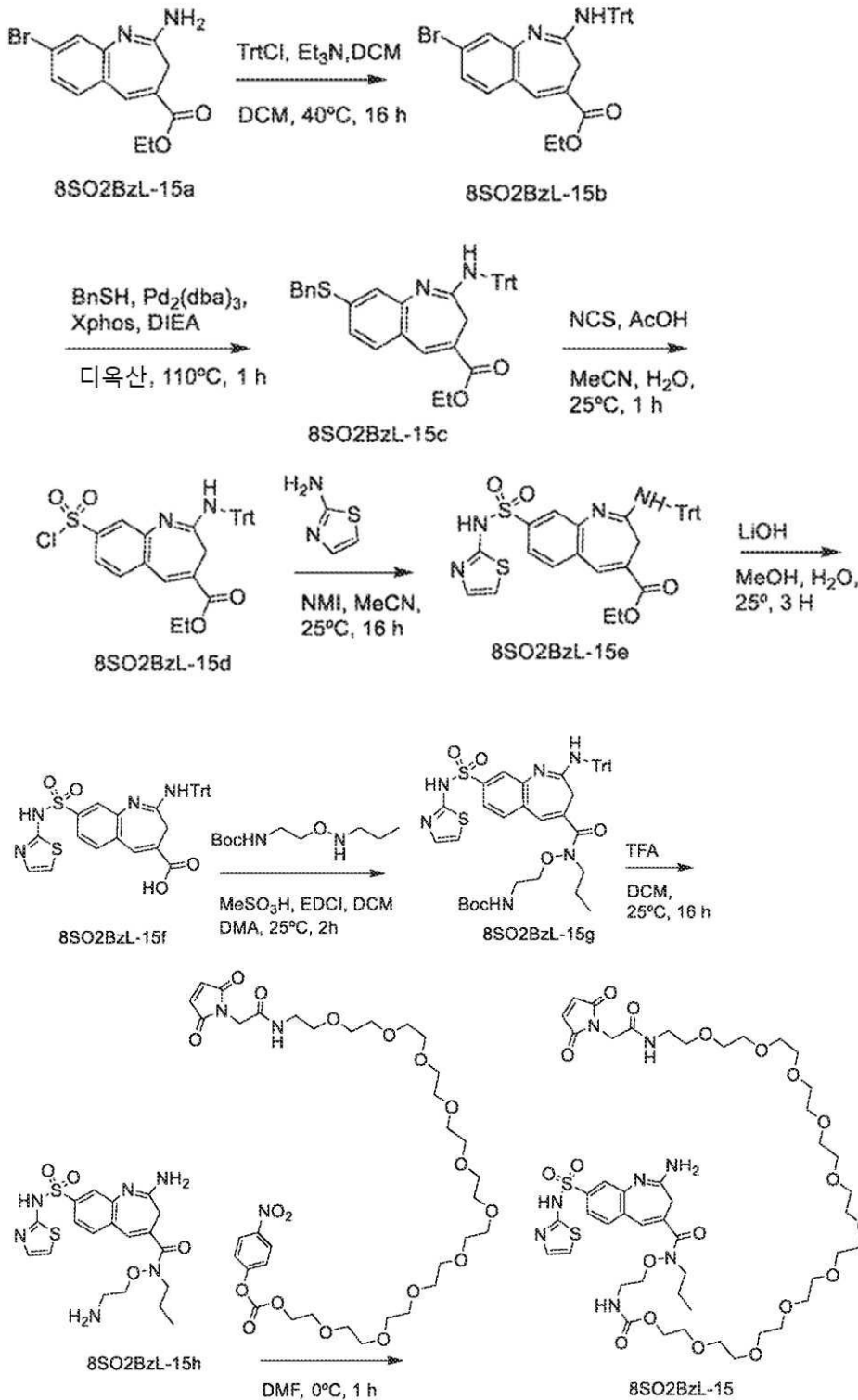
8SO2BzL-13의 제조

[0605]

실온에서 DMF (4 mL) 중 8SO2BzL-13c HCl (0.03 g, 0.06 mmol)의 용액에 트리에틸아민 (0.04 mL, 0.26 mmol)을 첨가하였다. 혼합물에 DMF (2 mL) 중 1-(2,5-디옥소-2,5-디하이드로-1H-피롤-1-일)-2-옥소-6,9,12,15,18,21,24,27,30,33-데카옥사-3-아자펜타트리akon탄-35-일 (4-니트로페닐) 카보네이트, PNPC-PEG10-mal (0.05 g, 0.06 mmol)의 용액을 첨가하였다. 20 min 후, 아세트산 (6 uL)을 첨가하고, 반응물을 진공 하에 농축시키고, 10 min에 걸쳐 10-90% ACN/물 (+0.1% TFA)의 구배를 사용하는 역상 HPLC에 의해 정제하여, 순수한 분획물의 농축 후 8SO2BzL-13 (0.04 g, 52%)을 수득하였다. LC/MS [M+H] 1060.47 (계산치); LC/MS [M+H] 1060.89 (관측치).

[0606]

실시예 L-15 2-[2-[2-[2-[2-[2-[2-[2-[2-[2-[2-(2,5-디옥소피롤-1-일)아세틸]아미노]에톡시]에톡시]에톡시]에톡시]에톡시]에톡시]에톡시]에톡시]에틸 N-[2-[2-아미노-8-(티아졸-2-일설파모일)-3H-1-벤자제핀-4-카보닐]-프로필-아미노]옥시에틸)카바메이트, 8SO2BzL-15의 합성



[0607]

[0608]

[0609]

[0610]

에틸 8-브로모-2-(트리틸아미노)-3H-1-벤자제핀-4-카복실레이트, 8SO2BzL-15b의 제조

DCM(50 mL) 중 에틸 2-아미노-8-브로모-3H-1-벤자제핀-4-카복실레이트, 8SO2BzL-15a(5 g, 16.1 mmol, 1 eq),  $\text{TrtCl}$ (6.76 g, 24.2 mmol, 1.5 eq),  $\text{TEA}$ (4.91 g, 48.5 mmol, 6.75 mL, 3 eq) 및  $\text{DMAP}$ (395 mg, 3.23 mmol, 0.2 eq)의 혼합물을 탈기시키고,  $\text{N}_2$ 로 3회 퍼징한 후,  $40^\circ\text{C}$ 에서 16 h 동안  $\text{N}_2$  분위기 하에서 교반하였다. 반응 혼합물을  $\text{H}_2\text{O}$  (50 mL)를 첨가하여 퀸칭하고,  $\text{EtOAc}$  (100 mL)로 추출하였다. 조합된 유기층을 염수 (50 mL)로 세척하고,  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  상에서 건조시키고, 여과하고, 감압 하에 농축시켜 잔류물을 수득하였다. 잔류물을 컬럼 크로마토그래피 ( $\text{SiO}_2$ , 석유 에테르:에틸 아세테이트 = 100:1 내지 0:1)로 정제하여 8SO2BzL-15b (7.8 g, 14.1 mmol,

87.4% 수율)를 황색 오일로서 수득하였다. LC/MS [M+H] 551.1 (계산치); LC/MS [M+H] 551.1 (관측치).

- [0611] 에틸 8-벤질설펜타닐-2-(트리틸아미노)-3H-1-벤자제핀-4-카복실레이트, 8S02BzL-15c의 제조
- [0612] 디옥산 (30 mL) 중 8S02BzL-15b (3 g, 5.44 mmol, 1 eq), DIEA (1.41 g, 10.8 mmol, 1.90 mL, 2 eq, (1E,4E)-1,5-디페닐펜타-1,4-디엔-3-온; 팔라듐, Pd<sub>2</sub>(dba)<sub>3</sub>, CAS 등록 번호 51364-51-3 (996 mg, 1.09 mmol, 0.2 eq) 및 (5-디페닐포스파닐-9,9-디메틸-크산텐-4-일)-디페닐-포스핀, Xphos(629 mg, 1.09 mmol, 0.2 eq)의 혼합물을 탈기하고, N<sub>2</sub>로 3회 퍼징한 후, 페닐메탄티올, BnSH(1.35 g, 10.8 mmol, 1.27 mL, 2 eq)를 첨가하고, 혼합물을 110°C에서 1 h 동안 N<sub>2</sub> 분위기 하에서 교반하였다. 반응 혼합물을 H<sub>2</sub>O (50 mL)를 첨가하여 켄칭하고, EtOAc (100 mL x 2)로 추출하였다. 조합된 유기층을 염수 (100 mL)로 세척하고, Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 상에서 건조시키고, 여과하고, 감압 하에 농축시켜 잔류물을 수득하였다. 잔류물을 컬럼 크로마토그래피 (SiO<sub>2</sub>, 석유 에테르:에틸 아세테이트 = 100:1 내지 0:18)로 정제하여 8S02BzL-15c (2.3 g, 3.87 mmol, 71.1% 수율)를 황색 오일로서 수득하였다.
- [0613] 에틸 8-클로로설펜타닐-2-(트리틸아미노)-3H-1-벤자제핀-4-카복실레이트, 8S02BzL-15d의 제조
- [0614] MeCN(30 mL) 및 H<sub>2</sub>O(3 mL) 중 8S02BzL-15c(3 g, 5.04 mmol, 1 eq), NCS(2.69 g, 20.2 mmol, 4 eq), AcOH(3.03 g, 50.4 mmol, 2.88 mL, 10 eq)의 혼합물을 25°C에서 1 h 동안 교반하였다. 반응 혼합물을 H<sub>2</sub>O (50 mL)를 첨가하여 켄칭하고, EtOAc (50 mL)로 추출하였다. 조합된 유기층을 염수 (50 mL)로 세척하고, Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 상에서 건조시키고, 여과하고, 감압 하에 농축시켜 잔류물을 수득하였다. 잔류물을 컬럼 크로마토그래피 (SiO<sub>2</sub>, 석유 에테르:에틸 아세테이트 = 99:1 내지 0:1)로 정제하여 8S02BzL-15d (2 g, 3.50 mmol, 69.4% 수율)를 황색 고체로서 수득하였다. LC/MS [M+H] 571.1 (계산치); LC/MS [M+H] 571.2 (관측치).
- [0615] 에틸 8-(티아졸-2-일설펜타닐)-2-(트리틸아미노)-3H-1-벤자제핀-4-카복실레이트, 8S02BzL-15e의 제조
- [0616] MeCN(30 mL) 중 8S02BzL-15d(1.5 g, 2.63 mmol, 1 eq) 및 1-메틸이미다졸(258 mg, 3.15 mmol, 251 uL, 1.2 eq)의 혼합물을 탈기하고 N<sub>2</sub>로 3회 퍼징한 후, 25°C에서 2 h 동안 N<sub>2</sub> 분위기 하에서 교반하였다. 그런 다음, 4,5-디하이드로티아졸-2-아민 (1.07 g, 10.5 mmol, 4 eq)을 첨가하고, 생성 혼합물을 25°C에서 추가로 16h 동안 N<sub>2</sub> 분위기 하에서 교반하였다. 반응 혼합물을 H<sub>2</sub>O (50 mL)를 첨가하여 켄칭하고, EtOAc (50 mL)로 추출하였다. 조합된 유기층을 염수 (100 mL)로 세척하고, Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 상에서 건조시키고, 여과하고, 감압 하에 농축시켜 잔류물을 수득하였다. 잔류물을 컬럼 크로마토그래피 (SiO<sub>2</sub>, 석유 에테르:에틸 아세테이트 = 100:1 내지 0:1)로 정제하여 8S02BzL-15e (0.5 g, 787 umol, 29.9% 수율)를 황색 고체로서 수득하였다. <sup>1</sup>H NMR (MeOD, 400 MHz) δ 7.71 (s, 1H), 7.23 (m, 20H), 6.75 (d, J = 4.8 Hz, 1H), 4.36 (q, J = 7.2 Hz, 2H), 2.98 (s, 2H), 1.38 (t, J = 7.2 Hz, 3H). LC/MS [M+H] 635.17 (계산치); LC/MS [M+H] 635.1 (관측치).
- [0617] 8-(N-(티아졸-2-일)설펜타닐)-2-(트리틸아미노)-3H-벤조[b]아제핀-4-카복실산, 8S02BzL-15f의 제조
- [0618] H<sub>2</sub>O(4 mL) 중 8S02BzL-15e(0.5 g, 787.69 umol, 1 eq), LiOH·H<sub>2</sub>O(264 mg, 6.30 mmol, 8 eq) 및 THF(4 mL)의 혼합물을 25°C에서 3 hr 동안 교반하였다. 반응 용액을 2M HCl 첨가 후 켄칭하여 pH = ~6을 조절한 다음, 여과하여 8S02BzL-15f (0.45 g, 699.66 umol, 88.82% 수율, HCl)를 백색 고체로서 수득하였다. LC/MS [M+H] 607.1 (계산치); LC/MS [M+H] 607.2 (관측치).
- [0619] tert-부틸 N-[2-[프로필-[8-(티아졸-2-일설펜타닐)-2-(트리틸아미노)-3H-1-벤자제핀-4-카보닐]아미노]옥시]에틸]카바메이트, 8S02BzL-15g의 제조
- [0620] DMA (5 mL) 및 DCM (5 mL) 중 8S02BzL-15f (0.42 g, 692 umol, 1 eq), tert-부틸 N-[2-(프로필아미노옥시)에틸]카바메이트 (181 mg, 830 umol, 1.2 eq), 메탄설폰산 (133 mg, 1.38 mmol, 98.5 uL, 2 eq), EDCI (663 mg, 3.46 mmol, 5 eq)의 혼합물을 탈기시키고, N<sub>2</sub>로 3회 퍼징한 다음, 25°C에서 2 hr 동안 N<sub>2</sub> 분위기 하에서 교반하였다. 반응 혼합물을 pH 약 7이 될 때까지 Na<sub>2</sub>HCO<sub>3</sub> (3mL)를 첨가하여 켄칭하고, EtOAc (5 mL x 3)로 추출하였다. 조합된 유기층을 염수 (5 mL)로 세척하고, Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 상에서 건조시키고, 여과하고, 감압 하에 농축시켜 잔류물을 수득하였다. 잔류물을 컬럼 크로마토그래피 (SiO<sub>2</sub>, 석유 에테르:에틸 아세테이트 = 99:1 내지 20:80)로 정제하여 8S02BzL-15g (0.5 g, 619 umol, 89.5% 수율)을 황색 고체로서 수득하였다. LC/MS [M+H] 807.3 (계산치); LC/MS [M+H] 807.3 (관측치).

- [0621] 2-아미노-N-(2-아미노에톡시)-N-프로필-8-(티아졸-2-일설펜과모일)-3H-1-벤자제핀-4-카복사미드, 8S02BzL-15h의 제조
- [0622] DCM(10 mL) 중 8S02BzL-15g(0.5 g, 619  $\mu\text{mol}$ , 1 eq), TFA(5.65 g, 49.5 mmol, 3.67 mL, 80 eq)의 혼합물을 25 °C에서 16 h 동안 교반하였다. 반응 혼합물을 H<sub>2</sub>O (5 mL)를 첨가하여 킨칭하고, MTBE (10 mL) (5 mL x 2)로 추출하여 과량의 TFA를 제거하였다. 조합된 수성층을 감압 하에 농축시켜 8S02BzL-15h (0.25 g, 432  $\mu\text{mol}$ , 69.7% 수율, TFA)를 백색 고체로서 수득하였다. LC/MS [M+H] 465.1 (계산치); LC/MS [M+H] 465.1 (관측치).
- [0623] 8S02BzL-15의 제조
- [0624] DMF(0.5 mL) 중 8S02BzL-15h(0.2 g, 288  $\mu\text{mol}$ , 1 eq, 2TFA), 2-[2-[2-[2-[2-[2-[2-[2-[2-[2-[2-[(2,5-디옥소피롤-1-일)아세틸]아미노]에톡시]에톡시]에톡시]에톡시]에톡시]에톡시]에톡시]에톡시]에톡시]에틸(4-니트로페닐)카보네이트(232 mg, 288  $\mu\text{mol}$ , 1 eq), DIEA(111 mg, 866  $\mu\text{mol}$ , 150  $\mu\text{L}$ , 3 eq)의 혼합물을 탈기하고, N<sub>2</sub>로 3회 퍼징한 다음, 0°C에서 1 h 동안 N<sub>2</sub> 분위기 하에서 교반하였다. 반응 용액을 pH = ~6이 될 때까지 TFA로 킨칭하였다. 잔류물을 분취용-HPLC (컬럼: Phenomenex Luna 80 x 30mm x 3 $\mu\text{m}$ ; 이동상: [물 (TFA)-ACN]; B%:15%-40%, 8min)에 의해 정제하여 8S02BzL-15 (15.0 mg, 13.2  $\mu\text{mol}$ , 4.6% 수율)를 백색 고체로서 수득하였다. <sup>1</sup>H NMR (MeOD-d<sub>4</sub>, 400 MHz)  $\delta$  7.97 (s, 1H), 7.88 (d, J = 2.0 Hz, 1H), 7.86 (d, J = 2.0 Hz, 1H), 7.39 (s, 1H), 7.18 (d, J = 4.8 Hz, 1H), 6.90 (s, 2H), 6.81 (d, J = 4.8 Hz, 1H), 4.17 (s, 2H), 3.74 (m, 2H), 3.67 (m, 2H), 3.59 (m, 42H), 3.38 (m, 6H), 1.80-1.72 (m, 2H) 1.00 (t, J = 7.2 Hz, 3H). LC/MS [M+H] 1129.4 (계산치); LC/MS [M+H] 1129.5 (관측치).
- [0625] 실시예 201 면역접합체(IC)의 제조
- [0626] 리신-접합된 면역접합체를 제조하기 위해, 항체를 G-25 SEPHADEX<sup>TM</sup> 탈염 컬럼(Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) 또는 Zeba<sup>TM</sup> Spin Desalting Column(Thermo Fisher Scientific)을 사용하여 pH 8.3에서 100 mM 붕산, 50 mM 염화나트륨, 1 mM 에틸렌디아민테트라아세트산을 함유하는 접합 완충제로 완충제 교환하였다. 그런 다음, 용리액을 완충액을 사용하여 각각 약 1-10 mg/ml의 농도로 조정된 후 멸균 여과하였다. 항체를 20 내지 30°C로 예비가온시키고, 5 내지 20 mM의 농도로 디메틸설폭사이드(DMSO) 또는 디메틸아세트아미드(DMA)에 용해된 2-20(예를 들면, 7-10) 몰 당량의 테트라플루오로페닐(TFP) 또는 설펜 테트라플루오로페닐(설펜 TFP) 에스테르, 화학식 II의 8-설펜-2-아미노벤자제핀-링커(8S02Bz-L) 화합물과 신속히 혼합하였다. 30°C에서 약 16시간 동안 반응을 진행시키고, pH 7.2의 인산 완충 식염수(PBS)에서 평형화된 2개의 연속적인 G-25 탈염 컬럼 또는 Zeba<sup>TM</sup> Spin Desalting 컬럼을 실행하여 면역접합체(IC)를 반응물로부터 분리하여 표 3a 및 표 3b의 면역접합체(IC)를 수득하였다. 아주반트-항체 비(DAR)는 XEVO<sup>TM</sup> G2-XS TOF 질량 분광기(Waters Corporation)에 연결된 ACQUITY<sup>TM</sup> UPLC H-클래스(Waters Corporation, Milford, MA)에서 C4 역상 칼럼을 사용하여 액체 크로마토그래피 질량 분광법에 의해 결정된다.
- [0627] 시스테인-접합된 면역접합체를 제조하기 위해, 항체를 Zeba<sup>TM</sup> Spin Desalting Column(Thermo Fisher Scientific)을 사용하여 2 mM EDTA와 PBS, pH 7.2를 함유하는 접합 완충제로 완충제 교환하였다. 사슬간 디설파이드는 2 내지 4 몰 과량의 Tris (2-카복시에틸) 포스핀(TCEP) 또는 디티오프레이트(DTT)을 사용하여 37°C에서 30분 내지 2시간 동안 환원시켰다. 과량의 TCEP 또는 DTT를 접합 완충제와 예비-평형화된 Zeba<sup>TM</sup> Spin Desalting 컬럼을 사용하여 제거하였다. 완충제 교환된 항체의 농도를 접합 완충제를 사용하여 대략 5 내지 20 mg/ml로 조정하고, 멸균 여과시켰다. 말레이미드-8S02Bz-L 화합물을 5 내지 20 mM의 농도로 디메틸설폭사이드(DMSO) 또는 디메틸아세트아미드(DMA)에 용해시켰다. 접합을 위해, 항체를 10 내지 20 몰 당량의 말레이미드-8S02Bz-L과 혼합하였다. 일부 경우에, 20%(v/v)까지 추가 DMA 또는 DMSO를 접합 완충제에서 말레이미드-8S02Bz-L의 용해도를 개선하기 위해 첨가하였다. 20°C에서 대략 30 min 내지 4시간 동안 반응을 진행시켰다. 생성된 접합체를 2개의 연속 Zeba<sup>TM</sup> Spin Desalting Column을 사용하여 비반응된 말레이미드-8S02Bz-L로부터 정제하였다. 컬럼은 인산-완충 식염수(PBS)(pH 7.2)로 예비-평형화시켰다. 아주반트 대 항체 비(DAR)는 XEVO<sup>TM</sup> G2-XS TOF 질량 분광기(Waters Corporation)에 연결된 ACQUITY<sup>TM</sup> UPLC H-클래스(Waters Corporation, Milford, MA)에서 C4 역상 칼럼을 사용하여 액체 크로마토그래피 질량 분광법에 의해 예측된다.
- [0628] 접합을 위해, 항체는 항체의 안정성 또는 항원-결합 특이성에 부정적으로 영향을 미치지 않는 당해 분야에 알려진 진 수성 완충제 시스템에 용해될 수 있다. 인산 완충 식염수를 사용할 수 있다. 8S02Bz-L 화합물은 본원 어딘가

에 기재된 것과 같은 적어도 하나의 극성 비양성자성 용매를 포함하는 용매 시스템에 용해된다. 일부 이러한 양태에서, 8S02Bz-L은 pH 8 Tris 완충제(예를 들면, 50 mM Tris)에서 약 5 mM, 약 10 mM, 약 20 mM, 약 30 mM, 약 40 mM 또는 약 50 mM 및 이의 범위, 예컨대 약 5 mM 내지 약 50mM 또는 약 10 mM 내지 약 30 mM의 농도로 용해된다. 일부 양태에서, 8-설포닐-2-아미노벤자제핀-링커 중간체는 DMSO(디메틸설폭사이드), DMA(디메틸아세트아미드), 아세토니트릴 또는 또 다른 적합한 이극성 비양성자성 용매에 용해된다.

[0629] 대안적으로 접합 반응에서, 당량 과량의 8S02Bz-L 용액은 희석되고, 항체 용액과 배합될 수 있다. 8S02Bz-L 용액은 적합하게는 적어도 하나의 극성 비양성자성 용매 및 적어도 하나의 극성 양성자성 용매에 희석될 수 있고, 이의 예는 물, 메탄올, 에탄올, n-프로판올 및 아세트산을 포함하였다. 항체에 대한 8S02Bz-L 중간체의 물 당량은 약 1.5:1, 약 3:1, 약 5:1, 약 10:1, 약 15:1 또는 약 20:1 및 이의 범위, 예컨대, 약 1.5:1 내지 약 20:1 약 1.5:1 내지 약 15:1, 약 1.5:1 내지 약 10:1, 약 3:1 내지 약 15:1, 약 3:1 내지 약 10:1, 약 5:1 내지 약 15:1 또는 약 5:1 내지 약 10:1일 수 있다. 반응은 LC-MS와 같은 당업계에 공지된 방법에 의해 완료에 대해 적절하게 모니터링될 수 있다. 접합 반응은 전형적으로 약 1시간 내지 약 16시간의 범위에서 완료된다. 반응이 완료한 후, 반응을 쉼시키기 위해 반응 혼합물에 시약이 첨가될 수 있다. 항체 티올 기가 티올-반응성 기, 예컨대 8S02Bz-L 링커 중간체의 말레이미드와 반응하면, 비반응된 항체 티올 기는 캡핑 시약과 반응할 수 있다. 적합한 캡핑 시약의 예는 에틸말레이미드이다.

[0630] 접합 후, 면역접합체는 예를 들면 비제한적인 예로서 크기 배제 크로마토그래피, 소수성 상호작용 크로마토그래피, 이온 교환 크로마토그래피, 크로마토포커싱, 한외여과, 원심분리 한외여과, 점선 흐름 여과 및 이들의 조합과 같은 당해 분야에 알려진 정제 방법에 의해 비접합된 반응물질 및/또는 접합체 응집체로부터 정제되고 분리될 수 있다. 예를 들면, 면역접합체를 20 mM 숙신산나트륨(pH 5)에 희석하는 것이 정제에 선행할 수 있다. 희석된 용액은 양이온 교환 칼럼에 적용된 후, 예를 들면 적어도 10 칼럼 부피의 20 mM 숙신산나트륨(pH 5)으로 세척된다. 접합체는 적합하게는 완충제, 예컨대 PBS로 용리될 수 있다.

[0631] 실시예 202 HEK 리포터 검정

[0632] 인간 TLR7 또는 인간 TLR8을 발현하는 HEK293 리포터 세포를 Invivogen으로부터 구입하고 세포 증식 및 실험을 위해 벤더 프로토콜을 따랐다. 간단히, 세포를 10% FBS, Zeocin 및 블라스티시딘이 보충된 DMEM에서 5% CO<sub>2</sub>에서 80-85% 포화상태로 성장시켰다. 이후, 세포를 HEK 검출 배지 및 면역자극 분자를 함유하는 기질에 의해 4x10<sup>4</sup>개의 세포/웰로 96웰 편평 플레이트에서 시딩하였다. 620-655 nm 파장에서 플레이트 판독기를 사용하여 활성을 측정하였다.

[0633] 실시예 203 시험관내 면역접합체 활성의 평가

[0634] 이 실시예는 본 발명의 면역접합체가 면역 활성화를 일으키는 데 효과적이고, 따라서 암의 치료에 유용하다는 것을 보여준다.

[0635] a) 인간 항원 제시 세포의 단리: 인간 골수성 항원 제시 세포(APC)를 CD14, CD16, CD40, CD86, CD123 및 HLA-DR에 대한 단일클론 항체를 함유하는 ROSETTESEP™ Human Monocyte Enrichment Cocktail(Stem Cell Technologies, Vancouver, Canada)을 사용하여 밀도 구배 원심분리에 의해 건강한 혈액 공여자(Stanford Blood Center, Palo Alto, California)로부터 수득된 인간 말초 혈액으로부터 음성 선택하였다. 후속하여, 미성숙 APC를 CD14, CD16, CD40, CD86, CD123 및 HLA-DR에 대한 단일클론 항체를 함유하는 CD16 고갈이 없는 EASYSEP™ Human Monocyte Enrichment Kit(Stem Cell Technologies)를 사용하여 음성 선택을 통해 90% 초과로 순도로 정제하였다.

[0636] b) 골수성 APC 활성화 검정: 2 x 10<sup>5</sup>개의 APC를 10% FBS, 100 U/mL 페니실린, 100 μg/mL(밀리리터당 마이 크로그람) 스트렙토마이신, 2 mM L-글루타민, 피루브산나트륨, 비필수 아미노산 및 표시된 경우 다양한 농도의 비접합된(네이티브) 항체 및 본 발명의 면역접합체(IC)(상기 실시예에 따라 제조된 것과 같음)가 보충된 Iscove 변형 돌베코 배지, IMDM(Lonza)을 함유하는 96웰 플레이트(Corning, Corning, NY)에서 항온처리하였다. 무세포 상청액을 전염증성 반응의 판독으로서 TNF α 분비를 측정하기 위해 ELISA를 통해 18시간 후 분석하였다.

[0637] c) PBMC 활성화 검정: 인간 말초 혈액 단핵구 세포(PBMC)를 밀도 구배 원심분리에 의해 건강한 혈액 공여자(Stanford Blood Center, Palo Alto, California)로부터 수득된 인간 말초 혈액으로부터 단리하였다. PBMC를 10:1의 효과기 대 표적 세포 비로 CEA-발현 종양 세포(예를 들면, MKN-45, HPAF-II)와의 공동-배양물에서 96웰

플레이트(Corning, Corning, NY)에서 항온처리하였다. 세포를 다양한 농도의 비접합된(네이키드) 항체 및 본 발명의 면역접합체(상기 실시예에 따라 제조된 것과 같음)에 의해 자극하였다. 무세포 상청액을 제조사의 가이드 라인(BioLegend®, San Diego, CA)에 따라 LegendPlex™ 키트를 사용하여 사이토카인 비드 어레이에 의해 분석하였다.

[0638] d) 인간 종래의 수지상 세포의 단리: 인간 종래의 수지상 세포(cDC)를 밀도 구배 원심분리에 의해 건강한 혈액 공여자(Stanford Blood Center, Palo Alto, California)로부터 수득된 인간 말초 혈액으로부터 음성 선택하였다. 간단히, 세포를 처음에 세포 조제물로부터 T 세포를 제거하기 위해 ROSETTESEP™ Human CD3 Depletion Cocktail(Stem Cell Technologies, Vancouver, Canada)을 사용하여 농후화하였다. 이후, cDC를 EASYSEP™ Human Myeloid DC Enrichment Kit(Stem Cell Technologies)를 사용하여 음성 선택을 통해 추가로 농후화하였다.

[0639] e) cDC 활성화 검정:  $8 \times 10^4$  개의 APC를 10:1의 효과기(cDC) 대 표적(종양 세포) 비로 ISAC 표적 항원을 발현하는 종양 세포와 공동-배양하였다. 세포를 10% FBS 및 표시된 경우 다양한 농도의 본 발명의 표시된 면역 접합체(상기 실시예에 따라 제조된 것과 같음)가 보충된 RPMI-1640 배지를 함유하는 96웰 플레이트(Corning, Corning, NY)에서 항온처리하였다. 약 18시간의 밤샘 항온처리 후, 무세포 상청액을 수집하고, BioLegend LEGENDPLEX 사이토카인 비드 어레이를 사용하여 사이토카인 분비(TNF  $\alpha$ 를 포함)에 대해 분석하였다.

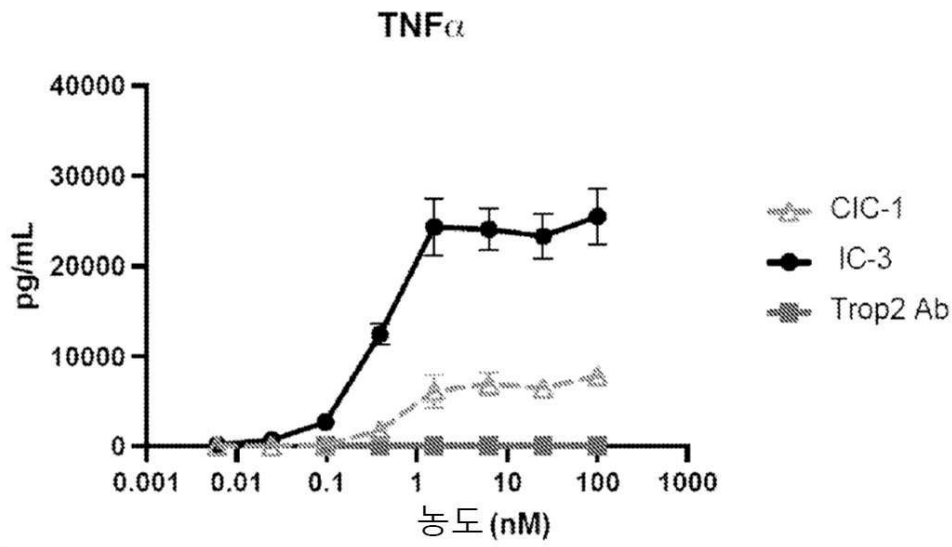
[0640] 골수성 세포 유형의 활성화를 상이한 골수성 집단이 사용된 기재된 검정 이외의 다양한 스크린 검정을 사용하여 측정할 수 있다. 이것은 건강한 공여자 혈액으로부터 단리된 단핵구, M-CSF 분화된 대식세포, GM-CSF 분화된 대식세포, GM-CSF+IL-4 단핵구-유래된 수지상 세포, 건강한 공여자 혈액으로부터 단리된 종래의 수지상 세포(cDC) 및 면역억제 상태로 극성화된 골수성 세포(골수성 유래된 억제자 세포 또는 MDSC라고도 칭함)를 포함할 수 있다. MDSC 극성화된 세포의 예는 면역억제 상태를 향해 분화된 단핵구, 예컨대 M2a M $\Phi$ (IL4/IL13), M2c M $\Phi$ (IL10/TGF $\beta$ ), GM-CSF/IL6 MDSC 및 종양-교육된 단핵구(TEM)를 포함한다. TEM 분화는 종양 조건화 배지(예를 들면, 786.O, MDA-MB-231, HCC1954)를 사용하여 수행될 수 있다. 원발성 종양-연관 골수 세포는 또한 해리된 종양 세포 현탁액(Discovery Life Sciences)에 존재하는 일차 세포를 포함할 수 있다.

[0641] 기재된 골수 세포 집단의 활성화의 평가는 단일-배양으로서 또는 면역접합체(IC)가 항체의 CDR 영역을 통해 결합할 수 있는 관심 항원을 발현하는 세포와의 공동-배양으로서 수행될 수 있다. 18-48시간 동안의 항온처리 후, 활성화는 유세포 분석을 사용하여 세포 표면 공동-자극 분자의 상향조절에 의해 또는 분비된 전염증성 사이토카인의 측정에 의해 평가될 수 있다. 사이토카인 측정을 위해, 무세포 상청액을 수확하고, 유세포분석법을 사용하여 사이토카인 비드 어레이(예를 들면, BioLegend로부터의 LegendPlex)에 의해 분석하였다.

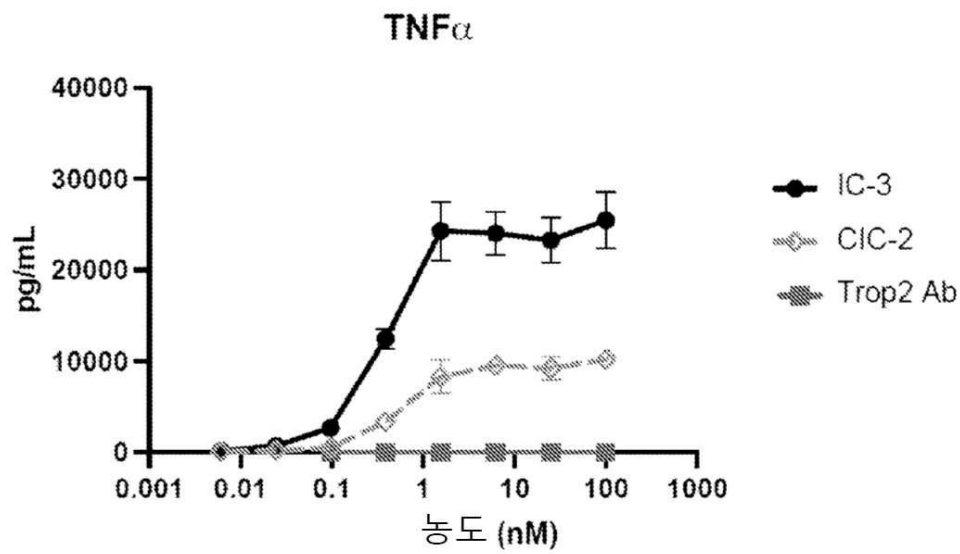
[0642] 본원에서 언급된 공보, 특허 출원, 및 특허를 포함하는 모든 참조문헌은 각각의 참조문헌이 참고로 편입됨이 개별적이고 구체적으로 명시되고 그 전문을 본원에 나타낸 것과 동일한 정도로 본원에 참고로 편입된다.

도면

도면1



도면2



서 열 목 록 (첨부)



아이콘을 클릭하시면 서열목록 파일이 열립니다.

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