(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2025-0075560
(43) 공개일자 2025년05월28일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 47/68 (2017.01) *A61K 31/437* (2006.01)
A61K 47/65 (2017.01) *C07K 16/30* (2006.01)
(52) CPC특허분류
A61K 47/6889 (2017.08)
A61K 31/437 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2025-7004934
(22) 출원일자(국제) 2023년07월14일
심사청구일자 없음
(85) 번역문제출일자 2025년02월14일
(86) 국제출원번호 PCT/CN2023/107444
(87) 국제공개번호 WO 2024/012566
국제공개일자 2024년01월18일
(30) 우선권주장
PCT/CN2022/106014 2022년07월15일 중국(CN)
(뒷면에 계속)

(71) 출원인
진콴팀 헬스케어 (쑤저우) 씨오., 엘티디.
중국 215123 장쑤성 쑤저우 쑤저우 인더스트리얼 파크 뤄수이 로드 넘버 398 빌딩 디 5 플로어
(72) 발명자
양, 동
중국 215123 장쑤성 쑤저우 쑤저우 인더스트리얼 파크 뤄수이 로드 넘버 398 빌딩 디 5 플로어
후, 밍유
중국 215123 장쑤성 쑤저우 쑤저우 인더스트리얼 파크 뤄수이 로드 넘버 398 빌딩 디 5 플로어
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
양영준, 이상영

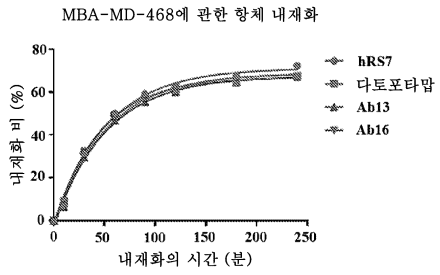
전체 청구항 수 : 총 34 항

(54) 발명의 명칭 **항-TROP2 항체 및 이의 접합체**

(57) 요 약

본 개시내용은 분자-약물 접합체를 표적화하기 위한 항체, 페이로드 및 링커 분자, 그리고 이의 상응하는 접합체, 제조 및 용도에 관한 것이다.

대 표 도



1.1

(52) CPC특허분류
A61K 47/65 (2017.08)
A61K 47/6803 (2025.05)
A61K 47/68037 (2025.05)
A61K 47/6849 (2017.08)
A61K 47/6851 (2017.08)
C07K 16/30 (2013.01)
C07K 2317/24 (2013.01)
C07K 2317/92 (2013.01)
C07K 2317/94 (2013.01)

(72) 발명자
순, 야쥔
중국 215123 장쑤성 쑤저우 쑤저우 인더스트리얼 파크 뤄수이 로드 넘버 398 빌딩 디 5 플로어
송, 폴 에이치
중국 215123 장쑤성 쑤저우 쑤저우 인더스트리얼 파크 뤄수이 로드 넘버 398 빌딩 디 5 플로어
수, 한원
중국 215123 장쑤성 쑤저우 쑤저우 인더스트리얼 파크 뤄수이 로드 넘버 398 빌딩 디 5 플로어
친, 강
중국 215123 장쑤성 쑤저우 쑤저우 인더스트리얼 파크 뤄수이 로드 넘버 398 빌딩 디 5 플로어

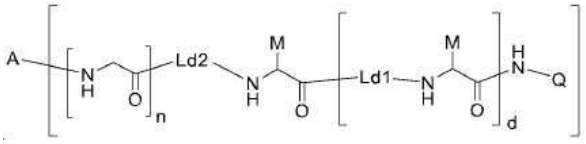
(30) 우선권주장
PCT/CN2023/086107 2023년04월04일 중국(CN)
PCT/CN2023/088115 2023년04월13일 중국(CN)

명 세 서

청구범위

청구항 1

화학식 (III)의 구조를 갖는 접합체:

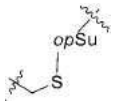
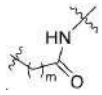


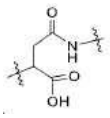
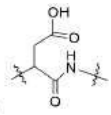
화학식 (III)

식중,

Q는 수소, $-C_2H_4-(PEG)_t-(CO)NH_2$ 또는 LKb-P이고;

M은 수소 또는 LKa-LKb-P이고; 여기서

각 LKa는  및  으로부터 독립적으로 선택되고;

*op*Su는  ,  또는 이의 혼합물이고;

각 LKb는 독립적으로 L^2-L^1-B이고;

각 B는 독립적으로 부재하거나, 하기 1) 및 2)의 조합이고: 1) 자가-희생 스페이서 Sp1; 및 2) 결합, 또는 $-CR^1R^2-$, C_{1-10} 알킬렌, C_{4-10} 시클로알킬렌, C_{4-10} 헤테로시클릴렌 및 -(CO)-로부터 선택된 2가 기 중 하나 또는 이들 중 둘 이상의 조합; 바람직하게는, B는 $-NH-CH_2-U-$이거나 부재하거나 $-NH-CH_2-U-(CR^1R^2)_g-(CO)-$이고; U는 부재하거나, O, S 또는 NH, 바람직하게는 O 또는 S이고;

다만 Q 및 M은 동시에 수소가 아니고;

P는 화학식 (III)의 B 모이어티 또는 L^1 모이어티에 결합되는 페이로드이고;

각 L^1은 효소에 의해 절단될 수 있는 아미노산 서열을 포함하는 독립적으로 절단가능한 서열 1을 포함하고, 절단가능한 서열 1은 1-10개 아미노산을 포함하고;

각 L^2는 독립적으로 결합이거나; 알킬렌에서 하나 이상의 $-CH_2-$ 구조가 $-CR^3R^4-$, -O-, -(CO)-, $-S(=O)_2-$, $-NR^5-$, $-N^{\oplus}R^6R^7-$, C_{4-10} 시클로알킬렌, C_{4-10} 헤테로시클릴렌, 페닐렌에 의해 임의로 대체되는 C_{2-20} 알킬렌이고; 여기서 시클로알킬렌, 헤테로시클릴렌 및 페닐렌은 각각 독립적으로 비치환되거나 할로겐, $-C_{1-10}$ 알킬, $-C_{1-10}$ 할로알킬, $-C_{1-10}$ 알킬렌-NH-R^8 및 $-C_{1-10}$ 알킬렌-O-R^9로부터 선택된 적어도 하나의 치환체로 치환되고;

Ld2 및 각 Ld1은 독립적으로 결합이거나; $-NH-C_{1-20}$ 알킬렌-(CO)-, $-NH-(PEG)_i-(CO)-$로부터 선택되거나, 독립적으로 비치환되거나 측쇄에서 $-(PEG)_j-R^{11}$로 치환된 2-10의 중합도를 갖는 천연 아미노산 또는 올리고머성 천연 아미노산이고;

$-(PEG)_t-$, $-(PEG)_i-$ 및 $-(PEG)_j-$는, 한쪽 말단에 임의적 추가의 C_{1-10} 알킬렌이 있는, 표시된 수의 연속적 -(O-

C_2H_4)- 구조 단위 또는 연속적 -(C_2H_4-O)- 구조 단위를 포함하는, 각 PEG 단편이고;

R^1, R^2, R^3, R^4, R^5, R^6, R^7, R^8, R^9는 수소, 할로겐, -C_{1-10} 알킬, -C_{1-10} 할로알킬, C_{4-10} 시클로알킬렌으로부터 각각 독립적으로 선택되거나;

R^1 및 R^2는 이들이 부착되는 탄소 원자와 함께 3-6 원 시클로알킬 기를 형성하거나;

R^3 및 R^4는 이들이 부착되는 탄소 원자와 함께 3-6 원 시클로알킬 기를 형성하고;

R^{11}은 C_{1-10} 알킬이고;

m은 1 내지 3의 임의의 정수이고;

n은 2 내지 20의 임의의 정수이고;

d는 0이거나, 1 내지 6의 임의의 정수이고;

각 i는 독립적으로 0-100, 바람직하게는 0 내지 20의 정수이고; 바람직하게는 각 i는 독립적으로 0 내지 12; 더욱 바람직하게는 0 내지 8; 특히 4의 정수이고;

각 j는 독립적으로 1-100, 바람직하게는 1 내지 20의 정수이고; 바람직하게는 각 j는 독립적으로 1 내지 12; 더욱 바람직하게는 8 내지 12; 특히 8 또는 12의 정수이고;

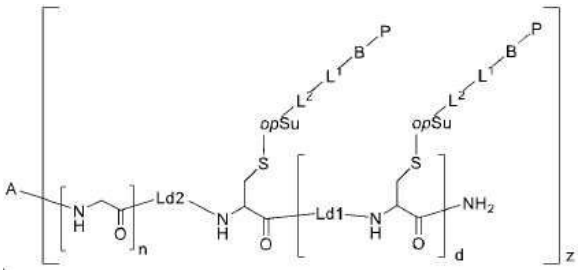
각 t는 독립적으로 1-100, 바람직하게는 1 내지 20의 정수이고; 바람직하게는 각 t는 독립적으로 1 내지 12; 더욱 바람직하게는 8 내지 12; 특히 8 또는 12의 정수이고;

A는, 바람직하게는 화학식 (III) 중 G_n 모이어티와 연결하도록 변형되는, 항-TROP2 항체 또는 이의 항원-결합 단편이고, G는 글리신이고;

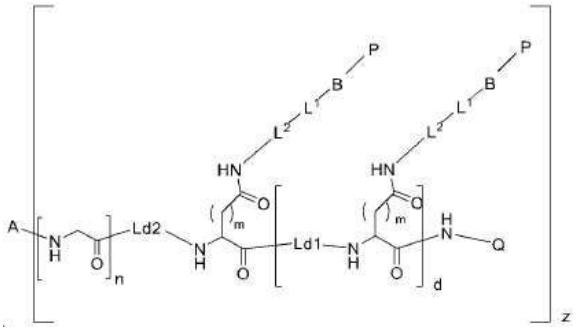
z는 1 내지 20의 정수임.

청구항 2

제 1 항에 있어서, 상기 접합체가 하기 화학식 (III-a) 또는 화학식 (III-b)의 구조를 갖는, 접합체:



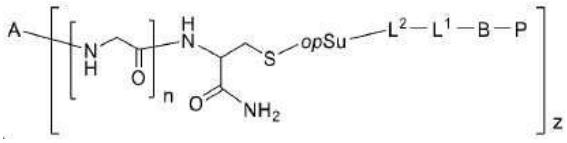
화학식 (III-a),



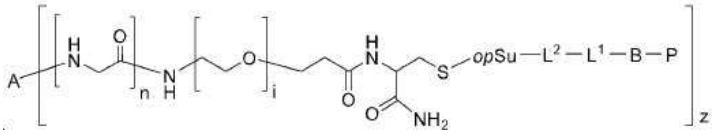
화학식 (III-b).

청구항 3

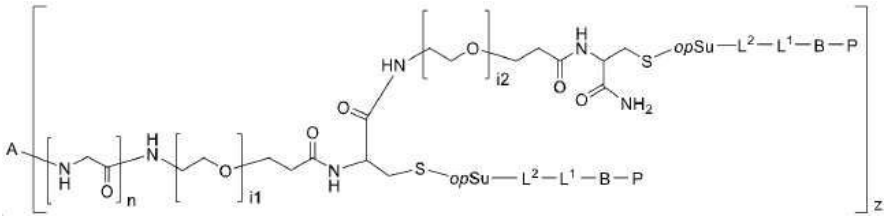
제 1 항 또는 제 2 항에 있어서, 상기 접합체가 하기의 구조를 갖는, 접합체:



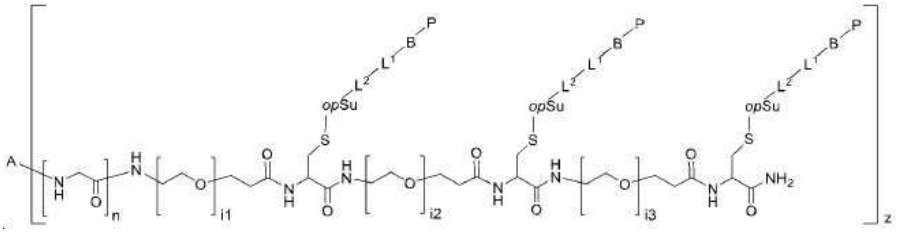
(접합체 III-a-0-1)



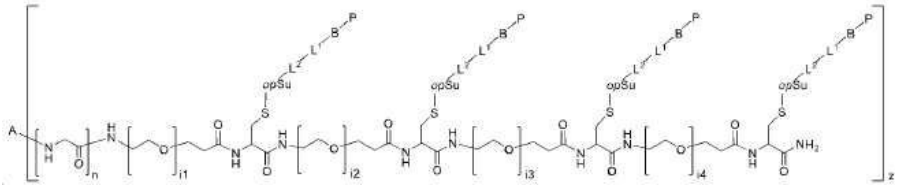
(접합체 III-a-0-2)



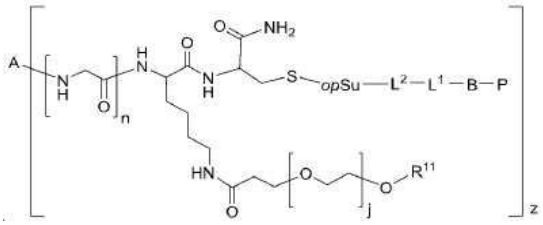
(접합체 III-a-0-3)



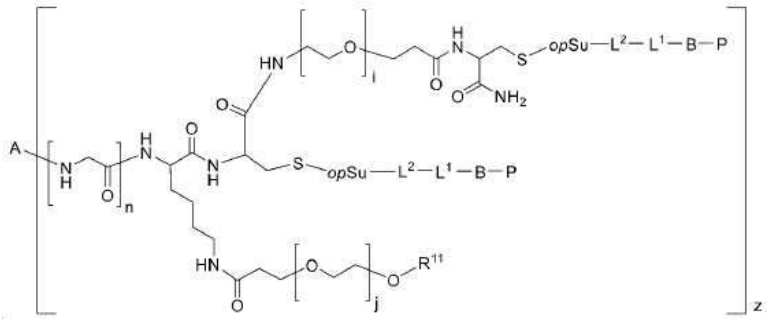
(접합체 III-a-0-4)



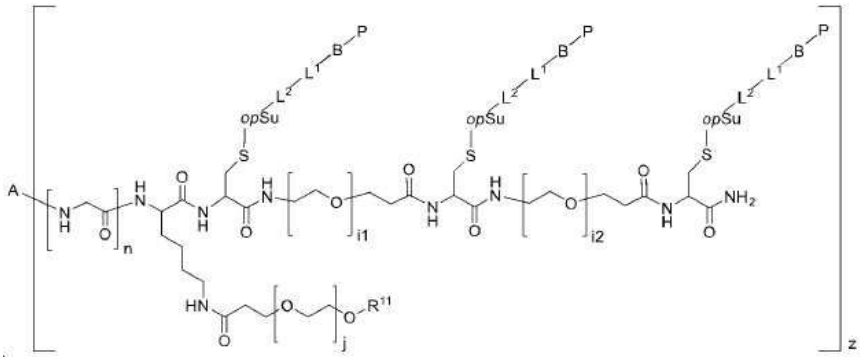
(접합체 III-a-0-5)



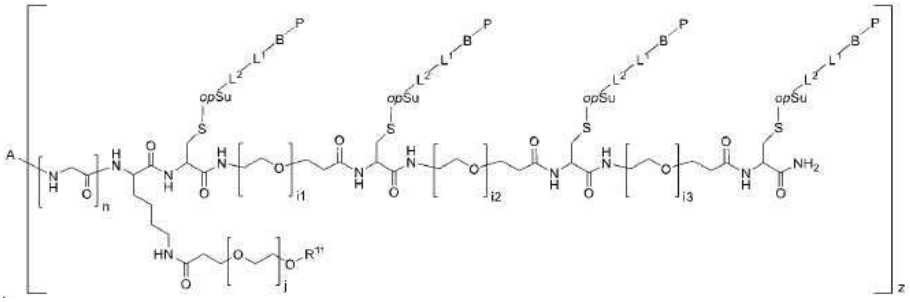
(접합체 III-a-1-1)



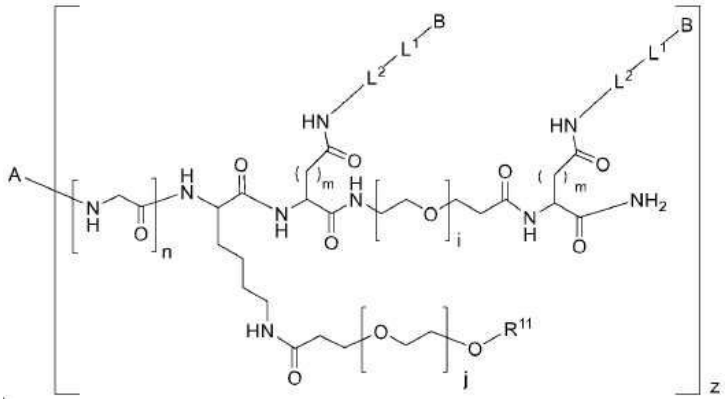
(접합체 III-a-1-2)



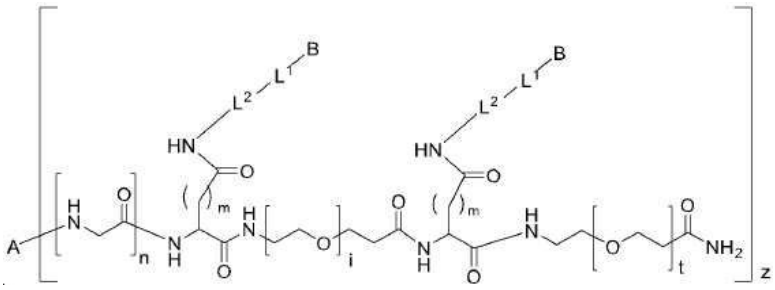
(접합체 III-a-1-3)



(접합체 III-a-1-4)



(접합체 III-b-1-1)



(접합체 III-b-0-1)

바람직하게는, z는 1 내지 4; 바람직하게는 2이고;

각 i, i1, i2, i3, i4는 독립적으로 0-100, 바람직하게는 0 내지 20의 정수이고; 바람직하게는 각 i, i1, i2, i3, i4는 독립적으로 0 내지 12; 더욱 바람직하게는 0 내지 8; 특히 4의 정수이고;

각 j는 독립적으로 1-100, 바람직하게는 1 내지 20의 정수이고; 바람직하게는 각 j는 독립적으로 1 내지 12; 더

욱 바람직하게는 8 내지 12; 특히 8 또는 12의 정수이고;

바람직하게는, n은 3이고, L^2는 $-(CH_2)_p-(CH_2)_2(CO)-$이거나 $-(C_2H_4-O)_p-(CH_2)_2(CO)-$이고, p는 2 내지 4이고, L^1은 Gly-Gly-Phe-Gly이고, B는 $-NH-CH_2-U-$이거나 부재하거나 $-NH-CH_2-U-(CR^1R^2)_g-(CO)-$이고, U는 부재하거나, U는 O이고, g는 1이고;

각 t는 독립적으로 1-100, 바람직하게는 1 내지 20의 정수이고; 바람직하게는 각 t는 독립적으로 1 내지 12; 더욱 바람직하게는 8 내지 12; 특히 8 또는 12의 정수이고;

m은 1 내지 3; 특히 1 또는 2의 임의의 정수임.

청구항 4

제 1 항 내지 제 3 항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 페이로드가, 제 1 항에 정의된 대로 화학식 (III)의 화합물에서 B 모이어티 또는 L^1 모이어티에 연결하기 위한 임의적 유도체화가 있는, 세포독소 또는 이의 단편이고;

바람직하게는, 상기 세포독소가 탁산, 메이탄시노이드, 아우리스타틴, 에포틸론, 콤브레타스타틴 A-4 포스페이트, 콤브레타스타틴 A-4 및 이들의 유도체, 인돌-술폰아미드, 빈블라스틴 예컨대 빈블라스틴, 빈크리스틴, 빈데신, 비노렐빈, 빈플루닌, 빈글리시네이트, 안히드로빈블라스틴, 돌라스타틴 10 및 유사체, 할리콘드린 B, 에리불린, 인돌-3-옥소아세트아미드, 포도필로톡신, 7-디에틸아미노-3-(2'-벤즈옥사졸릴)-쿠마린 (DBC), 디스코데르몰리드, 라울리말리드, 캄프토테신 및 이들의 유도체, 미톡산트론, 미토구아존, 질소 머스타드, 니트로소우레아즘, 아지리딘, 벤조도파, 카르보쿠온, 메투레데파, 우레데파, 다이네미신, 에스페라미신, 네오카르지노스타틴, 아클라시노마이신, 악티노마이신, 안트라마이신, 블레오마이신, 악티노마이신 C, 카라비신, 카르미노마이신, 카르디노필린, 카르미노마이신, 악티노마이신 D, 다우노루비신, 데토루비신, 아드리아마이신, 에피루비신, 에소루비신, 이다루비신, 마르셀로마이신, 미토마이신, 노갈라마이신, 올리보마이신, 페플로마이신, 포르피로마이신, 푸로마이신, 철 아드리아마이신, 로도루비신, 루포크로모마이신, 스트렙토조신, 지노스타틴, 조루비신, 트리코테센, T-2 독소, 베라쿠린 A, 바실록포린 A, 앙귀딘, 우베니멕스, 아자세린, 6-디아조-5-옥소-L-노르류신, 디메틸 엽산, 메토트렉세이트, 프테로프테린, 트리메트렉세이트, 에다트렉세이트, 플루다라빈, 6-머캅토퓨린, 티아미프린, 티오구아닌, 안시타빈, 젬시타빈, 에노시타빈, 아자시티딘, 6-아자우리딘, 카르모푸르, 시타라빈, 디데옥시우리딘, 독시플루리딘, 플록수리딘, 칼루스테론, 드로모스타놀론 프로피오네이트, 에피티오스타놀, 메피티오스탄, 테스토락톤, 아미노글루테티미드, 미토탄, 트릴로스탄, 플루타미드, 닐루타미드, 비칼루타미드, 류프로렐린 아세테이트, 단백질 키나제 억제제 및 프로테아솜 억제제로 이루어지는 군으로부터 선택되고/거나;

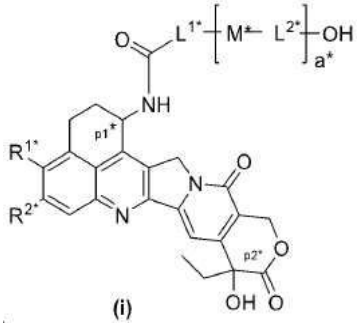
빈블라스틴, 콜히친, 탁산, 아우리스타틴, 메이탄시노이드, 칼리케아미신, 독소누비신, 듀오카르무신, SN-38, 크립토피신 유사체, 데룩스테칸, 듀오카마진, 칼리케아미신, 센타나마이신, 돌라스탄신, 피롤로벤조디아제핀, 엑사테칸 및 이들의 유도체로부터 선택되고/거나;

아우리스타틴, 특히 MMAE, MMAF 또는 MMAD로부터 선택되고/거나;

엑사테칸 및 이의 유도체, 예컨대 DX8951f로부터 선택되는, 접합체.

청구항 5

제 1 항 내지 제 4 항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 페이로드가 화학식 (i)의 구조를 갖는, 접합체:



(i)

식중,

a*는 0 또는 1이고;

p1* 및 p2*로 표시된 탄소 원자는 각각 비대칭 중심이고, 비대칭 중심은 *S* 구성, *R* 구성 또는 라세미이고;

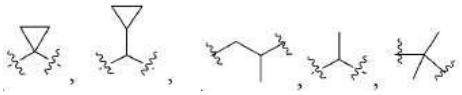
L^{1*}는, 비치환되거나 할로겐, -OH 및 $-NH_2$로부터 선택된 하나의 치환체로 치환되는, C_{1-6} 알킬렌으로부터 선택되고;

M*는 $-CH_2-$, -NH- 또는 -O-이고;

L^{2*}는 C_{1-3} 알킬렌이고;

R^{1*} 및 R^{2*}는 수소, C_{1-6} 알킬, 할로겐 및 C_{1-6} 알콕시로부터 각각 독립적으로 선택됨.

청구항 6

제 5 항에 있어서, L^{1*}가, 알킬렌 및 환식 알킬렌이 각각 독립적으로 비치환되거나 할로겐, -OH 및 $-NH_2$로부터 선택된 하나의 치환체로 치환되는, C_{1-6} 선형 알킬렌, C_{1-6} 분지형 알킬렌, C_{3-6} 환식 알킬렌 및 C_{3-4} 환식 알킬-C_{1-2} 선형 알킬렌 기로부터 선택되고; 바람직하게는, L^{1*}가, 알킬렌이 비치환되거나 할로겐, -OH 및 $-NH_2$로부터 선택된 하나의 치환체로 치환되는, C_{1-4} 알킬렌으로부터 선택되고; 더욱 바람직하게는, L^{1*}가, 각각 독립적으로 비치환되거나 할로겐, -OH 및 $-NH_2$로부터 선택된 적어도 하나의 치환체로 치환되는, $-CH_2-$, $-C_2H_4-$,  으로부터 선택되고; 가장 바람직하게는, L^{1*}가 $-CH_2-$,  및  으로부터 선택되고, 여기서 "#"은 카르보닐에 부착된 위치를 표시하는, 접합체.

청구항 7

제 5 항 또는 제 6 항에 있어서, a*가 0인, 접합체.

청구항 8

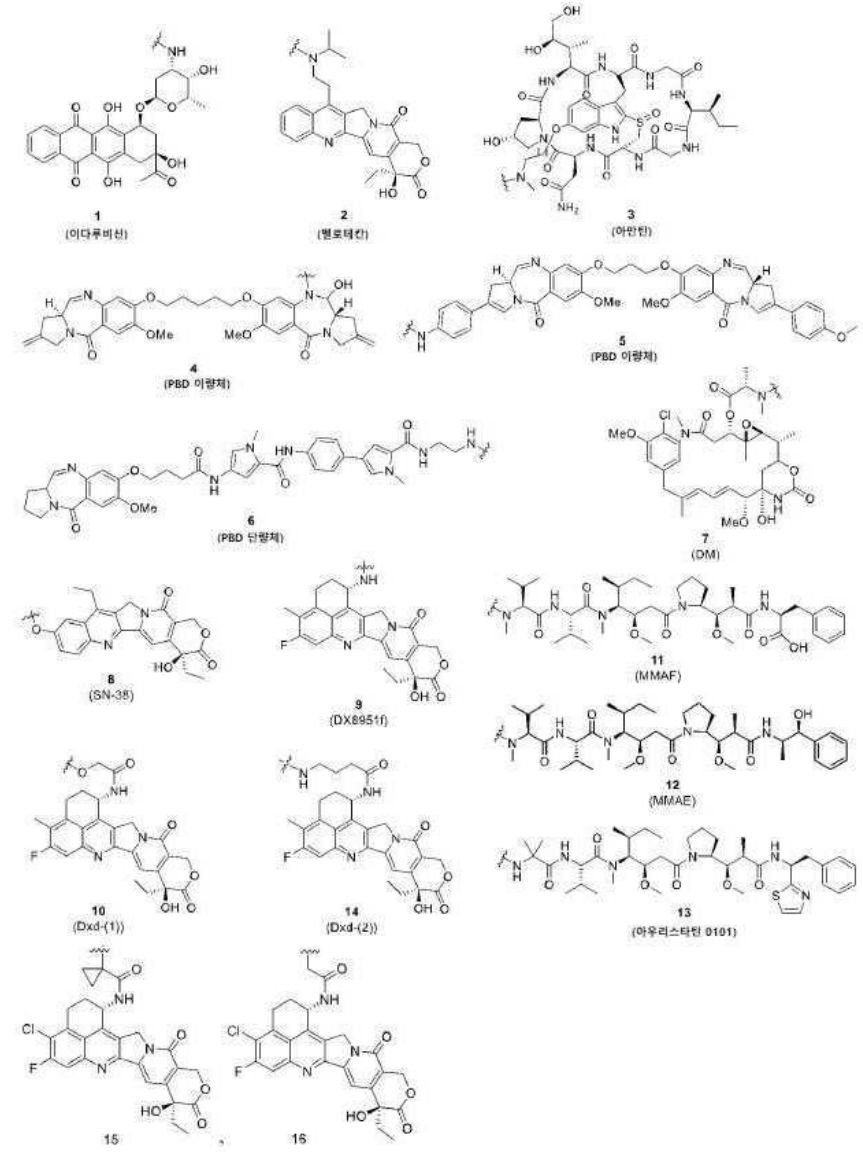
제 5 항 내지 제 7 항 중 어느 한 항에 있어서, R^{1*}가 C_{1-6} 알킬, 할로겐으로부터 선택되고; 바람직하게는 R^{1*}가 메틸 또는 Cl인, 접합체.

청구항 9

제 5 항 내지 제 8 항 중 어느 한 항에 있어서, R^{2*}가 C_{1-6} 알킬, 할로겐으로부터 선택되고; 바람직하게는, R^{2*}가 F인, 접합체.

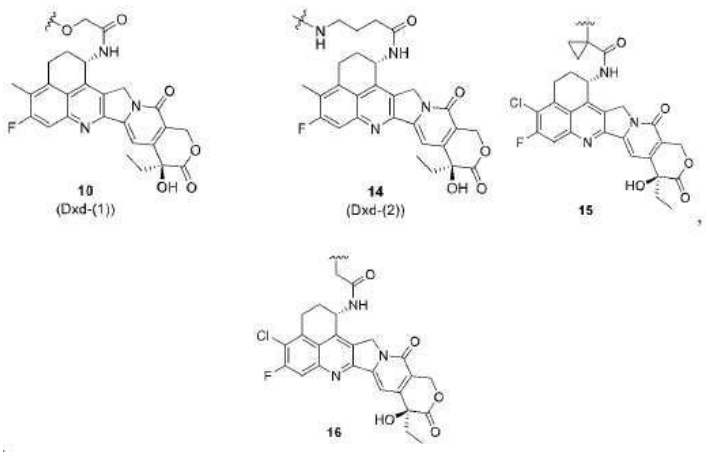
청구항 10

제 1 항 내지 제 3 항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 페이로드가



으로부터 선택되고;

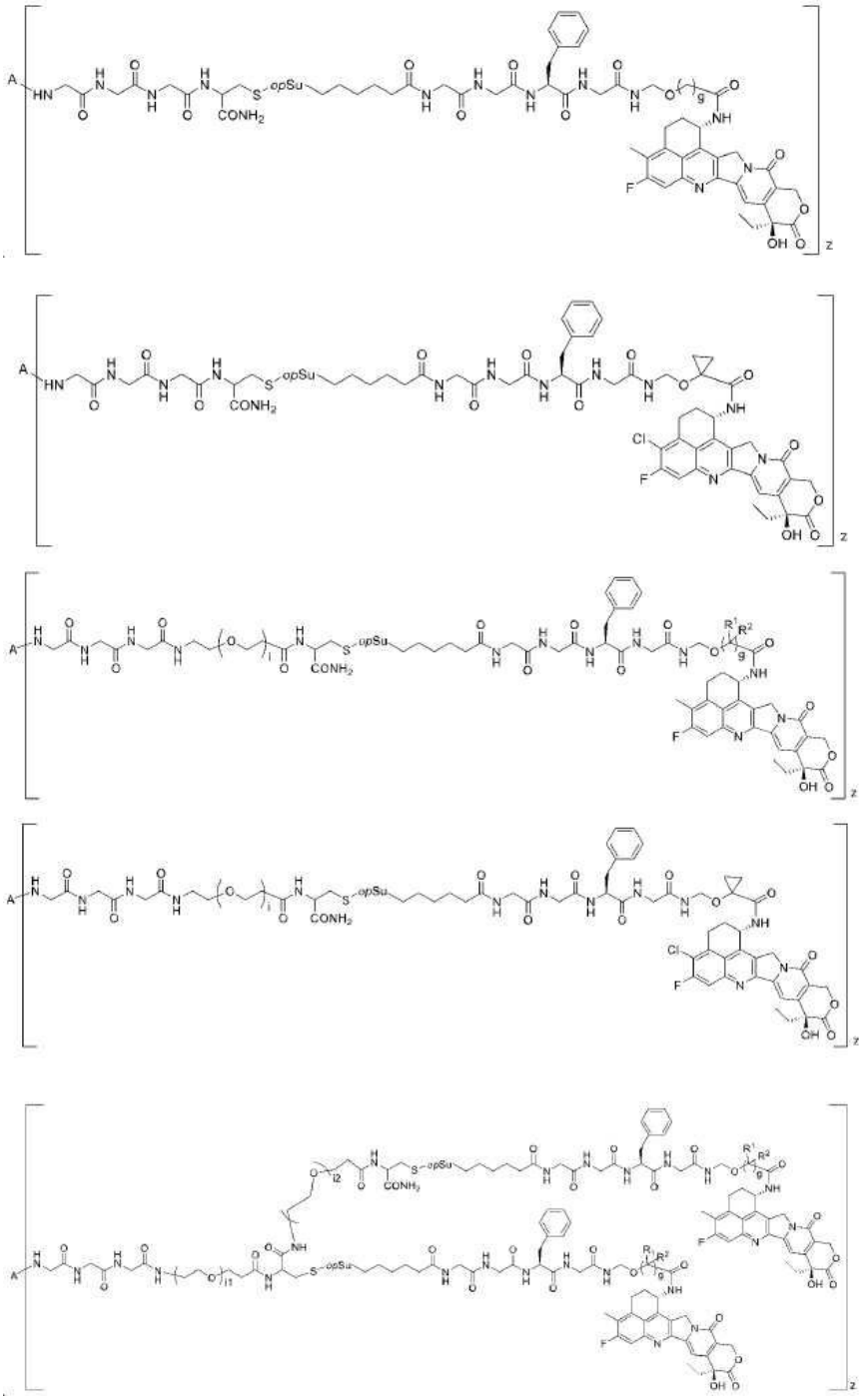
특히

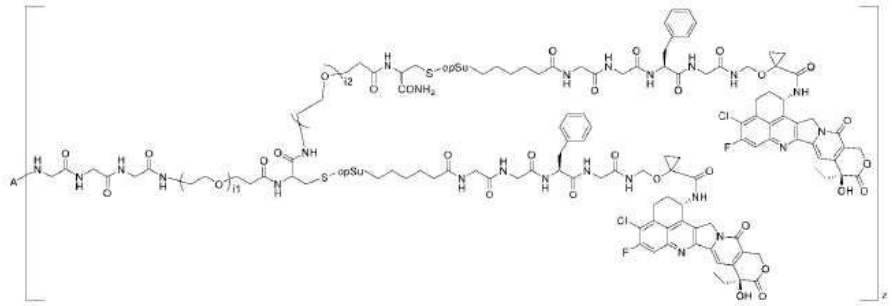


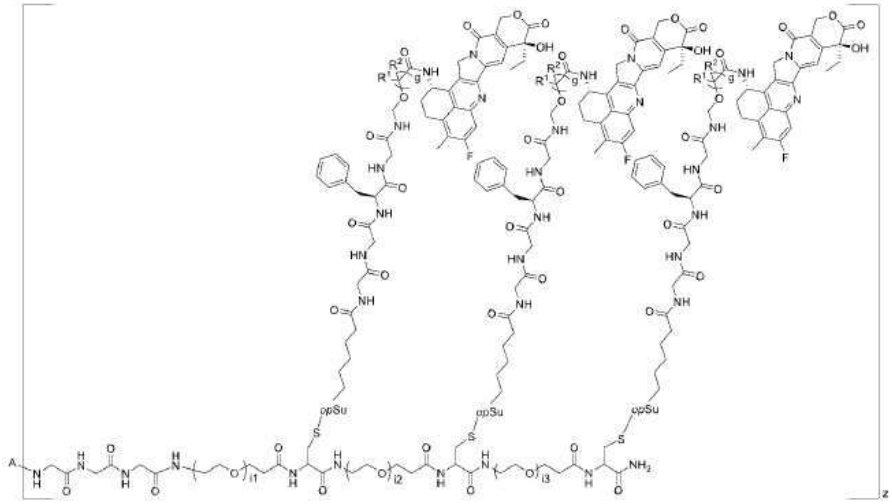
으로부터 선택되는, 접합체.

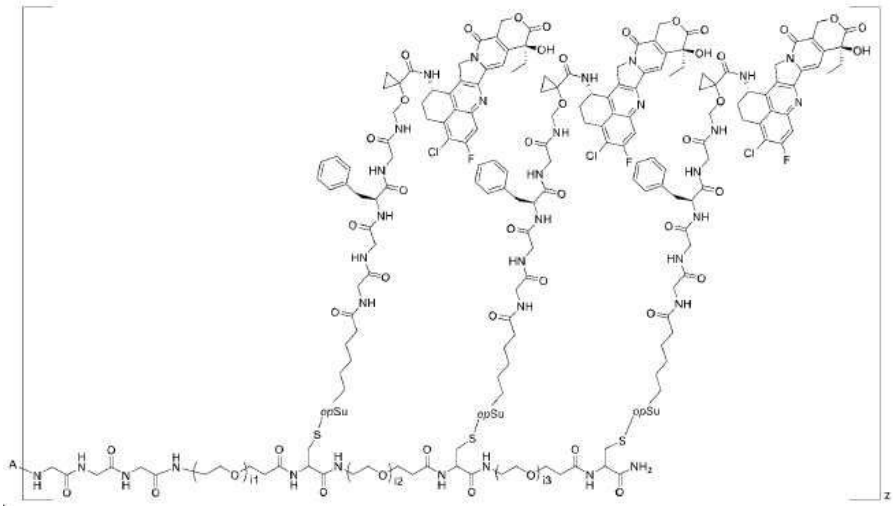
청구항 11

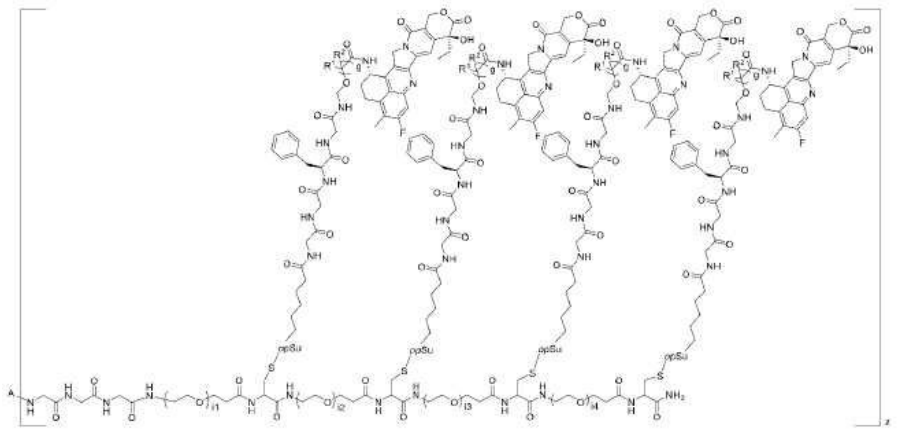
제 1 항 내지 제 3 항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 접합체가

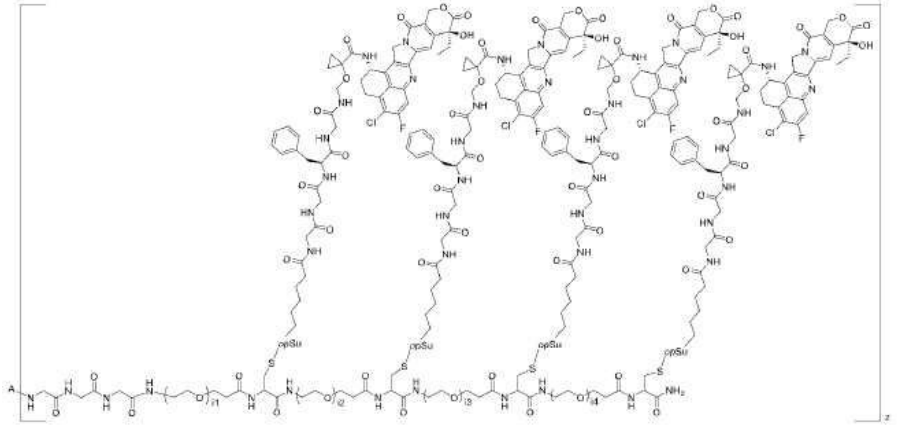


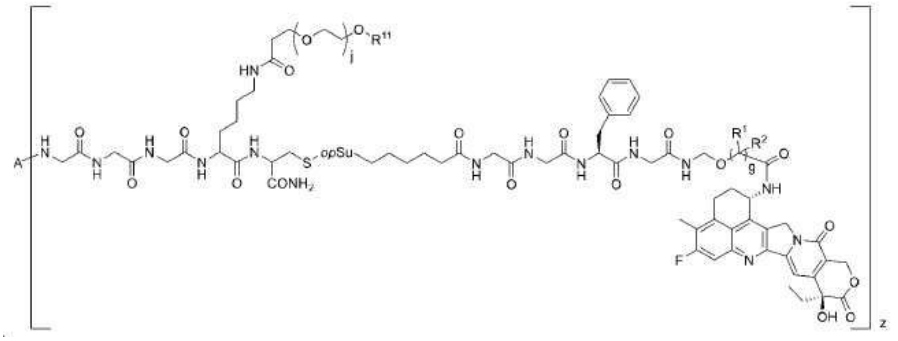


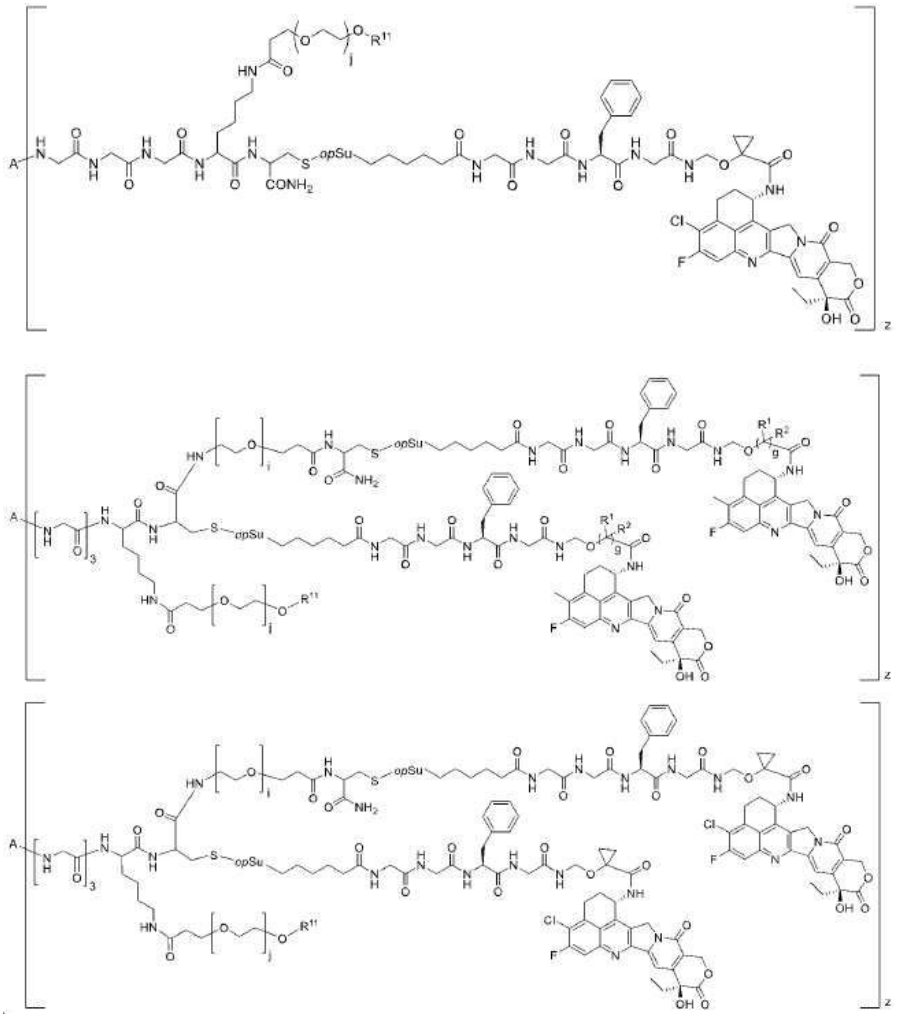


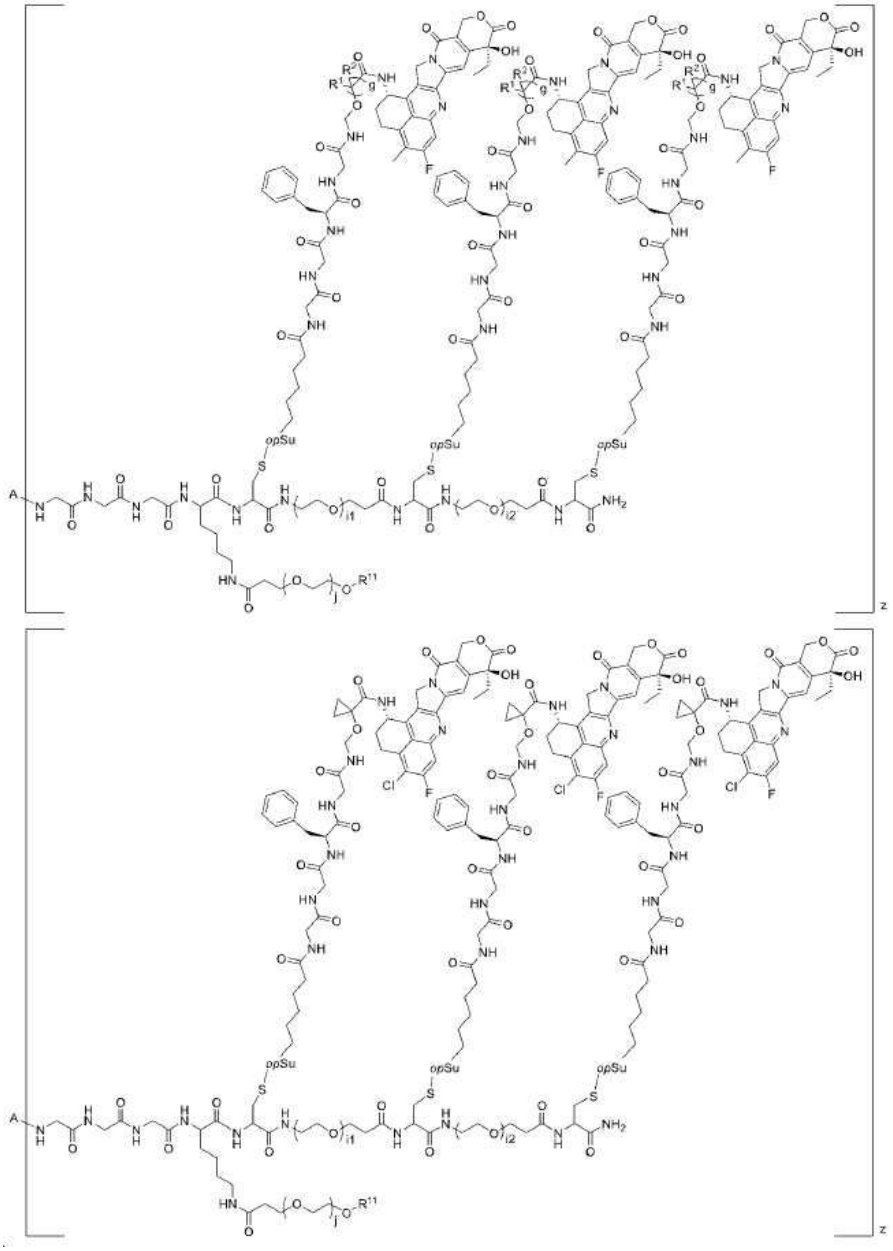


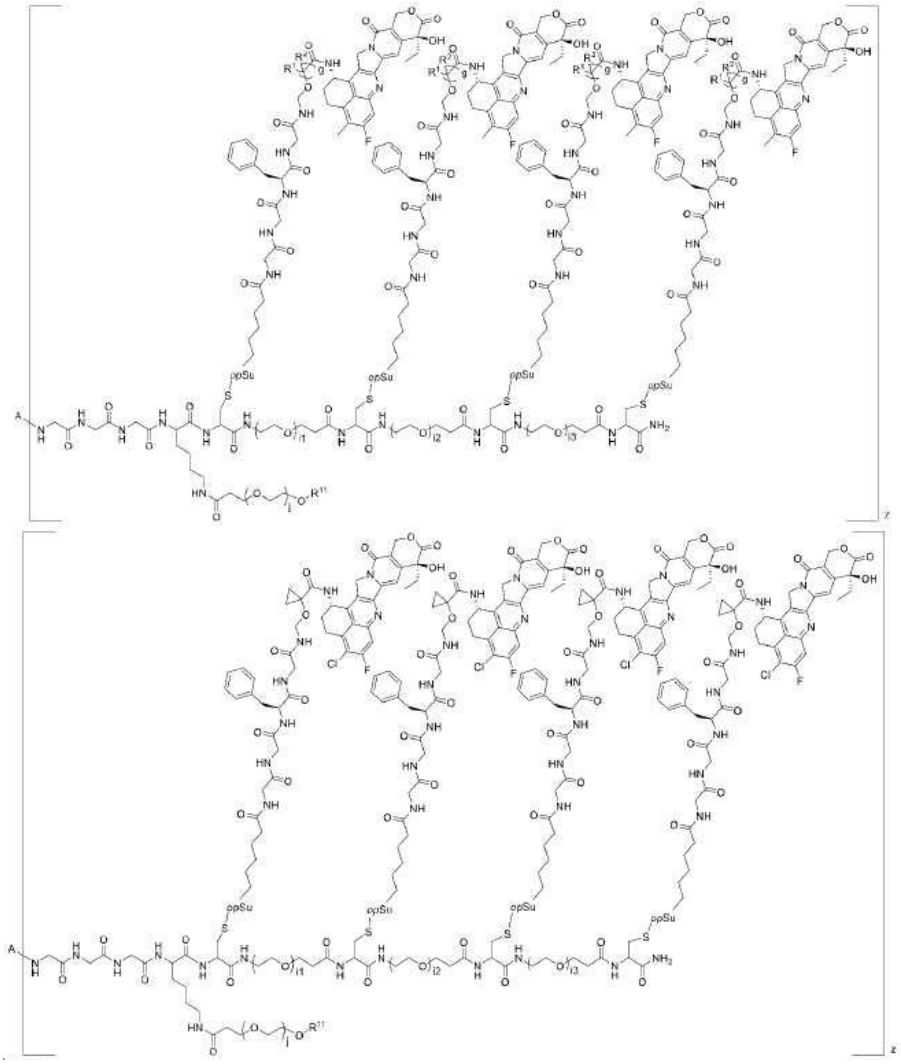


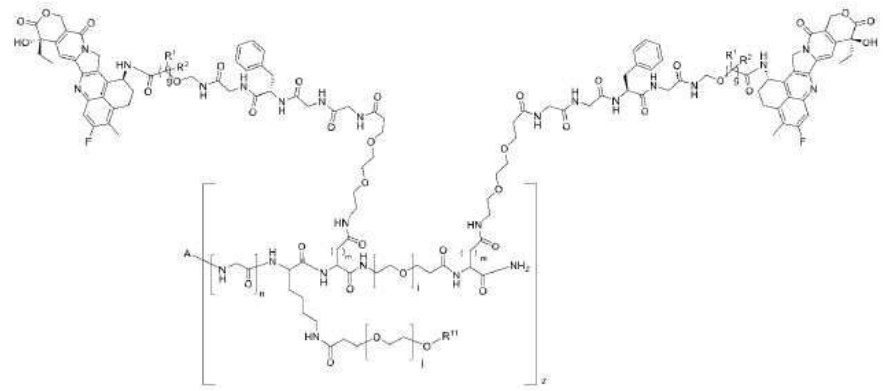


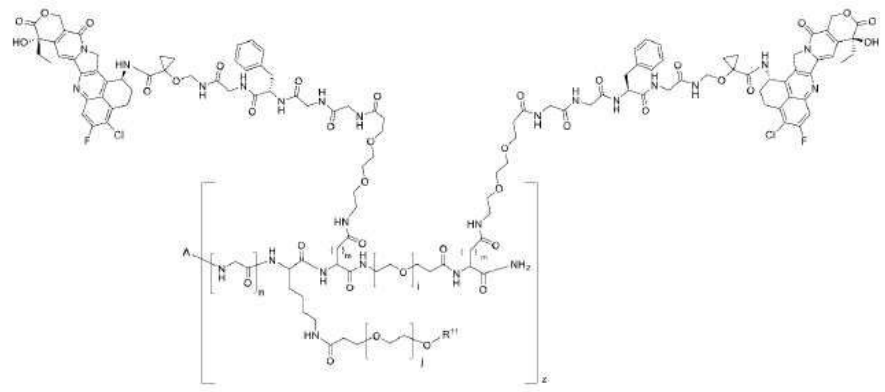


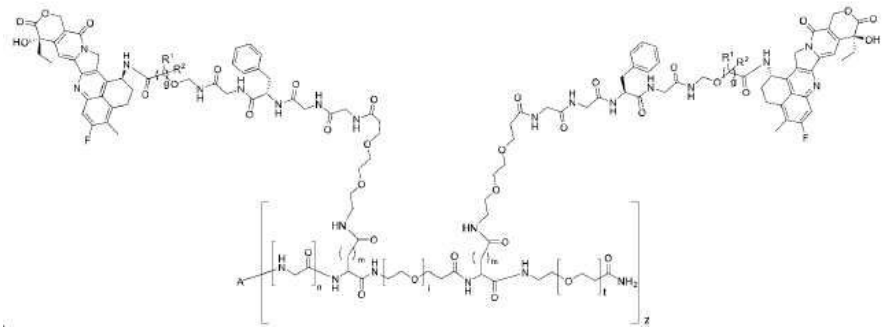


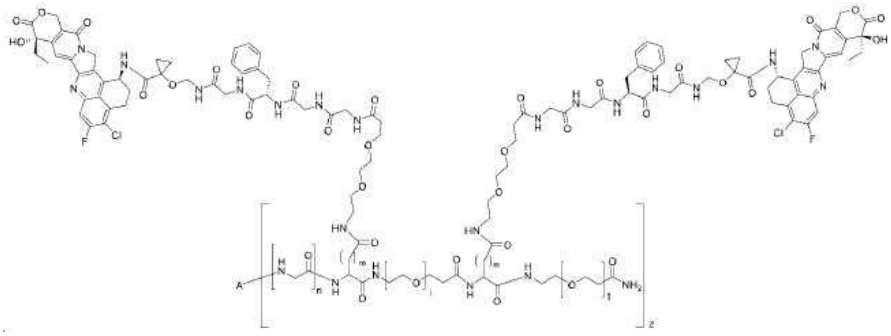












으로부터 선택되고;

각 g가 독립적으로 1 내지 6, 바람직하게는 1 내지 3; 더욱 바람직하게는 1의 정수이고;

각 R^1 및 R^2가 독립적으로 수소, 할로겐, $-C_{1-10}$ 알킬, $-C_{1-10}$ 할로알킬, C_{4-10} 시클로알킬렌으로부터 선택되거나; R^1 및 R^2가 이들이 부착되는 탄소 원자와 함께 3-6 원 시클로알킬 기를 형성하고; 바람직하게는 R^1 및 R^2가 수소이고;

각 t가 독립적으로 1-100, 바람직하게는 1 내지 20의 정수이고; 바람직하게는 각 t가 독립적으로 1 내지 12; 더욱 바람직하게는 8 내지 12; 특히 8 또는 12의 정수이고;

m이 1 내지 3; 특히 1 또는 2의 임의의 정수이고;

z가 1 내지 20; 특히 2 또는 4, 더욱 바람직하게는 2의 정수인, 접합체.

청구항 12

제 1 항에 있어서, 상기 항체 또는 이의 항원-결합 단편이 중쇄 가변 영역 (V_H) 및 경쇄 가변 영역 (V_L)을 포함하고,

V_H가

(i) X_1이 N, T 또는 A이고, X_2가 Y 또는 A이고, X_3이 N 또는 Q인, $X_1X_2GMX_3$ (서열번호: 1)의 아미노산 서열을 포함하는 HCDR1;

(ii) X_4가 Y, H 또는 D이고, X_5가 T 또는 S이고, X_6이 E 또는 V이고, X_7이 T 또는 K이고, X_8이 T 또는 A이고, X_9가 D 또는 E인, $WINTX_4X_5GX_6PX_7YX_8X_9DFKG$ (서열번호: 2)의 아미노산 서열을 포함하는 HCDR2;

(iii) X_{10}이 G 또는 S인, $X_{10}GFGSSYWYFDV$ (서열번호: 3)의 아미노산 서열을 포함하는 HCDR3

을 포함하고/거나;

V_L이

(i) KASQDVSIAVA (서열번호: 13) 또는 KASQDVSTAVA (서열번호:14)의 아미노산 서열을 포함하는 LCDR1;

(ii) SASYRYT (서열번호:15)의 아미노산 서열을 포함하는 LCDR2; 및

(iii) QQHYITPLT (서열번호: 16)의 아미노산 서열을 포함하는 LCDR3

을 포함하는, 접합체.

청구항 13

제 12 항에 있어서,

V_H가

(i) 서열번호: 4의 아미노산 서열을 포함하는 HCDR1,

(ii) 서열번호: 8의 아미노산 서열을 포함하는 HCDR2, 및

(iii) 서열번호: 11의 아미노산 서열을 포함하는 HCDR3

을 포함하고/거나;

V_L이

(i) 서열번호: 13의 아미노산 서열을 포함하는 LCDR1,

(ii) 서열번호: 15의 아미노산 서열을 포함하는 LCDR2, 및

(iii) 서열번호: 16의 아미노산 서열을 포함하는 LCDR3

을 포함하거나;

V_H가

(i) 서열번호: 5의 아미노산 서열을 포함하는 HCDR1,

(ii) 서열번호: 9의 아미노산 서열을 포함하는 HCDR2, 및

(iii) 서열번호: 12의 아미노산 서열을 포함하는 HCDR3

을 포함하고/거나;

V_L이

(i) 서열번호: 14의 아미노산 서열을 포함하는 LCDR1,

(ii) 서열번호: 15의 아미노산 서열을 포함하는 LCDR2, 및

(iii) 서열번호: 16의 아미노산 서열을 포함하는 LCDR3

을 포함하거나;

V_H가

(i) 서열번호: 4의 아미노산 서열을 포함하는 HCDR1,

(ii) 서열번호: 10의 아미노산 서열을 포함하는 HCDR2, 및

(iii) 서열번호: 11의 아미노산 서열을 포함하는 HCDR3

을 포함하고/거나;

V_L이

(i) 서열번호: 13의 아미노산 서열을 포함하는 LCDR1,

(ii) 서열번호: 15의 아미노산 서열을 포함하는 LCDR2, 및

(iii) 서열번호: 16의 아미노산 서열을 포함하는 LCDR3

을 포함하거나;

V_H가

(i) 서열번호: 7의 아미노산 서열을 포함하는 HCDR1,

(ii) 서열번호: 10의 아미노산 서열을 포함하는 HCDR2, 및

(iii) 서열번호: 11의 아미노산 서열을 포함하는 HCDR3

을 포함하고/거나;

V_L이

(i) 서열번호: 13의 아미노산 서열을 포함하는 LCDR1,

(ii) 서열번호: 15의 아미노산 서열을 포함하는 LCDR2, 및

(iii) 서열번호: 16의 아미노산 서열을 포함하는 LCDR3

을 포함하거나;

V_H가

(i) 서열번호: 6의 아미노산 서열을 포함하는 HCDR1,

(ii) 서열번호: 8의 아미노산 서열을 포함하는 HCDR2, 및

(iii) 서열번호: 11의 아미노산 서열을 포함하는 HCDR3

을 포함하고/거나;

V_L이

(i) 서열번호: 13의 아미노산 서열을 포함하는 LCDR1,

(ii) 서열번호: 15의 아미노산 서열을 포함하는 LCDR2, 및

(iii) 서열번호: 16의 아미노산 서열을 포함하는 LCDR3

을 포함하는, 접합체.

청구항 14

제 12 항 또는 제 13 항에 있어서, 상기 V_H가 서열번호: 21 내지 25의 아미노산 서열과 적어도 약 90% 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하고/거나,

상기 V_L이 서열번호: 26 또는 서열번호: 27의 아미노산 서열과 적어도 약 90% 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하는, 접합체.

청구항 15

제 12 항 내지 제 14 항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 항체 또는 항원-결합 단편이 서열번호: 28의 아미노산 서열과 적어도 약 90% 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하는 중 불변 도메인 (CH); 및/또는

서열번호: 29의 아미노산 서열과 적어도 약 90% 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하는 경 불변 도메인을 포함하는, 접합체.

청구항 16

제 12 항 내지 제 15 항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 항체 또는 항원-결합 단편이 약 0.5 nM 내지 약 20 nM의 평형 해리 상수 (K_D)로 TROP2에 결합하는, 접합체.

청구항 17

제 12 항에 있어서, 상기 항체 또는 항원-결합 단편이 서열번호: 30 내지 33의 아미노산 서열과 적어도 약 90% 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하는 중쇄, 및/또는 서열번호: 34 또는 서열번호: 35의 아미노산 서열과 적어도 약 90% 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하는 경쇄를 포함하는, 접합체.

청구항 18

제 17 항에 있어서, 상기 항체 또는 항원-결합 단편이 중쇄의 C-말단 변형 및/또는 경쇄의 C-말단 변형을 포함하고, 이로써 리가제 공여체 기질의 항체, Sp 및 인식 서열이 순차적으로 결합되게 하고; Sp가 GA, GGGGS, GGGGSGGGGS 및 GGGGSGGGGSGGGGS로부터 선택된 스페이서 서열이고; 리가제 공여체 기질의 인식 서열이 LPXTGJ이고, 여기서 X는 천연이거나 비천연인 임의의 단일 아미노산일 수 있고; J는 부재하거나, 1-10개 아미노산을 포함하는 아미노산 단편인, 접합체.

청구항 19

제 18 항에 있어서, 변형된 항체 또는 이의 항원-결합 단편이 서열번호: 30 내지 33의 중쇄, 및/또는 서열번호: 40 또는 서열번호: 41의 경쇄를 포함하거나;

상기 변형된 항체 또는 이의 항원-결합 단편이 서열번호: 36 내지 39의 중쇄, 및/또는 서열번호: 34 또는 서열번호: 35의 경쇄를 포함하는, 접합체.

청구항 20

제 1 항에 있어서, 상기 접합체가 1 내지 19의 정수 또는 비-정수의 약물 대 항체 비 (DAR)를 갖는, 접합체.

청구항 21

중쇄 가변 영역 (V_H) 및 경쇄 가변 영역 (V_L)을 포함하는 항-TROP2 항체 또는 이의 항원-결합 단편으로서,

V_H가

(i) X_1이 N 또는 A인, X_1AGMN의 아미노산 서열을 포함하는 HCDR1;

(ii) WINTDSGEPTYTDDFKG (서열번호:10) 또는 WINTYTGEPTYTDDFKG (서열번호: 8)의 아미노산 서열을 포함하는 HCDR2;

(iii) GGFGSSYWYFDV (서열번호: 11)의 아미노산 서열을 포함하는 HCDR3

을 포함하고/거나;

V_L이

(i) KASQDVSIAVA (서열번호:13)의 아미노산 서열을 포함하는 LCDR1

(ii) SASYRYT (서열번호:15)의 아미노산 서열을 포함하는 LCDR2;

(iii) QQHYITPLT (서열번호: 16)의 아미노산 서열을 포함하는 LCDR3

을 포함하는, 항-TROP2 항체 또는 이의 항원-결합 단편.

청구항 22

제 21 항에 있어서, 상기 V_H가 서열번호: 23 또는 서열번호: 24의 아미노산 서열과 적어도 약 90% 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하고/거나;

상기 V_L이 서열번호: 26 또는 서열번호: 27의 아미노산 서열과 적어도 약 90% 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하는, 항체 또는 항원-결합 단편.

청구항 23

제 21 항에 있어서, 상기 항체 또는 항원-결합 단편이 서열번호: 28의 아미노산 서열과 적어도 약 90% 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하는 중 불변 도메인 (CH); 및/또는

서열번호: 29의 아미노산 서열과 적어도 약 90% 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하는 경 불변 도메인을 포함하는, 항체 또는 항원-결합 단편.

청구항 24

제 21 항에 있어서, 상기 항체 또는 항원-결합 단편이 약 0.5 nM 내지 약 20 nM의 평형 해리 상수 (K_D)로 TROP2에 결합하는, 항체 또는 항원-결합 단편.

청구항 25

제 21 항에 있어서, 상기 항체 또는 항원-결합 단편이 서열번호: 31 또는 서열번호: 32의 아미노산 서열과 적어도 약 90% 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하는 중쇄, 및/또는 서열번호: 34 또는 서열번호: 35의 아미노산 서열과 적어도 약 90% 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하는 경쇄를 포함하는, 항체 또는 항원-결합 단편.

청구항 26

제 21 항 내지 제 25 항 중 어느 한 항의 항체 또는 항원-결합 단편을 인코딩하는 핵산 서열을 포함하는, 폴리뉴클레오티드 또는 벡터.

청구항 27

제 26 항의 폴리뉴클레오티드 또는 벡터를 포함하는, 숙주 세포.

청구항 28

제 1 항 내지 제 20 항 중 어느 한 항의 예방적으로 또는 치료적으로 유효량의 접합체, 제 21 항 내지 제 25 항 중 어느 한 항의 항체 또는 항원-결합 단편, 제 26 항의 폴리뉴클레오티드 또는 벡터, 또는 제 27 항의 숙주 세포; 및 적어도 하나의 약학적으로 허용가능한 담체를 포함하는, 약학적 조성물.

청구항 29

질환을 치료하기 위한 약제의 제조에서 제 1 항 내지 제 20 항 중 어느 한 항의 접합체, 제 21 항 내지 제 25 항 중 어느 한 항의 항체 또는 항원-결합 단편, 또는 제 28 항의 약학적 조성물의 용도로서; 상기 질환이

TROP2-연관된 종양인, 용도.

청구항 30

제 29 항에 있어서, 상기 TROP2-연관된 종양이 TROP2를 과발현하는 종양 또는 TROP2 유전자 돌연변이가 있는 종양을 포함하는, 용도.

청구항 31

제 29 항에 있어서, 상기 종양이 유방암, 위암, 폐암, 난소암, 및 요로상피암을 포함하는, 용도.

청구항 32

제 1 항 내지 제 20 항 중 어느 한 항의 접합체, 제 21 항 내지 제 25 항 중 어느 한 항의 항체 또는 항원-결합 단편, 또는 제 28 항의 약학적 조성물을 투여하는 것을 포함하는, 질환 진행을 예방하거나 질환을 앓고 있는 대상체를 치료하는 방법으로서; 상기 질환이 종양인, 방법.

청구항 33

제 21 항 내지 제 25 항 중 어느 한 항의 항체를 포함하는, 항체 약물 접합체.

청구항 34

제 21 항 내지 제 25 항 중 어느 한 항의 항체 또는 이의 항원-결합 단편을 생산하는 방법으로서,

(i) 항체 또는 이의 항원-결합 단편의 발현에 적합한 조건 하에서 제 27 항의 숙주 세포를 배양하는 것, 및

(ii) 숙주 세포 또는 이의 세포 배양물로부터 항체 또는 이의 항원-결합 단편을 회수하는 것을 포함하는, 방법.

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 본 개시내용은 생물약학 분야, 특히, 표적화 분자-약물 접합체를 제조하기 위한 항체, 페이로드 및 링커, 그리고 이의 상응하는 접합체, 제조 과정 및 용도에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0002] TROP2는 막관통 단백질이고, 표적화된 요법의 개발을 위한 천연 후보로 만드는, 자궁내막암, 전립선암, 췌장암, 결장암, 위암, 구강암, 신경교종을 포함하는, 여러 암 유형에서 과발현되는 것으로 밝혀졌다. TROP2는 세포성 자가-재생, 증식 및 형질전환에서 조절자로서 역할을 한다. 실험은 TROP2가 종양 성장을 촉진시킬 수 있고, TROP2 유전자가 녹아웃되는 때 종양 세포 증식이 방해되는 것을 보여주었다. TROP2의 제한된 조직 발현은, 표적화 TROP2 요법의 이점이기도 하는, 치료의 독성을 감소시킨다. ADC를 표적화하는 여러 TROP2, 예컨대 DS-1062, TRODELVY, BAT8003이 제안되었다. 이들 치료적 제제는 TROP2 양성 암 환자의 생존을 크게 개선하였다.

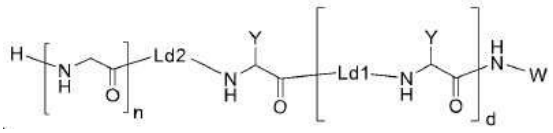
[0003] DS-1062는 Daiichi Sankyo에 의해 이의 소유 DXd ADC 기술을 사용하여 개발된 항체-접합된 약물이다. DXd에 결합된 Trop2 단백질을 표적화하는 단클론성 항체로 구성된다. 더 많은 NSCLC 환자를 포함하는, 데이터는 DS-1062가 양호한 용량-의존적 항암 활성을 나타냄을 보여준다. 용량이 증가됨에 따라, 더 많은 NSCLC 환자의 종양이 줄어든다. TRODELVY는 재발성 또는 난치성 전이성 TNBC에 특히 최초 FDA-승인된 ADC이고 최초 FDA-승인된 항-TROP2 ADC이다. 화학치료적 약물 이리노테칸의 활성 대사산물인, SN-38에 결합된 TROP2를 표적화하는 항체로 이루어진다.

[0004] 하지만, TROP2를 표적화하는 새로운 ADC 약물은 여전히 큰 수요가 있고 고-안전성 ADC는 새로운 약물의 개발 방향들 중 또한 하나이다.

발명의 내용

[0005] **요약**

[0006] 제1 양태에서, 화학식 (I)의 화합물이 제공된다:

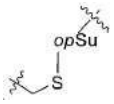
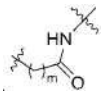
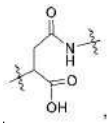
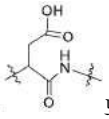
[0007]  화학식 (I)

[0008] 식중,

[0009] W는 수소, LKb 또는 $-C_2H_4-(PEG)_t-(CO)NH_2$이고;

[0010] Y는 수소이거나 LKa-LKb이고;

[0011] 다만 W 및 Y는 동시에 수소가 아니고;

[0012] 각 LKa는  및  으로부터 독립적으로 선택되고; *op*Su는 ,  또는 이의 혼합물이고;

[0013] 각 LKb는 독립적으로 L^2-L^1-B이고;

[0014] 각 B는 독립적으로 말단 기 R^{10}, 또는 하기 1), 2) 및 3)의 조합이고: 1) 자가-희생 스페이서 Sp1; 2) 결합, 또는 $-CR^1R^2-$, C_{1-10} 알킬렌, C_{4-10} 시클로알킬렌, C_{4-10} 헤테로시클릴렌 및 -(CO)-로부터 선택된 2가 기 중 하나 또는 이들 중 둘 이상의 조합; 및 3) 말단 기 R^{10};

[0015] R^{10}은 수소, 또는 페이로드에서 한 기와 반응하는 때 이탈할 수 있는 기이고;

[0016] L^1은 효소에 의해 절단될 수 있는 아미노산 서열을 포함하는 절단가능한 서열 1이고, 절단가능한 서열 1은 1-10개 아미노산을 포함하고;

[0017] L^2는 결합; 또는 알킬렌에서 하나 이상의 $-CH_2-$ 구조가 $-CR^3R^4-$, -O-, -(CO)-, $-S(=O)_2-$, $-NR^5-$, $-N^{\oplus}R^6R^7-$, C_{4-10} 시클로알킬렌, C_{4-10} 헤테로시클릴렌, 페닐렌에 의해 임의로 대체되는 C_{2-20} 알킬렌이고; 여기서 시클로알킬렌, 헤테로시클릴렌 및 페닐렌은 각각 독립적으로 비치환되거나 할로겐, $-C_{1-10}$ 알킬, $-C_{1-10}$ 할로알킬, $-C_{1-10}$ 알킬렌-NHR^8 및 $-C_{1-10}$ 알킬렌-OR^9로부터 선택된 적어도 하나의 치환체로 치환되고;

[0018] Ld2 및 각 Ld1은 독립적으로 결합이거나; $-NH-C_{1-20}$ 알킬렌-(CO)-, -NH-$(PEG)_i$-(CO)-로부터 선택되거나, 독립적으로 비치환되거나 측쇄에서 $-(PEG)_j-R^{11}$로 치환된 2-10의 중합도를 갖는 천연 아미노산 또는 올리고머성 천연 아미노산이고;

[0019] $-(PEG)_t-$, $-(PEG)_i-$ 및 $-(PEG)_j-$는, 한쪽 말단에 임의적 추가의 C_{1-10} 알킬렌이 있는, 표시된 수의 연속적 $-(O-C_2H_4)-$ 구조 단위 또는 연속적 $-(C_2H_4-O)-$ 구조 단위를 포함하는, 각 PEG 단편이고;

[0020] R^1, R^2, R^3, R^4, R^5, R^6, R^7, R^8, R^9는 수소, 할로겐, $-C_{1-10}$ 알킬, $-C_{1-10}$ 할로알킬, C_{4-10} 시클로알킬렌으로부터 각각 독립적으로 선택되거나;

[0021] R^1 및 R^2는 이들이 부착되는 탄소 원자와 함께 3-6 원 시클로알킬 기를 형성하거나;

[0022] R^3 및 R^4는 이들이 부착되는 탄소 원자와 함께 3-6 원 시클로알킬 기를 형성하고;

[0023] R^{11}은 C_{1-10} 알킬이고;

[0024] m은 1 내지 3의 임의의 정수이고;

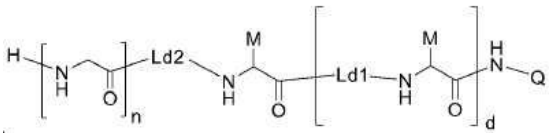
[0025] n은 2 내지 20의 임의의 정수이고;

[0026] d는 0이거나, 1 내지 6의 임의의 정수이고; 각 i는 독립적으로 0-100, 바람직하게는 0 내지 20의 정수이고; 바람직하게는 각 i는 독립적으로 0 내지 12; 더욱 바람직하게는 0 내지 8; 특히 4의 정수이고;

[0027] 각 j는 독립적으로 1-100, 바람직하게는 1 내지 20의 정수이고; 바람직하게는 각 j는 독립적으로 1 내지 12; 더욱 바람직하게는 8 내지 12; 특히 8 또는 12의 정수이고;

[0028] 각 t는 독립적으로 1-100, 바람직하게는 1 내지 20의 정수이고; 바람직하게는 각 t는 독립적으로 1 내지 12; 더욱 바람직하게는 8 내지 12; 특히 8 또는 12의 정수임.

[0029] 제2 양태에서, 화학식 (II)의 구조를 갖는 화합물이 제공된다

[0030]  화학식 (II)

[0031] 식중

[0032] Q는 수소, $-C_2H_4-(PEG)_t-(CO)NH_2$ 또는 LKb-P이고;

[0033] M은 수소 또는 LKa-LKb-P이고;

[0034] 다만 Q 및 M은 동시에 수소가 아니고;

[0035] P는 화학식 (I)의 화합물의 B 모이어티 또는 L^1 모이어티에 결합되는 페이로드이고;

[0036] n, d, Ld1, Ld2, t, LKa 및 LKb는 화학식 (I)에 정의된 바와 같고;

[0037] 바람직하게는, M은 수소 또는 LKa-L^2-L^1-B-P이고; 여기서 각 B는 독립적으로 부재하거나, 하기 1) 및 2)의 조합이고: 1) 자가-희생 스페이서 Sp1; 및 2) 결합, 또는 $-CR^1R^2-$, C_{1-10} 알킬렌, C_{4-10} 시클로알킬렌, C_{4-10} 헤테로시클릴렌 및 -(CO)-로부터 선택된 2가 기 중 하나 또는 이들 중 둘 이상의 조합이고;

[0038] 바람직하게는, Sp1은 PABC, 아세탈, 헤테로아세탈 및 이들의 조합으로부터 선택되고; 더욱 바람직하게는, Sp1은 아세탈, 헤테로아세탈 또는 PABC이고; 추가로 바람직하게는, 헤테로아세탈은 N,O-헤테로아세탈로부터 선택되고; 더욱 바람직하게는, Sp1은 $-O-CH_2-U-$ 또는 $-NH-CH_2-U-$이고; 여기서 -O- 또는 -NH-는 절단가능한 서열 1에 연결되고, U는 부재하거나, O, S 또는 NH, 바람직하게는 O 또는 S임.

[0039] 제3 양태에서, 중쇄 가변 영역 (V_H) 및 경쇄 가변 영역 (V_L)을 포함하는 항-TROP2 항체 또는 이의 항원-결합 단편이 제공되고, 여기서

[0040] V_H는

[0041] (i) X_1이 N 또는 A인, S X_1AGMN의 아미노산 서열을 포함하는 HCDR1;

[0042] (ii) WINTDSGEPTYTDDFKG (서열번호: 10) 또는 WINTYTGEPTYTDDFKG (서열번호: 8)의 아미노산 서열을 포함하는 HCDR2; 및

[0043] (iii) GGFGSSYWYFDV (서열번호: 11)의 아미노산 서열을 포함하는 HCDR3

[0044] 을 포함하고/거나;

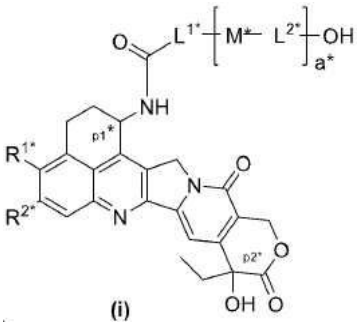
[0045] V_L은

[0046] (i) KASQDVSIAVA (서열번호:13) 또는 KASQDVSTAVA (서열번호:14)의 아미노산 서열을 포함하는 LCDR1;

[0047] (ii) SASYRYT (서열번호:15)의 아미노산 서열을 포함하는 LCDR2; 및

[0048] (iii) QQHYITPLT (서열번호: 16)의 아미노산 서열을 포함하는 LCDR3을 포함한다.

[0049] 제4 양태에서, 화학식 (i)의 구조를 갖는 세포독소가 제공된다:

[0050] 

[0051] 식중,

[0052] a*는 0 또는 1이고;

[0053] p1* 및 p2*로 표시된 탄소 원자는 각각 비대칭 중심이고, 비대칭 중심은 *S* 구성, *R* 구성 또는 라세미이고;

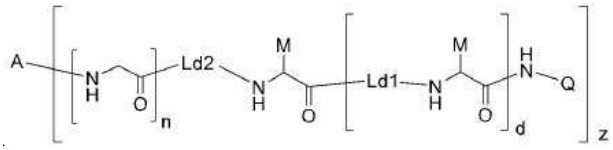
[0054] L^{1*}는, 비치환되거나 할로겐, -OH 및 $-NH_2$로부터 선택된 하나의 치환체로 치환되는, C_{1-6} 알킬렌으로부터 선택되고;

[0055] M*는 $-CH_2-$, -NH- 또는 -O-이고;

[0056] L^{2*}는 C_{1-3} 알킬렌이고;

[0057] R^{1*} 및 R^{2*}는 각각 독립적으로 수소, C_{1-6} 알킬, 할로겐 및 C_{1-6} 알콕시로부터 선택됨.

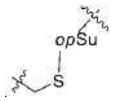
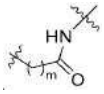
[0058] 제5 양태에서, 화학식 (III)의 구조를 갖는 접합체가 제공된다:

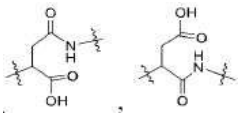
[0059]  화학식 (III)

[0060] 식중,

[0061] Q는 수소, $-C_2H_4-(PEG)_t-(CO)NH_2$ 또는 LKb-P이고;

[0062] M은 수소 또는 LKa-LKb-P이고;

[0063] 각 LKa는  및  으로부터 독립적으로 선택되고;

[0064] *op*Su는  또는 이의 혼합물이고;

[0065] 각 LKb는 독립적으로 L^2-L^1-B이고;

[0066] m, n, d, Ld1, Ld2, t, LKa 및 LKb는 화학식 (I)에 정의된 바와 같고;

[0067] 각 B는 독립적으로 부재하거나, 하기 1) 및 2)의 조합이고: 1) 자가-희생 스페이서 Sp1; 및 2) 결합, 또는 $-CR^1R^2-$, C_{1-10} 알킬렌, C_{4-10} 시클로알킬렌, C_{4-10} 헤테로시클릴렌 및 -(CO)-로부터 선택된 2가 기 중 하나 또는 이들 중 둘 이상의 조합; 바람직하게는, B는 $-NH-CH_2-U-$이거나, 부재하거나, $-NH-CH_2-U-(CR^1R^2)_g-(CO)-$ 또는 NH-

CH_2-U-$(CH_2)_g$-(CO)-이고;

[0068] 다만 Q 및 M은 동시에 수소가 아니고;

[0069] P는 화학식 (I)의 화합물의 B 모이어티 또는 L^1 모이어티에 결합되는 페이로드이고;

[0070] 각 L^1은 효소에 의해 절단될 수 있는 아미노산 서열을 포함하는 독립적으로 절단가능한 서열 1이고, 절단가능한 서열 1은 1-10개 아미노산을 포함하고;

[0071] 각 L^2는 독립적으로 결합; 또는 알킬렌에서 하나 이상의 $-CH_2-$ 구조가 $-CR^3R^4-$, -O-, -(CO)-, $-S(=O)_2-$, $-NR^5-$, $-N^{\oplus}R^6R^7-$, C_{4-10} 시클로알킬렌, C_{4-10} 헤테로시클릴렌, 페닐렌에 의해 임의로 대체되는 C_{2-20} 알킬렌이고; 여기서 시클로알킬렌, 헤테로시클릴렌 및 페닐렌은 각각 독립적으로 비치환되거나 할로겐, $-C_{1-10}$ 알킬, $-C_{1-10}$ 할로알킬, $-C_{1-10}$ 알킬렌-NH-R^8 및 $-C_{1-10}$ 알킬렌-O-R^9로부터 선택된 적어도 하나의 치환체로 치환되고;

[0072] $-(PEG)_t-$, $-(PEG)_i-$ 및 $-(PEG)_j-$는, 한쪽 말단에 임의적 추가의 C_{1-10} 알킬렌이 있는, 표시된 수의 연속적 $-(O-C_2H_4)-$ 구조 단위 또는 연속적 $-(C_2H_4-O)-$ 구조 단위를 포함하는, 각 PEG 단편이고;

[0073] R^1, R^2, R^3, R^4, R^5, R^6, R^7, R^8, R^9는 수소, 할로겐, $-C_{1-10}$ 알킬, $-C_{1-10}$ 할로알킬, C_{4-10} 시클로알킬렌으로부터 각각 독립적으로 선택되거나;

[0074] R^1 및 R^2는 이들이 부착되는 탄소 원자와 함께 3-6 원 시클로알킬 기를 형성하거나;

[0075] R^3 및 R^4는 이들이 부착되는 탄소 원자와 함께 3-6 원 시클로알킬 기를 형성하고;

[0076] 각 i는 독립적으로 0-100, 바람직하게는 0 내지 20의 정수이고; 바람직하게는 각 i는 독립적으로 0 내지 12; 더욱 바람직하게는 0 내지 8; 특히 4의 정수이고;

[0077] 각 j는 독립적으로 1-100, 바람직하게는 1 내지 20의 정수이고; 바람직하게는 각 j는 독립적으로 1 내지 12; 더욱 바람직하게는 8 내지 12; 특히 8 또는 12의 정수이고;

[0078] 각 t는 독립적으로 1-100, 바람직하게는 1 내지 20의 정수이고; 바람직하게는 각 t는 독립적으로 1 내지 12; 더욱 바람직하게는 8 내지 12; 특히 8 또는 12의 정수이고;

[0079] 각 g는 독립적으로 1-10, 예를 들어, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7의 정수이고;

[0080] A는 화학식 (I)의 화합물의 G_n 모이어티에 결합되는 항-TROP2 항체 또는 이의 항원-결합 단편이고; G는 글리신이고;

[0081] z는 1 내지 20의 정수임.

[0082] 제6 양태에서, 질환을 예방하거나 치료하기 위한 약제의 제조에서 항-TROP2 항체 또는 이의 항원-결합 단편 또는 약학적 조성물의 용도가 제공되고; 여기서 질환은 종양이다.

[0083] 제7 양태에서, 항체 또는 이의 항원-결합 단편을 인코딩하는 폴리뉴클레오티드가 제공된다.

[0084] 제8 양태에서, 폴리뉴클레오티드를 포함하는 벡터가 제공된다.

[0085] 제9 양태에서, 폴리뉴클레오티드 또는 벡터를 포함하는 숙주 세포가 제공된다.

[0086] 제10 양태에서, 다음을 포함하는, 항체 또는 이의 항원-결합 단편을 생산하는 방법이 제공된다:

[0087] (i) 항체 또는 이의 항원-결합 단편의 발현에 적합한 조건 하에서 숙주 세포를 배양하는 것, 및

[0088] (ii) 숙주 세포 또는 이의 세포 배양물로부터 항체 또는 이의 항원-결합 단편을 회수하는 것.

[0089] 또 다른 양태에서, 예방적으로 또는 치료적으로 유효량의 접합체, 및 적어도 하나의 약학적으로 허용가능한 담체를 포함하는 약학적 조성물이 제공된다.

[0090] 또 다른 양태에서, 예방적으로 또는 치료적으로 유효량의 항체 또는 항원-결합 단편, 및 적어도 하나의 약학적

으로 허용가능한 담체를 포함하는 약학적 조성물이 제공된다.

[0091] 또 다른 양태에서, 질환을 예방하거나 치료하기 위한 약제의 제조에서 접합체, 항체, 또는 약학적 조성물의 용도가 제공되고; 여기서 질환은 종양이다.

[0092] 또 다른 양태에서, 접합체, 항체, 또는 약학적 조성물 투여하는 것을 포함하는, 질환 진행을 예방하거나 질환을 앓고 있는 대상체를 치료하는 방법이 제공되고; 질환은 종양이다.

[0093] 일 구현예에서, 종양은 TROP2-연관된 종양이다.

[0094] 일부 구현예에서, 질환은 종양이다. 일부 구현예에서, 질환은 TROP2-양성 종양을 포함한다. 일부 구현예에서, 질환은 TROP2를 과발현하는 종양 또는 TROP2 유전자 돌연변이가 있는 종양을 포함한다. 일부 구현예에서, 질환은 다음으로 이루어지는 군으로부터 선택된다: 섬유육종, 점액육종, 지방육종, 연골육종, 골형성 육종, 척삭종, 혈관육종, 내피육종, 림프관육종, 림프관내피 육종, 활막종, 중피종, 유잉 종양, 평활근육종, 횡문근육종, 결장암, 췌장암, 유방암, 갑상선암, 자궁내막암, 흑색종, 난소암, 전립선암, 편평 세포 암종, 기저 세포 암종, 선암종, 땀샘 암종, 피지샘 암종, 유두 암종, 유두 선암종, 낭선암종, 수질 암종, 기관지 암종, 신세포 암종, 간암, 담관암, 융모막암종, 정상피종, 배아 암종, 윌름스 종양, 자궁경부암, 고환 종양, 폐암, 소세포 폐암, 방광암, 상피암, 신경교종, 성상세포종, 수질모세포종, 두개인두종, 상피세포종, 송과체종, 혈관모세포종, 청신경종, 희소돌기아교세포종, 수막종, 신경모세포종 및 망막모세포종. 일 구현예에서, TROP2-연관된 종양은 유방암, 위암, 폐암, 난소암, 및 요로상피암으로부터 선택된다.

[0095] 또 다른 양태에서, 항체를 포함하는 항체 약물 접합체가 제공된다.

도면의 간단한 설명

[0096] 도 1.1은 MBA-MD-468에 관한 항체 내재화를 도시하고, 도 1.2는 Trop2 ECD에 관한 결합 활성을 도시하고, 도 1.3은 NCI-N87에 관한 내재화를 도시한다.

도 2는 FaDu 세포의 생존력에 관한 ADC-7 및 DS1062a의 효과를 도시한다.

도 3은 인간 췌장암 세포 BxPC-3의 생존력에 관한 ADC-1 및 DS1062a의 효과를 도시한다.

도 4는 인간 유방암 세포 MDA-MB-468의 생존력에 관한 ADC-1 및 DS1062a의 효과를 도시한다.

도 5는 위암 세포 NCI-N87의 생존력에 관한 ADC-7 및 DS1062a의 효과를 도시한다.

도 6은 인두 편평 세포 암종 FaDu의 생존력에 관한 ADC-2, ADC-3 및 ADC-1의 효과를 도시한다.

도 7.1은 인간 췌장암 세포 BxPC-3의 증식에 관한 ADC-2, ADC-3 및 ADC-1의 효과를 도시하고, 도 7.2는 BxPC-3의 증식에 관한 ADC-2의 효과를 도시하고, 도 7.3은 FaDu의 증식에 관한 ADC-2의 효과를 도시하고, 도 7.4는 NCI-N87의 증식에 관한 ADC-2의 효과를 도시한다.

도 8은 BxPC-3 마우스 이종이식 종양에 관한 ADC-1의 억제성 효과를 도시한다.

도 9는 NCI-N87 마우스 이종이식 종양에 관한 ADC-1의 억제성 효과를 도시한다.

도 10은 BR-05-0028 마우스 이종이식 종양에 관한 ADC-1의 억제성 효과를 도시한다.

도 11은 BxPC-3 마우스 이종이식 종양에 관한 ADC-2 및 ADC-3의 억제성 효과를 도시한다.

도 12는 NCI-N87 마우스 이종이식 종양에 관한 ADC-2, ADC-3 및 ADC-1의 억제성 효과를 도시한다.

도 13.1은 FaDu 마우스 이종이식 종양에 관한 ADC-2, ADC-3 및 ADC-1의 억제성 효과를 도시하고, 도 13.2는 MDA-MB-468 마우스 이종이식 종양에 관한 ADC-2의 억제성 효과를 도시한다.

도 14는 BxPC-3 마우스 이종이식 종양에 관한 ADC-5 및 ADC-6의 억제성 효과를 도시한다.

도 15는 NCI-N87 마우스 이종이식 종양에 관한 ADC-5 및 ADC-6의 억제성 효과를 도시한다.

도 16은 FaDu 마우스 이종이식 종양에 관한 ADC-5 및 ADC-6의 억제성 효과를 도시한다.

도 17은 ADC-1의 혈청 안정성의 결과를 도시한다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0097] 특정 구현예는 본 개시내용의 기술적 내용을 실례하기 위해 아래에 제공된다. 당업자는 명세서에서 개시된 내용을 통해서 본 개시내용의 다른 이점 및 효과를 쉽게 이해할 수 있다. 본 개시내용은 다른 상이한 특정 구현예를 통해서 또한 이행 또는 적용될 수 있다. 다양한 변형 및 변동은 본 개시내용의 정신에서 이탈 없이 당업자에 의해 이루어질 수 있다.

[0098] 정의

[0099] 이하에서 달리 정의되지 않는 한, 본원에 사용된 모든 기술적 및 과학적 용어는 당업자에 의해 흔히 이해된 바와 동일한 의미를 갖는다. 본원에 사용된 기법은, 당업자에게 명백한 변이체 및 동등한 치환을 포함하는, 당업계에서 일반적으로 이해되는 것들을 지칭한다. 하기 용어가 당업자에 의해 용이하게 이해할 수 있다고 믿어지는 한편, 하기 정의는 본 개시내용을 더욱 양호하게 실례하기 위해 제시된다. 상표명이 본원에 존재하는 때, 이는 상응하는 상품 또는 이의 활성 성분을 지칭한다. 본원에 인용된 모든 특허, 공개된 특허 출원 및 공보는 이로써 참조로 포함된다.

[0100] 특정 양, 농도, 또는 다른 값 또는 파라미터가 범위, 바람직한 범위, 또는 바람직한 상한 또는 바람직한 하한의 형태로 제시되는 때, 상기 범위가 명시적으로 언급되는지와 무관하게, 임의의 상한 또는 바람직한 값을 임의의 하한 또는 바람직한 값과 조합함으로써 형성된 임의의 범위를 구체적으로 드러내는 것과 동등함이 이해되어야 한다. 달리 명시되지 않는 한, 본원에 나열된 숫자적 범위는 범위의 종점 그리고 범위 내에서 모든 정수 및 분수 (소수)를 포함하도록 의도된다. 예를 들어, 표현 "i는 1 내지 20의 정수이다"는 i가 1 내지 20의 임의의 정수이고, 예를 들어, i가 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 또는 20일 수 있음을 의미한다. 다른 유사한 표현 예컨대 j, k 및 g는 유사한 방식으로 또한 이해되어야 한다.

[0101] 문맥이 달리 명확하게 지시하지 않는 한, "한" 및 "상기" 같은 단수 형태는 복수 형태를 포함한다. 표현 "하나 이상" 또는 "적어도 하나"는 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 또는 그 이상을 의미할 수 있다.

[0102] 용어 "약" 및 "대략"은, 숫자적 변수와 관련하여 사용된 때, 변수의 값 및 변수의 모든 값이 실험적 오차 이내 (예를 들어, 평균에 대한 95% 신뢰 구간 이내) 또는 특정된 값의 ± 10%, 또는 더 넓은 범위 이내임을 일반적으로 의미한다.

[0103] 용어 "화학양론적 비"는 중량 기준으로 특정 양에 따라 다양한 서브스턴스 매칭을 의미한다. 예를 들어, 본 개시내용에서, 활성 성분은 충전제, 결합제, 및 윤활제와 지정된 중량비로 혼합된다.

[0104] 용어 "임의적" 또는 "임의로"는 거기에 후속적으로 기재된 이벤트가 일어날 수 있지만, 반드시는 아니고, 설명이 상기 이벤트 또는 상황이 일어나거나 일어나지 않는 경우를 포함함을 의미한다.

[0105] 표현 "포함하는(comprising)", "포함하는(including)", "함유하는" 및 "갖는"은 개방형이고, 추가의 언급되지 않은 요소, 단계, 또는 성분을 배제하지 않는다. 표현 "으로 이루어지는"은 지정되지 않은 임의의 요소, 단계, 또는 성분을 배제한다. 표현 "으로 본질적으로 이루어지는"은 범위가 지정된 요소, 단계 또는 성분, 더하기 청구된 주제의 본질적으로 신규한 특징에 실질적으로 영향을 미치지 않는 임의로 존재하는 요소, 단계 또는 성분으로 제한됨을 의미한다. 표현 "포함하는"이 표현 "으로 본질적으로 이루어지는" 및 "으로 이루어지는"을 포괄함이 이해되어야 한다.

[0106] 본원에 사용된 경우에, 용어 "항체"는 광범위한 식으로 사용되고 이들이 원하는 생물학적 활성을 갖는 한, 온전한 단클론성 항체, 다클론성 항체, 단일특이적 항체, 다중특이적 항체 (예를 들면, 이중특이적 항체), 및 항체 단편을 특히 포함한다. 항체는 임의의 서브타입 (예컨대 IgG, IgE, IgM, IgD, 및 IgA) 또는 서브클래스일 수 있고, 임의의 적합한 종에서 유래될 수 있다. 일부 구현예에서, 항체는 인간 또는 뮤린 기원이다. 항체는 또한 재조합 방법에 의해 제조된 완전히 인간 항체, 인간화된 항체 또는 키메라 항체일 수 있다.

[0107] 단클론성 항체는 항체의 실질적으로 균질한 집단으로부터 수득된 항체를 지칭하기 위해 본원에 사용된다, 즉, 집단을 구성하는 개별 항체는 소수의 가능한 자연적 돌연변이를 제외하고는 동일하다. 단클론성 항체는 단일 항원성 부위에 고도로 특이적이다. 단어 "단클론성"은 항체의 특징이 항체의 실질적으로 균질한 집단에서 유래되고 항체를 생산하기 위해 일부 특정한 방법을 요구하는 것으로 해석되지 않아야 함을 지칭한다.

[0108] 온전한 항체 또는 전장 항체는, 항체의 서브타입에 의존하여, CH1, CH2, CH3 및 CH4를 포함할 수 있는, 항원-결합 가변 영역(들) 뿐만 아니라 경쇄 불변 영역(들) (CL) 및 중쇄 불변 영역(들) (CH)을 본질적으로 포함한다. 항원-비딩 가변 영역 (단편 가변 영역, Fv 단편으로서 또한 알려짐)은 경쇄 가변 영역 (VL) 및 중쇄 가변 영역 (VH)을 전형적으로 포함한다. 불변 영역은 고유 서열이 있는 불변 영역 (예컨대 인간 고유 서열이 있는 불변 영

역) 또는 이의 아미노산 서열 변이체일 수 있다. 가변 영역은 표적 항원을 인식하고 이와 상호작용한다. 불변 영역은 면역계에 의해 인식될 수 있고 이와 상호작용한다.

[0109] 항체 단편은 온전한 항체의 한 부문, 바람직하게는 이의 항원-결합 영역 또는 가변 영역을 포함할 수 있다. 항체 단편의 예는 Fab, Fab', F(ab')2, VH 및 CH1 도메인으로 이루어지는 Fd 단편, Fv 단편, 단일-도메인 항체 (dAb) 단편, 및 단리된 상보성 결정 영역 (CDR)을 포함한다. Fab 단편은 전장 면역글로불린의 파파인 소화에 의해 수득된 항체 단편, 또는 예를 들어, 재조합 발현에 의해 생산된 동일한 구조를 갖는 단편이다. Fab 단편은 경쇄 (VL 및 CL 포함) 및 또 다른 쇄를 포함하고, 여기서 상기 다른 쇄는 중쇄 (VH)의 가변 도메인 및 중쇄 (CH1)의 불변 영역 도메인을 포함한다. F(ab')2 단편은 pH 4.0-4.5에서 면역글로불린의 펩신 소화에 의해 수득된 항체 단편, 또는 예를 들어, 재조합 발현에 의해 생산된 동일한 구조를 갖는 단편이다. F(ab')2 단편은 2개 Fab 단편을 본질적으로 포함하고, 여기서 각 중쇄 부문은, 2개 단편을 연결하는 디술피드 결합을 형성하는 시스테인을 포함하여, 몇개 추가의 아미노산을 포함한다. Fab' 단편은 F(ab')2 단편의 절반 (하나의 중쇄 및 하나의 경쇄)을 포함하는 단편이다. 항체 단편은, 예를 들어, 디술피드 결합을 통해 및/또는 펩티드 링커를 통해 함께 연계된 복수의 쇄를 포함할 수 있다. 항체 단편의 예는 단일-쇄 Fv (scFv), Fv, dsFv, 디아바디, Fd 및 Fd' 단편, 및 변형된 단편을 포함하는 다른 단편을 또한 포함한다. 항체 단편은 적어도 또는 약 50개 아미노산, 및 전형적으로 적어도 또는 약 200개 아미노산을 전형적으로 포함한다. 항원-결합 단편은, (예를 들면, 상응하는 영역의 치환에 의해) 항체 프레임워크에 삽입된 때, 항원에 면역특이적으로 결합하는 항체를 초래할 수 있는 임의의 항체 단편을 포함할 수 있다.

[0110] 본 개시내용에 따른 항체는 당업계에서 잘 알려진 기법, 예컨대 하기 기법 또는 이들의 조합을 사용하여 제조될 수 있다: 재조합 기법, 파지 디스플레이 기법, 합성 기법, 또는 당업계에서 알려진 다른 기법. 예를 들어, 유전적으로 조작된 재조합 항체 (또는 항체 모방체)는 적합한 배양 시스템 (예를 들면, *E. 콜리(coli)* 또는 포유류 세포)에 의해 발현될 수 있다. 조작은, 예를 들어, 이의 말단에 리가제-특이적 인식 서열의 도입을 지칭할 수 있다.

[0111] 세포독소는 세포의 발현 활성, 세포성 기능을 억제하거나 예방하고/거나, 세포의 파괴를 일으키는 서브스턴스를 지칭한다. ADC에서 현재 사용된 세포독소는 화학치료적 약물보다 더욱 독성이다. 세포독소의 예는, 비제한적으로, 하기 표적을 표적화하는 약물을 포함한다: 미세소관 세포골격, DNA, RNA, 키네신-매개된 단백질 수송, 세포 사멸의 조절. 미세소관 세포골격을 표적화하는 약물은, 예를 들어, 미세소관-안정화 제제 또는 튜불린 중합 억제제일 수 있다. 미세소관-안정화 제제의 예는 비제한적으로 탁산을 포함한다. 튜불린 중합 억제제의 예는 비제한적으로 메이탄시노이드, 아우리스타틴, 빈블라스틴, 콜히친, 및 돌라스타틴을 포함한다. DNA-표적화 약물은, 예를 들어, DNA 구조를 직접적으로 파괴하는 약물 또는 토포이소머라제 억제제일 수 있다. DNA 구조를 직접적으로 파괴하는 약물의 예는 비제한적으로 DNA 이중 가닥 파괴제, DNA 알킬화제, DNA 인터칼레이터를 포함한다. DNA 이중 가닥 파괴제는, 예를 들어, 비제한적으로 다이네미신, 에스페라미신, 네오카르지노스타틴, 운시알라마이신, 및 기타 등등을 포함하는, 에네디인 항생제일 수 있다. DNA 알킬화 제제는, 예를 들어, DNA 비스-알킬화제 (즉 DNA-가교제) 또는 DNA 모노-알킬화제일 수 있다. DNA 알킬화 제제의 예는 비제한적으로 피롤로[2,1-c][1,4]벤조디아제핀 (PBD) 이량체, 1-(클로로메틸)-2,3-디히드로겐-1H-벤조[e]인돌 (CBI) 이량체, CBI-PBD 헤테로이량체, 디히드로인돌로벤조디아제핀 (IGN) 이량체, 듀오카르마이신-유사 화합물, 및 기타 등등을 포함한다. 토포이소머라제 억제제의 예는 비제한적으로 엑사테칸 및 이들의 유도체 (예컨대 DX8951f, DXd-(1) 및 DXd-(2), 이들의 구조는 아래에 묘사됨), 캄프토테신 및 안트라사이클린을 포함한다. RNA-표적화 약물은, 예를 들어, 스플라이싱을 억제하는 약물일 수 있고, 이의 예는 비제한적으로 플라디에놀리드를 포함한다. 키네신-매개된 단백질 수송을 표적화하는 약물은, 예를 들어, 비제한적으로, 키네신 스핀들 단백질 (KSP) 억제제를 포함하는 유사분열 키네신 억제제일 수 있다.

[0112] 스페이서는 상이한 구조적 모듈들 사이 자리잡고 구조적 모듈을 공간적으로 분리할 수 있는 구조이다. 스페이서의 정의는 이것이 특정 기능을 갖는지 또는 이것이 *생체내* 절단 또는 분해될 수 있는지에 의해 제한되지 않는다. 스페이서의 예는 비제한적으로 아미노산 및 비-아미노산 구조를 포함하고, 여기서 비-아미노산 구조는, 비제한적으로, 아미노산 유도체 또는 유사체일 수 있다. "스페이서 서열"은 스페이서의 역할을 하는 아미노산 서열을 지칭하고, 이의 예는 비제한적으로 단일 아미노산, 복수의 아미노산을 함유하는 서열, 예를 들어, 2개 아미노산을 함유하는 서열, 등 예컨대 GA, 또는, 예를 들어, GGGGS, GGGGSGGGGS, GGGGSGGGGSGGGGS, 등을 포함한다. 자가-희생 스페이서는 전구체에서 보호적 부분의 활성화 후에 2개 화학적 결합의 절단을 상관시키도록 맞춤화된 공유 조립체이다: 자극시, 보호적 모이어티 (예컨대 절단가능한 서열)는 제거되고, 이는 더 작은 분자의 일시적으로 순차적 방출로 이어지는 해체 반응의 캐스케이드를 생성한다. 자가-희생 스페이서의 예는 비제한적

으로 PABC (p-벤질옥시카보닐), 아세탈, 헤테로아세탈 및 이들의 조합을 포함한다.

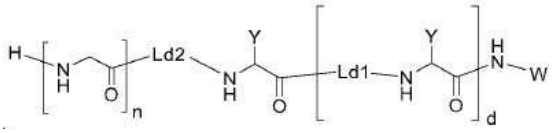
[0113] 용어 "알킬"은, 단일 결합을 통해서 분자의 나머지에 연결되는, 탄소 원자 및 수소 원자로 이루어지는 직선형 또는 분지형 포화된 지방족 탄화수소 기를 지칭한다. 알킬 기는 C_1-C_{20} 알킬 기, 예를 들어, C_1-C_4 알킬 기, C_1-C_3 알킬 기, C_1-C_2 알킬, C_3 알킬, C_4 알킬, C_3-C_6 알킬을 지칭하는, 1 내지 20개 탄소 원자를 함유할 수 있다. 알킬 기의 비-제한 예는 비제한적으로 메틸, 에틸, 프로필, 부틸, 펜틸, 헥실, 이소프로필, 이소부틸, sec-부틸, tert-부틸, 이소펜틸, 2-메틸부틸, 1-메틸부틸, 1-에틸프로필, 1,2-디메틸프로필, 네오펜틸, 1,1-디메틸프로필, 4-메틸펜틸, 3-메틸펜틸, 2-메틸펜틸, 1-메틸펜틸, 2-에틸부틸, 1-에틸부틸, 3,3-디메틸부틸, 2,2-디메틸 부틸, 1,1-디메틸부틸, 2,3-디메틸부틸, 1,3-디메틸부틸 또는 1,2-디메틸부틸, 또는 그들의 이성질체를 포함한다. 2가 라디칼은 자유 원자가 전자(들)가 있는 탄소 원자로부터 하나의 수소 원자를 제거함으로써 상응하는 1가 라디칼로부터 수득된 기를 지칭한다. 2가 라디칼은 분자의 나머지에 연결되는 2개 연결 부위를 갖는다. 예를 들어, "알킬렌" 또는 "알킬리덴"은 직선형 또는 분지형인 포화된 2가 탄화수소 기를 지칭한다. 알킬렌 기의 예는 비제한적으로 메틸렌 ($-CH_2-$), 에틸렌 ($-C_2H_4-$), 프로필렌 ($-C_3H_6-$), 부틸렌 ($-C_4H_8-$), 펜틸렌 ($-C_5H_{10}-$), 헥실렌 ($-C_6H_{12}-$), 1-메틸에틸렌 ($-CH(CH_3)CH_2-$), 2-메틸에틸렌 ($-CH_2CH(CH_3)-$), 메틸프로필렌, 에틸프로필렌, 및 기타 등등을 포함한다.

[0114] 본원에 사용된 경우에, 한 기가 또 다른 기와 조합되는 때, 화학적으로 안정한 구조가 형성된다면, 기의 연결은 선형 또는 분지형일 수 있다. 이러한 조합에 의해 형성된 구조는 구조에서 임의의 적합한 원자를 통해, 바람직하게는 지정된 화학적 결합을 통해 분자의 다른 모이어티에 연결될 수 있다. 예를 들어, $-CR^1R^2-$, C_{1-10} 알킬렌, C_{4-10} 시클로알킬렌, C_{4-10} 헤테로시클릴렌 및 -(CO)-로부터 선택된 2가 기 중 둘 이상이 함께 조합되어 조합물을 형성하는 때, 2가 기 중 둘 이상은 서로 선형 연결, 예컨대 $-CR^1R^2-C_{1-10}$ 알킬렌-(CO)-, $-CR^1R^2-C_{4-10}$ 시클로알킬렌-(CO)-, $-CR^1R^2-C_{4-10}$ 시클로알킬렌-C_{1-10} 알킬렌-(CO)-, $-CR^1R^2-CR^{1'}R^{2'}-(CO)-$, $-CR^1R^2-CR^{1'}R^{2'}-CR^{1''}R^{2''}-(CO)-$, 등을 형성할 수 있다. 생성된 2가 구조는 분자의 다른 모이어티에 추가로 연결될 수 있다.

[0115] 본원에 사용된 경우에, 표현 "항체-접합된 약물" 및 "항체-약물 접합체"는 동일한 의미를 갖는다.

[0116] 화학식 (I)의 화합물

[0117] 일 양태에서, 화학식 (I)의 화합물이 제공된다:

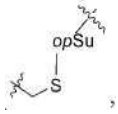
[0118] 

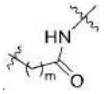
[0119] 식중,

[0120] W는 수소, LKb 또는 $-C_2H_4-(PEG)_t-(CO)NH_2$이고;

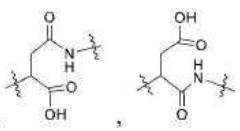
[0121] Y는 수소이거나 LKa-LKb이고;

[0122] 다만 W 및 Y는 동시에 수소가 아니고;

[0123] 각 LKa는 

, 및 

으로부터 독립적으로 선택되고;

[0124] *op*Su는 

, 또는 이의 혼합물이고;

[0125] 각 LKb는 독립적으로 L^2-L^1-B이고;

[0126] 각 B는 독립적으로 말단 기 R^{10}, 또는 하기 1), 2) 및 3)의 조합이고: 1) 자가-희생 스페이서 Sp1; 2) 결합, 또는 $-CR^1R^2-$, C_{1-10} 알킬렌, C_{4-10} 시클로알킬렌, C_{4-10} 헤테로시클릴렌 및 -(CO)-로부터 선택된 2가 기 중 하나 또는 이들 중 둘 이상의 조합; 및 3) 말단 기 R^{10};

[0127] R^{10}은 수소, 또는 페이로드에서 한 기와 반응하는 때 이탈할 수 있는 기이고;

[0128] 각 L^1은 효소에 의해 절단될 수 있는 아미노산 서열을 포함하는 독립적으로 절단가능한 서열 1이고, 절단가능한 서열 1은 1-10개 아미노산을 포함하고;

[0129] 각 L^2는 독립적으로 결합; 또는 알킬렌에서 하나 이상의 $-CH_2-$ 구조가 $-CR^3R^4-$, -O-, -(CO)-, $-S(=O)_2-$, $-NR^5-$, $-N^{\oplus}R^6R^7-$, C_{4-10} 시클로알킬렌, C_{4-10} 헤테로시클릴렌, 페닐렌에 의해 임의로 대체되는 C_{2-20} 알킬렌이고; 여기서 시클로알킬렌, 헤테로시클릴렌 및 페닐렌은 각각 독립적으로 비치환되거나 할로겐, $-C_{1-10}$ 알킬, $-C_{1-10}$ 할로알킬, $-C_{1-10}$ 알킬렌-NH-R^8 및 $-C_{1-10}$ 알킬렌-O-R^9로부터 선택된 적어도 하나의 치환체로 치환되고;

[0130] Ld2 및 각 Ld1은 독립적으로 결합이거나; $-NH-C_{1-20}$ 알킬렌-(CO)-, -NH-$(PEG)_i$-(CO)-로부터 선택되거나, 독립적으로 비치환되거나 측쇄에서 $-(PEG)_j-R^{11}$로 치환된 2-10의 중합도를 갖는 천연 아미노산 또는 올리고머성 천연 아미노산이고;

[0131] $-(PEG)_t-$, $-(PEG)_i-$ 및 $-(PEG)_j-$는, 한쪽 말단에 임의적 추가의 C_{1-10} 알킬렌이 있는, 표시된 수의 연속적 $-(O-C_2H_4)-$ 구조 단위 또는 연속적 $-(C_2H_4-O)-$ 구조 단위를 포함하는, 각 PEG 단편이고;

[0132] R^1, R^2, R^3, R^4, R^5, R^6, R^7, R^8, R^9는 수소, 할로겐, $-C_{1-10}$ 알킬, $-C_{1-10}$ 할로알킬, C_{4-10} 시클로알킬렌으로부터 각각 독립적으로 선택되거나;

[0133] R^1 및 R^2는 이들이 부착되는 탄소 원자와 함께 3-6 원 시클로알킬 기를 형성하거나;

[0134] R^3 및 R^4는 이들이 부착되는 탄소 원자와 함께 3-6 원 시클로알킬 기를 형성하고;

[0135] R^{11}은 C_{1-10} 알킬이고;

[0136] m은 1 내지 3의 임의의 정수이고;

[0137] n은 2 내지 20의 임의의 정수이고;

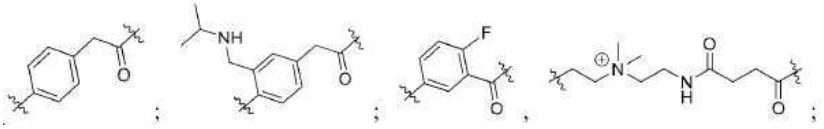
[0138] d는 0이거나, 1 내지 6의 임의의 정수이고;

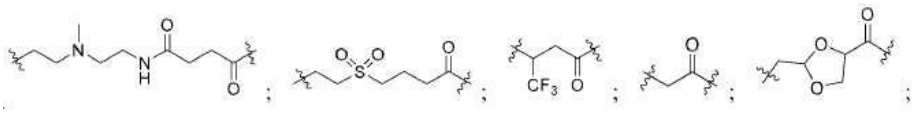
[0139] 각 i는 독립적으로 0-100, 바람직하게는 0 내지 20의 정수이고; 바람직하게는 각 i는 독립적으로 0 내지 12; 더욱 바람직하게는 0 내지 8; 특히 4의 정수이고;

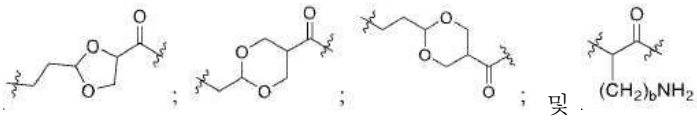
[0140] 각 j는 독립적으로 1-100, 바람직하게는 1 내지 20의 정수이고; 바람직하게는 각 j는 독립적으로 1 내지 12; 더욱 바람직하게는 8 내지 12; 특히 8 또는 12의 정수이고;

[0141] 각 t는 독립적으로 1-100, 바람직하게는 1 내지 20의 정수이고; 바람직하게는 각 t는 독립적으로 1 내지 12; 더욱 바람직하게는 8 내지 12; 특히 8 또는 12의 정수임.

[0142] 일 구현예에서, L^2는 다음으로부터 선택된다: $-(CH_2)_p-(CH_2)_2(CO)-$, p는 0, 또는 1 내지 5의 정수임;

[0143] 

[0144] 

[0145] 

, b는 1 내지 10의 정수임.

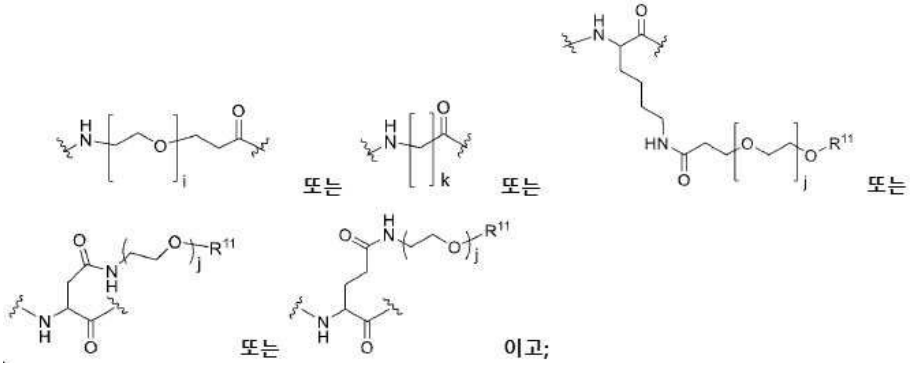
[0146] 일 구현예에서, p는 0 내지 3; 바람직하게는 3이다.

[0147] 일 구현예에서, L^2는 다음으로부터 선택된다: $-(C_2H_4-O)_p-(CH_2)_2(CO)-$, p는 1 내지 5의 정수이고; 더욱 바람직하게는 p는 2 또는 4임.

[0148] 일 구현예에서, L^2의 상기 구조의 각각에서 카르보닐 기는 L^1에 연결되고, 다른 결합 부위는 *op*Su에 연결된다.

[0149] 일 구현예에서, L^2의 상기 구조의 각각에서 카르보닐 기는 L^1에 연결되고, 다른 결합 부위는 아미드에 연결된다.

[0150] Ld2 및 각 Ld1은 독립적으로 결합 또는

[0151] 

[0152] 각 i는 독립적으로 0-100의 정수이고;

[0153] 각 j 및 k는 독립적으로 1-100의 정수이다.

[0154] 일 구현예에서, 각 i는 독립적으로 0 내지 20의 정수이다. 일 구현예에서, 각 i는 독립적으로 0 내지 12의 정수이다.

[0155] 일 구현예에서, 각 j 및 k는 독립적으로 1 내지 20의 정수이다. 일 구현예에서, 각 j 및 k는 독립적으로 1 내지 12의 정수이다.

[0156] 일 구현예에서, 각 i는 독립적으로 0 내지 8; 특히 4의 정수이다.

[0157] 일 구현예에서, 각 j는 독립적으로 8 내지 12; 특히 8 또는 12의 정수이다.

[0158] 일 구현예에서, 각 k는 독립적으로 1 내지 7; 특히 1, 또는 3 또는 5의 정수이다.

[0159] 일 구현예에서, Ld2 및 각 Ld1은 독립적으로 결합; 또는 2개 말단 각각에 아미노 및 카르보닐이 있는 C_{1-20} 알킬렌, 또는 2개 말단 각각에 아미노 및 카르보닐이 있는 (-$(PEG)_i$-로서 표시된) 특정 길이의 PEG 단편, 또는 독립적으로 비치환되거나 측쇄에서 (-$(PEG)_j$-로서 표시된) 특정 길이의 PEG 단편으로 치환된 하나 이상의 천연 아미노산이다.

[0160] 일 구현예에서, -$(PEG)_i$-는 -$(O-C_2H_4)_i$- 또는 -$(C_2H_4-O)_i$-, 및 한쪽 말단에 임의적 추가의 C_{1-10} 알킬렌을 포함하고; -$(PEG)_j$-는 -$(O-C_2H_4)_j$- 또는 -$(C_2H_4-O)_j$-, 및 한쪽 말단에 임의적 추가의 C_{1-10} 알킬렌을 포함한다. 일 구현예에서, -$(PEG)_i$-는 -C_2H_4-$(O-C_2H_4)_i$- 또는 -$(C_2H_4-O)_i$-C_2H_4-를 포함한다.

[0161] 분자에서 둘 이상의 Ld1, B, L^2 또는 L^1 구조가 있는 때, 각 Ld1, B, L^2 또는 L^1의 구조가 독립적으로 선택됨이

이해되어야 한다. 분자에서 둘 이상의 R^x (x는 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 등임)가 있는 때, 각 R^x는 독립적으로 선택된다. 일부 구현예에서, 분자에서 "x"들은 추가의 아포스트로피 (') 또는 아포스트로피들 (예컨대 '', ''', '''', 등)이 있거나 없이, 예를 들어 R, $R^{1'}$, $R^{1''}$, $R^{1'''}$, $R^{2'}$, $R^{2''}$, $R^{2'''}$, 등으로 표시되고, 여기서 각 R^x는, 추가의 아포스트로피 또는 아포스트로피들이 있거나 없이, 독립적으로 선택된다. 다른 R^x들 예컨대 R^3, R^4, R^5, R^6, R^7, R^8, R^9, 및 "Ld1", "B", "$L^{2''}$ 및 "$L^{1''}$는 유사한 식으로 이해되어야 한다. 일부 구현예에서, 분자에서 "i"는, 추가의 숫자가 있거나 없이, 예를 들어 i1, i2, i3, i4, 등으로 표시되고, 여기서 숫자는 임의의 순서를 지시하지 않지만, 그저 "i"를 구별하는데 사용된다. 그리고 각 "i"는, 추가의 숫자가 있거나 없이, 독립적으로 선택된다.

[0162] 일 구현예에서, 절단가능한 서열 1은 Gly-Gly-Phe-Gly, Phe-Lys, Val-Cit, Val-Lys, Gly-Phe-Leu-Gly, Ala-Leu-Ala-Leu, Ala-Ala-Ala 및 이들의 조합으로부터 선택되고; 바람직하게는, 절단가능한 서열 1은 Gly-Gly-Phe-Gly이다.

[0163] 일 구현예에서, W는 수소이다.

[0164] 일 구현예에서, W는 $-C_2H_4-(PEG)_t-(CO)NH_2$이고, 식중 t는 독립적으로 1-100, 바람직하게는 1 내지 20의 정수이고; 바람직하게는 각 t는 독립적으로 1 내지 12; 더욱 바람직하게는 8 내지 12; 특히 8 또는 12의 정수이다.

[0165] 일 구현예에서, R^{11}은 C_{1-6} 알킬, 바람직하게는 메틸이다.

[0166] 일 구현예에서, n은 2 내지 5, 특히 3의 정수이다.

[0167] 일 구현예에서, d는 0이거나, 1 내지 4; 바람직하게는 0, 1, 2 또는 3의 임의의 정수이다.

[0168] 티오숙신이미드는 생리학적 조건 하에서 불안정하고 접합 부위에 절단으로 이어지는 역 마이클 첨가 반응을 일으킬 수 있다. 더욱이, 또 다른 티올 화합물이 시스템에서 존재하는 때, 티오숙신이미드는 다른 티올 화합물과 티올 교환을 또한 겪을 수 있다. 이들 반응의 양쪽은 페이로드의 저하를 야기하고 독성 부작용을 초래한다. 본 개시내용에서, 링커에서 적용된 때, 개환된 숙신이미드 구조는 역 마이클 첨가 또는 티올 교환을 더 이상 경험하지 않고, 그래서 생성물은 더욱 안정하다. 개환 반응의 방법은 WO2015165413A1에서 찾아질 수 있다.

[0169] 개환된 숙신이미드 모이어티를 포함하는 화합물은, 숙신이미드 개환 반응의 효율과 무관하게, 고 순도 및 정의된 조성물로 수득하기 위해 반-분취형/분취형 HPLC 또는 다른 적합한 분리 수단에 의해 정제될 수 있다.

[0170] 리가제 수용체 또는 공여체 기질의 인식 서열을 포함하는 모이어티

[0171] 일 구현예에서, 화학식 (I)의 화합물의 G_n 모이어티는, 리가제의 촉매화 하에서 표적화 분자와 화학식 (I)의 화합물의 효소-촉매화된 커플링을 촉진시키는, 리가제 수용체 기질의 인식 서열이다. 표적화 분자는 임의로 변형되고 리가제 수용체 기질의 상응하는 인식 서열을 포함한다.

[0172] 일 구현예에서, 리가제는 트랜스펩티다제이다. 일 구현예에서, 리가제는 천연 트랜스펩티다제, 비천연 트랜스펩티다제, 이들의 변이체, 및 이들의 조합으로 이루어지는 군으로부터 선택된다. 비천연 트랜스펩티다제 효소는, 비제한적으로, 천연 트랜스펩티다제의 조작에 의해 수득된 것들일 수 있다. 바람직한 구현예에서, 리가제는 천연 소르타제, 비천연 소르타제, 및 이들의 조합으로 이루어지는 군으로부터 선택된다. 천연 소르타제의 종은 소르타제 A, 소르타제 B, 소르타제 C, 소르타제 D, 소르타제 *L. 플란타룸(plantarum)*, 등을 포함한다 (상세한 설명은 US20110321183A1에서 찾아질 수 있고, 참조로 본원에 포함됨). 리가제의 유형은 리가제 인식 서열에 상응하고 이로써 상이한 분자들 또는 구조적 단편들 사이 특정 접합을 달성하는데 사용된다.

[0173] 일부 구현예에서, 리가제는 소르타제 A, 소르타제 B, 소르타제 C, 소르타제 D 및 소르타제 *L. 플란타룸*으로부터 선택된 소르타제이다. 이들 구현예에서, 리가제 수용체 기질의 인식 서열은 올리고머성 글리신, 올리고머성 알라닌, 및 3-10의 중합도를 갖는 올리고머성 글리신/알라닌의 혼합물로 이루어지는 군으로부터 선택된다. 특정한 구현예에서, 리가제 수용체 기질의 인식 서열은 G_n이고, 여기서 G는 글리신 (Gly)이고, n은 2 내지 10의 정수이다.

[0174] 또 다른 특정한 구현예에서, 리가제는 *스타필로콕쿠스 아우레우스* (*Staphylococcus aureus*)에서 소르타제

A이다. 따라서, 리가제 인식 서열은 LPXTG처럼 효소의 전형적 인식 서열일 수 있다. 더욱 또 다른 특정한 구현예에서, 리가제 공여체 기질의 인식 서열은 LPXTGJ이고, 리가제 수용체 기질의 인식 서열은 G_n이고, 여기서 X는 천연 또는 비천연인 임의의 단일 아미노산일 수 있고; J는 부재하거나, 임의로 표지화된, 1-10개 아미노산을 포함하는 아미노산 단편이다. 일 구현예에서, J는 부재하다. 더욱 또 다른 구현예에서, J는 1-10개 아미노산을 포함하는 아미노산 단편이고, 여기서 각 아미노산은 독립적으로 임의의 천연 또는 비천연 아미노산이다. 또 다른 구현예에서, J는 G_m이고, 여기서 m은 1 내지 10의 정수이다. 더욱 또 다른 특정한 구현예에서, 리가제 공여체 기질의 인식 서열은 LPETG이다. 또 다른 특정한 구현예에서, 리가제 공여체 기질의 인식 서열은 LPETGG이다.

[0175] 일 구현예에서, 리가제는 *스타필로콕코스 아우레우스*에서 소르타제 B이고 상응하는 공여체 기질 인식 서열은 NPQTN일 수 있다. 또 다른 구현예에서, 리가제는 *바실루스 안트라시스*(*Bacillus anthracis*)에서 소르타제 B이고 상응하는 공여체 기질 인식 서열은 NPKTG일 수 있다.

[0176] 더욱 또 다른 구현예에서, 리가제는 *스트렙토콕쿠스 피오게네스* (*Streptococcus pyogenes*)에서 소르타제 A이고 상응하는 공여체 기질 인식 서열은 LPXTGJ일 수 있고, 여기서 J는 상기 정의된 바와 같다. 또 다른 구현예에서, 리가제는 *스트렙토마이세스 코엘리콜러*(*Streptomyces coelicolor*)에서 소르타제 서브패밀리 5이고, 상응하는 공여체 기질 인식 서열은 LAXTG일 수 있다.

[0177] 더욱 또 다른 구현예에서, 리가제는 *락토바실루스*(*Lactobacillus*) *플란타룸*에서 소르타제 A이고 상응하는 공여체 기질 인식 서열은 LPQTSEQ일 수 있다.

[0178] 리가제 인식 서열은 또한 수동 스크리닝에 의해 최적화된 트랜스펩티다제에 대한 다른 완전히 새로운 인식 서열일 수 있다.

[0179] 반응성 기를 포함하는 모이어티

[0180] 페이로드와 연결을 위한 반응성 기

[0181] 일 구현예에서, B는 말단 기 R^{10}이고, L^1내 절단가능한 서열 1은 페이로드에 연결된다. 이러한 경우에, B는 페이로드와 절단가능한 서열 1의 연결의 생성된 분자에서 부재하다. 일 구현예에서, B는 페이로드에 대한 연결에 사용된다. 페이로드와 연결을 위하여, 화학식 (I)의 화합물은 반응성 기를 포함한다. 일 구현예에서, 화학식 (I)의 화합물에서 B는 아미드 결합 또는 에스테르 결합 또는 에테르 결합을 통해서 페이로드에 연결된다. 일 구현예에서, 화학식 (I)내 B에서 반응성 기는 독립적으로 축합 반응, 친핵성 첨가 또는 친전자성 첨가를 위한 반응성 기 (예컨대 반응성 C=O 모이어티, 반응성 C=C-C=O 모이어티, 아미노 기, 아민 기, 히드록시 기 또는 티올 기), 또는 치환 반응을 위한 반응성 기 (예컨대 O, C, N 또는 S 원자에 부착된 이탈 기)이다. 일 구현예에서, B에서 반응성 기는 카르복실 기, 활성 에스테르, 알데히드 기, 아미노 기, 아민 기, 히드록시 기 및 티올 기로부터 독립적으로 선택된다. 특정 구현예에서, 페이로드에 연결하는데 사용되는 B에서 반응성 기는 아미노 기, 아민 기, 히드록시 기, 티올 기, 카르복실 기 및 활성 에스테르로부터 독립적으로 선택된다.

[0182] 일 구현예에서, B에서 반응성 기는, 페이로드에서 상응하는 기 (예컨대 카르복실 기, 술폰산 기, 유리 -OH 단부가 있는 포스포릴 기, 활성 에스테르, 산 클로리드 또는 이소시아네이트 기)와 반응하는, 독립적으로 아미노 기, 아민 기 또는 히드록시 기이다. 또 다른 구현예에서, B에서 반응성 기는, 페이로드에서 상응하는 기 (예컨대 아미노 기, 아민 기 또는 히드록시 기)와 반응하는, 독립적으로 카르복실 기 또는 활성 에스테르이다.

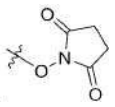
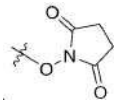
[0183] 일 구현예에서, B에서 반응성 기는, 페이로드에서 상응하는 기 (예컨대 할로겐, 히드록시 기, 알데히드 기)와 반응하는, 독립적으로 아미노 기, 히드록시 기 또는 티올 기이다. 또 다른 구현예에서, B에서 반응성 기는, 페이로드에서 상응하는 기 (예컨대 할로겐 또는 히드록시 기)와 반응하는, 독립적으로 히드록시 기이다.

[0184] 일 구현예에서, 각 B는 독립적으로 R^{10}, 또는 하기 1), 2) 및 3)의 조합이다: 1) 자가-희생 스페이서 Sp1; 2) 결합, 또는 $-CR^1R^2-$, C_{1-10} 알킬렌 및 -(CO)-로부터 선택된 2가 기 중 하나 또는 이들 중 둘 이상의 조합; 및 3) 말단 기 R^{10}.

[0185] 일 구현예에서, Sp1은 PABC, 아세탈, 헤테로아세탈 및 이들의 조합으로부터 선택된다. 일 구현예에서, Sp1은 아세탈, 헤테로아세탈 또는 PABC이다. 일 구현예에서, 헤테로아세탈은 N,O-헤테로아세탈로부터 선택된다. 일 구현예에서, Sp1은 $-O-CH_2-U-$, 또는 $-NH-CH_2-U-$이고 여기서 -O- 또는 -NH-는 절단가능한 서열 1에 연결되고; U는 부재하거나 O, S 또는 NH, 바람직하게는 O 또는 S이다. 일 구현예에서, U는 부재하거나, O, S 또는 NH, 바람직하

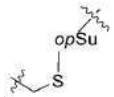
게는 O 또는 S이다.

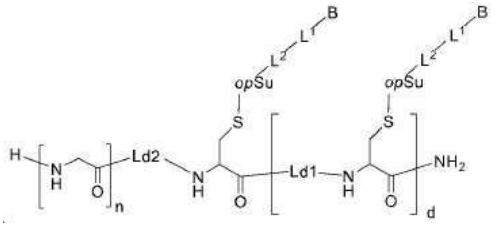
[0186] 일 구현예에서, B는 R^{10}, $-NH-CH_2-U-R^{10}$, $-NH-CH_2-U-(CR^1R^2)_g-(CO)-R^{10}$ 또는 $-NH-CH_2-U-(CH_2)_g-(CO)-R^{10}$이다.

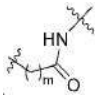
[0187] 일 구현예에서, R^{10}은 수소, 히드록시 또는  이다. 일 구현예에서, R^{10}은 수소이다. 일 구현예에서, R^{10}은 히드록시 또는  이다.

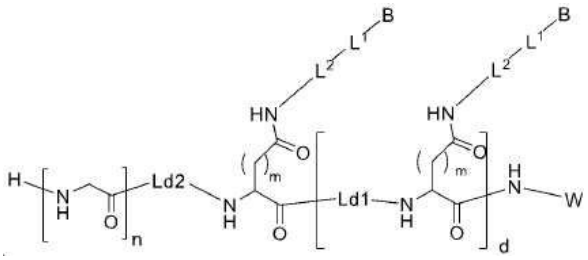
[0188] 일 구현예에서, R^{10}은 페이로드와 B의 반응에서 비롯하는 생성물 분자에서 나타나지 않을 구조의 부분을 나타낸다.

[0189] 화학식 (I) 화합물의 특정 구현예

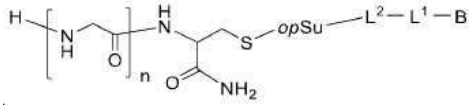
[0190] 일 구현예에서, W는 수소이고, 각 LKa는  이다. 일 구현예에서, 화학식 (I)은 화학식 (I-a)의 구조를 갖는다

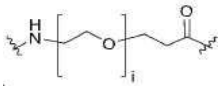
[0191]  화학식 (I-a).

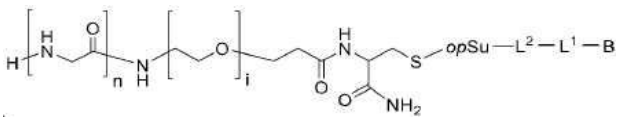
[0192] 일 구현예에서, 각 LKa는  이다. 일 구현예에서, 화학식 (I)은 화학식 (I-b)의 구조를 갖는다

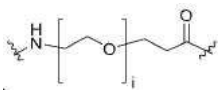
[0193]  화학식 (I-b).

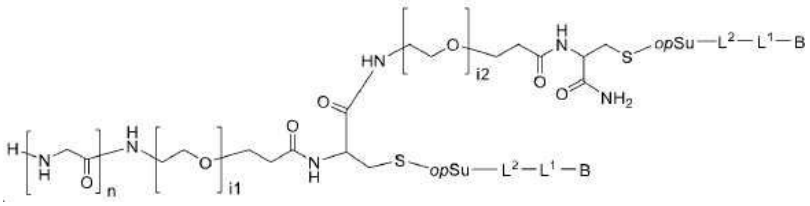
[0194] 일 구현예에서, Ld2는 결합이고, d는 0이다. 일 구현예에서, 화학식 (I-a)의 화합물은 다음과 같다:

[0195]  (I-a-0-1).

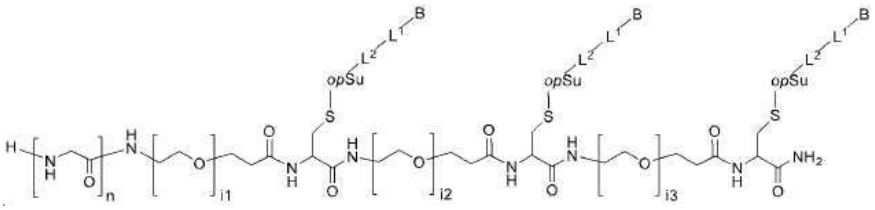
[0196] 일 구현예에서, d는 0이고, Ld2는  이다. 일 구현예에서, 화학식 (I-a)의 화합물은 다음과 같다:

[0197]  (I-a-0-2).

[0198] 일 구현예에서, d는 1, 2 또는 3이고, Ld2 및 각 Ld1은  으로부터 독립적으로 선택된다. 일 구현예에서, 화학식 (I-a)의 화합물은 다음과 같다:

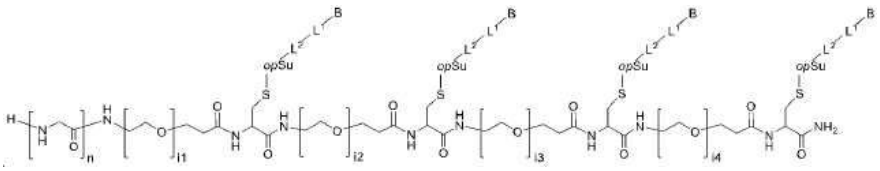
[0199] 

[0200] (I-a-0-3)

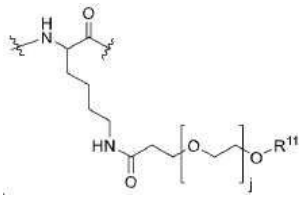
[0201] 

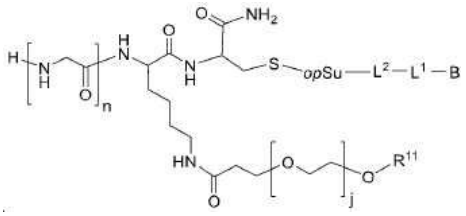
[0202] (I-a-0-4)

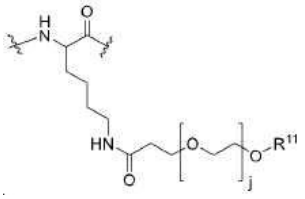
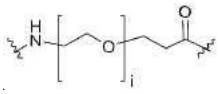
[0203] 또는

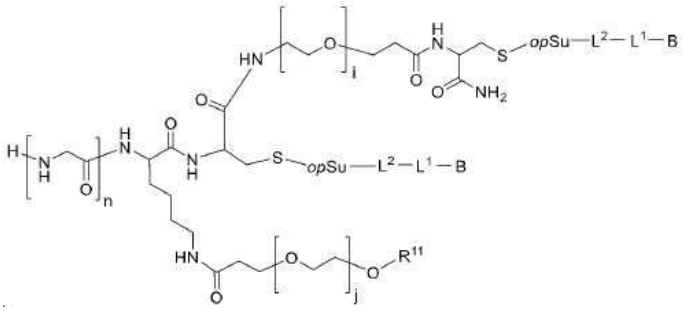
[0204] 

[0205] (I-a-0-5).

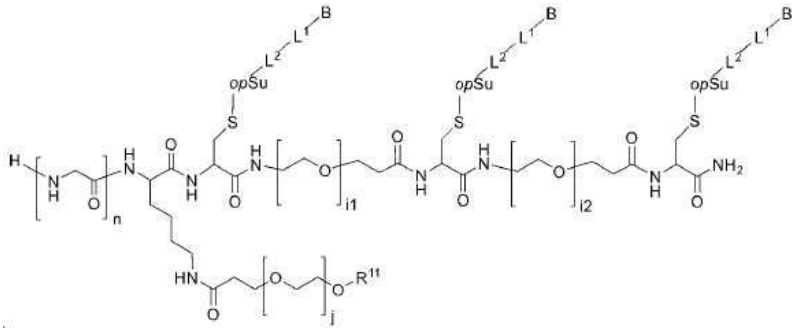
[0206] 일 구현예에서, Ld2는  이고, d는 0이다. 일 구현예에서, 화학식 (I-a)의 화합물은 다음과 같다:

[0207]  (I-a-1-1).

[0208] 일 구현예에서, d는 1, 2 또는 3이고, Ld2는  이고, 각 Ld1은  으로부터 독립적으로 선택된다. 일 구현예에서, 화학식 (I-a)의 화합물은 다음과 같다:

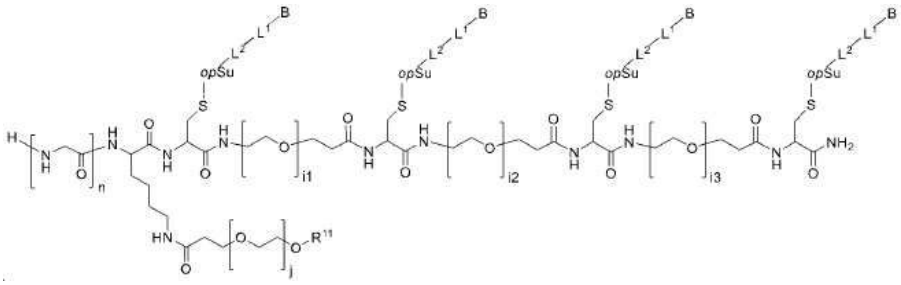
[0209] 

[0210] (I-a-1-2)

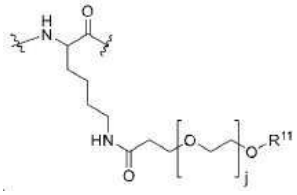
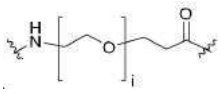
[0211] 

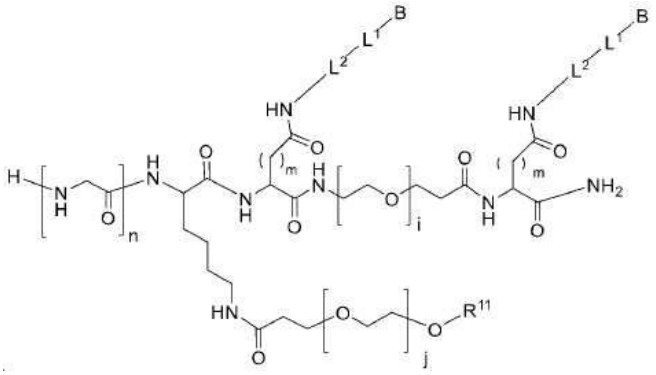
[0212] (I-a-1-3)

[0213] 또는

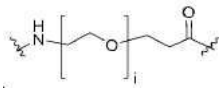
[0214] 

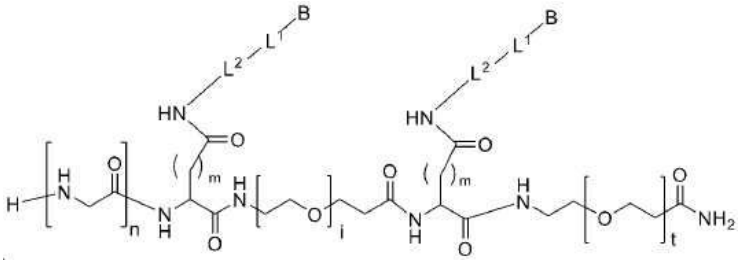
[0215] (I-a-1-4).

[0216] 일 구현예에서, d는 1이고, W는 수소이고, Ld2는  이고, 각 Ld1은  으로부터 독립적으로 선택된다. 일 구현예에서, 화학식 (I-b)의 화합물은 다음과 같다:

[0217] 

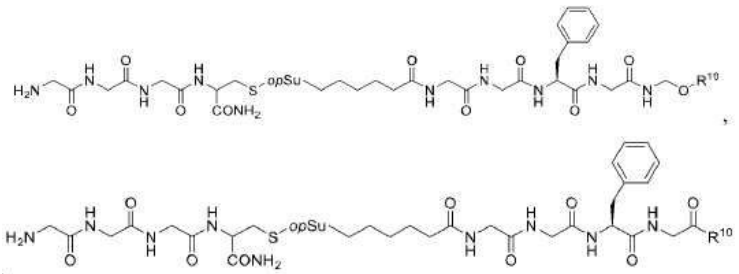
[0218] (I-b-1).

[0219] 일 구현예에서, d는 1이고, W는 $-C_2H_4-(PEG)_t-C(O)NH_2$이고, Ld2는 결합이고, 각 Ld1은  으로부터 독립적으로 선택된다. 일 구현예에서, 화학식 (I-b)의 화합물은 다음과 같다:

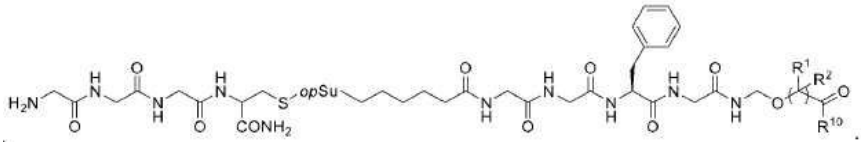
[0220] 

[0221] (I-b-0).

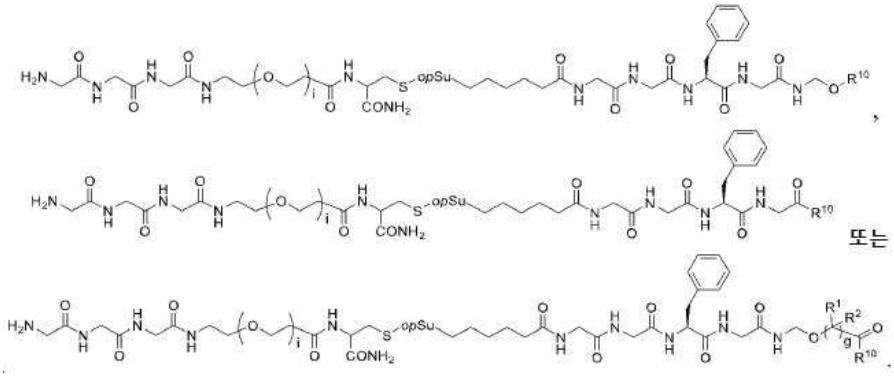
[0222] 일 구현예에서, n은 3이고, L^2는 $-(CH_2)_p-(CH_2)_2(CO)-$이고, p는 3이고, L^1은 GGFG이고, B는 $-NH-CH_2-U-R^{10}$ 또는 $-R^{10}$ 또는 $-NH-CH_2-U-(CR^1R^2)_g-(CO)-R^{10}$이고, U는 O이고, g는 1이다. 일 구현예에서, I-a-0-1은 다음의 구조를 갖는다:

[0223] 

[0224] 또는

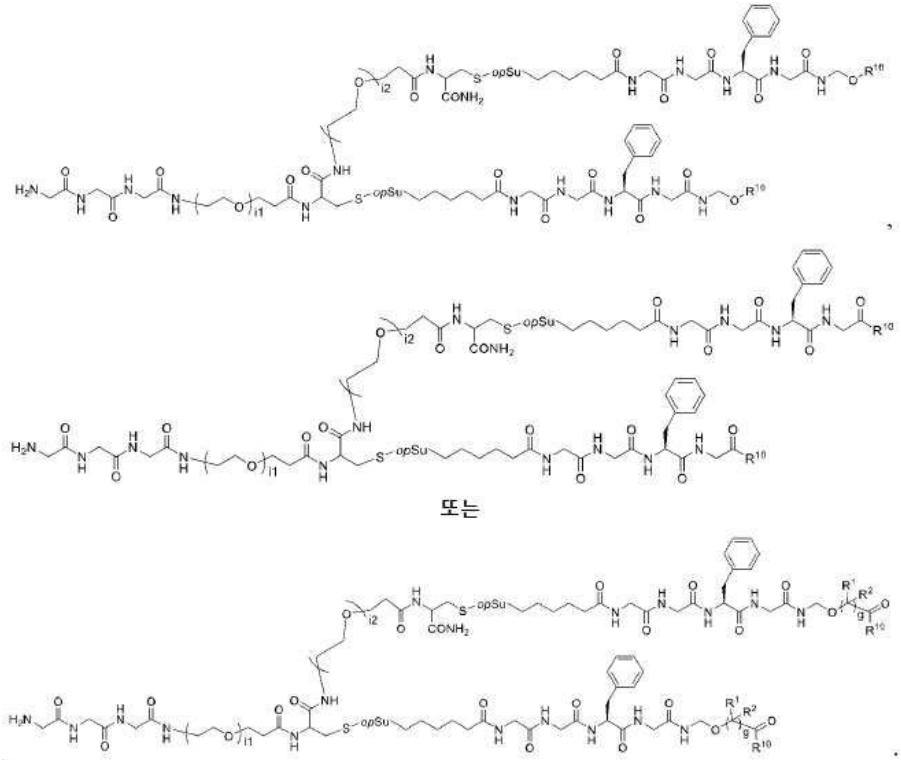
[0225] 

[0226] 일 구현예에서, I-a-0-2는 다음의 구조를 갖는다:



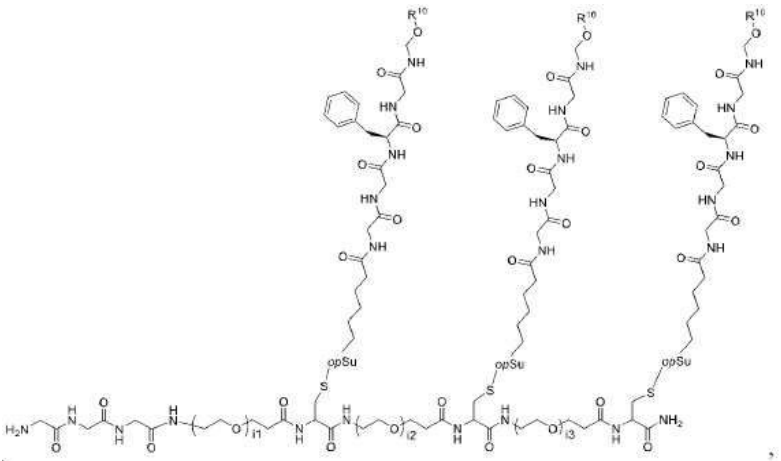
[0227]

[0228] 일 구현예에서, I-a-0-3은 다음의 구조를 갖는다:

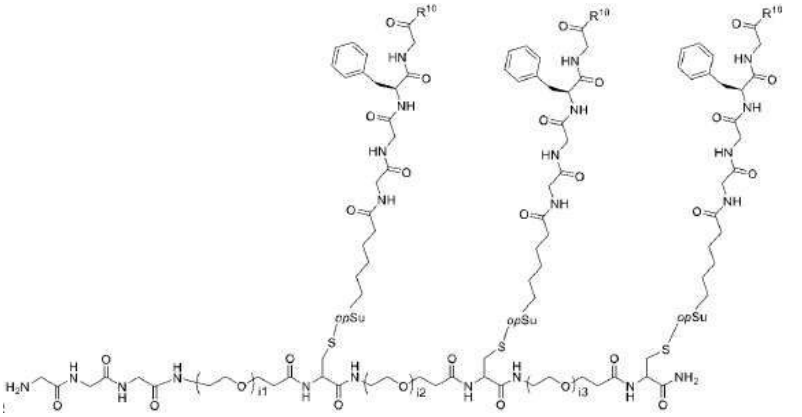


[0229]

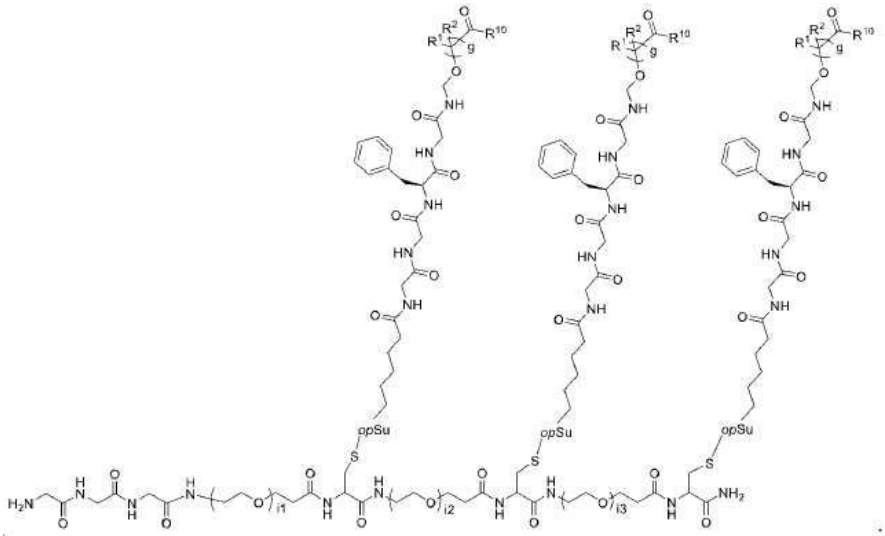
[0230] 일 구현예에서, I-a-0-4는 다음의 구조를 갖는다:



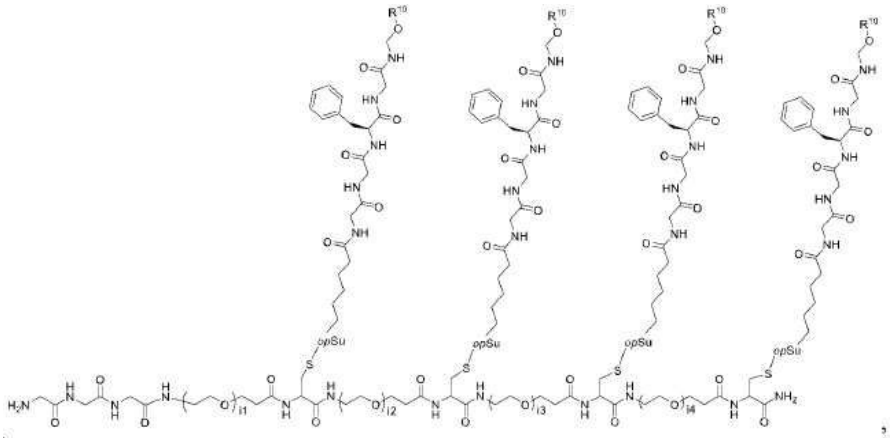
[0231]

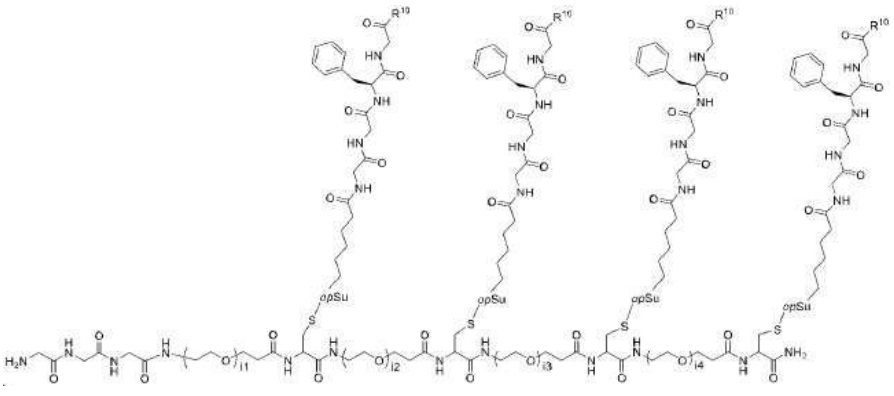
[0232] 

또는

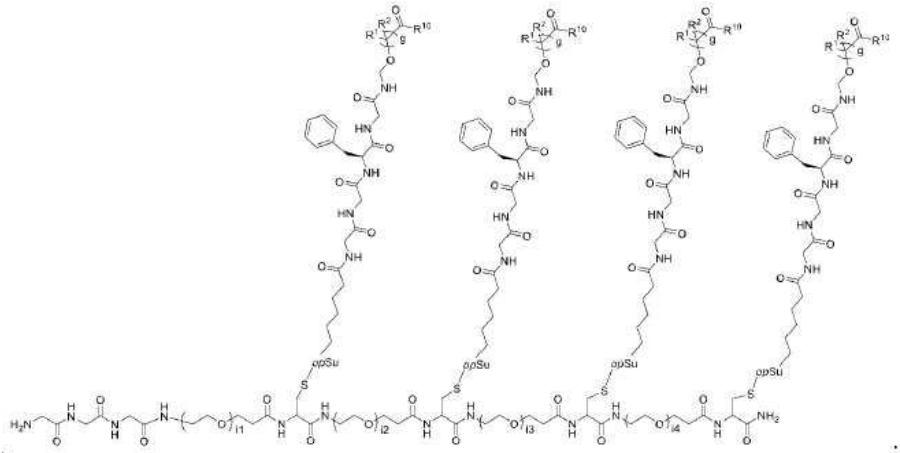
[0233] 

[0234] 일 구현예에서, I-a-0-5는 다음의 구조를 갖는다:

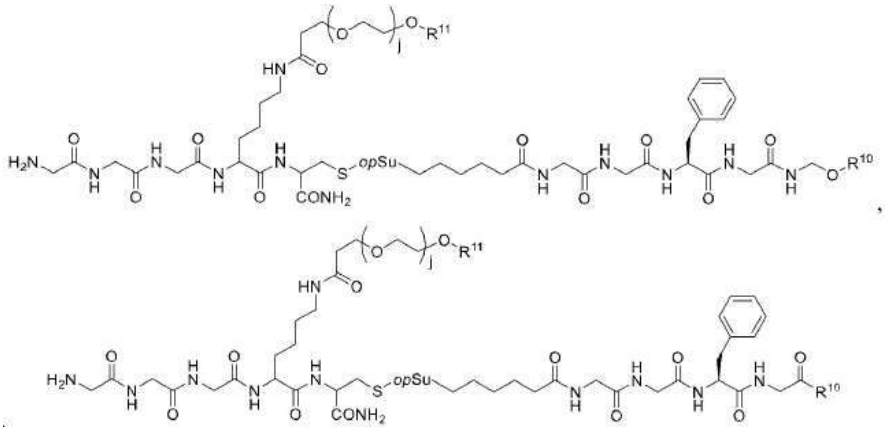
[0235] 

[0236] 

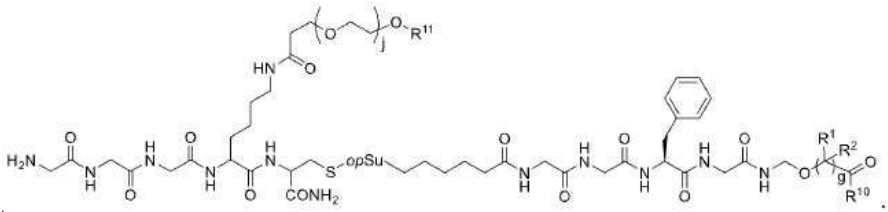
또는

[0237] 

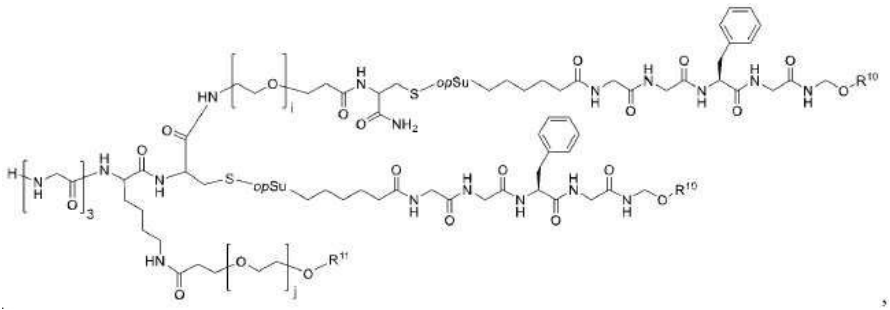
[0238] 일 구현예에서, I-a-1-1은 다음의 구조를 갖는다:

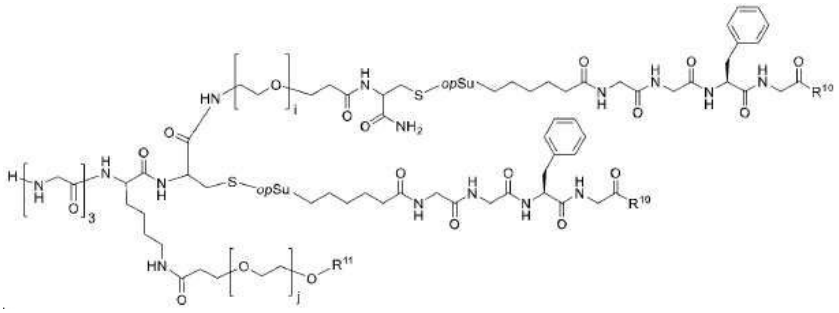
[0239] 

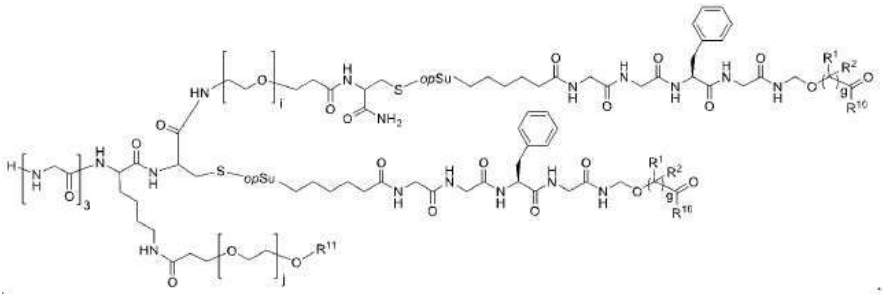
[0240] 또는

[0241] 

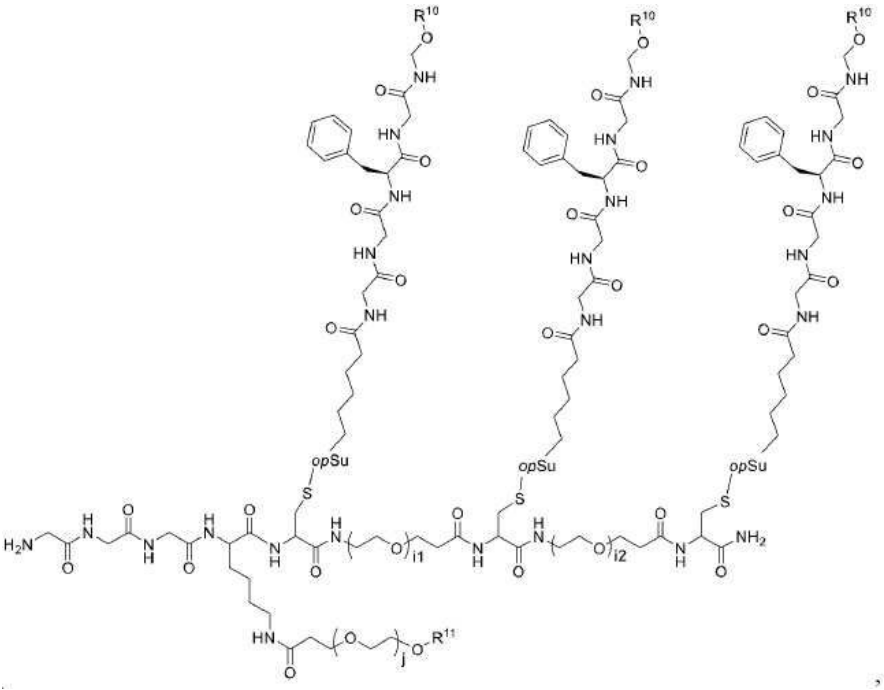
[0242] 일 구현예에서, I-a-1-2는 다음의 구조를 갖는다:

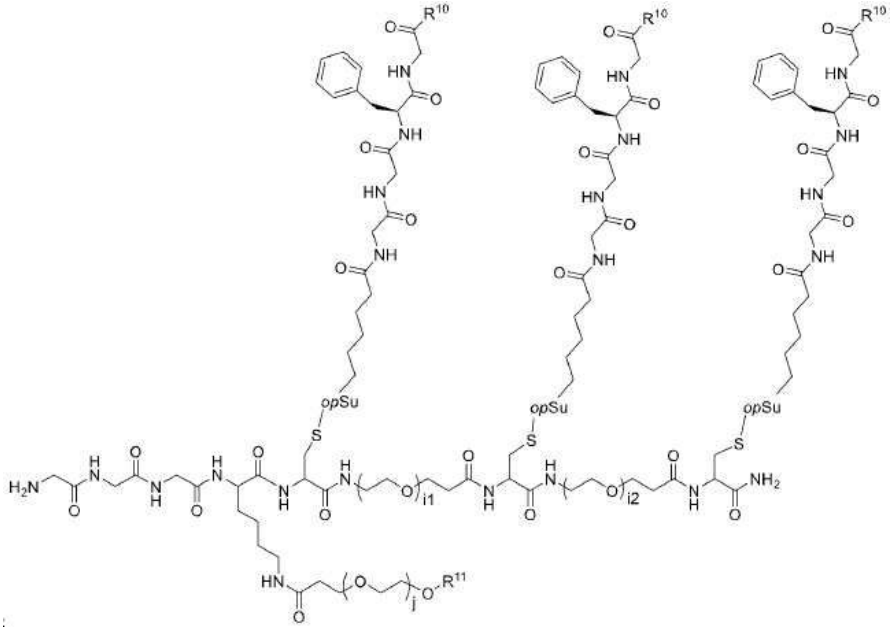
[0243] 

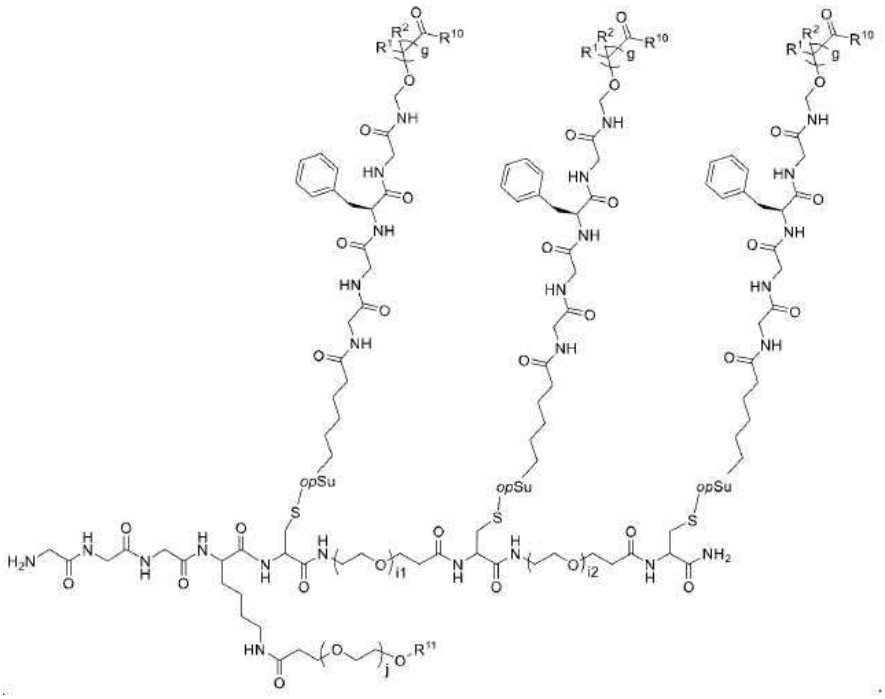
[0244]  또는

[0245] 

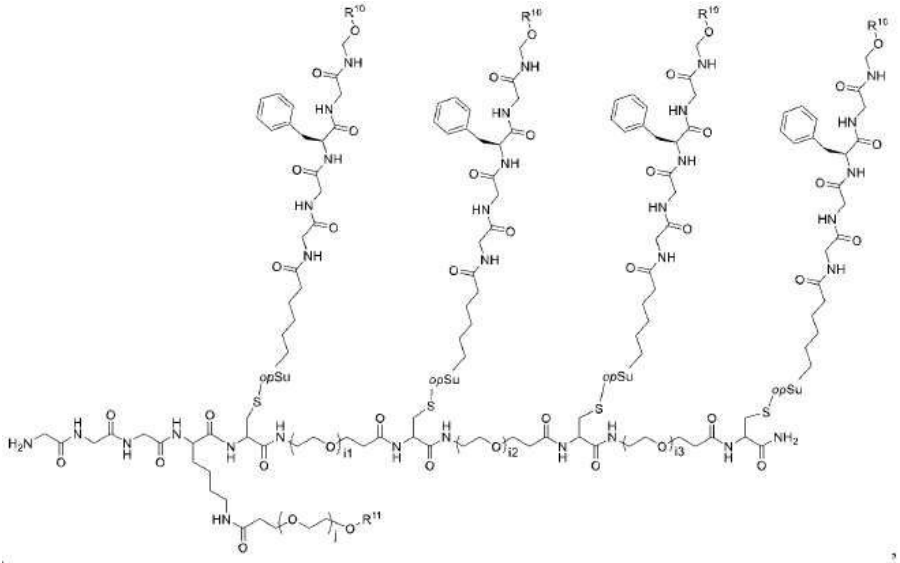
[0246] 일 구현예에서, I-a-1-3은 다음의 구조를 갖는다:

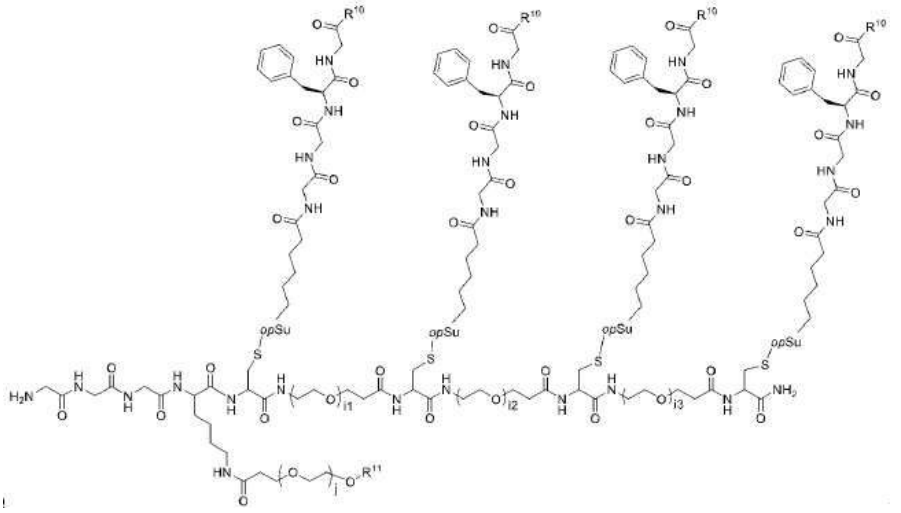
[0247] 

[0248]  또는

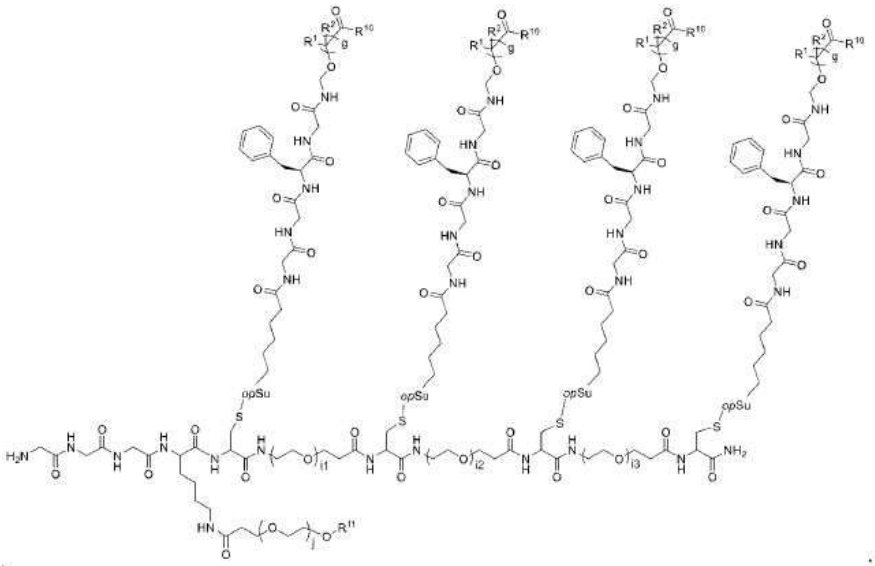
[0249] 

[0250] 일 구현예에서, I-a-1-4는 다음의 구조를 갖는다:

[0251] 

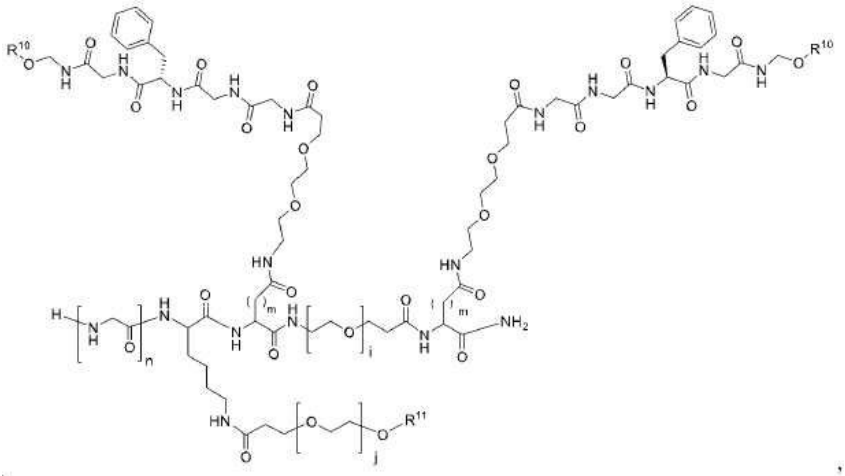
[0252] 

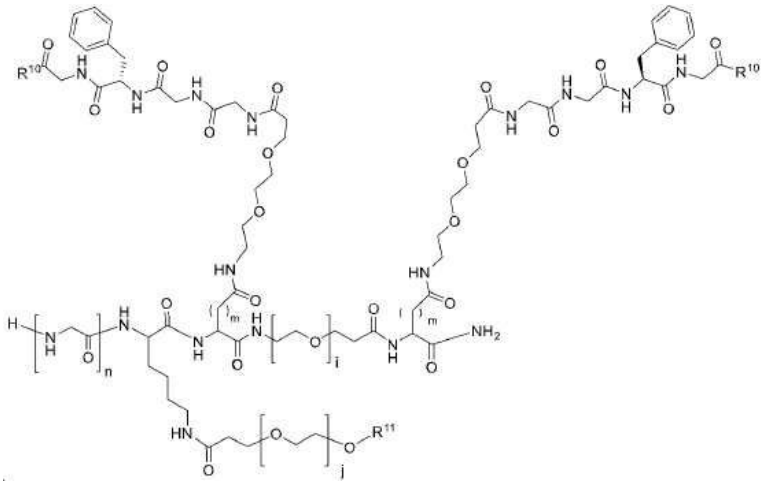
또는

[0253] 

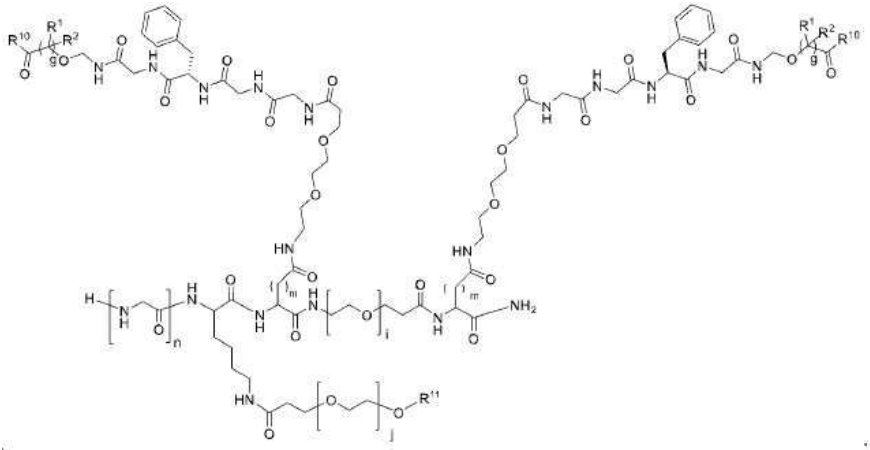
[0254] 일 구현예에서, n은 3이고, L^2는 $-(C_2H_4-O)_p-(CH_2)_2(CO)-$이고, p는 2이고, L^1은 GGFG이고, B는 $-NH-CH_2-U-R^{10}$ 또는 $-R^{10}$ 또는 $-NH-CH_2-U-(CR^1R^2)_g-(CO)-R^{10}$이고, U는 O이고, g는 1이다. 일 구현예에서, I-b-1은 다음의 구조를 갖는

다:

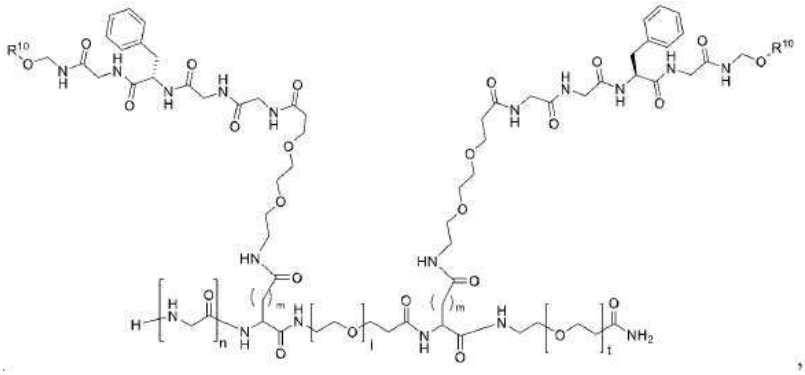
[0255] 

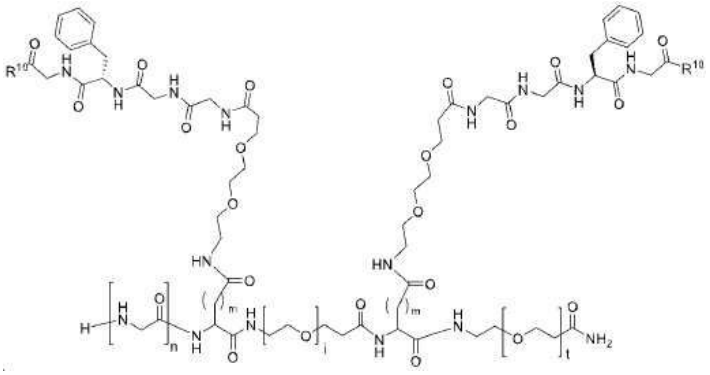
[0256] 

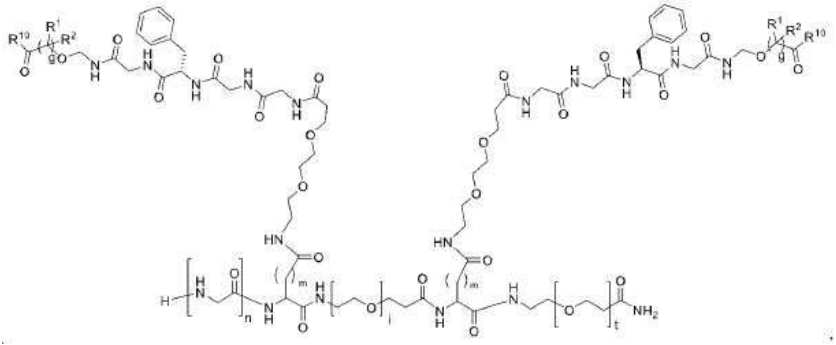
또는

[0257] 

[0258] 일 구현예에서, n은 3이고, L^2는 $-(C_2H_4-O)_p-(CH_2)_2(CO)-$이고, p는 2이고, L^1은 GGFG이고, B는 $-NH-CH_2-U-R^{10}$ 또는 $-R^{10}$ 또는 $-NH-CH_2-U-(CR^1R^2)_g-(CO)-R^{10}$이고, U는 O이고, g는 1이다. 일 구현예에서, I-b-0은 다음의 구조를 갖는다:

[0259] 

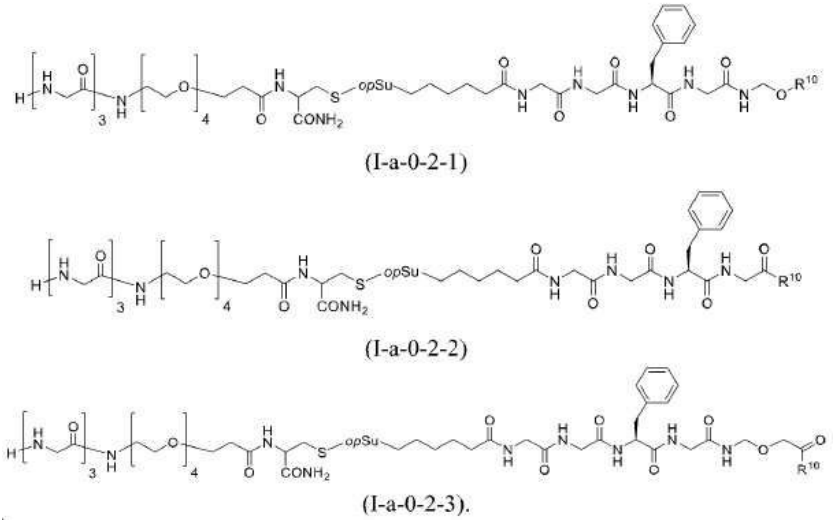
[0260]  또는

[0261] 

[0262] 일 구현예에서, i는 4이고, g는 1이고, R^{11}은 메틸이다.

[0263] 일 구현예에서, i는 2이고, g는 1이고, R^{11}은 메틸이다.

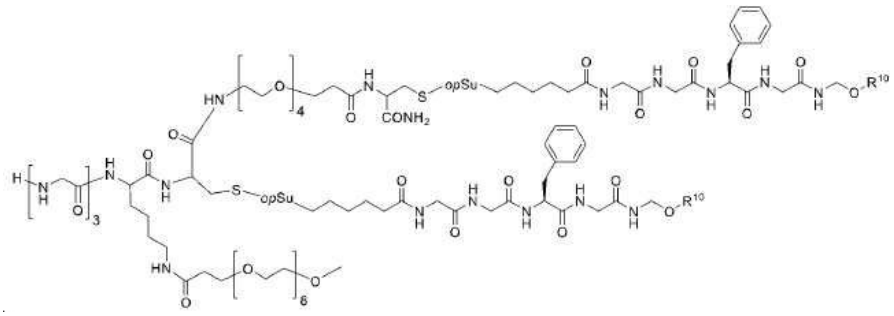
[0264] 일 구현예에서, I-a-0-2는 다음과 같다 (I-a-0-2-1 내지 I-a-0-2-3):

[0265] 
(I-a-0-2-1)

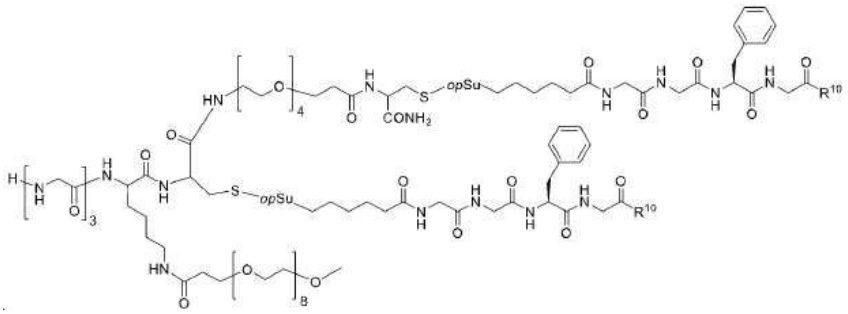
(I-a-0-2-2)

(I-a-0-2-3).

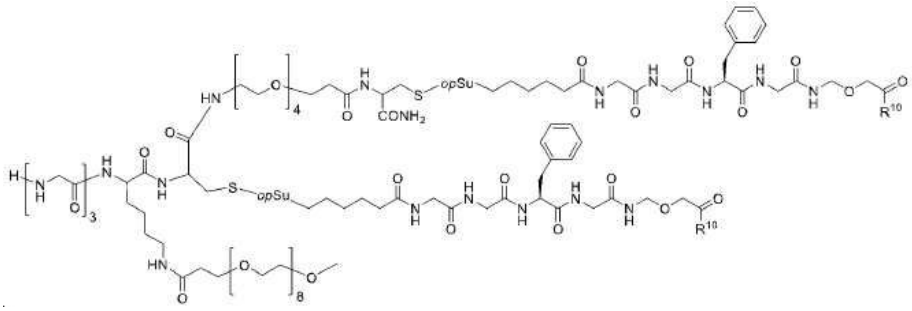
[0266] 일 구현예에서, i는 4이고, j는 8이고, g는 1이고, R^{11}은 메틸이다. 일 구현예에서, I-a-1-2는 다음과 같다 (I-a-1-2-1 내지 I-a-1-2-3):

[0267] 

[0268] (I-a-1-2-1)

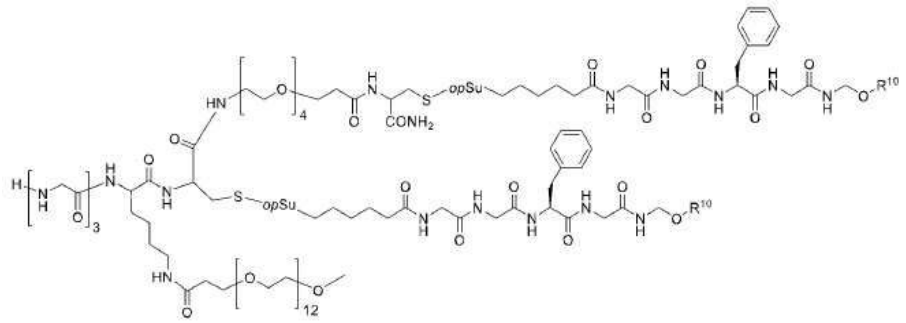
[0269] 

[0270] (I-a-1-2-2)

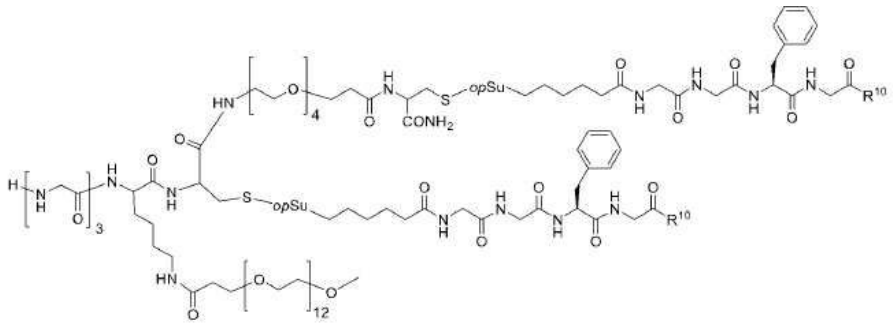
[0271] 

[0272] (I-a-1-2-3).

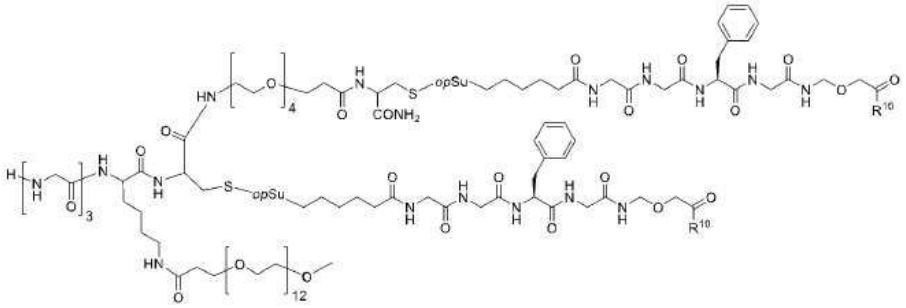
[0273] 일 구현예에서, n은 3이고, i는 4이고, j는 12이고, g는 1이고, R^{11}은 메틸이다. 일 구현예에서, I-a-1-2는 다음과 같다 (I-a-1-2-4 내지 I-a-1-2-6):

[0274] 

(I-a-1-2-4)



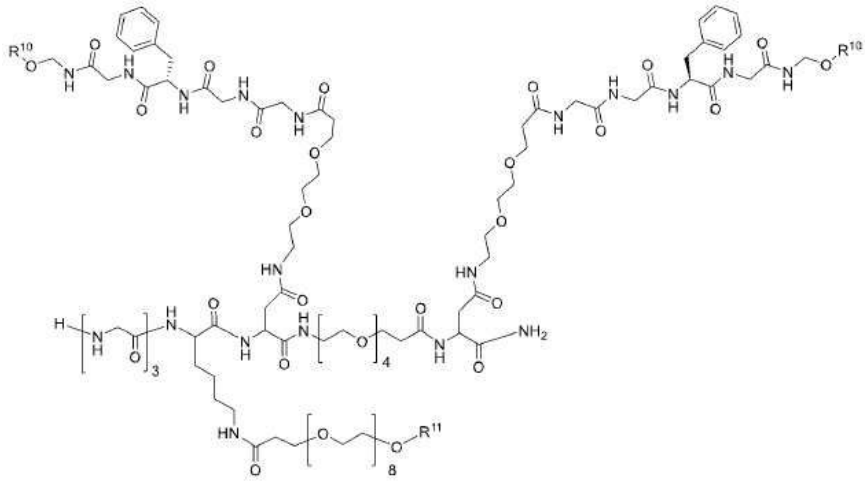
(I-a-1-2-5)



(I-a-1-2-6).

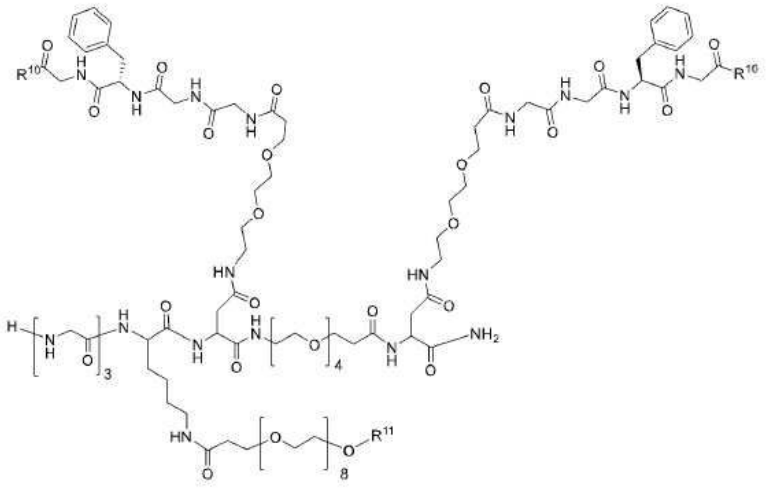
[0275]

[0276] 일 구현예에서, i는 4이고, j는 8이고, g는 1이고, m은 1이고, n은 3이고, R^{11}은 메틸이다. 일 구현예에서, I-b-1은 다음과 같다 (I-b-1-1 내지 I-b-1-3):

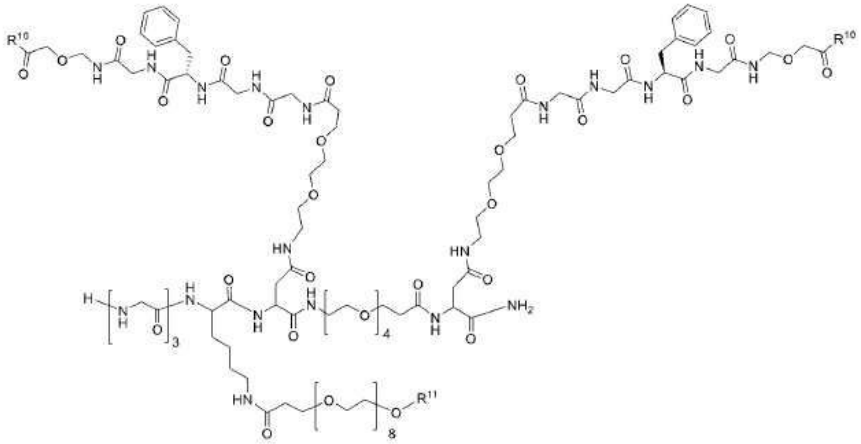


(I-b-1-1)

[0277]



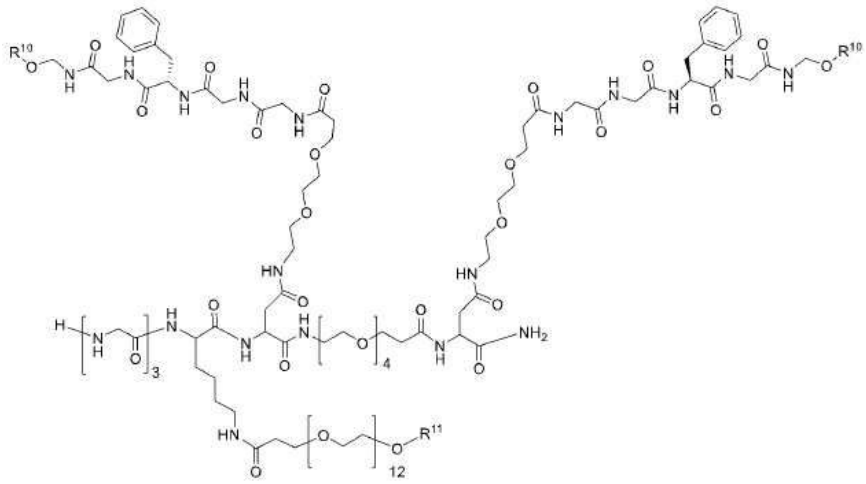
(I-b-1-2)



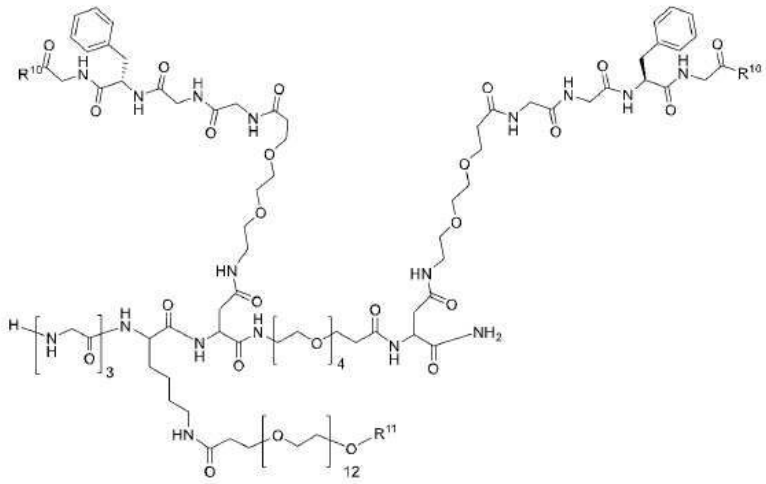
(I-b-1-3).

[0278]

[0279] 일 구현예에서, i는 4이고, j는 12이고, g는 1이고, m은 1이고, n은 3이고, R^{11}은 메틸이다. 일 구현예에서, I-b-1은 다음과 같다 (I-b-1-4 내지 I-b-1-1-6):

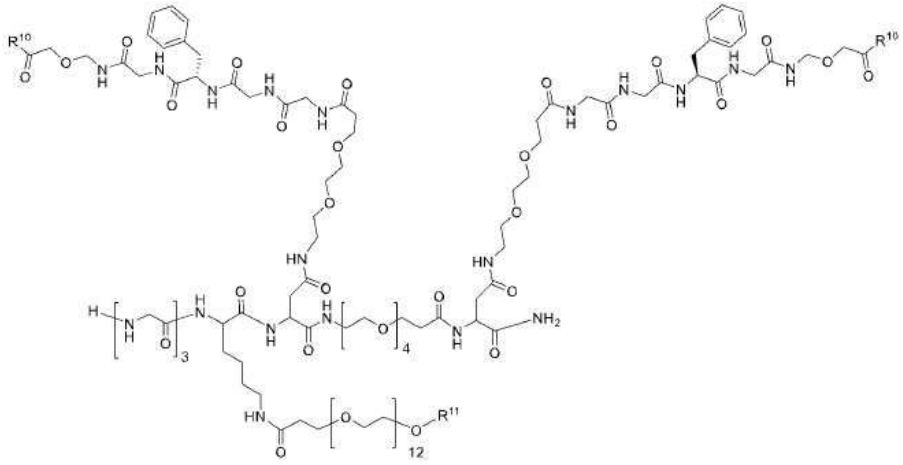


(I-b-1-4)



(I-b-1-5)

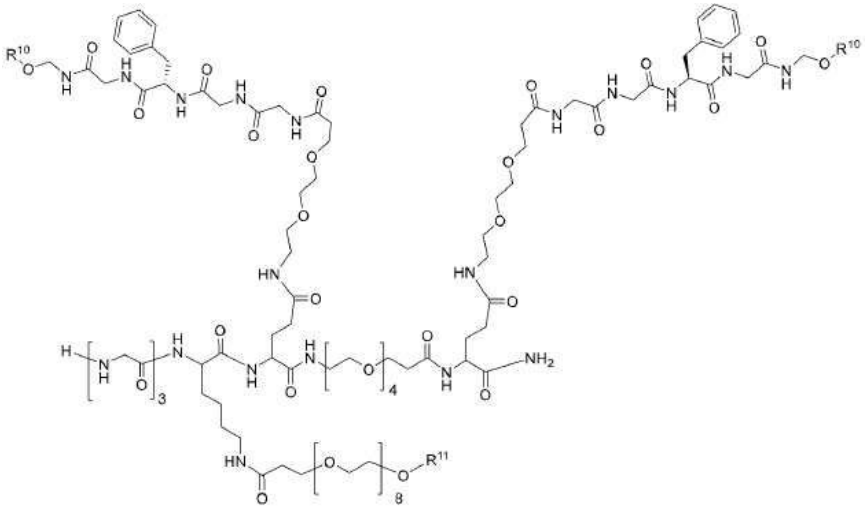
[0280]



(I-b-1-6).

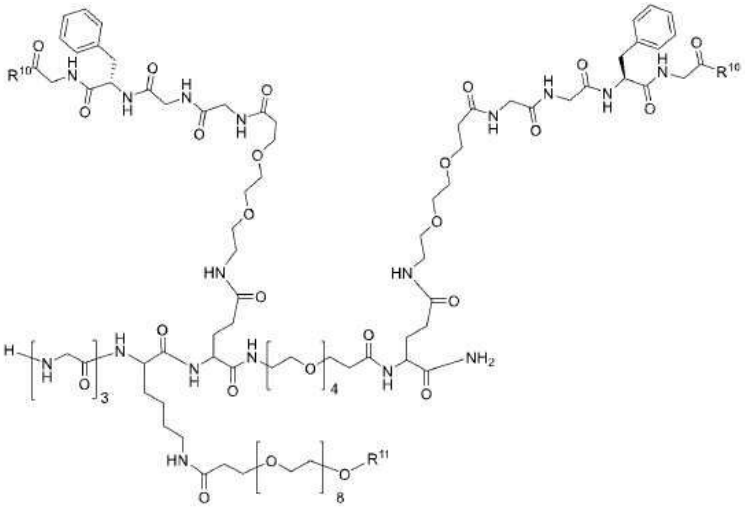
[0281]

[0282] 일 구현예에서, i는 4이고, j는 8이고, g는 1이고, m은 2이고, n은 3이고, R^{11}은 메틸이다. 일 구현예에서, I-b-1은 다음과 같다 (I-b-1-7 내지 I-b-1-9):

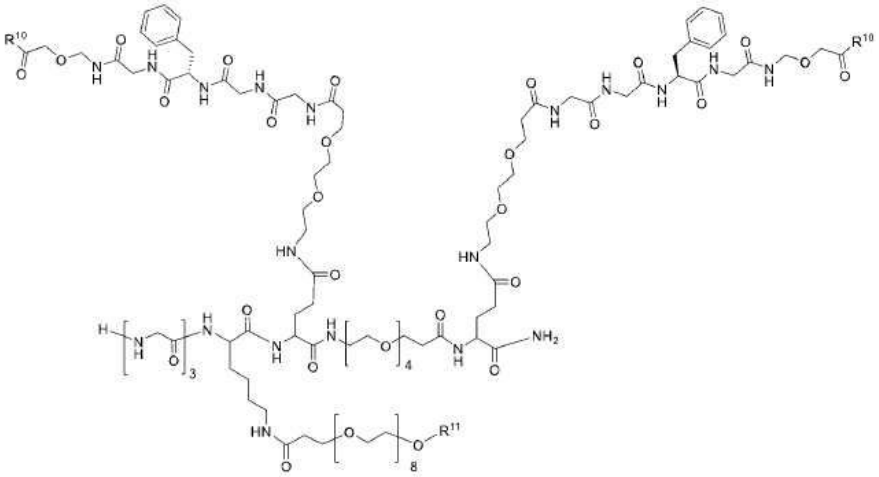


(I-b-1-7)

[0283]



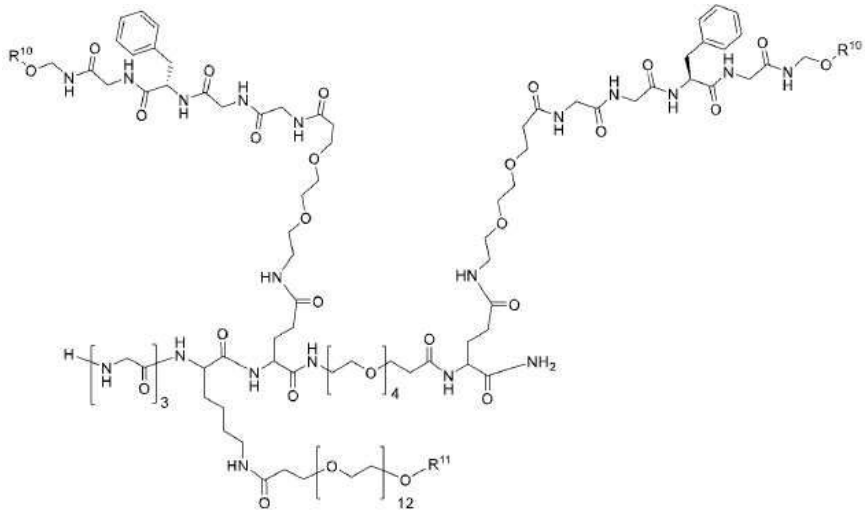
(I-b-1-8)



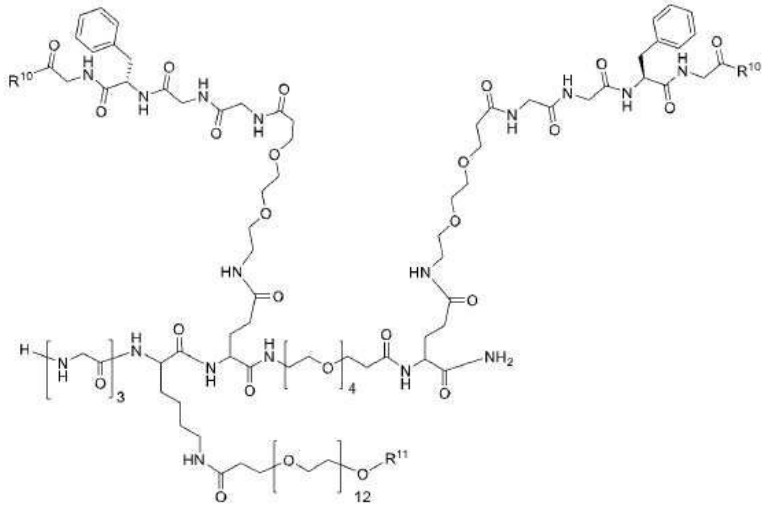
(I-b-1-9).

[0284]

[0285] 일 구현예에서, i는 4이고, j는 12이고, g는 1이고, m은 2이고, n은 3이고, R^{11}은 메틸이다. 일 구현예에서, I-b-1은 다음과 같다 (I-b-1-10 내지 I-b-1-12):

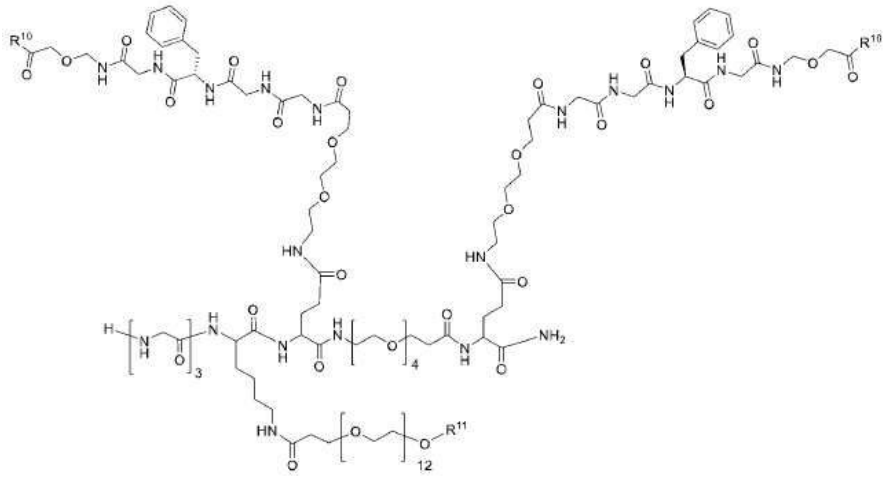


(I-b-1-10)



(I-b-1-11)

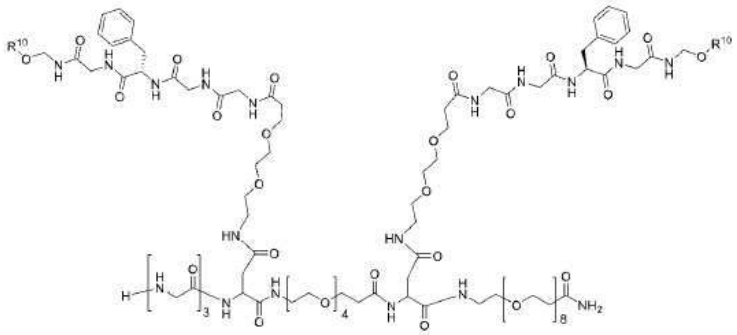
[0286]



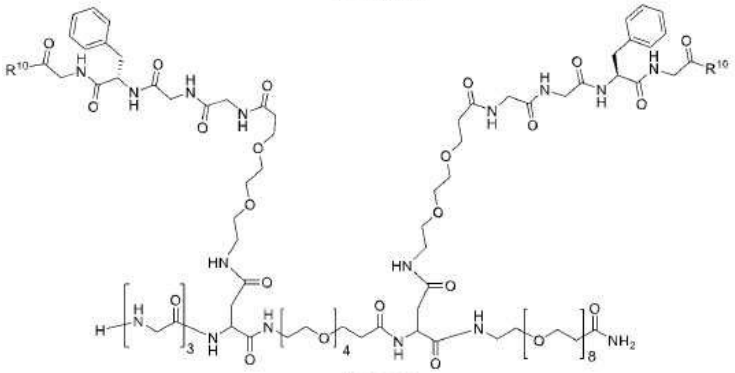
(I-b-1-12).

[0287]

[0288] 일 구현예에서, i는 4이고, t는 8이고, g는 1이고, m은 1이고, n은 3이고, R^{11}은 메틸이다. 일 구현예에서, I-b-0은 다음과 같다 (I-b-0-1 내지 I-b-0-3):

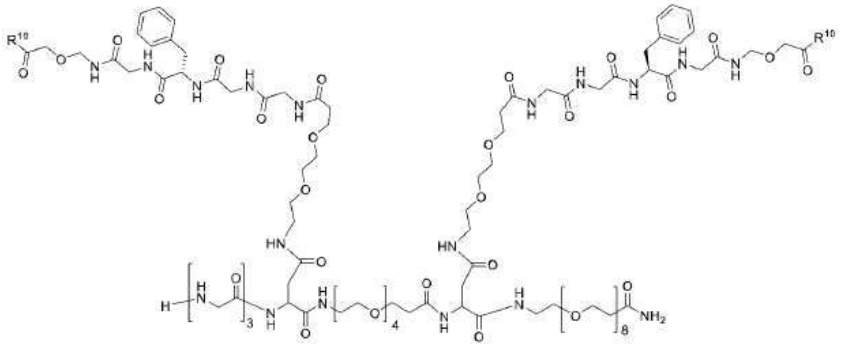


(I-b-0-1)



(I-b-0-2)

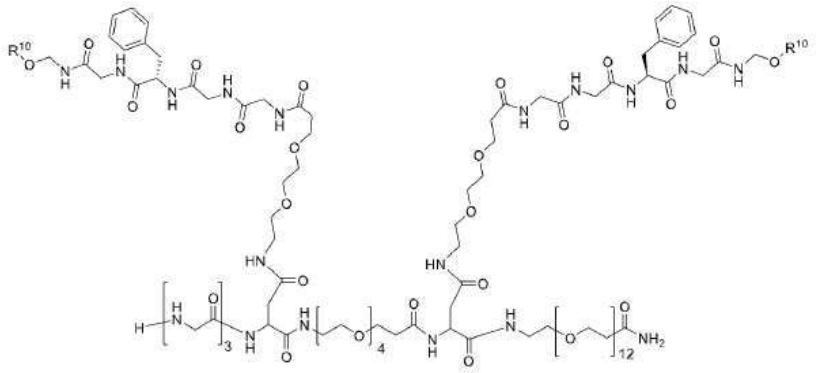
[0289]



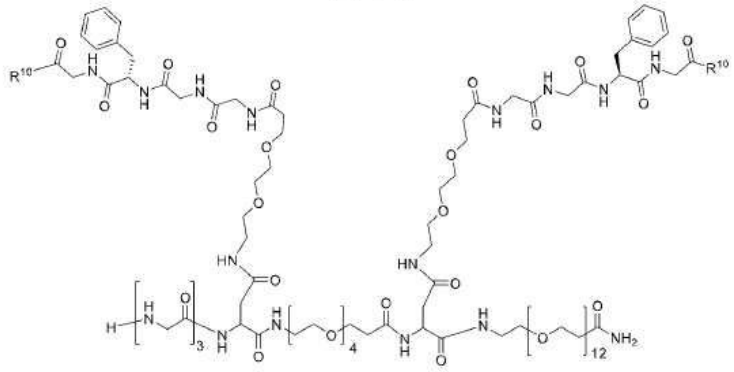
(I-b-0-3).

[0290]

[0291] 일 구현예에서, i는 4이고, t는 12이고, g는 1이고, m은 1이고, n은 3이고, R^{11}은 메틸이다. 일 구현예에서, I-b-0은 다음과 같다 (I-b-0-4 내지 I-b-0-6):

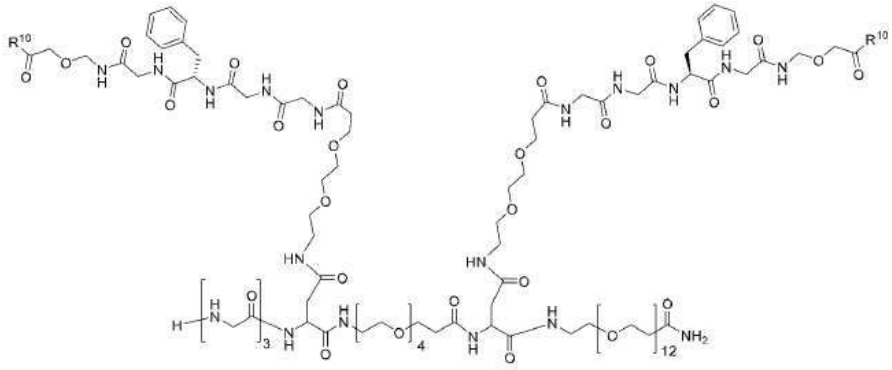


(I-b-0-4)



(I-b-0-5)

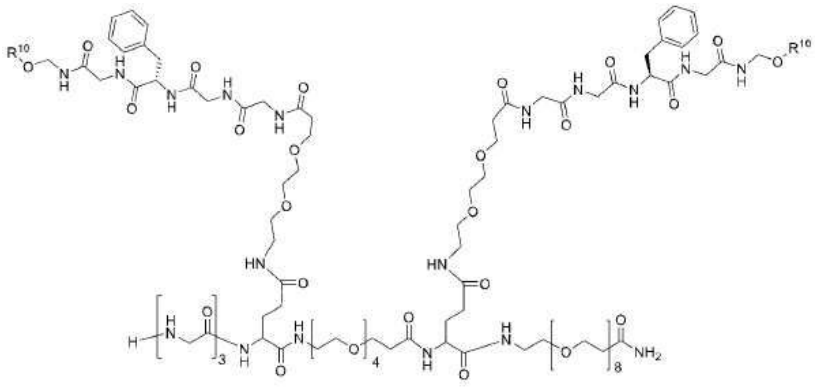
[0292]



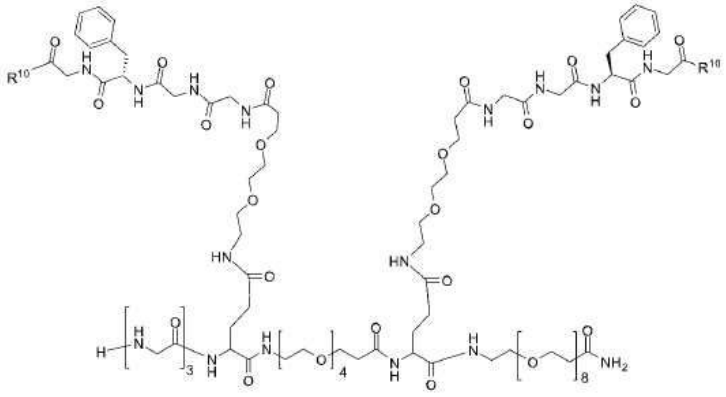
(I-b-0-6).

[0293]

[0294] 일 구현예에서, i는 4이고, t는 8이고, g는 1이고, m은 2이고, n은 3이고, R^{11}은 메틸이다. 일 구현예에서, I-b-0은 다음과 같다 (I-b-0-7 내지 I-b-0-9):

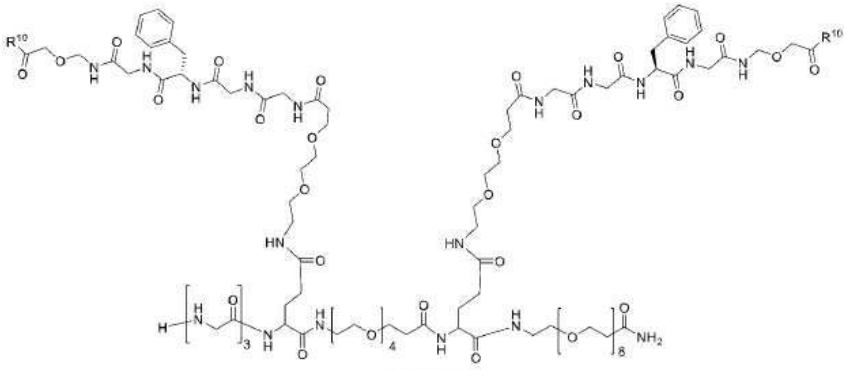


(I-b-0-7)



(I-b-0-8)

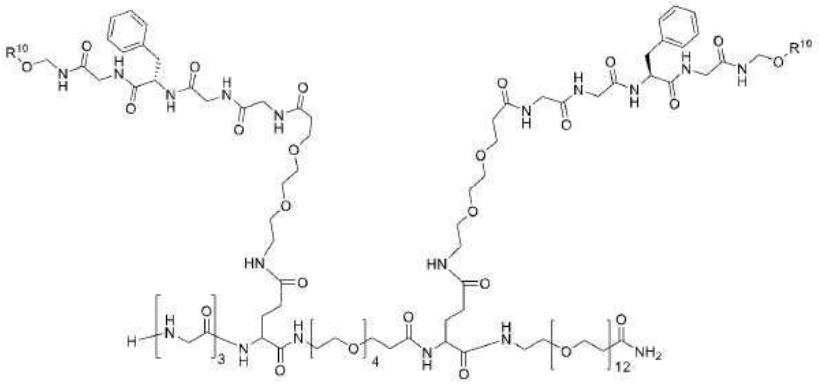
[0295]



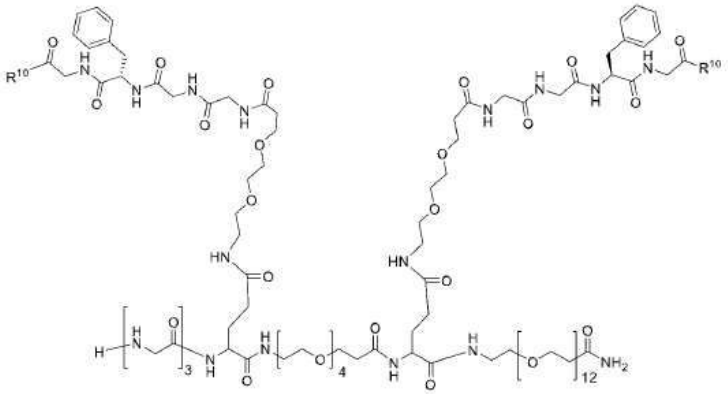
(I-b-0-9).

[0296]

[0297] 일 구현예에서, i는 4이고, t는 12이고, g는 1이고, m은 2이고, n은 3이고, R^{11}은 메틸이다. 일 구현예에서, I-b-0은 다음과 같다 (I-b-0-10 내지 I-b-0-12):

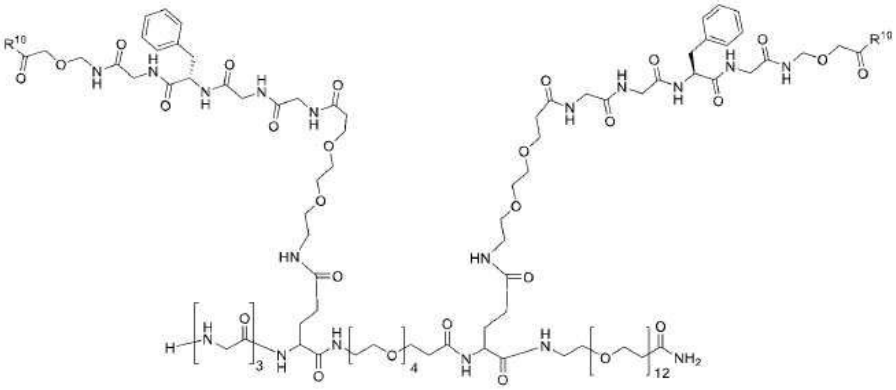


(I-b-0-10)



(I-b-0-11)

[0298]



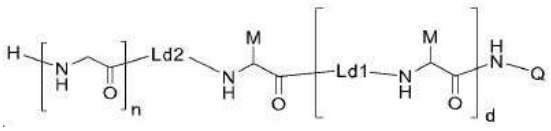
(I-b-0-12).

[0299]

[0300] 페이로드-보유 화학식 (I) 화합물

[0301] B에 의해 포함된 반응성 기는 또 다른 반응성 기를 함유하는 페이로드와 공유적으로 접합되어 페이로드-보유 화학식 (I) 화합물을 제공한다.

[0302] 더욱 또 다른 양태에서, 화학식 (II)의 구조를 갖는 화합물이 제공된다

[0303]  화학식 (II)

[0304] 식중

[0305] Q는 수소, $-C_2H_4-(PEG)_t-(CO)NH_2$ 또는 LKb-P이고;

[0306] M은 수소 또는 LKa-LKb-P이고;

[0307] 다만 Q 및 M은 동시에 수소가 아니고;

[0308] P는 화학식 (I)의 화합물의 B 모이어티 또는 L^1 모이어티에 결합되는 페이로드이고;

[0309] n, d, Ld1, Ld2, t, LKa 및 LKb는 화학식 (I)에 정의된 바와 같음.

[0310] 상기 본원에 정의된 대로, 화학식 (I)의 화합물에서, 각 LKb는 독립적으로 L^2-L^1-B이고; 각 B는 독립적으로 말단 기 R^{10}, 또는 하기 1), 2) 및 3)의 조합이고: 1) 자가-희생 스페이서 Sp1; 2) 결합, 또는 $-CR^1R^2-$, C_{1-10} 알킬렌, C_{4-10} 시클로알킬렌, C_{4-10} 헤테로시클릴렌 및 -(CO)-로부터 선택된 2가 기 중 하나 또는 이들 중 둘 이상의 조합; 및 3) 말단 기 R^{10}; R^{10}은 수소, 또는 페이로드에서 한 기와 반응하는 때 이탈할 수 있는 기이다. 일 구현예에서, R^{10}은 페이로드와 B의 반응에서 비롯하는 생성물 분자에서 나타나지 않을 구조의 부분을 나타낸다.

[0311] 일 구현예에서, P는 화학식 (I)의 화합물의 B 모이어티에 결합되어 화학식 (II)의 화합물을 형성한다. 상기 정의된 대로, R^{10}은 화학식 (II)의 화합물의 B-P 구조에서 나타나지 않을 것이다.

[0312] 화학식 (I)의 화합물에서 B가 말단 기 R^{10}인 때, R^{10}이 화학식 (II)의 화합물에서 나타나지 않을 것임이 이해되어야 한다. 그러므로, 결과적으로, B는 화학식 (II)의 화합물의 B-P 구조에서 부재하다.

[0313] 일 구현예에서, M은 수소 또는 LKa-L^2-L^1-B-P이고; 여기서 P는 화학식 (I)의 화합물의 B 모이어티 또는 L^1 모이어티에 결합되는 페이로드이고; 각 B는 독립적으로 말단 기 R^{10}, 또는 하기 1), 2) 및 3)의 조합이고: 1) 자가-희생 스페이서 Sp1; 2) 결합, 또는 $-CR^1R^2-$, C_{1-10} 알킬렌, C_{4-10} 시클로알킬렌, C_{4-10} 헤테로시클릴렌 및 -(CO)-로부터 선택된 2가 기 중 하나 또는 이들 중 둘 이상의 조합; 및 3) 말단 기 R^{10}; R^{10}은 수소, 또는 페이로드에서 한 기와 반응하는 때 이탈할 수 있는 기이고; R^{10}은 페이로드와 B의 반응에서 비롯하는 생성물 분자에서 나타나지 않을 구조의 부분을 나타낸다.

[0314] 일 구현예에서, M은 수소 또는 LKa-L^2-L^1-B-P이고; 여기서 각 B는 독립적으로 부재하거나, 하기 1) 및 2)의 조합이다: 1) 자가-희생 스페이서 Sp1; 및 2) 결합, 또는 $-CR^1R^2-$, C_{1-10} 알킬렌, C_{4-10} 시클로알킬렌, C_{4-10} 헤테로시클릴렌 및 -(CO)-로부터 선택된 2가 기 중 하나 또는 이들 중 둘 이상의 조합. 바람직한 구현예에서, M은 수소 또는 LKa-L^2-L^1-B-P이고; 여기서 각 B는 독립적으로 부재하거나, $-NH-CH_2-U-$이거나 $-NH-CH_2-U-(CR^1R^2)_g-(CO)-$이다. 또 다른 구현예에서, M은 수소 또는 LKa-L^2-L^1-B-P이다. 일 구현예에서, LKa-L^2-L^1-B-P에서, B는 부재하다. 일 구현예에서, LKa-L^2-L^1-B-P에서, B는 하기 1) 및 2)의 조합이다: 1) 자가-희생 스페이서 Sp1; 및 2) 결합, 또는 $-CR^1R^2-$, C_{1-10} 알킬렌, C_{4-10} 시클로알킬렌, C_{4-10} 헤테로시클릴렌 및 -(CO)-로부터 선택된 2가 기 중 하나 또는 이들 중 둘 이상의 조합. 일 구현예에서, LKa-L^2-L^1-B-P에서, B는 $-NH-CH_2-U-$이거나 $-NH-CH_2-U-(CR^1R^2)_g-(CO)-$이고; U는 부재하거나, O, S 또는 NH, 바람직하게는 O 또는 S이다. 일 구현예에서, 화학식 (I)의 화합물에서 B는 아미드 결합 또는 에스테르 결합 또는 에테르 결합을 통해서 페이로드에 연결된다.

[0315] 상기 본원에 정의된 대로, 화학식 (I)의 화합물에서 B가 말단 기 R^{10}인 때, B는 화학식 (II)의 화합물의 B-P 구조에서 부재하다. 이러한 경우에, L^1에서 절단가능한 서열 1이 페이로드에 연결되어 화학식 (II)의 화합물을 형성하는 것이 또한 이해될 수 있고, 여기서 B는 페이로드와 절단가능한 서열 1의 연결의 생성된 분자에서 부재하다. 따라서, 일 구현예에서, P는 화학식 (I)의 화합물의 L^1 모이어티에 결합되어 화학식 (II)의 화합물을 형성한다. 따라서, 일 구현예에서, M은 LKa-L^2-L^1-B-P이고, B는 부재하고; M은 LKa-L^2-L^1-P로서 또한 표시될 수 있다.

[0316] **페이로드**

[0317] 본 개시내용에서, 페이로드는 작은 분자 화합물, 핵산 및 유사체, 추적자 분자 (형광성 분자, 등 포함), 짧은 펩티드, 폴리펩티드, 펩티도미메틱스, 및 단백질로 이루어지는 군으로부터 선택될 수 있다. 일 구현예에서, 페

이로드는 작은 분자 화합물, 핵산 분자, 및 추적자 분자로 이루어지는 군으로부터 선택된다. 바람직한 구현예에서, 페이로드는 작은 분자 화합물로부터 선택된다. 더욱 바람직한 구현예에서, 페이로드는 세포독소 및 이의 단편으로 이루어지는 군으로부터 선택된다.

[0318] 일 구현예에서, 세포독소는 미세소관 세포골격을 표적화하는 약물로 이루어지는 군으로부터 선택된다. 바람직한 구현예에서, 세포독소는 탁산, 메이탄시노이드, 아우리스타틴, 에포틸론, 콤브레타스타틴 A-4 포스페이트, 콤브레타스타틴 A-4 및 이들의 유도체, 인돌-술폰아미드, 빈블라스틴 예컨대 빈블라스틴, 빈크리스틴, 빈데신, 비노렐빈, 빈플루닌, 빈글리시네이트, 안히드로빈블라스틴, 돌라스타틴 10 및 유사체, 할리콘드린 B 및 에리불린, 인돌-3-옥소아세트아미드, 포도필로톡신, 7-디에틸아미노-3-(2'-벤즈옥사졸릴)-쿠마린 (DBC), 디스코데르몰리드, 라울리말리드로 이루어지는 군으로부터 선택된다. 또 다른 구현예에서, 세포독소는 DNA 토포이소머라제 억제제 예컨대 캄프토테신 및 이의 유도체, 미톡산트론, 미토구아존으로 이루어지는 군으로부터 선택된다. 바람직한 구현예에서, 세포독소는 질소 머스타드 예컨대 클로람부실, 클로르나파진, 콜로포스파미드, 에스트라무스틴, 이포스파미드, 메클로레타민, 메클로레타민 옥시드 히드로클로리드, 멜팔란, 노벰비친, 페나메트, 페네스테린, 프레드니무스틴, 트로포스파미드, 우라실 머스타드로 이루어지는 군으로부터 선택된다. 더욱 또 다른 바람직한 구현예에서, 세포독소는 니트로소우레아 예컨대 카르무스틴, 플루벤주론, 포르모테롤, 로무스틴, 니무스틴, 라무스틴으로 이루어지는 군으로부터 선택된다. 일 구현예에서, 세포독소는 아지리딘으로 이루어지는 군으로부터 선택된다. 바람직한 구현예에서, 세포독소는 벤조도파, 카르보쿠온, 메투레데파, 및 우레데파로 이루어지는 군으로부터 선택된다. 일 구현예에서, 세포독소는 항-종양 항생제로 이루어지는 군으로부터 선택된다. 바람직한 구현예에서, 세포독소는 에네디인 항생제로 이루어지는 군으로부터 선택된다. 더욱 바람직한 구현예에서, 세포독소는 다이네미신, 에스페라미신, 네오카르지노스타틴, 및 아클라시노마이신으로 이루어지는 군으로부터 선택된다. 또 다른 바람직한 구현예에서, 세포독소는 악티노마이신, 안트라마이신, 블레오마이신, 악티노마이신 C, 카라비신, 카르미노마이신, 및 카르디노필린, 카르미노마이신, 악티노마이신 D, 다우노루비신, 데토루비신, 아드리아마이신, 에피루비신, 에소루비신, 이다루비신, 마르셀로마이신, 미토마이신, 노갈라마이신, 올리보마이신, 페플로마이신, 포르피로마이신, 푸로마이신, 철 아드리아마이신, 로도루비신, 루포크로모마이신, 스트렙토조신, 지노스타틴, 조루비신으로 이루어지는 군으로부터 선택된다. 더욱 또 다른 바람직한 구현예에서, 세포독소는 트리코테센으로 이루어지는 군으로부터 선택된다. 더욱 바람직한 구현예에서, 세포독소는 T-2 독소, 베라쿠린 A, 바실록포린 A, 및 앙귀딘으로 이루어지는 군으로부터 선택된다. 일 구현예에서, 세포독소는 항-종양 아미노산 유도체로 이루어지는 군으로부터 선택된다. 바람직한 구현예에서, 세포독소는 우베니멕스, 아자세린, 6-디아조-5-옥소-L-노르류신으로 이루어지는 군으로부터 선택된다. 또 다른 구현예에서, 세포독소는 엽산 유사체로 이루어지는 군으로부터 선택된다. 바람직한 구현예에서, 세포독소는 디메틸 엽산, 메토트렉세이트, 프테로프테린, 트리메트렉세이트, 및 에다트렉세이트로 이루어지는 군으로부터 선택된다. 일 구현예에서, 세포독소는 퓨린 유사체로 이루어지는 군으로부터 선택된다. 바람직한 구현예에서, 세포독소는 플루다라빈, 6-머캅토퓨린, 티아미프린, 티오구아닌으로 이루어지는 군으로부터 선택된다. 더욱 또 다른 구현예에서, 세포독소는 피리미딘 유사체로부터 선택된다. 바람직한 구현예에서, 세포독소는 안시타빈, 젬시타빈, 에노시타빈, 아자시티딘, 6-아자우리딘, 카르모푸르, 시타라빈, 디데옥시우리딘, 독시플루리딘, 플록스우리딘으로 이루어지는 군으로부터 선택된다. 일 구현예에서, 세포독소는 안드로겐으로 이루어지는 군으로부터 선택된다. 바람직한 구현예에서, 세포독소는 칼루스테론, 드로모스타놀론 프로피오네이트, 에피티오스타놀, 메피티오스탄, 테스토락톤으로 이루어지는 군으로부터 선택된다. 또 다른 구현예에서, 세포독소는 항-아드레날로 이루어지는 군으로부터 선택된다. 바람직한 구현예에서, 세포독소는 아미노글루테티미드, 미토탄, 및 트릴로스탄으로 이루어지는 군으로부터 선택된다. 일 구현예에서, 세포독소는 항-안드로겐으로 이루어지는 군으로부터 선택된다. 바람직한 구현예에서, 세포독소는 플루타미드, 닐루타미드, 비칼루타미드, 류프로렐린 아세테이트, 및 고세렐린으로 이루어지는 군으로부터 선택된다. 더욱 또 다른 구현예에서, 세포독소는 단백질 키나제 억제제 및 프로테아솜 억제제로 이루어지는 군으로부터 선택된다. 또 다른 구현예에서, 세포독소는 빈블라스틴, 콜히친, 탁산, 아우리스타틴, 메이탄시노이드, 칼리케아미신, 독소누비신, 듀오카르무신, SN-38, 크립토피신 유사체, 데룩스테칸, 듀오카르마진, 칼리케아미신, 센타나마이신, 돌라스탄신, 및 피롤로벤조디아제핀 (PBD)으로 이루어지는 군으로부터 선택된다. 특정한 구현예에서, 세포독소는 빈블라스틴, 콜히친, 탁산, 아우리스타틴, 및 메이탄시노이드로 이루어지는 군으로부터 선택된다.

[0319] 특정한 구현예에서, 세포독소는 엑사테칸 또는 이의 유도체, 예컨대 DX8951f 및 기타 등등이다.

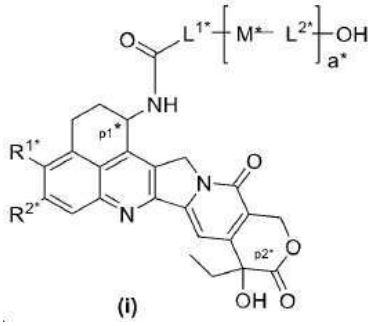
[0320] 또 다른 특정한 구현예에서, 세포독소는 메이탄시노이드, 예컨대 DM1 및 기타 등등이다. 티올 모이어티가 티오숙신이미드, 예를 들어 메이탄시노이드, 예를 들면, DM1을 형성하기 위해 말레이미드 모이어티와 반응할 수 있는, 티올 모이어티를 포함하는 세포독소가 사용되는 경우, 세포독소가 티오숙신이미드를 통해 직접적으로 결합

할 수 있음을 주목한다. 이러한 경우에, 일부 구현예에서 페이로드 및 티올 모이어티가 세포독소를 함께 구성하고, 그러므로 이러한 경우에 페이로드가 티올 모이어티를 제외한 세포독소 분자의 나머지 모이어티를 나타냄이 이해될 수 있다.

[0321] 특정한 구현예에서, 세포독소는 아우리스타틴, 예컨대 MMAE (모노메틸 아우리스타틴 E), MMAF (모노메틸 아우리스타틴 F), MMAD (모노메틸 아우리스타틴 D) 및 기타 등등이다. 아우리스타틴 화합물의 합성 및 구조는 US20060229253에 기재되고, 이의 전체 개시내용은 참조로 본원에 포함된다.

[0322] 페이로드는 화학식 (I)의 화합물에서 반응성 기와 반응하고 그래서 화학식 (I)의 화합물과 페이로드를 공유적으로 접합할 수 있는 반응성 기를 함유한다. 반응성 기를 함유하지 않는 화합물은 페이로드를 제공하기 위해 적절한 유도체화를 요구한다.

[0323] 일 구현예에서, 세포독소는 하기 화학식 (i)의 화합물이다

[0324] 

(i)

[0325] 식중,

[0326] a*는 0 또는 1이고;

[0327] p1* 및 p2*로 표시된 탄소 원자는 각각 비대칭 중심이고, 비대칭 중심은 *S* 구성, *R* 구성 또는 라세미이고;

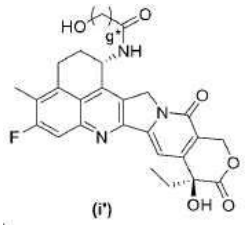
[0328] L^{1*}는, 비치환되거나 할로겐, -OH 및 $-NH_2$로부터 선택된 하나의 치환체로 치환되는, C_{1-6} 알킬렌으로부터 선택되고;

[0329] M*는 $-CH_2-$, -NH- 또는 -O-이고;

[0330] L^{2*}는 C_{1-3} 알킬렌이고;

[0331] R^{1*} 및 R^{2*}는 각각 독립적으로 수소, C_{1-6} 알킬, 할로겐 및 C_{1-6} 알콕시로부터 선택됨.

[0332] 특정한 구현예에서, 세포독소는 하기 화학식 (i')의 화합물이다

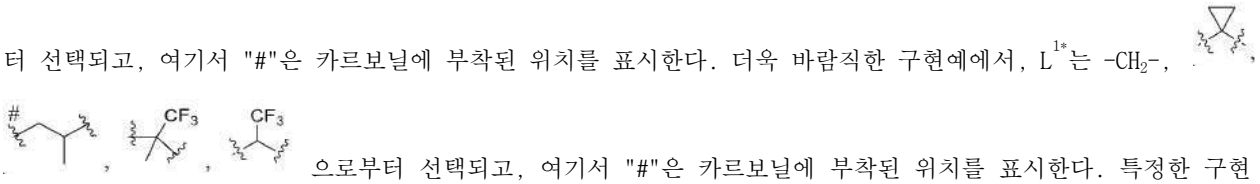
[0333] 

(i')

[0334] 식중, g는 1 내지 6의 임의의 정수임.

[0335] 일 구현예에서, g*는 1 내지 3, 바람직하게는 1의 임의의 정수이다.

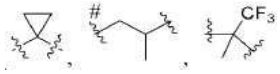
[0336] 일 구현예에서, L^{1*}는, 각각 독립적으로 비치환되거나 할로겐, -OH 및 $-NH_2$로부터 선택된 하나의 치환체로 치환되는, C_{1-6} 선형 알킬렌, C_{1-6} 분지형 알킬렌, C_{3-6} 환식 알킬렌 및 C_{3-4} 환식 알킬-C_{1-2} 선형 알킬렌 기로부터 선택된다. 일 구현예에서, L^{1*}는, 비치환되거나 할로겐, -OH 및 $-NH_2$로부터 선택된 하나의 치환체로 치환되는, C_{1-4} 알

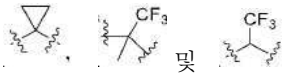
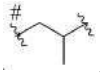
킬렌으로부터 선택된다. 바람직한 구현예에서, L^{1*}는, 각각 독립적으로 비치환되거나 할로겐, -OH 및 $-NH_2$로부터 선택된 적어도 하나의 치환체로 치환되는, $-CH_2-$, $-C_2H_4-$,  으로부터 선택된다. 바람직한 구현예에서, L^{1*}는 $-CH_2-$,  으로부터 선택되고, 여기서 "#"은 카르보닐에 부착된 위치를 표시한다. 더욱 바람직한 구현예에서, L^{1*}는 $-CH_2-$,  으로부터 선택되고, 여기서 "#"은 카르보닐에 부착된 위치를 표시한다. 특정한 구현예에서, L^{1*}는 $-CH_2-$,  및  으로부터 선택되고, 여기서 "#"은 카르보닐에 부착된 위치를 표시한다. 바람직한 구현예에서, 할로겐은 F, Cl 및 Br, 특히 F로부터 선택된다.

[0337] 일 구현예에서, a*는 1이고, M*는 $-CH_2-$, -NH- 또는 -O-이고; L^{2*}는 $-C_2H_4-$이다. 또 다른 구현예에서, a*는 1이고, M*는 $-CH_2-$이고, L^{2*}는 $-CH_2-$이다. 일 구현예에서, a*는 0이다.

[0338] 일 구현예에서, p1*로 표시된 탄소 원자는 *S* 구성 또는 라세미, 바람직하게는 *S* 구성된다. 또 다른 구현예에서, p2*로 표시된 탄소 원자는 *S* 구성 또는 라세미, 바람직하게는 *S* 구성된다.

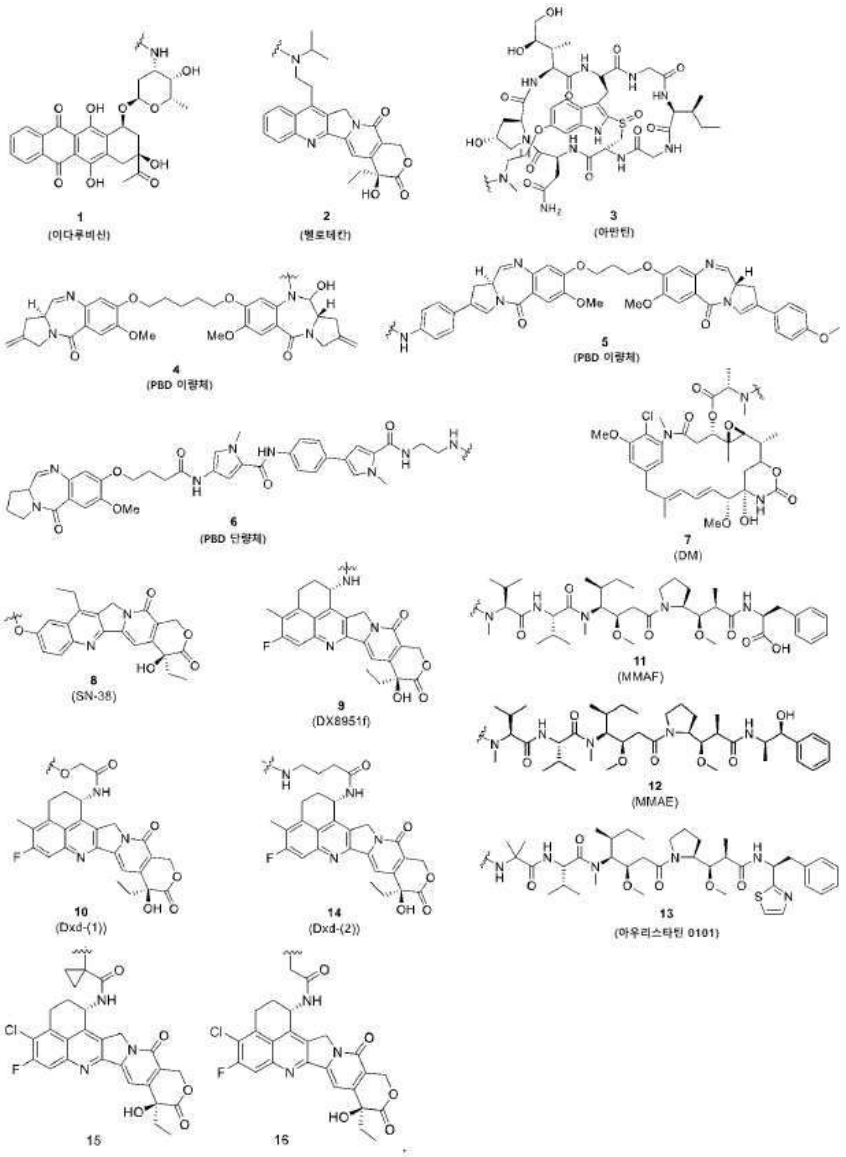
[0339] 일 구현예에서, R^{1*} 및 R^{2*}는 각각 독립적으로 수소, C_{1-3} 알킬, 할로겐 및 C_{1-3} 알콕시로부터 선택된다. 바람직한 구현예에서, R^{1*} 및 R^{2*}는 각각 독립적으로 CH_3-, F, Cl, Br 및 CH_3O-로부터 선택된다. 일 구현예에서, R^{1*}는 CH_3- 및 Cl로부터 선택된다. 또 다른 구현예에서, R^{2*}는 F이다.

[0340] 일 구현예에서, a*는 0이고, L^{1*}는 $-CH_2-$,  및  으로부터 선택되고, 여기서 "#"은 카르보닐에 부착된 위치를 표시한다. 일 구현예에서, a*는 1이고, L^{1*}는  이고, M*는 O이고, L^{2*}는 $-C_2H_4-$이다.

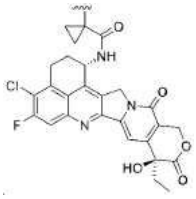
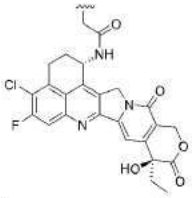
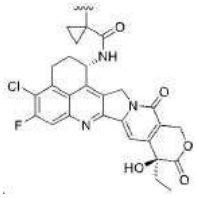
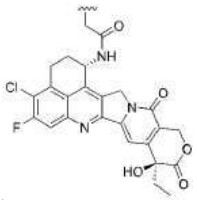
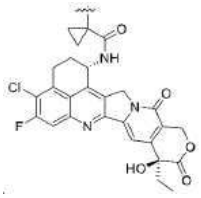
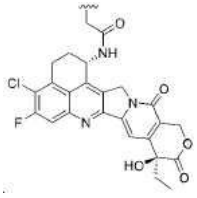
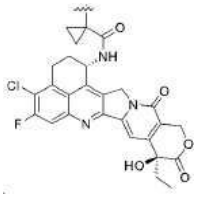
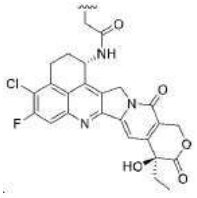
[0341] 일 구현예에서, a*는 0이고, R^{1*}는 Cl이고, R^{2*}는 F이고, L^{1*}는 $-CH_2-$,  으로부터 선택된다. 일 구현예에서, a*는 0이고, R^{1*}는 CH_3-이고, R^{2*}는 F이고, L^{1*}는  및  으로부터 선택되고, 여기서 "#"은 카르보닐에 부착된 위치를 표시한다.

[0342] 일 구현예에서, a*는 1이고, R^{1*}는 CH_3-이고, R^{2*}는 F이고, L^{1*}는  이고, M은 O이고, L^{2*}는 $-C_2H_4-$이다.

[0343] 일 구현예에서, 세포독소는 하기 화합물로부터 선택되고; 여기서 파상 결합은 화학식 (I)의 화합물과 연결을 위한 연결 부위를 보여준다.



[0344]

[0345] 일부 구현예에서, 페이로드는 DX8951f (화합물 9), DXd-(1) (화합물 10), DXd-(2) (화합물 14),  (화합물 15),  (화합물 16), 바람직하게는 DX8951f, DXd-(1)  또는 , 더욱 바람직하게는 DXd-(1),  또는 , 가장 바람직하게는  또는  으로부터 선택된다.

[0346] 페이로드-보유 화학식 (I) 화합물의 제조

[0347] 일 구현예에서, 결합 단위 및 페이로드는, 비제한적으로 축합 반응, 친핵성 첨가, 친전자성 첨가, 등을 포함하여, 당업계에서 알려진 임의의 반응을 사용하여, 상기 정의된 대로 반응성 기를 통해 연결된다.

[0348] 일 구현예에서, 페이로드는 세포독소이다. 일 구현예에서, 결합 단위-페이로드 중간체 (LBx로서 넘버링됨)는 하기 표에서 나타난 바와 같다.

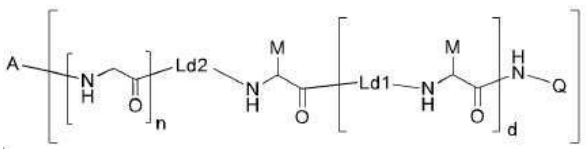
화학식 (II)의 화합물	링커의 화학식	i 및 j 의 값 (해당되는 경우)*	페이로드
II-a-0-1-1	I-a-0-1	-	화합물 10
II-a-0-2-1	I-a-0-2	i 는 4 임	화합물 10
II-a-0-3-1	I-a-0-3	i1 은 4 이고, i2 는 4 임	화합물 10
II-a-0-4-1	I-a-0-4	i1, i2, i3 은 각각 4 임	화합물 10
II-a-0-5-1	I-a-0-5	i1, i2, i3 및 i4 는 각각 4 임	화합물 10
II-a-1-1-1	I-a-1-1	j 는 8 임	화합물 10
II-a-1-1-4	I-a-1-1	j 는 12 임	화합물 10
II-a-1-2-1	I-a-1-2	i 는 4 이고, j 는 8 임	화합물 10
II-a-1-2-4-1	I-a-1-2	i 는 4 이고, j 는 12 임	화합물 10
II-a-1-2-4-2	I-a-1-2	i 는 4 이고, j 는 12 임	화합물 15
II-a-1-2-4-3	I-a-1-2	i 는 4 이고, j 는 12 임	화합물 16
II-a-1-2-6	I-a-1-2	i 는 4 이고, j 는 12 이고, g 는 1 이고, R^{11} 은 메틸임	화합물 9
II-a-1-3-1	I-a-1-3	i1 은 4 이고, i2 는 4 이고, j 는 8 임	화합물 10
II-a-1-3-4	I-a-1-3	i1 은 4 이고, i2 는 4 이고, j 는 12 임	화합물 10
II-a-1-4-1	I-a-1-4	i1, i2, i3 은 각각 4 이고, j 는 8 임	화합물 10
II-a-1-4-4	I-a-1-4	i1, i2, i3 은 각각 4 이고, j 는 12 임	화합물 10
II-b-1-1-4	I-b-1-1	i 는 4 이고, j 는 12 이고, g 는 1 이고, m 은 1 이고, R^{11} 은 메틸임	화합물 15

[0349] *: 나열된 모든 링커에 대하여, n 은 3 임.

[0350] 접합체 및 이의 제조

[0351] 게다가, 리가제 인식 서열을 포함하는 모이어티를 갖는 페이로드-보유 화학식 (I) 화합물은 리가제 인식 서열을 포함하는 다른 분자와 접합될 수 있고, 이로써 예를 들어, 표적화 분자-약물 접합체, 예컨대 항체-약물 접합체의 제조에서 사용될 수 있다. 따라서, 더욱 또 다른 양태에서, 화학식 (I)의 화합물, 표적화 분자, 및 페이로드를 포함하는 접합체가 제공된다.

[0352] 더욱 또 다른 양태에서, 화학식 (III)의 구조를 갖는 접합체가 제공된다:

[0353]  화학식 (III)

[0354] 식중,

[0355] n, d, Ld1 및 Ld2는 화학식 (I)에 정의된 바와 같고;

[0356] Q는 수소, $-C_2H_4-(PEG)_t-(CO)NH_2$ 또는 LKb-P이고;

[0357] M은 수소 또는 LKa-LKb-P이고;

[0358] 다만 Q 및 M은 동시에 수소가 아니고;

[0359] P는 화학식 (I)의 화합물의 B 모이어티 또는 L^1 모이어티에 결합되는 페이로드이고;

[0360] A는 화학식 (I)의 화합물의 G_n 모이어티에 결합되는 항-Trop2 항체 또는 이의 항원-결합 단편이고; G는 글리신이고;

[0361] z는 1 내지 20의 정수임.

[0362] 일 구현예에서, LKa 및 LKb는 화학식 (I)에 정의된 바와 같다.

[0363] 일 구현예에서, 접합체는 1 내지 20의 정수 또는 비-정수의 약물 대 항체 비 (DAR)를 갖는다.

[0364] 상기 본원에 정의된 대로, 일 구현예에서, 화학식 (I)의 화합물의 G_n 모이어티는, 리가제의 촉매화 하에서 표적화 분자와 화학식 (I)의 화합물의 효소-촉매화된 커플링을 촉진시키는, 리가제 수용체 기질의 인식 서열이다. 표적화 분자는 임의로 변형되고 리가제 수용체 또는 공여체 기질의 상응하는 인식 서열을 포함한다.

[0365] 항체 (또는 항원-결합 단편)가 리가제의 촉매화 하에서 화학식 (I)의 화합물의 G_n 모이어티와 접합하는 때, 리가제 수용체 기질의 인식 서열 및 리가제 공여체 기질의 인식 서열이 서로 반응하고 생성된 서열을 형성함이 이해되어야 한다.

[0366] 일 구현예에서, 항체 (또는 항원-결합 단편)는 리가제 공여체 기질의 인식 서열로서 LPXTGJ를 포함하고, 여기서 J는 상기 정의된 바와 같다. 리가제 수용체 기질의 상응하는 인식 서열인, G_n과 접합하는 때, LPXTGJ 서열에서 글리신의 업스트림 펩티드 결합은 소르타제 A에 의해 절단되고, 생성된 중간체는 G_n의 유리 N-말단에 결합되어 새로운 펩티드 결합을 생성한다. 생성된 서열은 $LPXTG_n$이다. 서열 G_n 및 LPXTGJ는 상기 정의된 바와 같다.

[0367] 일 구현예에서, P는 화학식 (I)의 화합물의 B 모이어티 또는 L^1 모이어티에 결합되고 A는 화학식 (III)의 화합물을 형성하기 위해 화학식 (I)의 화합물의 G_n 모이어티에 결합된다.

[0368] 상기 정의된 대로, R^{10}은 화학식 (III)의 화합물의 B-P 구조에서 나타나지 않을 것이다. 상기 정의된 대로, 화학식 (I)의 화합물에서 B가 말단 기 R^{10}인 때, B는 화학식 (III)의 화합물의 B-P 구조에서 부재하다.

[0369] 상기 정의된 대로, 화학식 (III)의 화합물의 A-G_n 구조에서, A는 리가제 공여체 기질의 인식 서열과 리가제 수용체 기질의 인식 서열의 반응에서 비롯하는 상응하는 서열을 임의로 포함한다.

[0370] 일 구현예에서, M은 수소 또는 LKa-L^2-L^1-B-P이고; 여기서 P는 화학식 (I)의 화합물의 B 모이어티 또는 L^1 모이어티에 결합되는 페이로드이고; 각 B는 독립적으로 말단 기 R^{10}, 또는 하기 1), 2) 및 3)의 조합이고: 1) 자가-희생 스페이서 Sp1; 2) 결합, 또는 $-CR^1R^2-$, C_{1-10} 알킬렌, C_{4-10} 시클로알킬렌, C_{4-10} 헤테로시클릴렌 및 -(CO)-로부터 선택된 2가 기 중 하나 또는 이들 중 둘 이상의 조합; 및 3) 말단 기 R^{10}; R^{10}은 수소, 또는 페이로드에서 한 기와 반응하는 때 이탈할 수 있는 기이고; R^{10}은 페이로드와 B의 반응에서 비롯하는 생성물 분자에서 나타나지 않을 구조의 부분을 나타낸다.

[0371] 일 구현예에서, M은 수소 또는 LKa-L^2-L^1-B-P이고; 여기서 각 B는 독립적으로 부재하거나, 하기 1) 및 2)의 조합이다: 1) 자가-희생 스페이서 Sp1; 및 2) 결합, 또는 $-CR^1R^2-$, C_{1-10} 알킬렌, C_{4-10} 시클로알킬렌, C_{4-10} 헤테로시클릴렌 및 -(CO)-로부터 선택된 2가 기 중 하나 또는 이들 중 둘 이상의 조합. 바람직한 구현예에서, M은 수소

또는 LKa-L^2-L^1-B-P이고; 여기서 각 B는 독립적으로 부재하거나, -NH-CH_2-U-이거나 -NH-CH_2-U-$(CR^1R^2)_g$-(CO)-이다. 또 다른 구현예에서, M은 수소 또는 LKa-L^2-L^1-B-P이다. 일 구현예에서, LKa-L^2-L^1-B-P에서, B는 부재하다. 일 구현예에서, LKa-L^2-L^1-B-P에서, B는 하기 1) 및 2)의 조합이다: 1) 자가-희생 스페이서 Sp1; 및 2) 결합, 또는 -CR^1R^2-, C_{1-10} 알킬렌, C_{4-10} 시클로알킬렌, C_{4-10} 헤테로시클릴렌 및 -(CO)-로부터 선택된 2가 기 중 하나 또는 이들 중 둘 이상의 조합. 일 구현예에서, LKa-L^2-L^1-B-P에서, B는 -NH-CH_2-U-이거나 -NH-CH_2-U-$(CR^1R^2)_g$-(CO)-이거나, U는 부재하거나, O, S 또는 NH, 바람직하게는 O 또는 S이다. 일 구현예에서, 화학식 (I)의 화합물에서 B는 아미드 결합 또는 에스테르 결합 또는 에테르 결합을 통해서 페이로드에 연결된다. 일 구현예에서, M은 LKa-L^2-L^1-B-P이고, B는 부재하고; M은 또한 LKa-L^2-L^1-P로서 표시될 수 있다.

[0372] 표적화 분자

[0373] 일 구현예에서, 표적화 분자는, 중쇄 가변 영역 (V_H) 및 경쇄 가변 영역 (V_L)을 포함하는, 항-Trop2 항체 또는 이의 항원-결합 단편이고, 여기서

[0374] V_H는

[0375] (i) X_1이 N, T 또는 A이고, X_2가 Y 또는 A이고, X_3이 N 또는 Q인, $X_1X_2GMX_3$ (서열번호:1)의 아미노산 서열을 포함하는 HCDR1;

[0376] (ii) X_4가 Y, H 또는 D이고, X_5가 T 또는 S이고, X_6이 E 또는 V이고, X_7이 T 또는 K이고, X_8이 T 또는 A이고, X_9가 D 또는 E인, WINTX$_4$X$_5$GX$_6$PX$_7$YX$_8$X$_9$DFKG (서열번호: 2)의 아미노산 서열을 포함하는 HCDR2;

[0377] (iii) X_{10}이 G 또는 S인, X_{10}GFGSSYWYFDV (서열번호: 3)의 아미노산 서열을 포함하는 HCDR3

[0378] 을 포함하고/거나;

[0379] V_L은

[0380] (i) KASQDVSIAVA (서열번호:13) 또는 KASQDVSTAVA (서열번호:14)의 아미노산 서열을 포함하는 LCDR1;

[0381] (ii) SASYRYT (서열번호:15)의 아미노산 서열을 포함하는 LCDR2; 및

[0382] (iii) QQHYITPLT (서열번호:16)의 아미노산 서열을 포함하는 LCDR3

[0383] 을 포함한다.

[0384] 일 구현예에서, HCDR1은 NYGMN, TAGMQ, AAGMN 또는 NAGMN의 아미노산 서열을 포함한다.

[0385] 일 구현예에서, HCDR2는 WINTYTGEPTYTDDFKG (서열번호: 8), WINTHSGVPKYAEDFKG (서열번호:9), WINTDSGEPTYTDDFKG (서열번호:10)의 아미노산을 포함한다.

[0386] 일 구현예에서, HCDR3은 GGFGSSYWYFDV (서열번호:11) 또는 SGFGSSYWYFDV (서열번호:12)의 아미노산을 포함한다.

[0387] 일 구현예에서, 항체 또는 이의 항원-결합 단편은 중쇄 가변 영역 (V_H) 및 경쇄 가변 영역 (V_L)을 포함하고, 여기서

[0388] V_H는

[0389] (i) X_1이 N 또는 A인, X_1AGMN의 아미노산 서열을 포함하는 HCDR1;

[0390] (ii) WINTDSGEPTYTDDFKG (서열번호: 10)의 아미노산 서열을 포함하는 HCDR2;

[0391] (iii) GGFGSSYWYFDV (서열번호:11)의 아미노산 서열을 포함하는 HCDR3

[0392] 을 포함하고/거나;

[0393] V_L은

[0394] (i) KASQDVSIAVA (서열번호: 13) 또는 KASQDVSTAVA (서열번호: 14)의 아미노산 서열을 포함하는 LCDR1;

[0395] (ii) SASYRYT (서열번호:15)의 아미노산 서열을 포함하는 LCDR2;

[0396] (iii) QQHYITPLT (서열번호: 16)의 아미노산 서열을 포함하는 LCDR3

[0397] 을 포함한다.

[0398] 일 구현예에서, V_H는

[0399] (i) 서열번호: 4의 아미노산 서열을 포함하는 HCDR1,

[0400] (ii) 서열번호: 8의 아미노산 서열을 포함하는 HCDR2, 및

[0401] (iii) 서열번호: 11의 아미노산 서열을 포함하는 HCDR3

[0402] 을 포함하고/거나;

[0403] V_L은

[0404] (i) 서열번호: 13의 아미노산 서열을 포함하는 LCDR1,

[0405] (ii) 서열번호: 15의 아미노산 서열을 포함하는 LCDR2, 및

[0406] (iii) 서열번호: 16의 아미노산 서열을 포함하는 LCDR3

[0407] 을 포함한다.

[0408] 일 구현예에서, V_H는

[0409] (i) 서열번호: 5의 아미노산 서열을 포함하는 HCDR1,

[0410] (ii) 서열번호: 9의 아미노산 서열을 포함하는 HCDR2, 및

[0411] (iii) 서열번호: 12의 아미노산 서열을 포함하는 HCDR3

[0412] 을 포함하고/거나;

[0413] V_L은

[0414] (i) 서열번호: 14의 아미노산 서열을 포함하는 LCDR1,

[0415] (ii) 서열번호: 15의 아미노산 서열을 포함하는 LCDR2, 및

[0416] (iii) 서열번호: 16의 아미노산 서열을 포함하는 LCDR3

[0417] 을 포함한다.

[0418] 일 구현예에서, V_H는

[0419] (i) 서열번호: 4의 아미노산 서열을 포함하는 HCDR1,

[0420] (ii) 서열번호: 10의 아미노산 서열을 포함하는 HCDR2, 및

[0421] (iii) 서열번호: 11의 아미노산 서열을 포함하는 HCDR3

[0422] 을 포함하고/거나;

[0423] V_L은

[0424] (i) 서열번호: 13의 아미노산 서열을 포함하는 LCDR1,

[0425] (ii) 서열번호: 15의 아미노산 서열을 포함하는 LCDR2, 및

[0426] (iii) 서열번호: 16의 아미노산 서열을 포함하는 LCDR3

[0427] 을 포함한다.

[0428] 일 구현예에서, V_H는

[0429] (i) 서열번호: 7의 아미노산 서열을 포함하는 HCDR1,

[0430] (ii) 서열번호: 10의 아미노산 서열을 포함하는 HCDR2, 및

[0431] (iii) 서열번호: 11의 아미노산 서열을 포함하는 HCDR3

[0432] 을 포함하고/거나;

[0433] V_L은

[0434] (i) 서열번호: 13의 아미노산 서열을 포함하는 LCDR1,

[0435] (ii) 서열번호: 15의 아미노산 서열을 포함하는 LCDR2, 및

[0436] (iii) 서열번호: 16의 아미노산 서열을 포함하는 LCDR3

[0437] 을 포함한다.

[0438] 일 구현예에서, V_H는

[0439] (i) 서열번호: 6의 아미노산 서열을 포함하는 HCDR1,

[0440] (ii) 서열번호: 8의 아미노산 서열을 포함하는 HCDR2, 및

[0441] (iii) 서열번호: 11의 아미노산 서열을 포함하는 HCDR3

[0442] 을 포함하고/거나;

[0443] V_L은

[0444] (i) 서열번호: 13의 아미노산 서열을 포함하는 LCDR1,

[0445] (ii) 서열번호: 15의 아미노산 서열을 포함하는 LCDR2, 및

[0446] (iii) 서열번호: 16의 아미노산 서열을 포함하는 LCDR3

[0447] 을 포함한다.

[0448] 일 구현예에서, V_H는 구조: FR1-HCDR1-FR2-HCDR2-FR3-HCDR3-FR4를 포함하고, FR1은 서열번호: 17의 아미노산을 포함하고, FR2는 서열번호: 18의 아미노산을 포함하고, FR3은 서열번호: 19의 아미노산을 포함하고, FR4는 서열번호: 20의 아미노산을 포함한다.

[0449] 일 구현예에서, V_H는 서열번호: 21-25의 아미노산 서열과 적어도 약 90% 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함한다. 일 구현예에서, V_H는 서열번호: 21의 아미노산 서열을 포함한다. 일 구현예에서, V_H는 서열번호: 22의 아미노산 서열을 포함한다. 일 구현예에서, V_H는 서열번호: 23의 아미노산 서열을 포함한다. 일 구현예에서, V_H는 서열번호: 24의 아미노산 서열을 포함한다. 일 구현예에서, V_H는 서열번호: 25의 아미노산 서열을 포함한다.

[0450] 일 구현예에서, V_L은 서열번호: 26 또는 서열번호: 27의 아미노산 서열과 적어도 약 90% 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함한다. 일 구현예에서, V_L은 서열번호: 26의 아미노산 서열을 포함한다. 일 구현예에서, V_L은 서열번호: 27의 아미노산 서열을 포함한다.

[0451] 일 구현예에서, V_H는 서열번호: 23 또는 서열번호: 24의 아미노산 서열과 적어도 약 90% 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하고/거나; V_L은 서열번호: 26 또는 서열번호: 27의 아미노산 서열과 적어도 약 90% 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함한다.

[0452] 일 구현예에서, V_H는 서열번호: 21의 아미노산 서열을 포함하고, V_L은 서열번호: 26의 아미노산 서열을 포함한다. 일 구현예에서, V_H는 서열번호: 22의 아미노산 서열을 포함하고, V_L은 서열번호: 27의 아미노산 서열

을 포함한다. 일 구현예에서, V_H는 서열번호: 23의 아미노산 서열을 포함하고, V_L은 서열번호: 26의 아미노산 서열을 포함한다. 일 구현예에서, V_H는 서열번호: 24의 아미노산 서열을 포함하고, V_L은 서열번호: 26의 아미노산 서열을 포함한다. 일 구현예에서, V_H는 서열번호: 25의 아미노산 서열을 포함하고, V_L은 서열번호: 26의 아미노산 서열을 포함한다.

[0453] 일 구현예에서, 항체 또는 항원-결합 단편은 서열번호: 28의 아미노산 서열과 적어도 약 90% 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하는 중 불변 도메인 (CH); 및/또는

[0454] 서열번호: 29의 아미노산 서열과 적어도 약 90% 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하는 경 불변 도메인을 포함한다.

[0455] 일 구현예에서, 항체 또는 항원-결합 단편은 서열번호: 28의 아미노산 서열을 포함하는 중 불변 도메인 (CH), 및

[0456] 서열번호: 29의 아미노산 서열을 포함하는 경 불변 도메인을 포함한다.

[0457] 일 구현예에서, 항체 또는 항원-결합 단편은 약 0.5 nM 내지 약 20 nM의 평형 해리 상수 (K_D)로 TROP2에 결합한다. 일 구현예에서, K_D의 값은 약 0.5 nM, 약 1 nM, 약 2 nM, 약 3 nM, 약 4 nM, 약 5 nM, 약 6 nM, 약 7 nM, 약 8 nM, 약 9 nM, 약 10 nM, 약 11 nM, 약 12 nM, 약 13 nM, 약 15 nM, 약 18 nM, 약 20 nM, 또는 또는 임의의 2개 값 (끝 값 포함) 사이 범위이다. 일 구현예에서, K_D의 값은 약 7.5 nM 내지 약 13.5 nM이다.

[0458] 일 구현예에서, 표적화 분자는 항-인간 TROP2 항체 또는 이의 항원-결합 단편이다.

[0459] 일 구현예에서, 항체는 단클론성 항체, 키메라 항체, 인간화된 항체, 항체 단편, 및 항체 모방체로부터 선택된 재조합 항체이다. 일 구현예에서, 항체 모방체는 scFv, 미니바디, 디아바디, 나노바디로부터 선택된다.

[0460] 일 구현예에서, 항체 또는 항원-결합 단편은 서열번호: 30-33의 아미노산 서열과 적어도 약 90% 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하는 중쇄, 및/또는 서열번호: 34 또는 서열번호: 35의 아미노산 서열과 적어도 약 90% 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하는 경쇄를 포함한다.

[0461] 적어도 약 90%는 약 91%, 약 92%, 약 93%, 약 94%, 약 95%, 약 96%, 약 97%, 약 98%, 약 99%, 약 100%, 또는 임의의 2개 값 (끝 값 포함) 사이 범위이다.

[0462] 일 구현예에서, 항체 또는 항원-결합 단편은 서열번호: 30-33의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄, 및/또는 서열번호: 34 또는 서열번호: 35의 아미노산 서열을 포함하는 경쇄를 포함한다.

[0463] 일 구현예에서, 항체 또는 항원-결합 단편은 서열번호: 30의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 및 서열번호: 34의 아미노산 서열을 포함하는 경쇄를 포함한다.

[0464] 일 구현예에서, 항체 또는 항원-결합 단편은 서열번호: 31의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 및 서열번호: 34의 아미노산 서열을 포함하는 경쇄를 포함한다.

[0465] 일 구현예에서, 항체 또는 항원-결합 단편은 서열번호: 32의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 및 서열번호: 34의 아미노산 서열을 포함하는 경쇄를 포함한다.

[0466] 일 구현예에서, 항체 또는 항원-결합 단편은 서열번호: 33의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 및 서열번호: 35의 아미노산 서열을 포함하는 경쇄를 포함한다.

[0467] 항-인간 TROP2 항체의 예는 비제한적으로 트로델비(Trodelvy)의 항체 (hRS7) 및 DS1062의 항체 (다토포타맙(Datopotamab))를 포함한다. 항체의 서열은 표 1에서 나타난다.

[0468] 일 구현예에서, 약학적 조성물은 항체 또는 항원-결합 단편을 포함한다.

표 1 항체의 서열

명칭	아미노산	서열번호	명칭	아미노산	서열번호
HCDR1	NYGMN	4	LCDR1	KASQDVSIAVA	13
	TAGMQ	5			
	AAGMN	6		KASQDVSTAVA	14
	NAGMN	7			
HCDR2	WINTYTGEPTYTDDFKG	8	LCDR2	SASYRYT	15
	WINTHSGVPKYAEDFKG	9			
	WINTDSGEPTYTDDFKG	10			
HCDR3	GGFGSSYWYFDV	11	LCDR3	QQHYITPLT	16
	SGFGSSYWYFDV	12			
명칭	아미노산				서열번호
VH-FR1	QVQLQQSGSELKKPGASVKVSCKASGYTFT				17
VH-FR2	WVKQAPGQGLKWMG				18
VH-FR3	RFAFSLDTSVSTAYLQISSLKADDTAVYFCAR				19
VH-FR4	WGQGSLVTVSS				20
V_H	QVQLQQSGSELKKPGASVKVSCKASGYTFTNYGMNWVKQAPGQGLKWMGWINTYTGEPTYTDDFKGRFAFSLDTSVSTAYLQISSLKADDTAVYFCARGGFGSSYWYFDVWGQGSLVTVSS				21
	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTTAGMQWVRQAPGQGLEWMGWINTHSGVPKYAEDFKGRVTISADTSTSTAYLQLSSLKSEDTAVYYCARSGFGSSYWYFDVWGQGTLVTVSS				22
	QVQLQQSGSELKKPGASVKVSCKASGYTFTNAGMNWVKQAPGQGLKWMGWINTDSGEPTYTDDFKGRFAFSLDTSVSTAYLQISSLKADDTAVYFCARGGFGSSYWYFDVWGQGSLVTVSS				23
	QVQLQQSGSELKKPGASVKVSCKASGYTFTAAGMNWVKQAPGQGLKWMGWINTYTGEPTYTDDFKGRFAFSLDTSVSTAYLQISSLKADDTAVYFCARGGFGSSYWYFDVWGQGSLVTVSS				24
	QVQLQQSGSELKKPGASVKVSCKASGYTFTNYGMNWVKQAPGQGLKWMGWINTDSGEPTYTDDFKGRFAFSLDTSVSTAYLQISSLKADDTAVYFCARGGFGSSYWYFDVWGQGSLVTVSS				25
V_L	DIQLTQSPSSLSASVGDRVSITCKASQDVSIAVAWYQQKPGKAPKLLIYSASYRYTGVPDRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFAVYYCQQHYITPLTFGAGTKVEIKRTV				26

[0469]

	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCKASQDVSTAVAWYQQKPGKAPKL LIYSASYRYTGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFAVYYCQQHYITP LTFGQGTKLEIKRTV	27
C_H	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALT SGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKV DKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEV TCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVV SVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVY TLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPP VLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSL SLSPGK	28
C_L	AAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQS GNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLS SPVTKSFNRGEC	29
HC	QVQLQQSGSELKKPGASVKVSCKASGYTFTNYGMNWVKQAPGQG LKWMGWINTYTGEPTYTDDFKGRFAFSLDTSVSTAYLQISSLKADD TAVYFCARGGFGSSYWYFDVWGQGSLVTVSSASTKGPSVFPLAPSS KSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGL YSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTC PPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVK FNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKE YKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSL TCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTV DKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	30
	QVQLQQSGSELKKPGASVKVSCKASGYTFTNAGMNWVKQAPGQG LKWMGWINTDSGEPTYTDDFKGRFAFSLDTSVSTAYLQISSLKADD TAVYFCARGGFGSSYWYFDVWGQGSLVTVSSASTKGPSVFPLAPSS KSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGL YSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTC PPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVK FNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKE YKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSL TCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTV DKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	31
	QVQLQQSGSELKKPGASVKVSCKASGYTFTAAGMNWVKQAPGQG LKWMGWINTYTGEPTYTDDFKGRFAFSLDTSVSTAYLQISSLKADD TAVYFCARGGFGSSYWYFDVWGQGSLVTVSSASTKGPSVFPLAPSS KSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGL YSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTC PPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVK FNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKE YKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSL TCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTV DKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	32
	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTTAGMQWVRQAPGQG LEWMGWINTHSGVPKYAEDFKGRVTISADTSTSTAYLQLSSLKSEDT AVYYCARSGFGSSYWYFDVWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSK STSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLY SLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCP PCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKF NWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEY KCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLT CLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVD KSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	33
LC	DIQLTQSPSSLSASVGDRVSITCKASQDVSIAVAWYQQKPGKAPKLLI YSASYRYTGVPDRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFAVYYCQQHYITPL	34

[0470]

	TFGAGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREA KVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKH KVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC	
	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCKASQDVSTAVAWYQQKPGKAPKL LIYSASYRYTGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFAVYYCQQHYITP LTFGQGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPRE AKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEK HKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC	35

[0471]

[0472] 링커-페이로드와 접합된 항체

[0473] 화학식 (I)의 화합물과 접합을 위하여, 본 개시내용의 항체는 화학식 (I)의 화합물에서 Gn과 연결하기 위해 변형된 모이어티를 포함할 수 있다. 이러한 변형된 모이어티의 도입 위치는 제한되지 않고, 예를 들어, 이의 도입 위치는, 비제한적으로, 항체의 중쇄 또는 경쇄의 C-말단 또는 N-말단에 자리잡을 수 있다.

[0474] 일 구현예에서, 항-인간 TROP2 항체 및 페이로드의 접합에 의해 형성된 본 개시내용의 접합체는 종양 세포의 표면 상에서 TROP2에 특이적으로 결합할 수 있고 TROP2-발현 종양 세포를 선택적으로 사멸시킬 수 있다. 또 다른

바람직한 구현예에서, TROP2-양성 종양으로부터 선택된 질환, 장애 또는 병태를 치료하기 위한 약제의 제조에서 본 개시내용의 접합체 또는 본 개시내용의 약학적 조성물의 용도가 제공된다. 더욱 바람직한 구현예에서, 질환, 장애 또는 병태는 유방암, 요로상피 암종, 폐암, 간암, 자궁내막암, 두경부암, 난소암, 및 기타 등등으로부터 선택된다.

[0475] 대안적 구현예에서, 화학식 (I)의 화합물에서 Gn과 접합을 위한 변형된 모이어티는, 예를 들어, 화학적 변형 방법을 사용하여 항체의 중쇄 또는 경쇄의 비-말단 위치에 도입될 수 있다.

[0476] 일 구현예에서, 본 개시내용의 표적화 분자는, 말단 변형을 포함할 수 있는, 항체 또는 이의 항원-결합 단편이다. 말단 변형은, 리가제 인식 서열을 예를 들어 포함하는, 항체의 중쇄 또는 경쇄의 C-말단 또는 N-말단에서 변형을 지칭한다. 또 다른 구현예에서, 말단 변형은 2-100개 아미노산을 포함하는 스페이서 Sp2를 추가로 포함할 수 있고, 여기서 항체, Sp2 및 리가제 인식 서열은 순차적으로 결합된다. 바람직한 구현예에서, Sp2는 2-20개 아미노산을 함유하는 스페이서 서열이다. 특정한 구현예에서, Sp2는 GA, GGGGS, GGGGSGGGGS 및 GGGGSGGGGSGGGGS, 특히 GA로부터 선택된 스페이서 서열이다.

[0477] 바람직한 구현예에서, 항체 또는 이의 항원-결합 단편의 경쇄는 3개 유형을 포함한다: 야생형 (LC); 리가제 인식 서열 LPXTG의 직접 도입에 의해 변형되는 C-말단 변형된 경쇄 (LCCT) 및 짧은 펩티드 스페이서 더하기 리가제 공여체 기질 인식 서열 LPXTG의 도입에 의해 변형되는 C-말단 변형된 경쇄 ($LCCT_L$). 항체 또는 이의 항원-결합 단편의 중쇄는 3개 유형을 포함한다: 야생형 (HC); 리가제 인식 서열 LPXTG의 직접 도입에 의해 변형되는 C-말단 변형된 중쇄 (HCCT); 및 짧은 펩티드 스페이서 더하기 리가제 공여체 기질 인식 서열 LPXTG의 도입에 의해 변형되는 C-말단 변형된 중쇄 ($HCCT_L$). X는 임의의 천연 또는 비-천연 단일 아미노산일 수 있다. 일 구현예에서, X는 글리신이다. 변형된 항체의 서열은 표 2에서 나타난다.

[0478] 본 개시내용의 접합체는 페이로드를 추가로 포함할 수 있다. 페이로드는 위에 정의된 바와 같다.

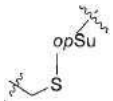
[0479] 일 구현예에서, 약학적 조성물은 항체-약물 접합체 (ADC)를 포함한다.

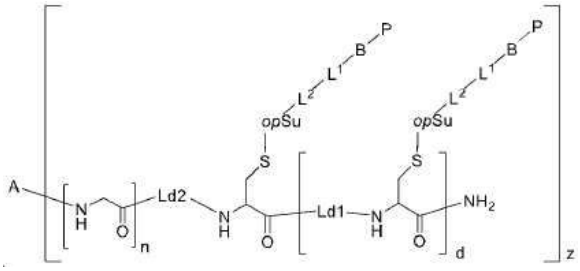
표 2 변형된 항체의 서열

명칭	아미노산	서열번호
HC	QVQLQQSGSELKKPGASVKVSCKASGYTFTNYGMNWVKQAPGQG LKWMGWINTYTGEPTYTDDFKGRFAFSLDTSVSTAYLQISSLKADD TAVYFCARGGFGSSYWYFDVWGQGSLVTVSSASTKGPSVFPLAPSS KSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSG LYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHT CPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPE VKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNG KEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQ VSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSK LTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGALPETGG	36
	QVQLQQSGSELKKPGASVKVSCKASGYTFTNAGMNWVKQAPGQG LKWMGWINTDSGEPTYTDDFKGRFAFSLDTSVSTAYLQISSLKADD TAVYFCARGGFGSSYWYFDVWGQGSLVTVSSASTKGPSVFPLAPSS KSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSG LYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHT CPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPE VKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNG KEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQ VSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSK LTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGALPETGG	37
	QVQLQQSGSELKKPGASVKVSCKASGYTFTAAGMNWVKQAPGQG LKWMGWINTYTGEPTYTDDFKGRFAFSLDTSVSTAYLQISSLKADD TAVYFCARGGFGSSYWYFDVWGQGSLVTVSSASTKGPSVFPLAPSS KSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSG LYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHT CPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPE VKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNG KEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQ VSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSK LTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGALPETGG	38
	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTTAGMQWVRQAPGQG LEWMGWINTHSGVPKYAEDFKGRVTISADTSTSTAYLQLSSLKSED TAVYYCARSGFGSSYWYFDVWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSS KSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSG LYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHT CPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPE VKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNG KEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQ VSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSK LTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGALPETGG	39
LC	DIQLTQSPSSLSASVGDRVSITCKASQDVSIAVAWYQQKPGKAPKLLI YSASYRYTGVPDRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFAVYYCQQHYITPL TFGAGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREA KVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKH KVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGECGALPETGG	40
	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCKASQDVSTAVAWYQQKPGKAPKL LIYSASYRYTGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFAVYYCQQHYIT PLTFGQGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPR EAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYE KHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGECGALPETGG	41

[0480]

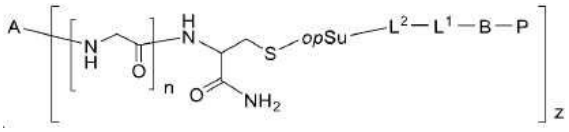
[0481] **접합체에 대한 특정 구현예**

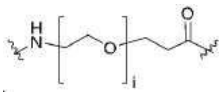
[0482] 일 구현예에서, Q는 수소이고, 각 LKa는  이다. 일 구현예에서, 화학식 (III)은 화학식 (III-a)의 구조를 갖고:

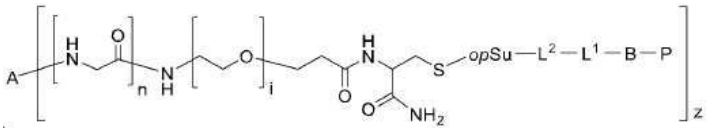
[0483]  화학식 (III-a),

[0484] 식중 A는 항-TROP2 항체 또는 항원-결합 단편이고, 항체 또는 항원-결합 단편은 $(Gly)_n$과 연결하도록 변형된다.

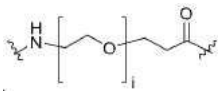
[0485] 일 구현예에서, Ld2는 결합이고, d는 0이다. 일 구현예에서, 화학식 (III-a)의 화합물은 다음과 같다:

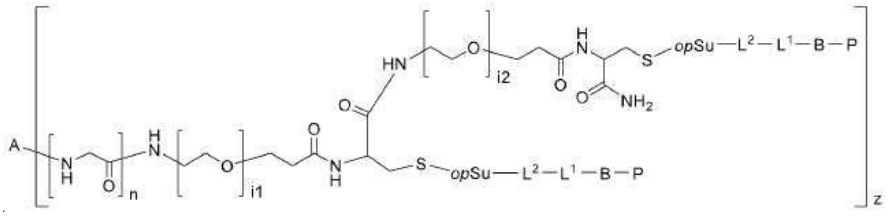
[0486]  (접합체 III-a-0-1)

[0487] 일 구현예에서, d는 0이고, Ld2는  이다. 일 구현예에서, 화학식 (III-a)의 화합물은 다음과 같다:

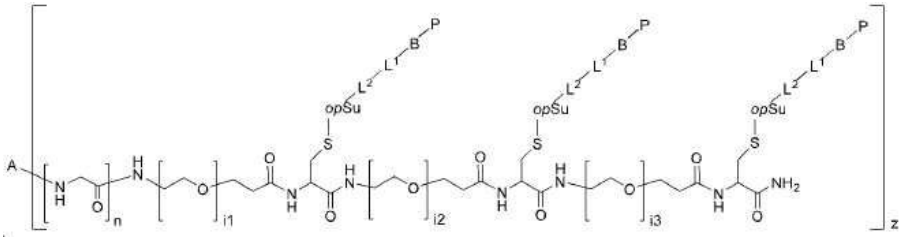
[0488] 

[0489] (접합체 III-a-0-2)

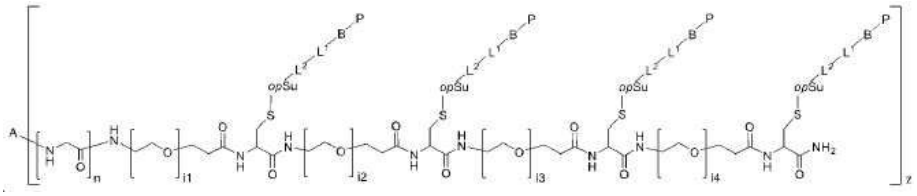
[0490] 일 구현예에서, d는 1, 2 또는 3이고, Ld2 및 각 Ld1은  으로부터 독립적으로 선택된다. 일 구현예에서, 화학식 (III-a)의 화합물은 다음과 같다:

[0491] 

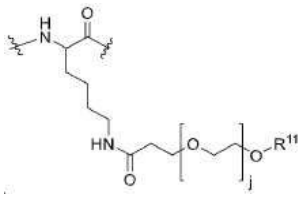
[0492] (접합체 III-a-0-3)

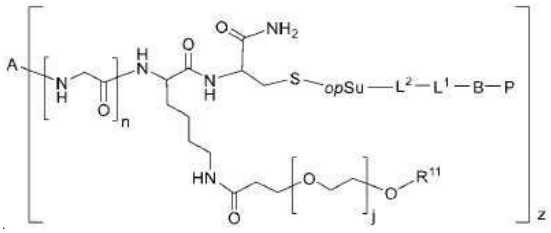
[0493] 

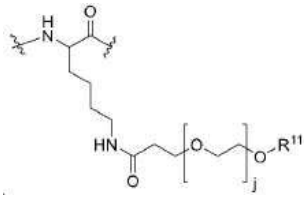
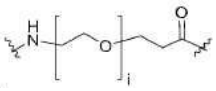
[0494] (접합체 III-a-0-4)

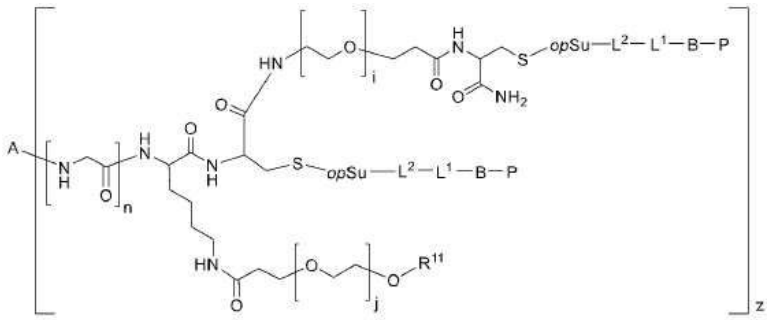
[0495] 

[0496] (접합체 III-a-0-5).

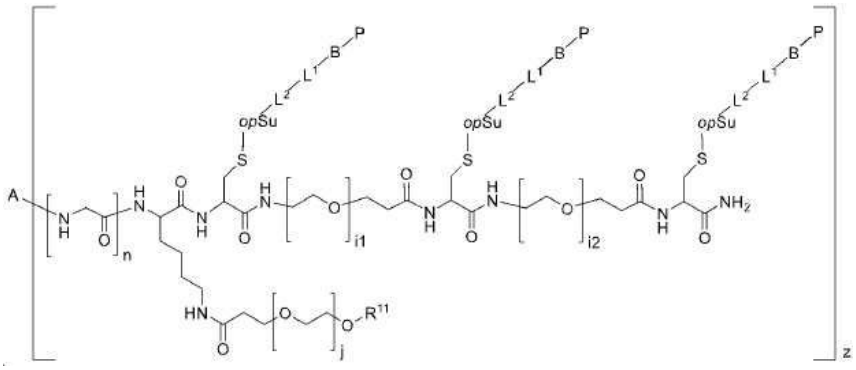
[0497] 일 구현예에서, Ld2는  이고, d는 0이다. 일 구현예에서, 화학식 (III-a)의 화합물은 다음과 같다:

[0498]  (접합체 III-a-1-1).

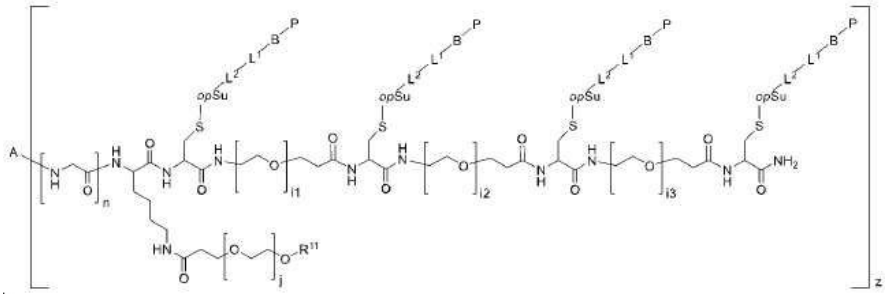
[0499] 일 구현예에서, d는 1, 2 또는 3이고, Ld2는  이고, 각 Ld1은  으로부터 독립적으로 선택된다. 일 구현예에서, 화학식 (III-a)의 화합물은 다음과 같다:

[0500] 

[0501] (접합체 III-a-1-2)

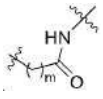
[0502] 

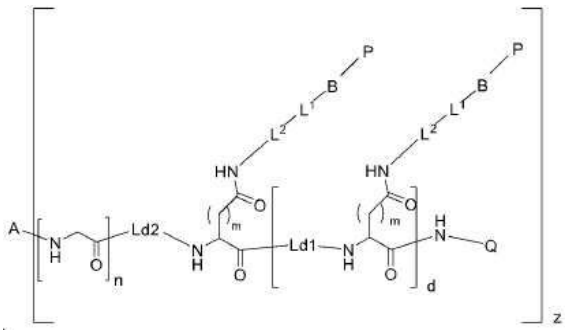
[0503] (접합체 III-a-1-3)

[0504] 

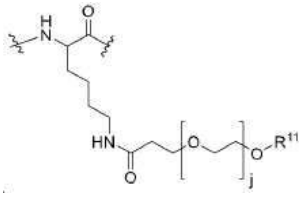
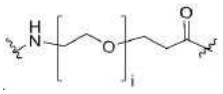
[0505] (접합체 III-a-1-4).

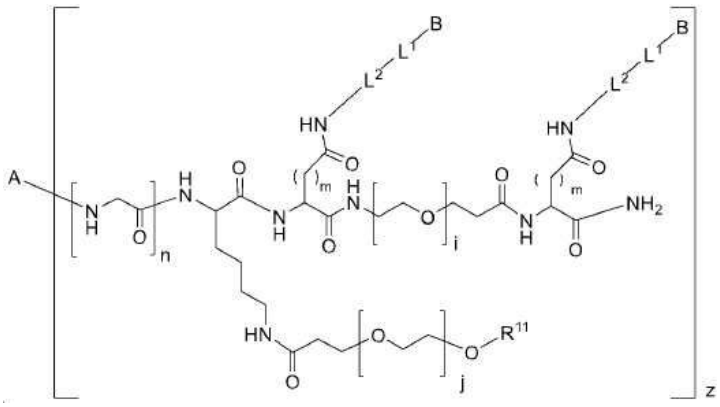
[0506] 일 구현예에서, z는 1 내지 4이다. 일 구현예에서, z는 2 또는 4이다. 일 구현예에서, z는 2이다. 일 구현예에서, 접합체 III-a-0-1, III-a-0-2, III-a-1-1에서, z는 2 또는 4이다. 일 구현예에서, 접합체 III-a-0-3, III-a-0-4, III-a-0-5, III-a-1-3 및 III-a-1-4에서, z는 2이다. 일 구현예에서, 접합체 III-a-1-2에서, z는 4이다.

[0507] 일 구현예에서, LKa는  이다. 일 구현예에서, 화학식 (III)은 화학식 (III-b)의 구조를 갖고:

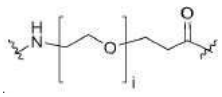
[0508]  화학식 (III-b),

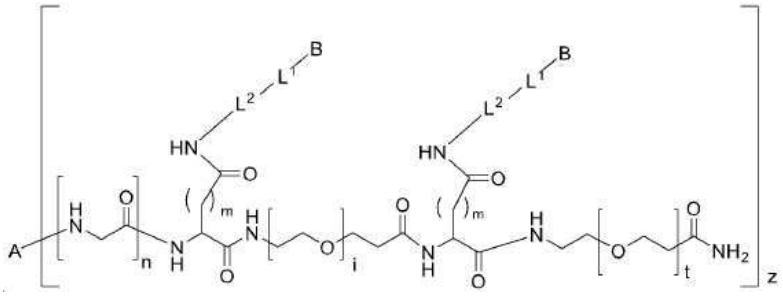
[0509] 식중 A는 항-TROP2 항체 또는 항원-결합 단편이고, 항체 또는 항원-결합 단편은 $(Gly)_n$과 연결하도록 변형된다.

[0510] 일 구현예에서, Q는 수소이고, d는 1이고, Ld2는  이고, Ld1은  으로부터 선택된다. 일 구현예에서, 화학식 (III-b)의 화합물은 다음과 같다:

[0511] 

[0512] (접합체 III-b-1).

[0513] 일 구현예에서, Q는 $-C_2H_4-(PEG)_t-(CO)NH_2$이고, d는 1이고, Ld2는 결합이고, Ld1은  으로부터 선택된다. 일 구현예에서, 화학식 (III-b)의 화합물은 다음과 같다:

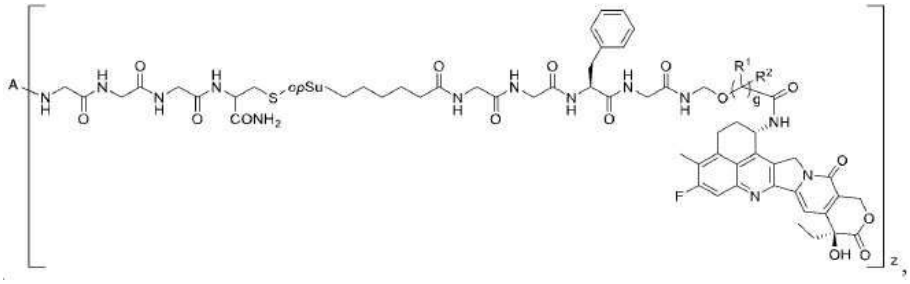
[0514] 

[0515] (접합체 III-b-0).

[0516] 일 구현예에서, z는 1 내지 4이다. 일 구현예에서, z는 2 또는 4이다. 일 구현예에서, z는 2이다. 일 구현예에서, 접합체 III-b-1-1 및 III-b-0-1에서 z는 2 또는 4이다. 일 구현예에서, 접합체 III-b-1-1 및 III-b-0-1에서, z는 4이다.

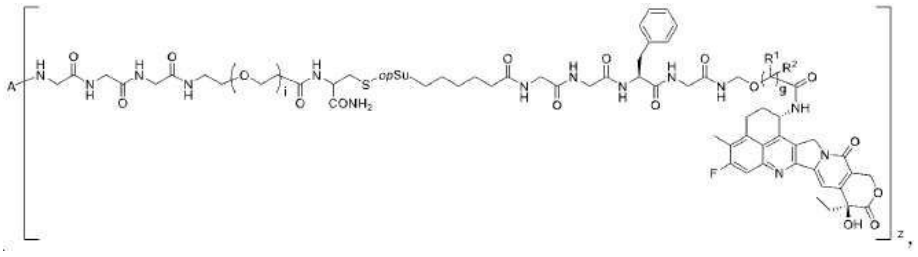
[0517] 일 구현예에서, 화학식 (I)의 화합물에서 B는 말단 기 R^{10}이고, L^1에서 절단가능한 서열 1은 화학식 (II)의 화합물을 형성하기 위해 페이로드에 연결되고, 여기서 B는 페이로드와 절단가능한 서열 1의 연결의 생성된 분자에서 부재하다. 이러한 경우에, M은 LKa-L2-L1-B-P인 것으로 이해될 수 있고, 여기서 B는 존재하지 않는다. 이러한 경우에, M은 LKa-L^2-L^1-P로서 또한 표시될 수 있다. 일 구현예에서, n은 3이고, L^2는 $-(CH_2)_p-(CH_2)_2(CO)-$이고, p는 3이고, L^1은 GGFG이고, B는 $-NH-CH_2-U-$이거나 부재하거나 $-NH-CH_2-U-(CR^1R^2)_g-(CO)-$이고, U는 O이고, g는 1이다.

[0518] 일 구현예에서, 접합체 III-a-0-1은 다음의 구조를 갖고:

[0519] 

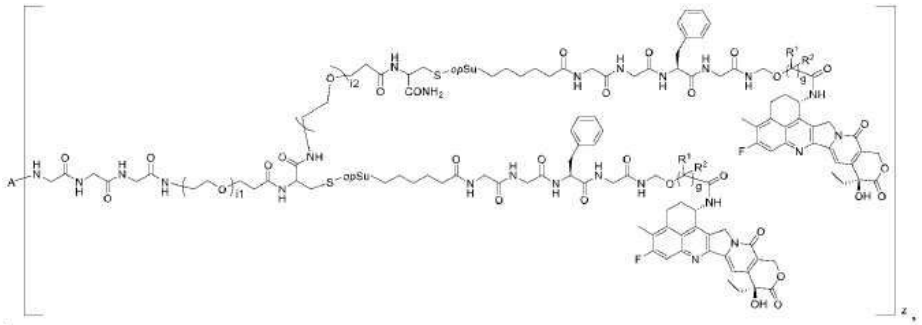
[0520] 식중 A는 항-TROP2 항체 또는 항원-결합 단편이고, 항체 또는 항원-결합 단편은 $(Gly)_n$과 연결하도록 변형된다.

[0521] 일 구현예에서, 접합체 III-a-0-2는 다음의 구조를 갖고:

[0522] 

[0523] 식중 A는 항-TROP2 항체 또는 항원-결합 단편이고, 항체 또는 항원-결합 단편은 $(Gly)_n$과 연결하도록 변형된다.

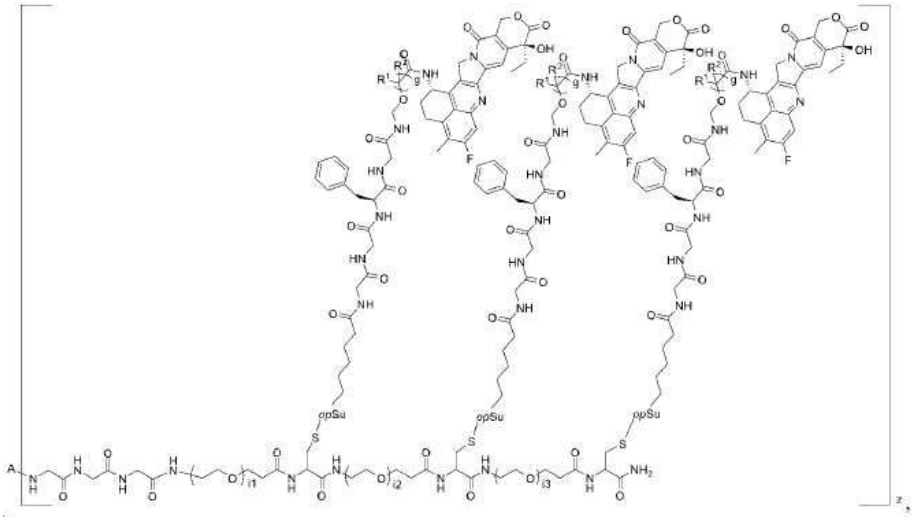
[0524] 일 구현예에서, 접합체 III-a-0-3은 다음의 구조를 갖고:



[0525]

[0526] 식중 A는 항-TROP2 항체 또는 항원-결합 단편이고, 항체 또는 항원-결합 단편은 $(Gly)_n$과 연결하도록 변형된다.

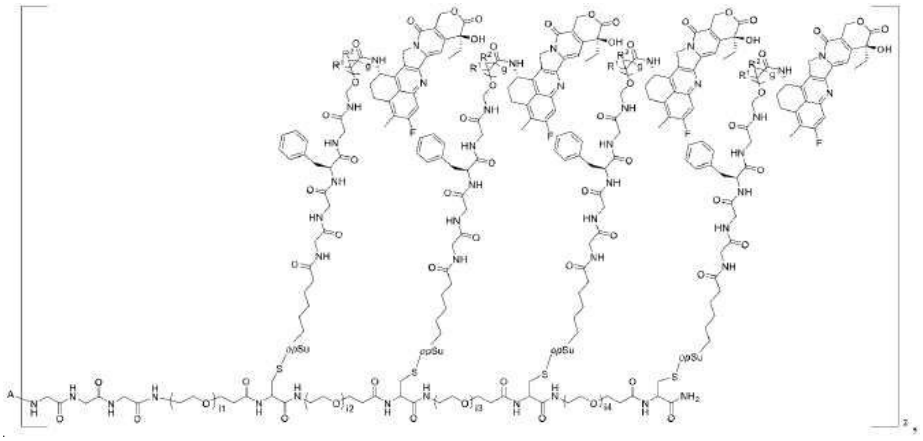
[0527] 일 구현예에서, 접합체 III-a-0-4는 다음의 구조를 갖고:



[0528]

[0529] 식중 A는 항-TROP2 항체 또는 항원-결합 단편이고, 항체 또는 항원-결합 단편은 $(Gly)_n$과 연결하도록 변형된다.

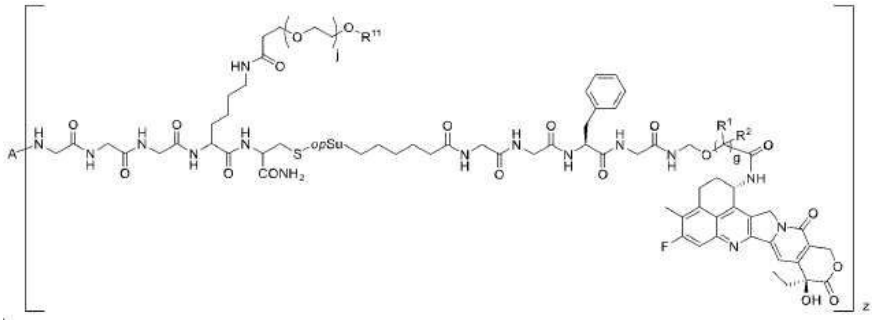
[0530] 일 구현예에서, 접합체 III-a-0-5는 다음의 구조를 갖고:



[0531]

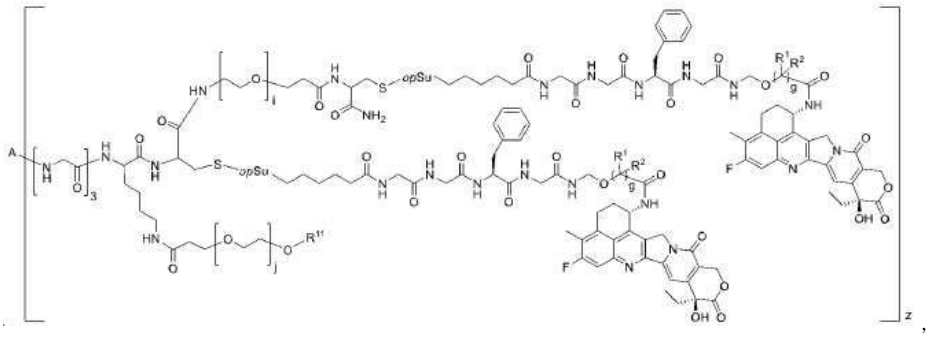
[0532] 식중 A는 항-TROP2 항체 또는 항원-결합 단편이고, 항체 또는 항원-결합 단편은 $(Gly)_n$과 연결하도록 변형된다.

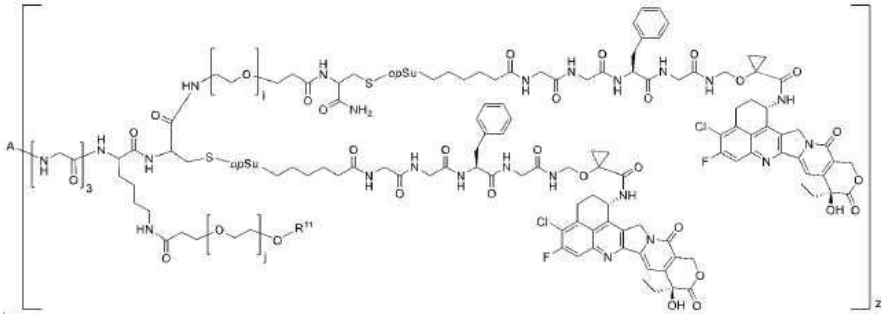
[0533] 일 구현예에서, 접합체 III-a-1-1은 다음의 구조를 갖고:

[0534] 

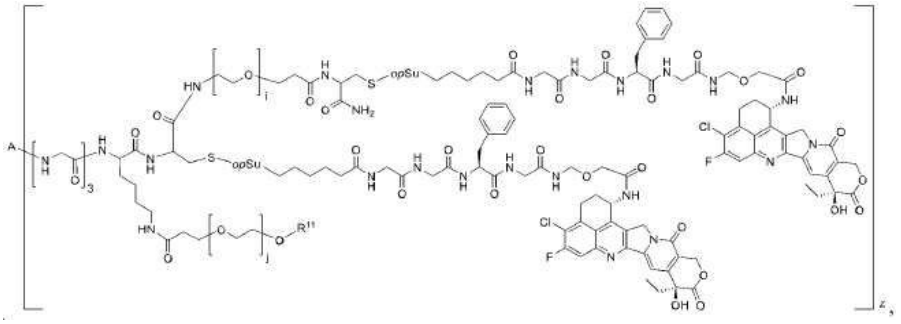
[0535] 식중 A는 항-TROP2 항체 또는 항원-결합 단편이고, 항체 또는 항원-결합 단편은 $(Gly)_n$과 연결하도록 변형된다.

[0536] 일 구현예에서, 접합체 III-a-1-2는 다음의 구조를 갖고:

[0537] 

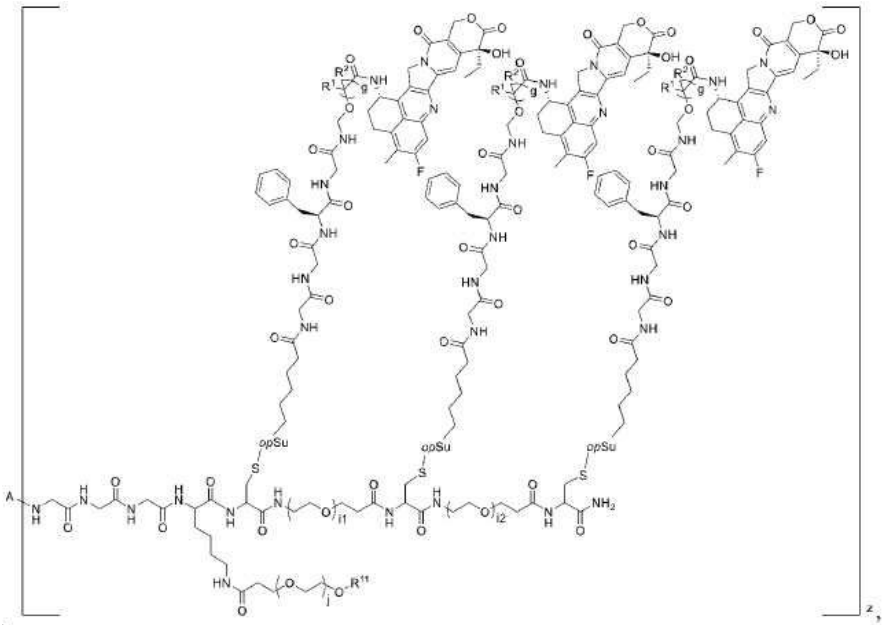
[0538] 

[0539] 또는

[0540] 

[0541] 식중 A는 항-TROP2 항체 또는 항원-결합 단편이고, 항체 또는 항원-결합 단편은 $(Gly)_n$과 연결하도록 변형된다.

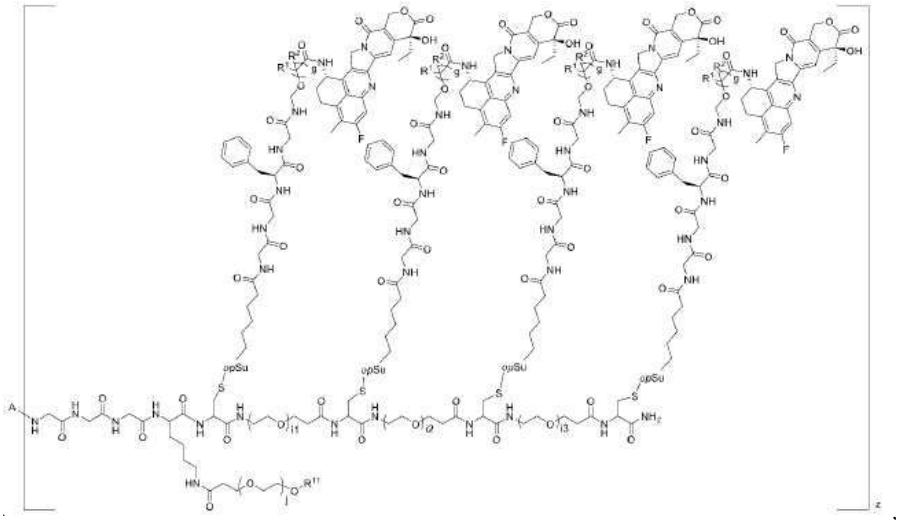
[0542] 일 구현예에서, 접합체 III-a-1-3은 다음의 구조를 갖고:



[0543]

[0544] 식중 A는 항-TROP2 항체 또는 항원-결합 단편이고, 항체 또는 항원-결합 단편은 $(Gly)_n$과 연결하도록 변형된다.

[0545] 일 구현예에서, 접합체 III-a-1-4는 다음의 구조를 갖고:

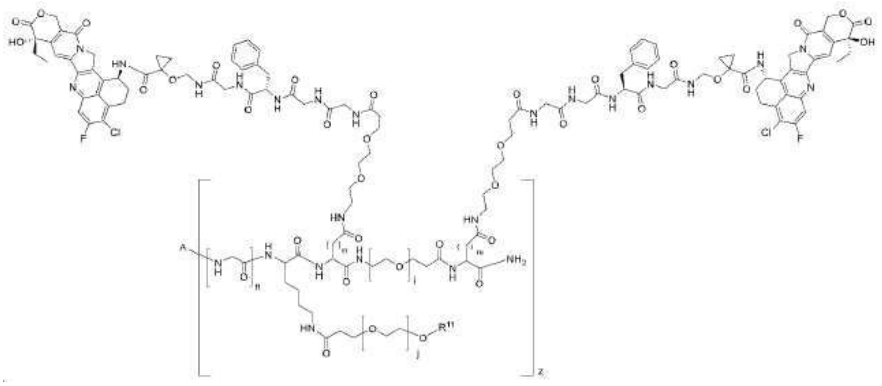


[0546]

[0547] 식중 A는 항-TROP2 항체 또는 항원-결합 단편이고, 항체 또는 항원-결합 단편은 $(Gly)_n$과 연결하도록 변형된다.

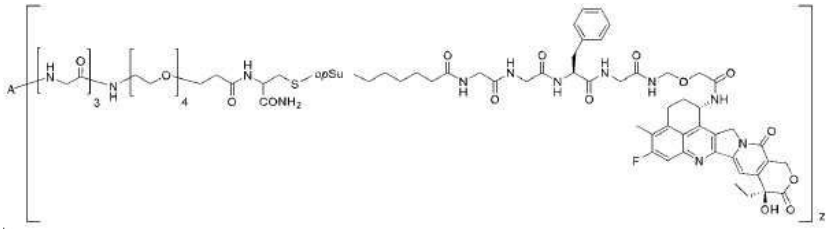
[0548] 일 구현예에서, i는 4이고, g는 1이고, R^{11}은 메틸이다.

[0549] 일 구현예에서, n은 3이고, L^2는 $-(C_2H_4-O)_p-(CH_2)_2(CO)-$이고, p는 2이고, L^1은 GGFG이고, B는 $-NH-CH_2-U-$이고, U는 O이다. 일 구현예에서, 접합체 III-b-1-1은 다음의 구조를 갖고:

[0550] ,

[0551] 식중 A는 항-TROP2 항체 또는 항원-결합 단편이고, 항체 또는 항원-결합 단편은 $(Gly)_n$과 연결하도록 변형된다.

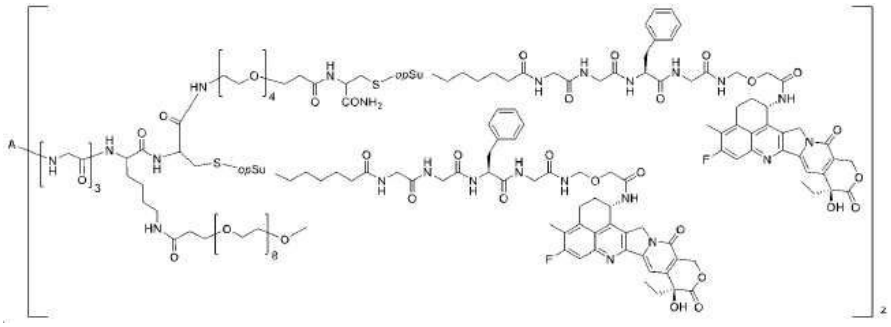
[0552] 일 구현예에서, 접합체 III-a-0-2는 다음과 같고 (접합체 III-a-0-2-1):

[0553] 

[0554] (접합체 III-a-0-2-1),

[0555] 식중 A는 항-TROP2 항체 또는 항원-결합 단편이고, 항체 또는 항원-결합 단편은 (Gly)n과 연결하도록 변형된다.

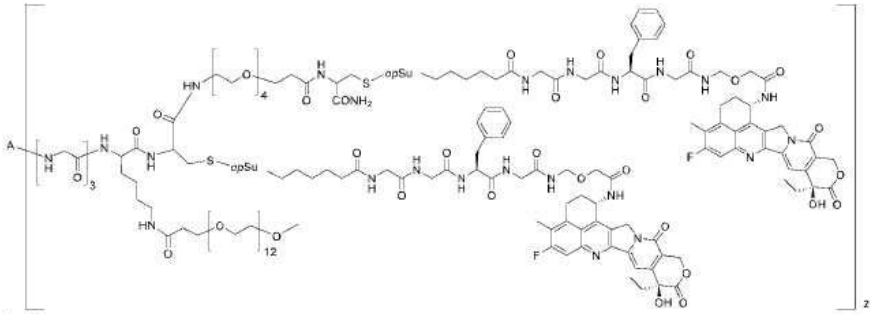
[0556] 일 구현예에서, i는 4이고, j는 8이고, g는 1이고, R^{11}은 메틸이다. 일 구현예에서, 접합체 III-a-1-2는 다음과 같고 (접합체 III-a-1-2-1):

[0557] 

[0558] (접합체 III-a-1-2-1),

[0559] 식중 A는 항-TROP2 항체 또는 항원-결합 단편이고, 항체 또는 항원-결합 단편은 $(Gly)_n$과 연결하도록 변형된다.

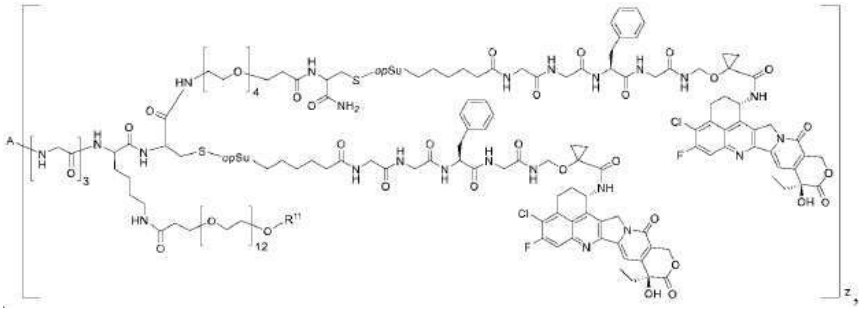
[0560] 일 구현예에서, i는 4이고, j는 12이고, g는 1이고, R^{11}은 메틸이다. 일 구현예에서, 접합체 III-a-1-2는 다음과 같고 (접합체 III-a-1-2-4-1):

[0561] 

[0562] (접합체 III-a-1-2-4-1),

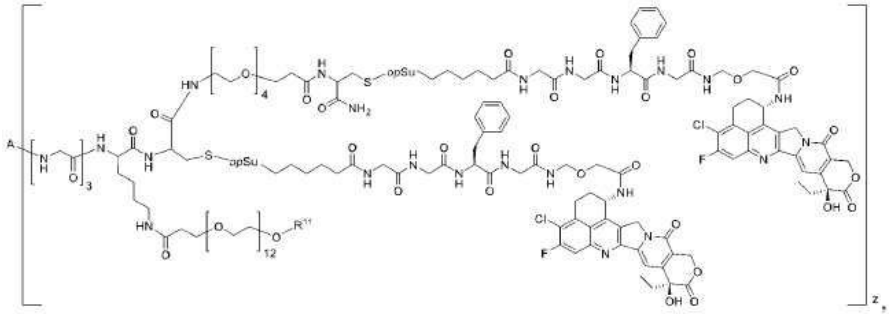
[0563] 식중 A는 항-TROP2 항체 또는 항원-결합 단편이고, 항체 또는 항원-결합 단편은 $(Gly)_n$과 연결하도록 변형된다.

[0564] 일 구현예에서, i는 4이고, j는 12이고, R^{11}은 메틸이다. 일 구현예에서, 접합체 III-a-1-2는 다음과 같고 (접합체 III-a-1-2-4-2):

[0565] 

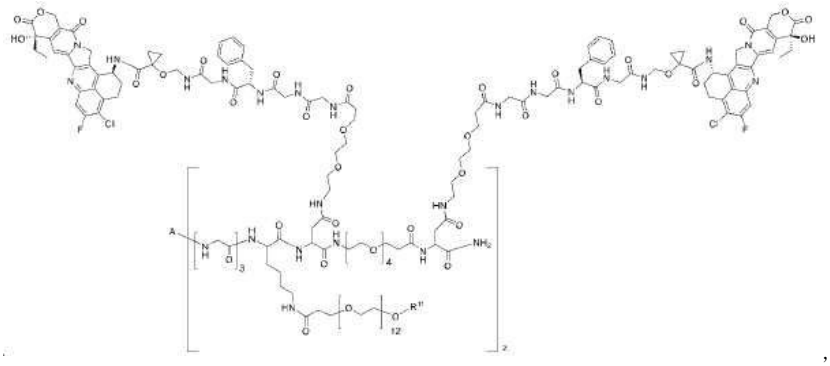
[0566] 식중 A는 항-TROP2 항체 또는 항원-결합 단편이고, 항체 또는 항원-결합 단편은 $(Gly)_n$과 연결하도록 변형된다.

[0567] 일 구현예에서, i는 4이고, j는 12이고, R^{11}은 메틸이다. 일 구현예에서, 접합체 III-a-1-2는 다음과 같고 (접합체 III-a-1-2-4-3):

[0568] 

[0569] 식중 A는 항-TROP2 항체 또는 항원-결합 단편이고, 항체 또는 항원-결합 단편은 $(Gly)_n$과 연결하도록 변형된다.

[0570] 일 구현예에서, n은 3이고, i는 4이고, j는 12이고, m은 1이고, R^{11}은 메틸이다. 일 구현예에서, 접합체 III-b-1-1은 다음과 같고 (접합체 III-b-1-1-4):

[0571] ,

[0572] 식중 A는 항-TROP2 항체 또는 항원-결합 단편이고, 항체 또는 항원-결합 단편은 $(Gly)_n$과 연결하도록 변형된다.

[0573] **접합체의 제조**

[0574] 본 개시내용의 접합체는 당업계에서 알려진 임의의 방법에 의해 제조될 수 있다. 일부 구현예에서, 접합체는 표적화 분자 및 페이로드-보유 화학식 (I) 화합물의 리가제-촉매화된 부위-특이적 접합에 의해 제조되고, 여기서 표적화 분자는 리가제 인식 서열에 의해 변형된다. 본 방법은 단계 A 및 단계 B를 포함한다.

[0575] 단계 A. 결합 단위-페이로드 중간체의 제조

[0576] 바람직한 구현예에서, 화학식 (I)의 화합물에서 B는 또 다른 반응성 기를 함유하는 페이로드에 반응성 기를 통해 공유적으로 결합된다.

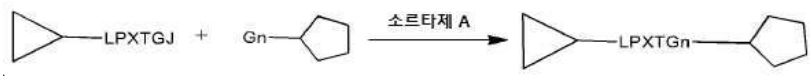
[0577] 본 개시내용의 화학식 (I)의 화합물을 사용하여 제조된 결합 단위-페이로드 중간체는 정의된 구조, 정의된 조성 및 고 순도를 갖고, 그래서 항체와의 접합 반응이 실행되는 때, 더 적은 불순물이 도입되거나 다른 불순물이 도입되지 않는다. 이러한 중간체가 리가제 인식 서열을 함유하는 변형된 항체와의 리가제-촉매화된 부위-특이적 접합에 사용되는 때, 품질이 고도로 제어가능한 균질한 ADC가 수득된다.

[0578] 단계 B. 표적화 분자를 페이로드-보유 화학식 (I) 화합물에 결합

[0579] 본 개시내용의 표적화 분자는 당업계에서 알려진 임의의 방법에 의해 페이로드-보유 화학식 (I) 화합물 (즉, 화학식 (II)의 화합물)과 접합될 수 있다.

[0580] 표적화 분자 및 페이로드-보유 화학식 (I) 화합물은 기질의 리가제-특이적 인식 서열을 통해 서로 결합된다. 인식 서열은 이용된 특정한 리가제에 의존한다. 일 구현예에서, 표적화 분자는 경쇄 및/또는 중쇄의 C-말단에서 도입된 인식 서열-기반된 말단 변형이 있는 항체이고, 표적화 분자는, 야생형 또는 최적화된 조작된 리가제 또는 이의 임의의 조합의 촉매화 하에서, 그리고 적합한 촉매적 반응 조건 하에서, 화학식 (II)의 화합물과 접합된다.

[0581] 특정 구현예에서, 리가제는 소르타제 A이고 접합 반응은 하기 반응식에 의해 표현될 수 있다:

[0582] 

[0583] 삼각형은 항체의 한 부문을 나타내고; 오각형은 화학식 (II)의 화합물의 한 부문을 나타낸다. n, X 및 J는 각각 상기 정의된 바와 같다. 수용체 기질의 상응하는 인식 서열인 G_n과 접합된 때, LPXTGJ 서열에서 글리신의 업스트림 펩티드 결합은 소르타제 A에 의해 절단되고, 생성된 중간체는 G_n의 유리 N-말단에 결합되어 새로운 펩티드 결합을 생성한다. 생성된 아미노산 서열은 $LPXTG_n$이다. 서열 G_n 및 LPXTGJ는 위에 정의된 바와 같다.

[0584] **생리학적 환경에서 접합체의 대사**

[0585] 한 부분 또는 전체 링커가 종양 세포에서 절단되는 때, 항종양 화합물 모이어티는 방출되어 항종양 화합물의 항종양 효과를 나타낸다. 링커가 약물에 대한 연결 위치에서 절단됨에 따라, 항종양 화합물은 이의 본래 구조에서 방출되어 이의 본래 항종양 효과를 나타낸다.

[0586] 일 구현예에서, 절단가능한 서열 1 (예컨대 GGFG)은 리소좀성 효소 (예컨대 카텝신 B 및/또는 카텝신 L)에 의해 절단될 수 있다.

[0587] 일 구현예에서, Sp1은 자가-희생 스페이서를 포함한다. 일 구현예에서, Sp1은 PABC, 아세탈 또는 헤테로아세탈을 포함한다. 일 구현예에서, L^1은 GGFG이다. 일 구현예에서, 링커는 -GGFG-NH-CH_2-O-를 포함한다. 일 구현예에서, -GGFG-NH-CH_2-O-는, 세포에서 절단하고 목표화된 분자 (예컨대 약물)를 방출할, 제한 효소 부위 및 자가-희생 스페이서의 조합을 나타낸다.

[0588] 약학적 조성물 및 약학적 제조

[0589] 본 개시내용의 또 다른 목적은 예방적으로 또는 치료적으로 유효량의 본 개시내용의 접합체, 및 적어도 하나의 약학적으로 허용가능한 담체를 포함하는 약학적 조성물을 제공하는 것이다.

[0590] 본 개시내용의 또 다른 목적은 예방적으로 또는 치료적으로 유효량의 본 개시내용의 항-TROP2 항체, 및 적어도 하나의 약학적으로 허용가능한 담체를 포함하는 약학적 조성물을 제공하는 것이다.

[0591] 본 개시내용의 약학적 조성물은 인간 또는 동물의 증상을 예방, 경감, 예방 또는 치유하는 효과를 달성하는 한 임의의 방식으로 투여될 수 있다. 예를 들어, 다양한 적합한 투약 형태, 특히 주사제 예컨대 주사용 동결건조된 분말, 주사, 또는 주사용 멸균 분말은 투여 루트에 따라 제조될 수 있다.

[0592] 용어 "약학적으로 허용가능한"은 정상 의학적 판단의 범위 내에서 환자의 조직과 접촉된 때, 과도한 독성, 자극

또는 알레르기성 반응, 등이 발생하지 않고, 합리적인 이점-단점 비를 갖고 의도된 용도에 효과적임을 의미한다.

[0593] 용어 약학적으로 허용가능한 담체는 약학적으로 허용가능하고 접합체의 생체활성 및 특성을 방해하지 않는 담체 물질을 지칭한다. 수성 담체의 예는 비제한적으로 완충된 식염수, 및 기타 등등을 포함한다. 약학적으로 허용가능한 담체는 조성물을 생리학적 조건에 가깝게 만드는 담체 물질, 예컨대 pH 조정 제제, 완충화 제제, 독성 조정 제제 및 기타 등등, 및 아세트산나트륨, 염화나트륨, 염화칼륨, 염화칼슘, 락트산나트륨, 및 기타 등등을 또한 포함한다. 일부 구현예에서, 용어 "담체"는 치료를 위하여 활성 성분과 투여되는 희석제, 보조제, 부형제, 또는 비히클을 지칭한다. 이러한 약학적 담체는 멸균 액체, 예컨대 물 및 석유, 동물, 식물 또는 합성에서 기원하는 오일, 예컨대 땅콩 오일, 대두 오일, 미네랄 오일 및 참깨 오일을 포함하는, 오일일 수 있다. 물은 약학적 조성물이 정맥내로 투여되는 때 바람직한 담체이다. 식염수 및 물 또는 글리세롤내 글루코스의 용액은 특히 주사를 위한 액체 담체로서 또한 사용될 수 있다. 적합한 약학적 부형제는 전분, 글루코스, 락토스, 수크로스, 젤라틴, 맥아, 쌀, 밀가루, 초크, 실리카 겔, 스테아르산나트륨, 글리세롤 모노스테아레이트, 활석, 염화나트륨, 탈지분유, 글리세롤, 프로필렌, 글리콜, 물, 에탄올 및 기타 등등을 포함한다. 원하는 경우, 조성물은 소량의 습식화 제제, 유화제, 또는 pH 완충화 제제 예컨대 아세테이트, 시트레이트 또는 포스페이트를 또한 포함할 수 있다

[0594] 일 구현예에서, 본 개시내용의 약학적 조성물은 약 1 내지 약 20, 예컨대 약 1 내지 약 10, 약 1 내지 약 8, 약 1 내지 약 6, 약 1 내지 약 4, 약 1 내지 약 3, 약 1 내지 약 2.5, 약 1 내지 약 2의 정수 또는 비-정수의 약물 대 항체 비 (DAR)를 갖는다. 특정한 구현예에서, 본 개시내용의 접합체는 약 2, 약 4, 약 6 또는 약 8의 DAR을 갖는다.

[0595] 치료 방법 및 용도

[0596] 접합체 또는 항체는 종양 및/또는 자가면역 질환의 치료에 유용하다. 접합체 치료에 감수성인 종양은 특이적 종양-연관된 항원 또는 세포 표면 수용체를 특징으로 하는 것들을 포함하고, 이들은 접합체에서 표적화 분자에 의해 인식될 것이고 접합체에서 페이로드/세포독소에 의해 사멸될 수 있다.

[0597] 따라서, 더욱 또 다른 양태에서, 종양 또는 자가면역 질환으로부터 선택된 질환, 장애 또는 병태를 치료하기 위한 약제의 제조에서 본 개시내용의 접합체 또는 항체 또는 본 개시내용의 약학적 조성물의 용도가 또한 제공된다.

[0598] 또 다른 양태에서, 종양 또는 자가면역 질환의 치료에서 사용을 위한 본 개시내용의 접합체 또는 본 개시내용의 약학적 조성물이 제공된다.

[0599] 또 다른 양태에서, 종양 또는 자가면역 질환의 치료에서 사용을 위한 본 개시내용의 항체 또는 본 개시내용의 약학적 조성물이 제공된다.

[0600] 추가 양태에서, 종양 또는 자가면역 질환을 치료하는 방법으로서, 유효량의 본 개시내용의 접합체 또는 항체 또는 본 개시내용의 약학적 조성물을 치료를 필요로 하는 개체에게 투여하는 것을 포함하는 방법이 제공된다.

[0601] 바람직한 구현예에서, 항-인간 TROP2 항체 및 작은 분자 세포독소의 접합에 의해 형성된 본 개시내용의 접합체는 종양 세포의 표면 상에서 TROP2에 특이적으로 결합할 수 있고 TROP2-발현 종양 세포를 선택적으로 사멸시킬 수 있다. 또 다른 바람직한 구현예에서, TROP2-양성 종양으로부터 선택된 질환, 장애 또는 병태를 치료하기 위한 약제의 제조에서 본 개시내용의 접합체 (또는 항체) 또는 본 개시내용의 약학적 조성물의 용도가 제공된다. 더욱 바람직한 구현예에서, 질환, 장애 또는 병태는 TROP2-양성 종양이다. 일 구현예에서, TROP2-양성 종양은 유방암, 위암, 폐암, 난소암, 요로상피암, 및 기타 등등으로 이루어지는 군으로부터 선택된다.

[0602] 대상체에게 투여된 접합체 (또는 항체)의 투약량은 상당한 정도로 조정될 수 있다. 투약량은 특정한 투여 루트 및 대상체의 필요에 따라 가변할 수 있고, 의료 전문가의 판단에 적용될 수 있다.

[0603] **유익한 효과**

[0604] 본 발명의 항체-약물 접합체는 특별히 설계된 링커-페이로드를 사용하고, 더욱 안정하고 더 낮은 DAR에서 큰 효능을 달성할 수 있고, 그러므로 부작용을 감소시킬 수 있고 치료적 지수를 증가시킬 수 있다.

[0605] 본 개시내용은 독특한 구조가 있는 결합 단위를 활용하고 표적화 분자 및 페이로드의 접합을 촉매화하기 위해 리가제를 사용한다. 본 개시내용의 접합체는 양호한 균질성, 고 활성 및 고 선택성을 갖는다. 게다가, 결합 단

위-페이로드 중간체의 독성은 유리 페이로드의 것보다 훨씬 더 낮고, 그래서 약물의 제작 과정은 덜 유해하고, 이는 산업적 생산에서 유리하다.

[0606] 본 개시내용의 접합체는 하기 기술적 효과들 중 적어도 하나를 달성한다:

[0607] (1) 표적 세포에 대한 높은 억제성 활성, 또는 표적 세포에 관한 강한 사멸 효과.

[0608] (2) 양호한 물리화학적 특성 (예를 들면, 용해도, 물리적 및/또는 화학적 안정성).

[0609] (3) 양호한 약동학적 특성 (예를 들면, 혈장에서 양호한 안정성, 적절한 반감기 및 작용의 지속기간).

[0610] (4) 양호한 안전성 (비-표적 정상 세포 또는 조직에 관한 낮은 독성, 및/또는 더 적은 부작용, 더 넓은 치료 윈도우), 등.

[0611] (5) 고도로 모듈성 설계, 다중 약물의 간단한 조립.

[0612] **실시예**

[0613] 제조예

[0614] 대상 및 기술적 해결책을 더욱 명확하게 실례하기 위해, 본 개시내용을 특정 실시예를 참조하여 아래에 추가로 기재한다. 실시예가 본 개시내용의 범위를 제한하도록 의도되지 않음이 이해되어야 한다. 하기 실시예에서 언급되지 않았던 특정 실험적 방법을 종래 실험적 방법에 따라 실시하였다.

[0615] 계기, 물질 및 시약

[0616] 달리 명시되지 않는 한, 실시예에서 사용된 계기 및 시약은 상업적으로 이용가능하다. 시약을 추가 정제 없이 직접적으로 사용할 수 있다.

[0617] MS: Thermo Fisher Q Exactive Plus, Water2795-Quattro 마이크로 삼중 사중극자 질량 분석기

[0618] HPLC : Waters 2695, Agilent 1100, Agilent 1200

[0619] 반-분취형 HPLC: Lisure HP 플러스 50D

[0620] 유세포 분석: CytoFLEX S

[0621] HIC-HPLC: 부틸-HIC; 이동상 A: 25 mM PB, 2M $(NH_4)_2SO_4$, pH 7.0; 이동상 B: 25 mM PB, pH 7.0; 유속: 0.8 ml/분; 획득 시간: 25 분; 주사량: 20 μg; 컬럼 온도: 25 ℃; 검출 파장: 280 nm; 샘플 챔버 온도: 8 ℃.

[0622] SEC-HPLC: 컬럼: TSK-겔 G3000 SWXL, TOSOH 7.8 mm ID × 300 mm, 5 μm; 이동상: 0.2 M KH_2PO_4, 0.25 M KCl, pH 6.2; 유속 : 0.5 ml/분; 획득 시간: 30 분; 주사 부피: 50 μl; 컬럼 온도: 25 ℃; 검출 파장; 280 nm; 샘플 트레이 온도: 8 ℃.

[0623] CHO를 Thermo Fisher Scientific으로부터 수득하였고; pcDNA 3.3을 Life Technology로부터 수득하였고; HEK293F를 Prejin으로부터 수득하였고; PEIMAX 형질감염 시약을 Polyscience로부터 수득하였고; MabSelect Sure ProA를 GE로부터 수득하였고; Capto S ImpAct를 GE로부터 수득하였고; Rink-아미드-MBHA-수지 및 디클로로 수지를 Nankai 합성으로부터 수득하였고; HCC1954를 ATCC CAT# CRL-2338로부터 수득하였고; SK-BR-3을 ATCC CAT# HTB-30으로부터 수득하였고; BT-474를 ATCC CAT# HTB-20으로부터 수득하였고; NCI-N87 세포를 ATCC CAT# CRL-5822로부터 수득하였고; MCF7을 ATCC CAT# HTB-22로부터 수득하였고; MDA-MB-231을 ATCC CAT# HTB-26으로부터 수득하였고; MDA-MB-468을 ATCC CAT# HTB-132로부터 수득하였고; CFPAC-1을 ATCC CAT# CRL-1918로부터 수득하였고; NCI-H2110을 ATCC CAT# CRL-5924로부터 수득하였고; JIMT-1을 Wuxi Apptech으로부터 수득하였고; Capan-1을 ATCC CAT# CRL-1573으로부터 수득하였고;; *스타필로콕쿠스 아우레우스*에서 유래된 최적화된 재조합 효소 소르타제 A를 *E. 콜리*에서 제조한다.

[0624] **실시예 1 항체 발현 벡터의 작제, 항체 발현, 정제 및 식별**

[0625] 1.1 항-TROP2 항체를 인코딩하는 발현 벡터의 작제

[0626] 항-TROP2 항체의 경쇄를 인코딩하는 발현 벡터를 생성하기 위해, LC의 핵산 서열을 pCDNA 3.3 벡터 (Life technology)로 개별적으로 클로닝하였고; 항-TROP2 항체의 중쇄를 인코딩하는 발현 벡터를 생성하기 위해, HC의 핵산 서열을 pCDNA 3.3 벡터 (Life technology)로 개별적으로 클로닝하였다.

표 3 항체의 서열

명칭	HC or LC	서열번호
hRS7 (TRODELVY 제)	HC	30
	LC	34
다토포타맙	HC	33
	LC	35
Ab13	HC	31
	LC	34
Ab16	HC	32
	LC	34
GQhRS7	HC	30
	LC	40
GQAb13	HC	31
	LC	40
GQAb16	HC	32
	LC	40

주석: ADC 의 제조 과정에서, LPETGG 서열에서 GG 의 업스트림 펩티드 결합은 소르타제 A 에 의해 절단되고, 생성된 중간체는 링커-페이로드내 G_3 의 유리 N-말단에 결합되어 새로운 펩티드 결합을 생성한다.

[0627]

[0628] 1.2 항-TROP2 항체의 발현

[0629] 항-TROP2 항체의 경쇄 및 중쇄를 인코딩하는 플라스미드를 페어링하였고 2:1의 질량비로 혼합하였다. 플라스미드 쌍 및 PEIMAX (Polyscience) 형질감염 시약을 HEK293F 기초 배지에 별도로 희석하였고 그 다음 고르게 혼합하였다. 혼합물을 실온에서 방치하였고 HEK293F 씨드 세포 배양물에 첨가하였다. 세포를 32에서 24 시간 동안 배양하였고 세포 밀도 및 생존력 분석을 위하여 샘플링하였고 10% 부피의 HEK293F 공급 배지로 보충하였다. 그 다음 배양 온도를 추후 배양을 위하여 32℃로 이동하였다. 72 시간의 인큐베이션에, 세포 배양물을 세포 밀도 및 생존력 분석을 위하여 재차 샘플링하였다. 144 시간의 인큐베이션에, 세포 배양물을 세포 밀도 및 생존력 분석을 위하여 샘플링하였다.

[0630] 1.3 항-TROP2 항체의 정제

[0631] 항체를 제조업체의 지시에 따라 친화도 크로마토그래피에 의해 정제하였다. 간략히, 크로마토그래피 컬럼 (BestChrom, Shanghai, 중국)을 MabSelect SureLX 수지 (GE Healthcare)로 패킹하였고 50 mM Tris, 150 mM NaCl, pH 7.4로 평형화하였다. 그 다음 세포 배양물의 상청액을 수득하였고 컬럼에 적용하였다. 컬럼을 50 mM Tris, 150 mM NaCl, pH 7.4로 세정하여 비-특이적으로 결합된 단백질을 제거하였다. 그 다음 항체를 50 mM 시트레이트 완충액, pH 3.5로 용출하였고 항체-함유 용출액을 1 M Tris-HCl, pH 9.0을 이용하여 pH 6.5로 조정하였다. 최종적으로, 항체의 완충액을 Anicon Ultra-15 원심분리 필터 (Merk Millipore)에 의해 50 mM Tris, 150 mM NaCl, pH 7.4로 교환하였다.

[0632] 1.4 결합 역학 및 친화도 분석

[0633] 결합 역학 및 친화도 분석을 수행하였다. 표면 플라스몬 공명 (SPR) 분석을 제조업체의 지침에 따라 센서 칩 단백질 A (GE healthcare)가 있는 Biacore T200 (GE healthcare)에서 수행하였다. 모든 측정을 25℃에 HBS-EP^+ 완충액 (10 mM HEPES, pH 7.4, 150 mM NaCl, 3 mM EDTA, 및 0.05% 계면활성제 P20)에서 수행하였다. 정제된 항체의 각각의 약 110-140 RU (공명 단위)를 각각 센서 칩의 유동 셀 2 및 4 (즉, 반응 표면)에서 포획하였다. 유동 셀 1 및 3을 HBS-EP^+ 완충액으로 처리하여 참조 표면의 역할을 하였다.

[0634] 인간 TROP2 (즉, 분석물) (Acrobio 시스템)의 재조합 세포외 도메인의 시리얼 희석액 (243, 81, 27, 9, 3, 1, 0.333, 및 0.111 nM, 각각)을 HBS-EP^+ 완충액에서 제조하였다. 항체를 포획한 다음 30 μL/분의 유속으로 TROP2의 시리얼 희석액을 3-분 주사하였고 (회합 상) 완충액을 10 분 유동하였다 (해리 상). 칩 표면을 50 μL/분의 유속으로 10 mM 글리신-HCl pH 1.5의 30-초 주사의 2개 펄스에 의해 재생하였다. 수집된 데이터를, 하기 단계: (1) y-축 상에서 응답 및 x-축 상에서 주사의 시작을 0으로 설정하는 단계, (2) 참조 표면 데이터를 반응 표면

데이터로부터 먼저 차감하여 분석물 주사 곡선을 얻고, 그 다음 완충액 주사 곡선을 분석물 주사 곡선으로부터 차감함으로써 이중 참조를 수행하는 단계, 및 (3) 글로벌 적합성을 갖춘 1:1 결합 모델을 사용하여 역학 분석을 수행하는 단계를 포함하는, 당업계에서 알려진 방법을 사용하여 Biacore T200 평가 소프트웨어에서 프로세싱하였다. 각 항체에 대한 결과를 *Ka* (온-레이트), *Kd* (오프-레이트) 및 K_D (평형 해리 상수)로서 제시하였다.

[0635] 1.5 항-TROP2 항체의 SEC-HPLC 검출

[0636] 항체 샘플을 12,000 rpm으로 5 분 동안 원심분리하였고, 상청액을 SEC-HPLC 컬럼에 적용하여 단량체 (온전한 항체에 상응함), 각 항체의 고분자량 (HMW, 응집으로 인한 항체 응집체에 상응함) 및 저분자량 (LMW, 분해로 인한 항체 단편에 상응함) 형태의 백분율을 검출하였다.

[0637]

항체	*Kd* (nM)	순도 (SEC-HPLC)			HIC 체류 시간
		HMW(%)	단량체 (%)	LMW(%)	
다토포타맙 (DS1062a Ab)	13	0.41	99	0	6.605±0.056
hRS7	1.28	1.22	99	0.1	9.412±0.003
Ab13	8.16	0.62	99	0	7.476±0.025
Ab16	13.1	0.47	99	0	9.358±0.037

[0638] Trop2를 정상 조직에서 널리 발현하고, Ab13 및 Ab16의 친화도를 감소시킨다. 저 친화도 항체는 이전 실험에서 검증된 효능을 유지하면서 안전성을 개선할 수 있어야 한다.

[0639] 1.6 내재화 활성

[0640] 생존력이 양호한 MDA-MB-468을 트립신화하였고, 수집하였고, 냉 FACS 완충액 (DPBS + 2% FBS)에서 현탁하였고 2×10^6 세포/ml로 조정하였다. 항-Trop2 항체 및 아이소타입 대조군 항체 샘플을 20 분 동안 실온에서 1:1의 몰비로 항-인간-IgG-Fc-AF647 2차 항체와 혼합함으로써 형광 표지화하였다. 표지화된 항체를 10 μg/ml의 최종 농도로 세포 현탁액에 첨가하였다. 항체-세포 혼합물을 1 시간 동안 얼음 위에서 인큐베이션하였다. 표면 결합 후, 항체-세포 혼합물을 냉 FACS 완충액에 의해 2회 세정하여 과잉 항체를 제거하였다. 세포를 0 분, 10 분, 30 분, 60 분, 90 분, 120 분, 180 분 및 240 분 동안 항체 내재화를 위하여 37℃에 인큐베이션하였고, 각 시점에 V-바닥 96 웰 플레이트로 웰당 1×10^5 세포를 옮겼다. 내재화를 빙조에 세포를 복귀시킴으로써 중단하였다. 비-내재화 세포 (0 분)를 MAX 및 MIN 그룹으로 분할하였고, 한편 항체 내재화된 세포를 I 그룹으로서 표시하였다. MIN 및 I 그룹을 퀀치 완충액 (150 mM NaCl + 100 mM 글리신, pH=2.0 내지 2.5)에 의해 2회 세정하여 항체의 표면 결합을 해리하였다. 퀀치 후, 모든 그룹을 FACS 완충액으로 2회 세정하였고 유세포 분석에 의해 APC 채널에서 분석하였다.

[0641] MFI 데이터를 아래 공식에 포함하였고, 결과를 Prism 6에서 1 상 지수 연관 함수에 의해 분석하였다.

[0642] 아이소타입 대조군: $MFI_{(I)}=MFI_{(샘플,\ I)}-MFI_{(아이소타입\ 대조군\ 항체,\ I)}$

[0643] $MFI_{(MAX)}=MFI_{(샘플,\ MAX)}-MFI_{(음성\ 항체,\ MAX)}$

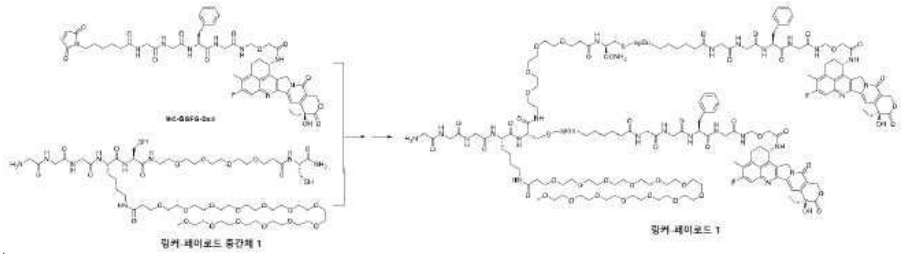
[0644] $MFI_{(MIN)}=MFI_{(샘플,\ MIN)}-MFI_{(음성\ 항체,\ MIN)}$

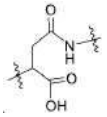
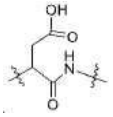
[0645] 내재화 비: $R_{(t)}=(MFI_{(I)}-MFI_{(MIN)})/MFI_{(MAX)}\times100\%$.

[0646] 도 1에 도시된 대로, 모든 4개 항체는 MDA-MB-468에서 비교가능한 내재화 활성을 보여준다.

[0647] **실시예 2 중간체의 제조**

[0648] 실시예 2.1 링커-페이로드 1 및 링커-페이로드 2의 제조

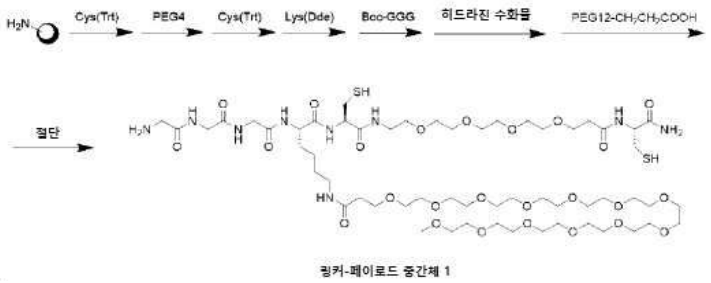
[0649] 

[0650] *op*Su는  및  의 혼합물임;

[0651] 중간체 MC-GGFG-DXd의 제조

[0652] 중간체 MC-GGFG-DXd는 상업적으로 이용가능하거나 EP2907824에 기재된 대로 절차에 따라 제조한다. 이 화합물을 링커-페이로드 1을 제조하는데 사용한다.

[0653] 링커-페이로드 중간체 1의 제조

[0654] 

링커-페이로드 중간체 1

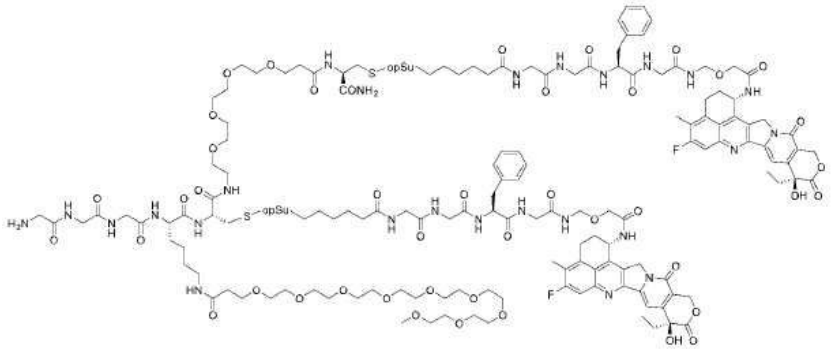
[0655] 링커-페이로드 중간체 1을 Rink-아미드-MBHA-수지를 사용하는 종래 고체상 폴리펩티드 합성에 의해 합성할 수 있다. Fmoc를 결합 단위에서 아미노산을 보호하는데 사용하였다. 커플링 시약을 HOBT, HOAt/DIC, DCC, EDCI 또는 HATU로부터 선택하였다. 합성 후, 생성물을 수지로부터 TFA/TIS/H_2O 용액을 사용하여 절단하였다. 생성물을 분취형-HPLC에 의해 정제하였고, 동결건조하였고 사용을 위하여 저장하였다. MS m/z: $[M-H]^-$ = 1382.6.

[0656] 링커-페이로드 1의 제조

[0657] 링커-페이로드 중간체 1 및 MC-GGFG-DXd (몰비 ~1:2)를 칭량하였고 물 및 DMF, 각각에 용해하였고, 그 다음 철저히 혼합하여 혼합물을 제공하였고, 이것을 0-40℃에 0.5-30시간 동안 반응하였다. 일단 반응을 완료하였다면, 반응 혼합물을 적절한 양의 Tris Base 용액 또는 개환 반응을 촉진시키는 다른 용액과 직접적으로 첨가하였고, 반응을 0-40℃에 또 다른 0.2-20시간 동안 수행하였다. 반응을 완료한 후, 생성물을 반-분취형/분취형 HPLC에 의해 정제하였고 동결건조하여 링커-페이로드 1을 수득하였다. MS m/z: $[(M+3H)/3]^+$ = 1163.3.

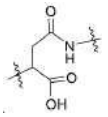
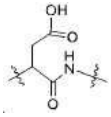
[0658] 링커-페이로드 2의 제조

[0659] 하기 링커-페이로드 링커-페이로드 2를 링커-페이로드 1과 유사한 합성 루트 및 시약을 사용하여 제조할 수 있다.



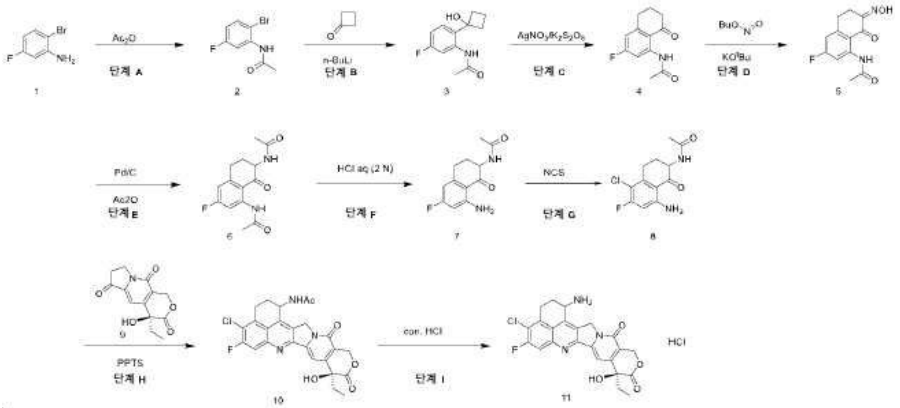
링커-페이로드 2

[0660]

[0661] *op*Su는  및  의 혼합물이다.

[0662] 실시예 2.2 링커-페이로드 3 및 링커-페이로드 4의 제조

[0663] 중간체 11의 제조



[0664]

[0665] 단계 A: N-(2-브로모-5-플루오로페닐)아세트아미드: 아세트산 (500 mL) 중 아세트산 무수물 (214 g, 2.10 mol)의 교반된 용액에 진한 H_2SO_4 (3 mL), 이어서 2-브로모-5-플루오로아닐린 (100 g, 526.27 mmol)을 부분적으로 실온에서 첨가하였다. 혼합물을 3 시간 동안 교반하였고, 그 다음 2000 mL 빙수에 부었다. 침전물을 형성하였고, 이것을 여과에 의해 수집하였고 실온에서 진공내 건조하여 N-(2-브로모-5-플루오로페닐)아세트아미드 (105 g)를 황색 고체로서 제공하였다. ^{1}H NMR (400 MHz, DMSO-d_6) δ 7.68 (dd, J = 8.9, 6.0 Hz, 1H), 7.61 (ddd, J = 10.7, 5.3, 3.1 Hz, 1H), 7.02 (ddd, J = 8.9, 8.0, 3.1 Hz, 1H), 2.11 (s, 3H). MS m/z 232.0(M+H).

[0666] 단계 B: N-(5-플루오로-2-(1-히드록시시클로부틸)페닐)아세트아미드: THF (1000 mL) 중 N-(2-브로모-5-플루오로페닐)아세트아미드 (105 g, 452.48 mmol)의 교반된 용액에 n-BuLi (594 mL, n-헥산 중 1.6 M, 950.22 mmol)를 적가식으로 1 시간 동안 -78℃에 첨가하였다. 완료 후, 혼합물을 0.5 시간 동안 N_2 하에서 교반하였다. 그 다음 THF (50 mL) 중 시클로부타논 (38.06 g, 542.98 mmol)의 용액을 -78℃에 0.5 시간 동안 적가식으로 첨가하였다. 혼합물을 -78℃에서 실온으로 6 시간 동안 교반하였다. 혼합물을 0℃에서 수성 500 mL 포화된 NH_4Cl에 부었다. 에틸 아세테이트 (500 mL x 3)로 추출하였고, 염수 (250 mL x 2)로 세정하였고, Na_2SO_4 상에서 건조하였고 농축하였다. 혼합물을 (PE/EA =1:1, 100 mL)로 10 분 동안 분쇄하였고, 여과하였고 케이크를 수집하였고 진공내 건조하여 N-(5-플루오로-2-(1-히드록시시클로부틸)페닐)아세트아미드 (24 g)를 황색 고체로서 제공하였다. LCMS m/z 206.1(M-18+H), 246.1(M+Na).

[0667] 단계 C: N-(3-플루오로-8-옥소-5,6,7,8-테트라히드로나프탈렌-1-일)아세트아미드: CH_2Cl_2 (170 mL) 및 물 (170 mL) 중 N-(5-플루오로-2-(1-히드록시시클로부틸)페닐)아세트아미드 (24 g, 107.50 mmol)의 교반된 혼합물에 질

산은 ($AgNO_3$) (5.48 g, 32.25 mmol) 및 과황산칼륨 ($K_2S_2O_8$) (58.12 g, 215.01 mmol)을 첨가하였고, 혼합물을 30℃에서 6 시간 동안 교반하였다. 혼합물을 셀라이트에서 여과하였고 CH_2Cl_2 (100 mL)로 세정하였고, 여과물을 농축하였고 FCC(EA/PE=0-40%)에 의해 정제하여 N-(3-플루오로-8-옥소-5,6,7,8-테트라히드로나프탈렌-1-일)아세트아미드 (14 g)를 밝은 황색 고체로서 제공하였다. MS m/z 222.1(M+H).

[0668] 단계 D: N-(3-플루오로-7-(히드록시이미노)-8-옥소-5,6,7,8-테트라히드로나프탈렌-1-일)아세트아미드: 0℃에 THF (500 mL) 중 N-(3-플루오로-8-옥소-5,6,7,8-테트라히드로나프탈렌-1-일)아세트아미드 (14 g, 63.28 mmol)의 교반 혼합물에 1-부틸 니트라이트 (8.48 g, 63.28 mmol), 이어서 t-BuOK(8.52 g, 75.94 mmol)를 첨가하였다. 혼합물을 0℃에 2 시간 동안 교반하였다. 완료 후, 혼합물을 HCl (2 N)에 의해 산성화하여 pH=3 조정하였다. 혼합물을 에틸 아세테이트 (200 mL x 3)에 의해 추출하였고, 염수 (100 mL x 2)에 의해 세정하였고, Na_2SO_4 상에서 건조하였고 감압 하에서 농축하였다. 조 혼합물을 tert-부틸 메틸 에테르 (200 mL)로 10 분 동안 분쇄하였고, 여과하였고 케이크를 수집하였고 진공내 건조하여 N-(3-플루오로-7-(히드록시이미노)-8-옥소-5,6,7,8-테트라히드로나프탈렌-1-일)아세트아미드 (12 g)를 황색 고체로서 제공하였다. MS m/z 251.1(M+H).

[0669] 단계 E: N,N'-(3-플루오로-8-옥소-5,6,7,8-테트라히드로나프탈렌-1,7-디일)디아세트아미드: 아세트산 무수물 (90 mL) 및 THF (90 mL) 중 N-(3-플루오로-7-(히드록시이미노)-8-옥소-5,6,7,8-테트라히드로나프탈렌-1-일)아세트아미드 (12 g, 47.96 mmol)의 용액에 10% Pd/C (1 g)를 첨가하였고, 혼합물을 25℃에 H_2 분위기 하에서 16 시간 동안 교반하였다. 0℃로 냉각 후, Et_3N (20 mL)을 적가식으로 첨가하였고, 혼합물을 0℃에 1 시간 동안 교반하였다. 셀라이트에서 여과하였고, 여과물을 빙-수 (500 mL)에 부었다. 에틸 아세테이트 (500 mL x 3)로 추출하였고, 염수 (250 mL x 2)로 세정하였고, Na_2SO_4 상에서 건조하였고 농축하였다. 잔류물을 tert-부틸 메틸 에테르 (120 mL)로 10 분 동안 분쇄하였고, 여과하였고 케이크를 수집하였고 진공내 건조하여 N,N'-(3-플루오로-8-옥소-5,6,7,8-테트라히드로나프탈렌-1,7-디일)디아세트아미드 (7.9 g)를 황색 고체로서 제공하였다. MS m/z 279.1(M+H).

[0670] 단계 F: N,N'-(3-플루오로-8-옥소-5,6,7,8-테트라히드로나프탈렌-1,7-디일)디아세트아미드: MeOH (150 mL) 중 N,N'-(3-플루오로-8-옥소-5,6,7,8-테트라히드로나프탈렌-1,7-디일)디아세트아미드 (7.9 g, 28.39 mmol)의 용액에 수성 HCl (2 N, 150 mL)을 첨가하였고, 혼합물을 50℃에 7 시간 동안 교반하였다. 0℃로 냉각 후, 포화 수성 $NaHCO_3$을 적가식으로 첨가하여 pH = 8 조정하였다. 에틸 아세테이트 (200 mL x 3)로 추출하였고, 염수 (200 mL x 2)로 세정하였고, Na_2SO_4 상에서 건조하였고 감압 하에서 농축하여 N,N'-(3-플루오로-8-옥소-5,6,7,8-테트라히드로나프탈렌-1,7-디일)디아세트아미드 (6.0 g)를 황색 고체로서 제공하였다. ^{1}H NMR (400 MHz, 클로로포름-d) δ 6.57 (s, 3H), 6.18 (td, J = 11.1, 2.4 Hz, 2H), 4.52 (dt, J = 13.3, 5.0 Hz, 1H), 3.13 (ddd, J = 17.5, 13.0, 4.6 Hz, 1H), 3.00 - 2.81 (m, 1H), 2.69 (dtd, J = 9.4, 4.6, 2.5 Hz, 1H), 2.09 (s, 3H), 1.79 (qd, J = 13.0, 4.3 Hz, 1H). MS m/z 237.1(M+H).

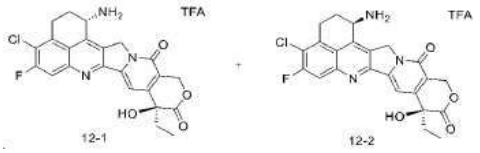
[0671] 단계 G: N-(8-아미노-5-클로로-6-플루오로-1-옥소-1,2,3,4-테트라히드로나프탈렌-2-일)아세트아미드: DMF (80 mL) 중 N,N'-(3-플루오로-8-옥소-5,6,7,8-테트라히드로나프탈렌-1,7-디일)디아세트아미드 (4.0 g, 16.93 mmol)의 용액에 NCS (2.26 g, 16.93 mmol)를 부분적으로 0℃에 첨가하였고, 혼합물을 실온에서 16 시간 동안 교반하였다. 혼합물을 200 mL 빙-수에 부었다. 침전물을 형성하였고, 이것을 여과에 의해 수집하였고 실온에서 진공내 건조하여 N-(8-아미노-5-클로로-6-플루오로-1-옥소-1,2,3,4-테트라히드로나프탈렌-2-일)아세트아미드 (4.0 g)를 황색 고체로서 제공하였다. ^{1}H NMR (400 MHz, DMSO-d_6) δ 8.11 (d, J = 8.0 Hz, 1H), 7.71 (s, 2H), 6.62 (d, J = 11.9 Hz, 1H), 4.53 (ddd, J = 13.0, 8.0, 4.7 Hz, 1H), 3.18 - 3.04 (m, 1H), 2.91 (ddd, J = 17.5, 12.4, 4.8 Hz, 1H), 2.21 - 2.08 (m, 1H), 1.99 - 1.83 (m, 4H). MS m/z 271.0(M+H).

[0672] 단계 H: N-((9S)-4-클로로-9-에틸-5-플루오로-9-히드록시-10,13-디옥소-2,3,9,10,13,15-헥사히드로-1H,12H-벤조[데]피라노[3',4':6,7]인돌리지노[1,2-b]퀴놀린-1-일)아세트아미드: 톨루엔 (400 mL) 중 N-(8-아미노-5-클로로-6-플루오로-1-옥소-1,2,3,4-테트라히드로나프탈렌-2-일)아세트아미드 (4.0 g, 14.78 mmol)의 혼합물에 (S)-4-에틸-4-히드록시-7,8-디히드로-1H-피라노[3,4-f]인돌리진-3,6,10(4H)-트리온 (4.28 g, 16.25 mmol), 피리디늄 p-톨루엔술포네이트 (1.11 g, 4.43 mmol) 및 o-크레졸 (10 mL)을 첨가하였고, 혼합물을 N_2 하에서 24 시간 동안 가열 환류하였다. 용매를 감압에 의해 제거하였고 혼합물을 FCC(THF/CH_2Cl_2=0-60%)에 의해 정제하여 N-((9S)-4-클로로-9-에틸-5-플루오로-9-히드록시-10,13-디옥소-2,3,9,10,13,15-헥사히드로-1H,12H-벤조[데]피라

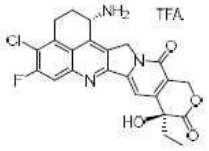
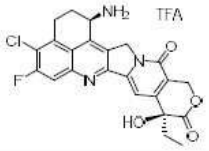
노[3',4':6,7]인돌리지노[1,2-b]퀴놀린-1-일)아세트아미드 (4.1 g)를 갈색 고체로서 제공하였다. MS m/z 498.1(M+H).

[0673] 단계 I: (9S)-1-아미노-4-클로로-9-에틸-5-플루오로-9-히드록시-1,2,3,9,12,15-헥사히드로-10H,13H-벤조[데]피라노[3',4':6,7]인돌리지노[1,2-b]퀴놀린-10,13-디온: 20 mL 진한 수성 HCl 중 N-((9S)-4-클로로-9-에틸-5-플루오로-9-히드록시-10,13-디옥소-2,3,9,10,13,15-헥사히드로-1H,12H-벤조[데]피라노[3',4':6,7]인돌리지노[1,2-b]퀴놀린-1-일)아세트아미드 (2.0 g, 4.02 mmol)의 혼합물을 70℃에 N_2 하에서 36 시간 동안 교반하였다. 혼합물을 감압 하에서 농축하여 조 (9S)-1-아미노-4-클로로-9-에틸-5-플루오로-9-히드록시-1,2,3,9,12,15-헥사히드로-10H,13H-벤조[데]피라노[3',4':6,7]인돌리지노[1,2-b]퀴놀린-10,13-디온 히드로클로리드 (2 g)를 갈색 고체로서 제공하였다. MS (ESI) m/z 456.1 (M+H).

[0674] 중간체 12 (12-1, 12-2)의 제조

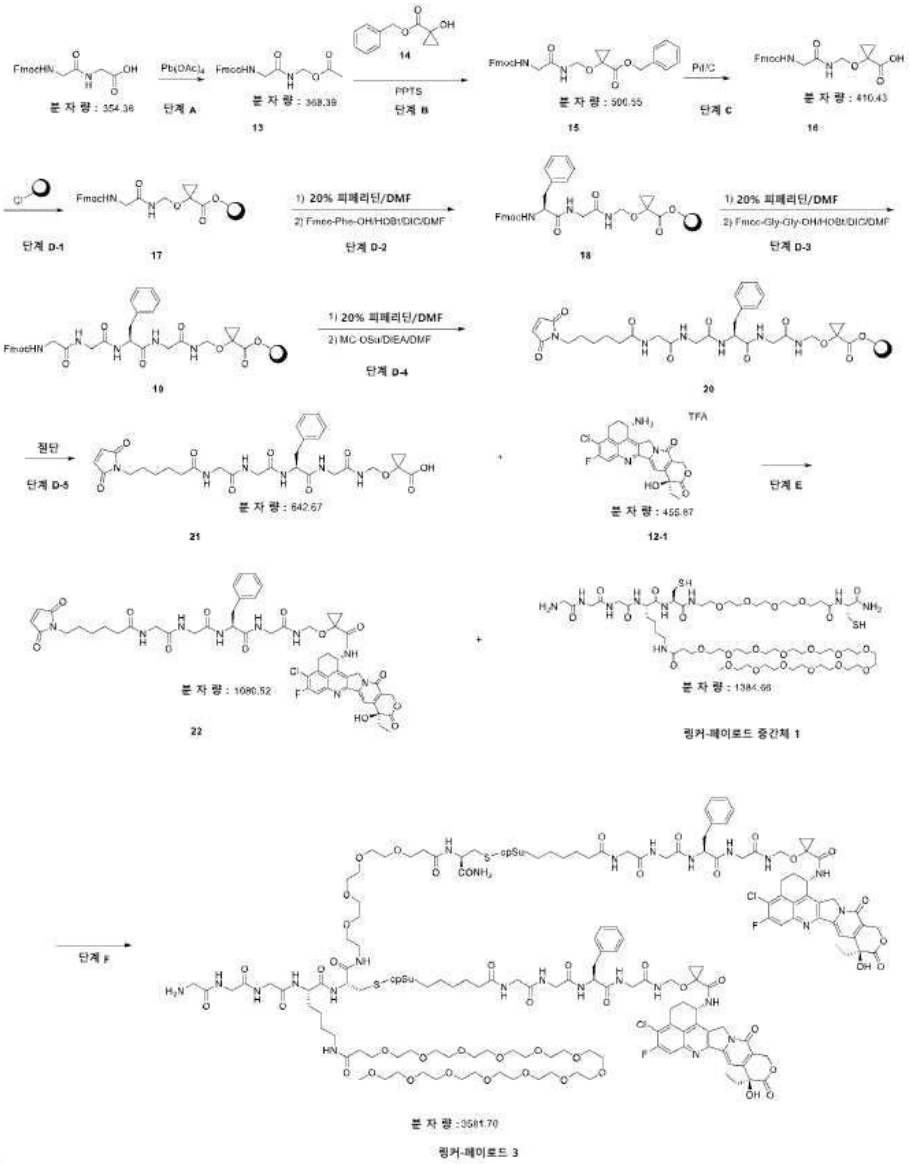
[0675] 

[0676] 12-1 및 12-2를 TFA 염으로서 (9S)-1-아미노-4-클로로-9-에틸-5-플루오로-9-히드록시-1,2,3,9,12,15-헥사히드로-10H,13H-벤조[데]피라노[3',4':6,7]인돌리지노[1,2-b]퀴놀린-10,13-디온 히드로클로리드 (중간체 11)로부터 분취형-HPLC에 의해 제조하였다.

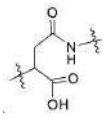
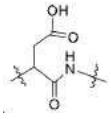
번호	구조	^{1}HNMR	MS (M+H)	HPLC 에서 체류 시간 (분)
12-1		^{1}H NMR (400 MHz, DMSO-d6) δ8.51 (d, *J* = 4.8 Hz, 3H), 8.17 (d, *J* = 10.2 Hz, 1H), 7.38 (s, 1H), 6.56 (s, 1H), 5.74 (d, *J* = 19.4 Hz, 1H), 5.52 – 5.40 (m, 3H), 5.16 (s, 1H), 3.44 (dd, *J* = 16.3, 4.1 Hz, 1H), 3.19 (t, *J* = 13.9 Hz, 1H), 2.57 (d, *J* = 14.0 Hz, 1H), 2.26 (t, *J* = 14.3 Hz, 1H), 1.89 (hept, *J* = 7.0 Hz, 2H), 0.89 (t, *J* = 7.3 Hz, 3H).	456.0	1.395
12-2		^{1}H NMR (400 MHz, DMSO-d6) δ 8.56 (s, 2H), 8.17 (d, J = 10.1 Hz, 1H), 7.38 (s, 1H), 6.57 (s, 1H), 5.74 (d, J = 19.4 Hz, 1H), 5.53 – 5.28 (m, 3H), 5.16 (s, 1H), 3.59 – 3.01 (m, 2H), 2.35 – 2.19 (m, 2H), 2.00 – 1.78 (m, 2H), 0.88 (t, J = 7.3 Hz, 3H).	456.0	1.541

[0677] 위에 HPLC 의 조건: 장비: Agilent 1200; 크로마토그래픽 컬럼: Waters XBridge C18 4.6*50mm,3.5um; 유동:2.0mL/분; 구배 용출: 5.0%-95.0%-95.0%-5.0%-5.0%, 0.00 분-1.50 분-2.50 분-2.52 분-3.00 분; 온도 : 40℃; 상 : A: 아세토니트릴, B: H_2O (0.05% TFA); 파장: 214 nm/254 nm.

[0678] 링커-페이로드 3의 제조



[0679]

[0680] *op*Su는  및  의 혼합물이다.

[0681] 화합물 13의 제조 (단계 A)

[0682] 4.33 g Fmoc-Gly-Gly-OH 및 6.84 g $Pb(OAc)_4$를 칭량하였고 500 ml 단목 둥근 바닥 플라스크에 첨가하였다. 무수 THF/톨루엔 (120/40 ml)을 질소 분위기 하에서 첨가하였고 용해를 위하여 교반하였다. 그 다음 1.16 mL의 피리딘을 반응 시스템에 첨가하였다. 반응 시스템을 80℃로 가열하였고 5시간 동안 질소 분위기 하에서 환류하였다. 샘플을 채집하였고 HPLC에 의해 검출하여 반응을 모니터링하였다.

[0683] 반응 시스템을 실온으로 냉각하였고, 여과하였고, 필터 케이크를 EA로 3 회 세정하였다. 여과물을 조합하였고 농축 건조하였다. 컬럼 크로마토그래피를 수행하여 (PE: EA = 100: 0 - 50: 100) 44%의 수율로 백색 고체에서 약 2000 mg의 표적 생성물을 제공하였다.

[0684] 화합물 15의 제조 (단계 B)

[0685] 200 mg 화합물 13을 칭량하였고 100 ml 단목 둥근 바닥 플라스크에 첨가하였다. 그 다음 15 ml THF를 첨가하였고 용해를 위하여 교반하였다. 그 다음 화합물 14 (312mg, 3.0 e.q.) 및 $TsOH \cdot H_2O$ (15 mg, 0.15 e.q.)를 반응

시스템에 첨가하였다. 반응 시스템을 밤새 실온에서 반응하였다. 샘플을 채집하였고 TLC (PE/EA=1: 1)에 의해 검출하여 반응을 모니터링하였다. 원료는 기본적으로 사라졌고 새로운 지점을 검출하였다.

[0686] 포화된 중탄산나트륨 용액을 첨가하여 반응을 퀀칭하였다. 추출을 EA로 3 회 동안 실행하였다. 유기 상을 조합하였고 식염수로 세정하였고, 무수 황산마그네슘으로 건조하였고 농축하였다. 조 생성물을 컬럼 크로마토그래피 (PE: EA = 5: 1 - 1: 1)에 의해 정제하여 29%의 수율로 무색 오일에서 약 80 mg의 표적 생성물을 제공하였다. MS m/z: $[M+H]^+$ = 501.1

[0687] 화합물 16의 제조 (단계 C)

[0688] 200 mg의 화합물 15를 칭량하였고 100 ml 단목 둥근 바닥 플라스크에 첨가하였다. 그 다음 10 ml의 EtOH 및 5 ml의 EA를 완전히 용해하면서 첨가하였다. 그 다음 40 mg의 팔라듐 탄소를 반응 시스템에 질소 분위기 하에서 첨가하였고, 반응 시스템을 수소 기체로 3 회 동안 퍼징하였다. 반응 시스템을 수소 분위기 하에서 유지하였고 0.5 시간 동안 실온에서 교반하였다. 샘플을 채집하였고 TLC (DCM/MeOH=10: 1)에 의해 검출하여 반응을 모니터링하였다. 원료는 기본적으로 사라졌고, 새로운 지점을 검출하였다.

[0689] 반응 시스템을 여과하였고, 필터 케이크를 EA로 3 회 동안 세정하였다. 여과물을 조합하였고 농축 건조하여 100% 수율로 백색 고체에서 200 mg 생성물을 제공하였다. 생성물을 다음 반응에서 정제 없이 직접적으로 사용할 수 있다. MS m/z: $[M-H]^-$ = 409.4.

[0690] 화합물 21의 제조 (단계 D)

[0691] 단계 D-1

[0692] 2.0 g의 디클로로수지를 칭량하였고 폴리펩티드 합성 튜브에 두었다. DCM (10 ml)을 첨가하였고 실온에서 30 분 동안 팽창하였다. 용매를 진공 흡입에 의해 제거하였다. 수지를 2회 DCM으로, 7 mL의 부피 및 각 세정 당 1 분의 시간 길이로 세정하였다. 용매를 진공 흡입에 의해 제거하였다. 그 다음 화합물 16 (200 mg)을 칭량하였고 50 ml 원심분리 튜브에 첨가하였다. DCM (약 10 ml)을 첨가하였다. 고체를 진탕에 의해 용해하였다. 위 수지에 첨가하였다. 교반을 실행하여 용액에서 모든 수지를 담갔다 (튜브 벽에 부착된 수지가 있다면, 소량의 DCM을 사용하여 튜브 벽을 세정하였다). 교반을 4-5 시간 동안 실행하였다. 반응을 완료한 후, 적절한 양의 메탄올을 첨가하였다. 교반을 30 분 동안 실행하였다. 용매를 진공 흡입에 의해 제거하였다. 수지를 DMF 1회, 메탄올 1회, DMF 1회, 메탄올 1회 및 DMF 2회 순서대로, 10 mL의 부피 및 각 세정에 대하여 1 분의 시간 길이로 세정하였다. 용매를 진공 흡입에 의해 제거하였다. 소량의 건조한 수지를 닌히드린 검출을 위하여 채집하였다. 수지는 무색이었고 투명하였고, 용액은 황색을 띄어, 다음 커플링 단계에 적합함을 나타냈다.

[0693] 단계 D-2

[0694] 10 mL 기성품 20% 피페리딘/DMF 용액을 첨가하고 매번 10 분 동안 반응함으로써 탈보호를 2회 실행하였다. 반응을 완료한 후, 용액을 진공 흡입에 의해 제거하였다. 수지를 DMF 2회, 메탄올 1회, DMF 1회, 메탄올 1회 및 DMF 2회 순서대로, 10 mL의 부피 및 각 세정에 대하여 1 분의 시간 길이로 세정하였다. 용매를 진공 흡입에 의해 제거하였다. 소량의 건조한 수지를 닌히드린 검출을 위하여 채집하였다. 양쪽 수지 및 용액은 암청색이었다.

[0695] 50 mL 원심분리 튜브에 563 mg Fmoc-Phe-OH, 197 mg HOBt를 첨가하였다. 그 다음 약 7 mL DMF를 첨가하였다. 고체를 진탕에 의해 용해하였다. 그 다음 0.24 mL DIC를 첨가하였다. 10-30 분 동안 활성화하여 활성화된 반응 용액을 제공하였다.

[0696] 3 몰 당량의 활성화된 반응 용액을 수지에 첨가하였다. 교반을 실행하여 용액에서 완전히 수지를 담갔다 (튜브 벽에 부착된 수지가 있다면, 소량의 DCM을 사용하여 튜브 벽을 세정하였다). 교반을 2-3 시간 동안 실행하였다. 반응을 완료한 후, 용매를 진공 흡입에 의해 제거하였다. 수지를 DMF 2회, 메탄올 1회, DMF 1회, 메탄올 1회 및 DMF 2회 순서대로, 10 mL의 부피 및 각 세정에 대하여 1 분의 시간 길이로 세정하였다. 용매를 진공 흡입에 의해 제거하였다. 소량의 건조한 수지를 닌히드린 검출을 위하여 채집하였다. 수지는 무색이었고 투명하였고, 용액은 황색을 띄어, 다음 커플링 단계에 적합함을 나타냈다.

[0697] 단계 D-3

[0698] 10 mL 기성품 20% 피페리딘/DMF 용액을 첨가하고 매번 10 분 동안 반응함으로써 탈보호를 2회 실행하였다. 반응을 완료한 후, 용액을 진공 흡입에 의해 제거하였다. 수지를 DMF 2회, 메탄올 1회, DMF 1회, 메탄올 1회 및 DMF 2회 순서대로, 10 mL의 부피 및 각 세정에 대하여 1 분의 시간 길이로 세정하였다. 용매를 진공 흡입에 의해 제

거하였다. 소량의 건조한 수지를 닌히드린 검출을 위하여 채집하였다. 양쪽 수지 및 용액은 암청색이었다.

[0699] 50 mL 원심분리 튜브에 531 mg Fmoc-GG-OH, 197mg HOBt를 첨가하였다. 그 다음 약 10 mL DMF를 첨가하였다. 고체를 진탕에 의해 용해하였다. 그 다음 0.24 mL DIC를 첨가하였다. 10-30 분 동안 활성화하여 활성화된 반응 용액을 제공하였다.

[0700] 3 몰 당량의 활성화된 반응 용액을 수지에 첨가하였다. 교반을 실행하여 용액에서 완전히 수지를 담갔다 (튜브 벽에 부착된 수지가 있다면, 소량의 DCM을 사용하여 튜브 벽을 세정하였다). 교반을 2-3 시간 동안 실행하였다. 반응을 완료한 후, 반응 용액을 진공 흡입에 의해 제거하였다. 수지를 DMF 2회, 메탄올 1회, DMF 1회, 메탄올 1회 및 DMF 2회 순서대로, 10 mL의 부피 및 각 세정에 대하여 1 분의 시간 길이로 세정하였다. 용매를 진공 흡입에 의해 제거하였다. 소량의 건조한 수지를 닌히드린 검출을 위하여 채집하였다. 수지는 무색이었고 투명하였고, 용액은 황색을 띄어, 다음 커플링 단계에 적합함을 나타냈다.

[0701] 단계 D-4

[0702] 10 mL 기성품 20% 피페리딘/DMF 용액을 첨가하고 매번 10 분 동안 반응함으로써 탈보호를 2회 실행하였다. 반응을 완료한 후, 용액을 진공 흡입에 의해 제거하였다. 수지를 DMF 2회, 메탄올 1회, DMF 1회, 메탄올 1회 및 DMF 2회 순서대로, 10 mL의 부피 및 각 세정에 대하여 1 분의 시간 길이로 세정하였다. 용매를 진공 흡입에 의해 제거하였다. 소량의 건조한 수지를 닌히드린 검출을 위하여 채집하였다. 양쪽 수지 및 용액은 암청색이었다. 그 다음, 462 mg MC-OSu를 50 mL 원심분리 튜브에 두었고, 약 10 mL DMF를 첨가하였다. 고체를 진탕에 의해 용해하였다. 그 다음 0.24 mL DIEA를 수지에 첨가하였다. 교반을 실행하여 용액에서 완전히 수지를 담갔다 (튜브 벽에 부착된 수지가 있다면, 소량의 DCM을 사용하여 튜브 벽을 세정하였다). 교반을 2-3 시간 동안 실행하였다. 반응을 완료한 후, 반응 용액을 진공 흡입에 의해 제거하였다. 수지를 DMF 2회, 메탄올 1회, DMF 1회, 메탄올 1회 및 DMF 2회 순서대로, 10 mL의 부피 및 각 세정에 대하여 1 분의 시간 길이로 세정하였다. 용매를 진공 흡입에 의해 제거하였다. 소량의 건조한 수지를 닌히드린 검출을 위하여 채집하였다. 수지는 무색이었고 투명하였고, 용액은 황색을 띄어, 다음 커플링 단계에 적합함을 나타냈다.

[0703] 단계 D-5

[0704] 수지를 10 mL의 메탄올로 2회 세정하였다. 그 다음 용매를 진공 흡입에 의해 철저히 제거하였다. 수지를 부어 버렸고 칭량하였다. 용해 완충액을 250 mL 원뿔 플라스크에서 제조하였고, 여기서: TFE/DCM의 비는 80%/20%이었고, 부피는 펩티드 수지의 중량의 7-8 배이었다. 용해 완충액을 펩티드 수지에 첨가하였고, 잘 진탕하였다. 수지를 용해 완충액에서 충분히 흡입하였고, 용해를 실온에서 2-3 시간 동안 실시하였다. 용해 완충액을 그 다음 주사기로 만든 간단한 필터를 사용하여 여과제거하였고, 수지를 1-2 ml DCM으로 세정하였고 폐기하였다. 그 다음 150 mL 사전냉각된 무수 에테르를 용해 완충액에 첨가하였고, 잘 진탕하였고 그 다음 20-30 분 동안 방치하였다. 50 mL 원심분리 튜브를 사용하여, 위의 시스템을 3 분 동안 3500 rpm으로 원심분리기에서 원심분리하였고, 상청액을 부어 버렸고 폐기하였다. 고체를 사전냉각된 무수 에테르로 진탕하였고, 초음파 하에서 1회 세정하였고, 3 분 동안 3500rpm으로 원심분리하였고, 상청액을 부어 버렸고 폐기하였다. 고체를 원심분리 튜브에 넣었고 밤새 공기 건조하였고, 그 다음 분취형 정제에 적용하여 40%의 수율로 백색 고체에서 125 mg의 생성물을 제공하였다. MS m/z: $[M-H]^-$ = 641.5.

[0705] 화합물 22의 제조 (단계 E)

[0706] 150 mg의 원료 화합물 21 및 55 mg의 TSTU를 칭량하였고 10 mL 단목 둥근 바닥 플라스크에 첨가하였고, 무수 DMF (3 mL)를 질소 분위기 하에서 첨가하였고 20 분 동안 교반하였다. 그 다음 18 mg 화합물 12-1 및 20 μl DIEA를 순서대로 반응 시스템에 첨가하였다. 교반을 실온에서 2-8 시간 동안 질소 분위기 하에서 실행하였다. 샘플을 채집하였고 HPLC에 의해 검출하여 반응을 모니터링하였다. 원료 피크는 완전히 사라졌고, 새로운 피크를 검출하였다.

[0707] 반응 시스템을 분취형 정제에 적용하였고, 표적 생성물을 수집하였고 동결건조하여 황색을 띈 고체에서 약 22mg의 생성물을 제공하였다. MS m/z: $[M+H]^+$ = 1081.0.

[0708] 링커-페이로드 3의 제조 (단계 F)

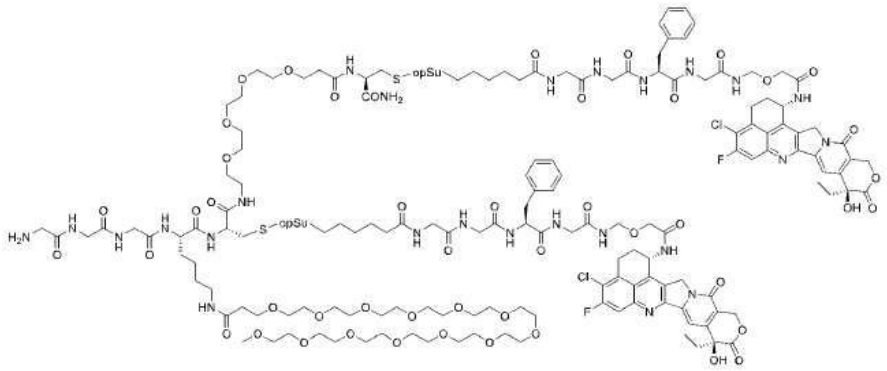
[0709] 화합물 22 (30 mg)를 칭량하였고 10 ml 단목 둥근 바닥 플라스크에 첨가하였고, 정제수 (2 ml)를 첨가하였다. 교반을 용해를 위하여 실행하였다. 링커-페이로드 중간체 1 (19.5 mg)을 함유하는 DMF 용액 (2 ml)을 반응 시스

템에 첨가하였고 교반하였다. 밤새 반응 후, HPLC를 사용하여 모든 원료가 중간체로 전환한 때까지 반응을 모니터링하였다. 반응 혼합물을 적절한 양의 Tris Base 용액 또는 개환 반응을 촉진하는 다른 용액과 직접적으로 첨가하였고, 반응을 0-40℃에 또 다른 0.2-20시간 동안 수행하였다. 반응을 모든 중간체가 소비된 때까지 HPLC에 의해 모니터링하였고 그 다음 아세트산 용액에 의해 퀀칭하였다.

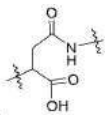
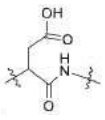
[0710] 반응 시스템을 분취형 정제에 적용하였고, 표적 생성물을 수집하였고 동결건조하여 황색을 띈 고체로 약 25mg의 링커-페이로드 3을 제공하였다. MS m/z: $[(M+3H)/3]^{+}$ = 1194.4.

[0711] 링커-페이로드 4의 제조

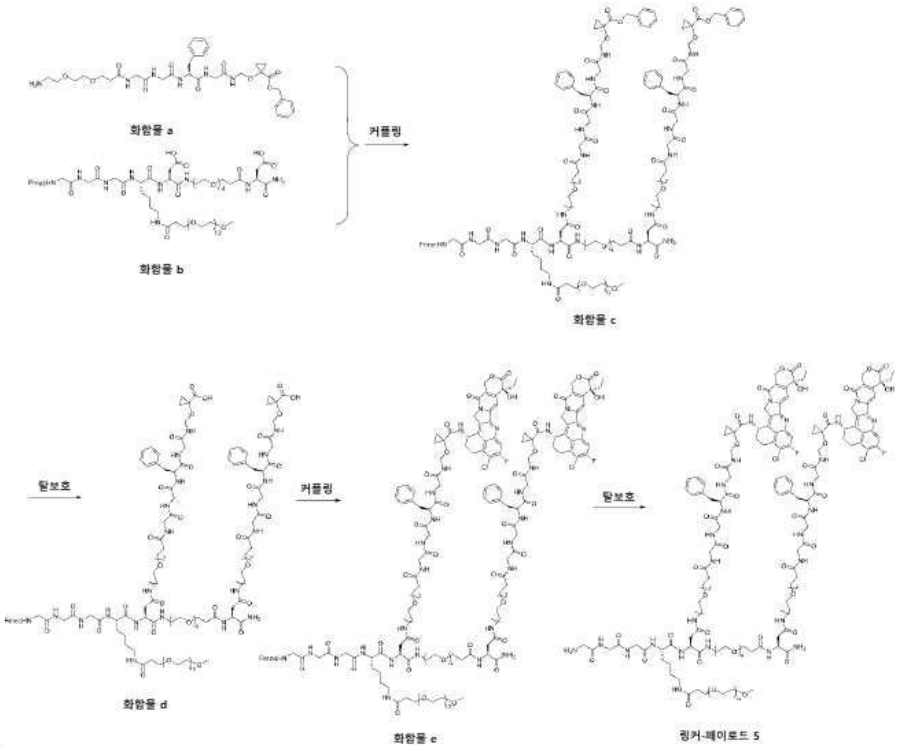
[0712] 하기 링커-페이로드 4를 링커-페이로드 3과 유사한 합성 루트 및 시약을 사용하여 제조할 수 있다. 링커-페이로드 4의 구조는 다음과 같다:

[0713] 

링커-페이로드 4

[0714] *op*Su는  및  의 혼합물이다.

[0715] 실시예 2.3 링커-페이로드 5의 제조

[0716] 

[0717] 단계 1: 중간체 화합물 b의 제조

[0718] 단계 1.1 NH_2-Asp(OtBu)-Rink 아미드 수지의 제조

[0719] 400 g의 Rink 아미드 수지를 칭량하였고 2400 mL의 DCM에 의해 팽창하였다. 2400 mL의 탈보호 시약을 첨가하여 Fmoc를 완전히 제거하였고 그 다음 실온에서 DMF 및 DCM으로 몇 회 세정하였다. 후속 닌히드린 테스트에서, 수지는 청색을 보여주었다.

[0720] 88.87 g Fmoc-Asp(OtBu)-OH 및 29.19 g HOBT를 칭량하였고 2000 mL DMF 및 80 mL DIC 용액에 용해하였다. 빙조에서 -10 ℃에 0.5 시간 동안 넣은 후, 이것을 수지와 반응 케틀에 천천히 첨가하였고, 반응을 실온에서 2-5 시간 동안 질소로 교반하였고, 그 다음 여과하였다. 수지를 DMF 및 DCM으로 계속해서 세정하였고 후속 닌히드린 테스트에서 무색 또는 밝은 황색을 보여주었다.

[0721] 2400 mL의 탈보호 시약을 첨가하여 Fmoc를 완전히 제거하였고 그 다음 실온에서 DMF 및 DCM으로 몇 회 세정하였다. 후속 닌히드린 테스트에서, 수지는 청색을 보여주었다.

[0722] 단계 1.2 NH_2-PEG4-Asp(OtBu)-Rink 아미드 수지의 제조

[0723] 131.64 g Fmoc-PEG4-OH 및 48.64 g HOBT를 칭량하였고 2000 mL DMF 및 80.0 mL DIC 용액에 용해하였다. 빙조에서 -10 ℃에 0.5 시간 동안 넣은 후, 이것을 수지와 반응 케틀에 천천히 첨가하였고, 반응을 실온에서 2-4 시간 동안 질소로 교반하였고, 그 다음 여과하였다. 수지를 DMF 및 DCM으로 계속해서 세정하였고 후속 닌히드린 테스트에서 무색 또는 밝은 황색을 보여주었다.

[0724] 2400 mL의 탈보호 시약을 첨가하여 Fmoc를 완전히 제거하였고 그 다음 실온에서 DMF 및 DCM으로 몇 회 세정하였다. 후속 닌히드린 테스트에서, 수지는 청색을 보여주었다.

[0725] 단계 1.3 NH_2-Asp(OtBu)-PEG4-Asp(OtBu)-Rink 아미드 수지의 제조

[0726] 222.18 g Fmoc-Asp(OtBu)-OH 및 72.96 g HOBT를 칭량하였고 2000 mL DMF 및 80 mL DIC 용액에 용해하였다. 빙조에서 -10 ℃에 0.5 시간 동안 넣은 후, 이것을 수지와 반응 케틀에 천천히 첨가하였고, 반응을 실온에서 2-4 시간 동안 질소로 교반하였고, 그 다음 여과하였다. 수지를 DMF 및 DCM으로 계속해서 세정하였고 후속 닌히드린 테스트에서 무색 또는 밝은 황색을 보여주었다.

[0727] 2400 mL의 탈보호 시약을 첨가하여 Fmoc를 완전히 제거하였고 그 다음 실온에서 DMF 및 DCM으로 몇 회 세정하였다. 후속 닌히드린 테스트에서, 수지는 청색을 보여주었다.

[0728] 단계 1.4 Dde-Lys(NH_2)-Asp(OtBu)-PEG4-Asp(OtBu)-Rink 아미드 수지의 제조

[0729] 191.75 g Dde-Lys(Fmoc)-OH 및 48.64 g HOBT를 칭량하였고 2000 mL DMF 및 80.0 mL DIC 용액에 용해하였다. 빙조에서 -10 ℃에 0.5 시간 동안 넣은 후, 이것을 수지와 반응 케틀에 천천히 첨가하였고, 반응을 실온에서 2-4 시간 동안 질소로 교반하였고, 그 다음 여과하였다. 수지를 DMF 및 DCM으로 계속해서 세정하였고 후속 닌히드린 테스트에서 무색 또는 밝은 황색을 보여주었다.

[0730] 2400 mL의 탈보호 시약을 첨가하여 Fmoc를 완전히 제거하였고 그 다음 실온에서 DMF 및 DCM으로 몇 회 세정하였다. 후속 닌히드린 테스트에서, 수지는 청색을 보여주었다.

[0731] 단계 1.5 Dde-Lys(mPEG12)-Asp(OtBu)-PEG4-Asp(OtBu)-Rink 아미드 수지의 제조

[0732] 170.84 g m-PEG12-CH_2CH_2COOH 및 48.64 g HOBT를 칭량하였고 2000 mL DMF 및 80.0 mL DIC 용액에 용해하였다. 빙조에서 -10 ℃에 0.5 시간 동안 넣은 후, 이것을 수지와 반응 케틀에 천천히 첨가하였고, 반응을 실온에서 2-4 시간 동안 질소로 교반하였고, 그 다음 여과하였다. 수지를 DMF 및 DCM으로 계속해서 세정하였고 후속 닌히드린 테스트에서 무색 또는 밝은 황색을 보여주었다.

[0733] 단계 1.6 NH_2-Lys(PEG12)-Asp(OtBu)-PEG4-Asp(OtBu)-Rink 아미드 수지의 제조

[0734] 2400 mL의 탈-Dde 시약을 첨가하였고, 반응을 실온에서 질소 하에서 0.5 시간 동안 교반하였고, 그 다음 여과하였다. 작업을 3 회 반복한 후, 수지를 DMF 및 DCM으로 계속해서 세정하였고 후속 닌히드린 테스트에서 청색을 보여주었다.

[0735] 단계 1.7 Fmoc-Gly-Gly-Gly-Lys(PEG12)-Asp(OtBu)-PEG4-Asp(OtBu)-Rink 아미드 수지의 제조

[0736] 111.08 g Fmoc-Gly-Gly-Gly-OH 및 48.64 g HOBT를 칭량하였고 2000 mL DMF 및 80.0 mL DIC 용액에 용해하였다. 빙조에서 -10 ℃에 0.5 시간 동안 넣은 후, 이것을 수지와 반응 케틀에 천천히 첨가하였고, 반응을 실온에서 2-4 시간 동안 질소로 교반하였고, 그 다음 여과하였다. 수지를 DMF 및 DCM으로 계속해서 세정하였고 후속 닌히드린 테스트에서 무색 또는 밝은 황색을 보여주었다. 수지 펩티드를 무수 에탄올로 3 회 세정하였고, 여과하였고 절단을 기다렸다.

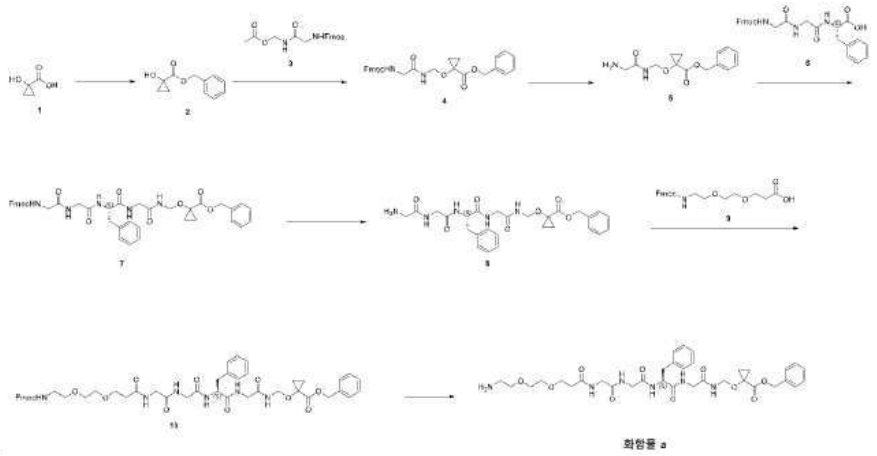
[0737] 단계 1.8 중간체 화합물 b의 제조

[0738] 10000 mL 절단 시약 (TFA:TIS:H_2O = 95:2.5:2.5)을 10L 반응기에 첨가하였고 -10±2℃로 냉각하였다. 건조되고 칭량된 수지를 첨가하였다. 반응을 실온으로 가온하였고 질소 하에서 2-3 시간 동안 교반하였다. 그 후, 수지를 여과하였고 100 mL의 TFA로 1회 세정하였다. 여과물 및 세정 용액을 조합하였다.

[0739] 40 L의 사전-냉각된 (-10℃ 아래) 냉 에테르를 생성물 용액에 첨가하였다. 혼합물을 10 분 동안 교반하였고, 그 다음 침전물을 원심분리하였다. 상청액을 원심분리 후 폐기하였고, 침전물을 수집하였고 냉 에테르로 세정하였고, 침전물을 재차 원심분리하였다 (매번 원심분리 스피드를 3600 rpm으로 설정하였고, 원심분리 시간은 5 분이었고, 원심분리 공동의 온도는 -5 ℃이었다).

[0740] 침전물을 조 화합물 b로서 수집하였다. 조 생성물을 분취형-HPLC에 의해 정제하였고 동결건조하여 순수한 화합물 b를 수득하였다

[0741] 단계 2: 중간체 화합물 a의 제조

[0742] 

[0743] 단계 2.1 화합물 2의 제조

[0744] 화합물 1 (1 e.q.) 및 DMF (5 v/v)를 반응 플라스크에 첨가하였고, 혼합물을 교반하였고 질소 보호 하에서 용해하였다. 빙조를 0-5℃로 냉각한 후, DIEA (3 e.q.)를 적가식으로 첨가하였고, 혼합물을 적가식으로 첨가 후 10 분 동안 5℃에 교반하였다. 그 다음 벤질 브로미드 (1.3 e.q.)를 적가식으로 첨가하였고, 적가식으로 첨가를 완료한 후, 약 20℃의 실온으로 자연적으로 상승하게 두었고 16 시간 동안 교반하였다.

[0745] 반응 용액을 빙수에 천천히 부었고, MTBE를 첨가하였고 교반하였고, 용액을 분리를 위하여 방치하였다. 수성 상을 MTBE로 4 회 추출하였고, 조합된 유기 상들을 포화된 염수로 세정하였고, 그 다음 유기 상을 무수 황산나트륨 상에서 건조하였고, 진공 하에서 농축하여 조 황색 오일을 수득하였고, 이것을 습식 방법에 의해 컬럼에 적용하였다. 밝은 황색 오일을 PE/EA=6:1의 용출에 의해 수득하였고, 수율은 100%이다.

[0746] 단계 2.2 화합물 4의 제조

[0747] 질소 보호 하에서, 중간체 2 (2.0 e.q.), 화합물 3 (1 e.q.) 및 THF (10 v/v)를 반응 플라스크에 첨가하였고 교반하여 용해하였고, TsOH (0.1 e.q.)를 칭량하였고 반응에 첨가하였고, 반응을 20-22℃에 4 시간 동안 유지하였다. 반응 용액을 빙수에 천천히 부었고, EA로 3 회 추출하였고, 조합된 유기 상을 포화된 수성 중탄산나트륨 용액, 물 및 포화된 염수로 계속해서 세정하였고, 유기 상을 무수 황산나트륨으로 건조하였고, 여과하였고 진공 하에 농축하여 조 생성물을 수득하였다. 생성물을 PE/EA=1:1의 용출에 의해 컬럼을 통해서 실리카 겔 샘플을 혼합함으로써 수집하였고, 농축하여 40%의 수율로 백색 고체를 수득하였다.

[0748] 단계 2.3 화합물 7의 제조

[0749] 질소 보호 하에서, 화합물 4 및 DMAc (10 v/v)를 반응 플라스크에 첨가하였고 교반하여 용해하였다. 반응을 14-18℃로 냉각하였고, DBU (0.5 e.q.)를 적가식으로 첨가하였고, 반응을 이 온도에 1.5 시간 동안 교반하였고, 원료의 반응의 완료를 TLC에 의해 모니터링하였다. 반응을 0-5℃로 냉각하였고, PPTS (0.5 e.q.), EDCI (1 e.q.), HOBT (1 e.q.) 및 화합물 6 (0.85eq)을 첨가하였고 0-10℃에 3-4 시간 동안 반응하였고, 반응을 LCMS에 의해 모니터링하였다.

[0750] 반응 용액을 빙수에 첨가하였고, 2-메틸테트라히드로푸란을 첨가하여 1회 추출하였고, 수성 상을 2-메틸테트라히드로푸란으로 2회 추출하였다. 유기 상들을 조합하였고, 0.5 M 염산으로 세정하였고, 포화된 수성 $NaHCO_3$, 물, 및 포화된 염수로 세정하였고, 무수 황산나트륨 상에서 건조하였고, 여과하였고, 농축하였고, 증발 건조하였고, 실리카 겔과 혼합하였고, 컬럼에 의해 정제하였다. 생성물을 DCM/MeOH의 용출에 의해 수집하였고 진공 하에서 농축하여 78%의 수율로 백색 고체를 수득하였다.

[0751] 단계 2.4 화합물 10의 제조

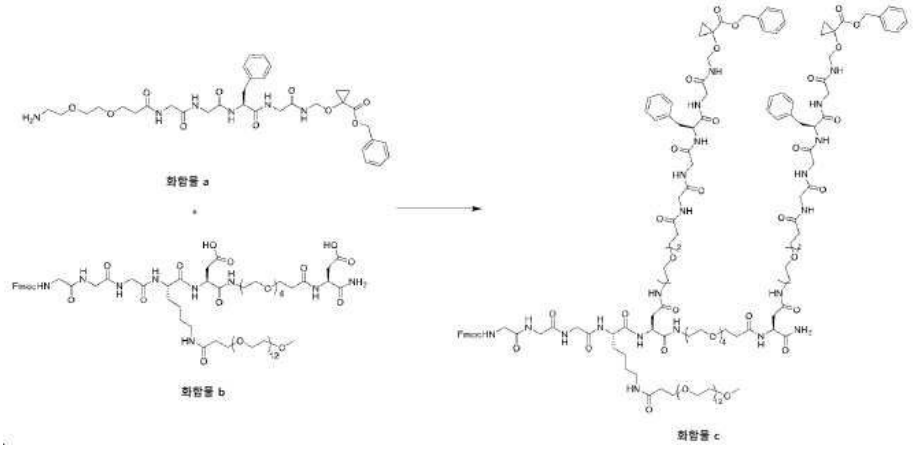
[0752] 질소 보호 하에서, 중간체 7 및 DMAc (10 v/v)를 반응 플라스크에 첨가하였고 교반하여 용해하였다. 반응을 14-18℃로 냉각하였고, DBU (0.5 e.q.)를 적가식으로 첨가하였고, 반응을 이 온도에 1.5 시간 동안 교반하였고, 반응의 완료를 TLC에 의해 모니터링하였다. 반응을 0-5℃로 냉각하였고, PPTS (0.5 e.q.), EDCI (1 e.q.), HOBT (1 e.q.) 및 화합물 9 (0.85 e.q.)을 첨가하였고 0-10℃에 3-4 시간 동안 반응하였고, 반응을 LCMS에 의해 모니터링하였다.

[0753] 반응 용액을 빙수에 첨가하였고, 2-메틸테트라히드로푸란을 첨가하여 1회 추출하였고, 수성 상을 2-메틸테트라히드로푸란으로 2회 추출하였다. 유기 상들을 조합하였고, 0.5 M 염산으로 세정하였고, 포화된 수성 $NaHCO_3$, 물, 및 포화된 염수로 세정하였고, 무수 황산나트륨 상에서 건조하였고, 여과하였고, 농축하였고, 증발 건조하였고, 실리카 겔과 혼합하였고, 컬럼에 의해 정제하였다. 생성물을 DCM/MeOH의 용출에 의해 수집하였고 진공 하에서 농축하여 50%의 수율로 백색 고체를 수득하였다.

[0754] 단계 2.5 화합물 a의 제조

[0755] 질소 보호 하에서, 중간체 10을 DCM (15 v/v)에 용해하였고, DBU (0.5 e.q.)를 20℃에 적가식으로 첨가하였고, 반응을 18-22℃에 5 시간 동안 교반하였다. 완료한 반응을 LCMS에 의해 모니터링하였다. 반응 용액을 DCM으로 희석하였고 습식 방법에 의해 컬럼에 의해 정제하였고, 생성물을 DCM:MeOH의 용출에 의해 수집하여 82%의 수율로 백색 고체를 수득하였다.

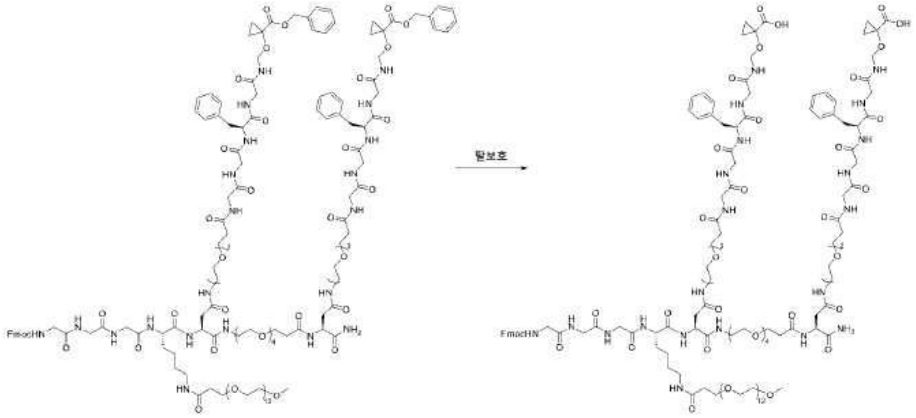
[0756] 단계 3: 중간체 화합물 c의 제조



[0757]

[0758] 화합물 b (400 mg, 0.245 mmol) 및 화합물 a (377 mg, 0.539 mmol)를 DMF (6 ml)에 용해하였고, 그 다음 DIPEA (159 mg, 1.23 mmol) 및 HATU (233 mg, 0.613 mmol)를 반응 용액에 첨가하였고, 반응을 실온에서 2시간 동안 교반하였다. 화합물 b의 사라짐 후, 이것을 분취형-HPLC에 의해 정제하였고, 제조 용액을 동결건조하여 52%의 수율로 380 mg의 생성물을 수득하였다. $C_{142}H_{207}O_{49}N_{21}$ $[(M+3H)/3]^+$에 대한 계산치: 997.8, 실측치: 875.9 (단편화된 질량).

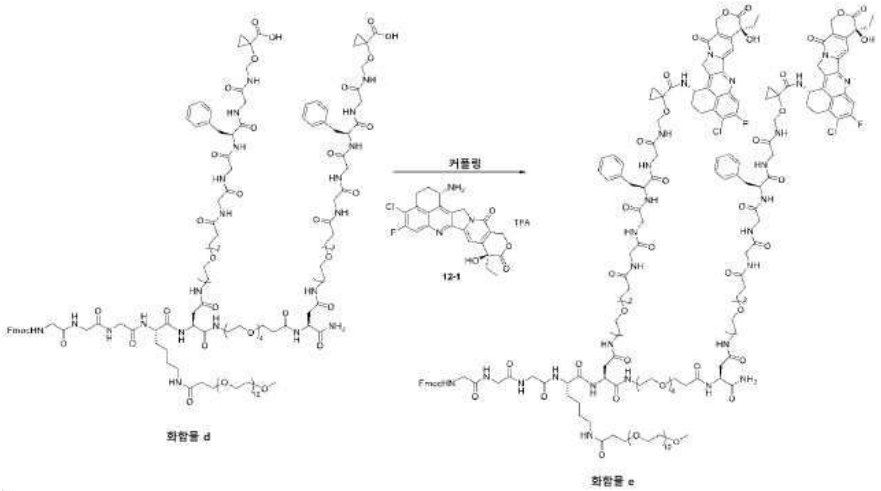
[0759] 단계 4: 중간체 화합물 d의 제조



[0760]

[0761] 화합물 c (380 mg, 0.245 mmol)를 정제수 (80 ml)에 용해하였고, 수산화팔라듐 (38 mg)을 첨가하였다. 시스템을 3 회 동안 수소로 대체하였고, 반응을 실온에서 1.5 시간 동안 교반하였다. 반응 진행을 그 기간 동안 모니터링하였고, 반응을 원료의 사라짐 직후 중단하여 탈-Fmoc 생성물의 증가를 방지하였다. 반응 용액을 여과하였고 분취형-HPLC에 의해 정제하여 76%의 수율로 270 mg의 생성물을 수득하였다. $C_{128}H_{195}O_{49}N_{21}$ $[(M+3H)/3]^+$에 대한 계산치: 937.8, 실측치: 875.9 (단편화된 질량).

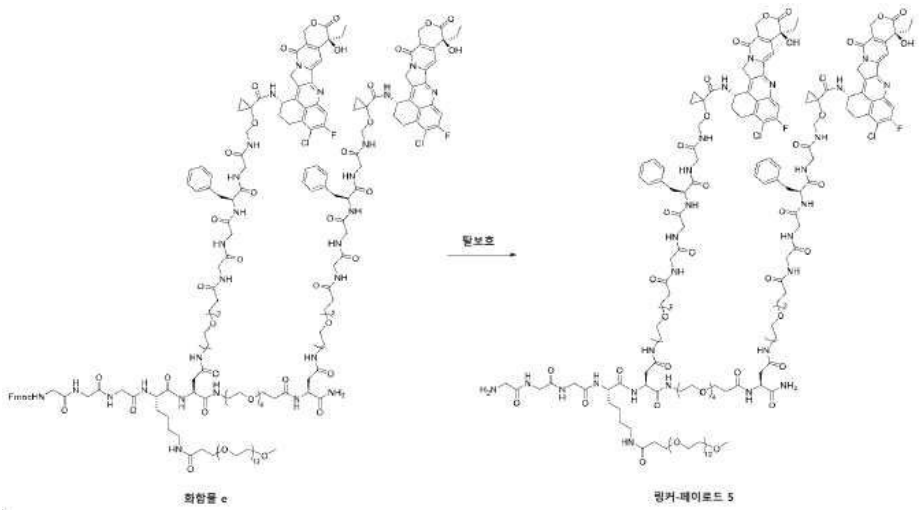
[0762] 단계 5: 중간체 화합물 e의 제조



[0763]

[0764] 화합물 d (270 mg, 0.096 mmol) 및 12-1 (120 mg, 0.211 mmol)을 DMF (5 ml)에 용해하였고, 그 다음 DIPEA (62 mg, 0.48 mmol) 및 HATU (92 mg, 0.24 mmol)를 반응 용액에 첨가하였고 실온에서 2-16 시간 동안 교반하였다. HPLC에 의해 모니터링된 반응의 완료 후, 반응 혼합물을 분취형-HPLC에 의해 직접적으로 정제하였고, 수집된 용리제를 조합하였고 동결건조하여 66%의 수율로 235 mg의 생성물을 수득하였다. $C_{174}H_{229}O_{55}Cl_2F_2N_{27}$ $[(M+3H)/3]^+$에 대한 계산치: 1229.2, 실측치: 1229.3.

[0765] 단계 6: 링커-페이로드 5의 제조

[0766] 

[0767] 화합물 e (210 mg, 0.057 mmol)를 DMF (5 ml)에 용해하였고, 그 다음 디에틸아민 (0.5 ml)을 첨가하였고 반응을 실온에서 15 분 동안 반응하였고, 반응 종점을 HPLC에 의해 모니터링하였다. 반응을 완료한 후, 이것을 빙조하에서 10% TFA 수용액으로 중성으로 조정하였고, 반응을 분취형-HPLC에 의해 정제하였고, 145 mg의 생성물을 73%의 수율로 동결건조 후 수득하였다. $C_{159}H_{219}O_{53}Cl_2F_2N_{27}$ $[(M+3H)/3]^+$에 대한 계산치: 1155.2, 실측치: 1155.3.

[0768] 실시예 3 표적화 분자-약학적 접합체의 제조

[0769] 3.1 DS1062a 유사성 및 트로델비의 제조

[0770] DS1062a 유사체 (DS1062a 및 DS-1062*)를 특허 US20160297890A에 기재된 방법에 기반하여 제조하였거나, WuXi Biologics에 의해 만들었다.

[0771] 트로델비는 상업적으로 이용가능하였다.

[0772] 3.2 ADC-1의 제조

[0773] 3.2.1 GQhRS7의 치료

[0774] GQhRS7을 한외여과, 투석 또는 탈염 컬럼에 의해 처리하였다. 저장 용액을 리가제 완충액으로 대체하였다.

[0775] 3.2.2 ADC-1의 효소-촉매화된 커플링

[0776] ADC-1을, 야생형 소르타제 A 또는 이를 기반으로 최적화되고 조작된 돌연변이체 리가제의 촉매화 하에서, 링커-페이로드 1과 GQhRS7의 커플링 반응에 의해 제조하였다. 리가제 완충액에서, 변형된 항체 및 링커-페이로드를 1:1 내지 1:100의 몰비로 철저히 혼합하였고, 고체 상 커플링 시스템에 첨가하였다. 고체 상 커플링 시스템은 고체 상 커플링 시스템의 매트릭스에서 부동화된 리가제를 포함하였다. 부동화된 리가제는 링커-페이로드 1과 항체 GQhRS7의 커플링 반응을 촉매화하였다. 커플링 반응을 4 - 40℃에 0.5 - 20 시간 동안 실시하였다. 반응을 완료한 후, 반응 혼합물을 한외여과 또는 투석에 적용하여 미반응된 중간체를 제거하여, ADC-1을 제공하였다. ADC-1을 20 mM 시트르산, 200 mM NaCl, pH 5.0을 함유하는 완충액에서 4℃ 또는 - 80℃에 저장하였다.

[0777] 3.2.3 ADC-1의 HIC-HPLC 검출 및 분석

[0778] ADC-1의 DAR (약물-대-항체 비) 분포를 HIC-HPLC에 의해 분석하였다. 세포독소가 없는 항체 GQhRS7은 5% 미만이었고; 커플링된 생성물은 주로 3.5의 DAR로 ADC-1을 함유하였다.

[0779] 3.2.4 ADC-1의 SEC-HPLC 검출 및 분석

[0780] ADC-1의 고분자량 응집도를 SEC-HPLC에 의해 분석하였다. 결과는 고분자량 중합체가 ADC-1에서 검출되지 않아, 커플링 반응 조건이 가볍고 항체 구조에 손상을 일으키지 않음을 보여주었다.

[0781] 3.3 링커-페이로드 중간체를 리가제에 의해 부위-특이적 방식으로 항체에 각각 접합하여 ADC를 형성하였다. 접합 반응을 위한 방법을 WO2015165413A1에서 찾을 수 있다. 생성된 ADC는 하기 표에서 나열된 바와 같다:

[0782]

ADC의 명칭	링커-페이로드	항체
ADC-1	링커-페이로드 1	GQhRS7
ADC-2	링커-페이로드 3	GQhRS7
ADC-3	링커-페이로드 4	GQhRS7
ADC-4	링커-페이로드 5	GQhRS7
ADC-5	링커-페이로드 5	GQAb13
ADC-6	링커-페이로드 5	GQAb16
ADC-7	링커-페이로드 2	GQhRS7

[0783] 3.4 결합 활성

[0784] 0.5 μg/mL의 농도로 인간 Trop 2 ECD를 밤새 동안 4℃에 96-웰 플레이트에서 코팅하였다. 플레이트를 그 다음 실온에서 1 시간 동안 3% BSA-PBST로 차단하였다. PBST (0.05% Tween)로 세정 후, 상이한 농도에 ADC-2 (즉 ADC2), 트로델비 및 GQhRS7을 포함하는 테스팅 물품의 시리즈 샘플을 96-웰 플레이트, 각각에 첨가하였고, 그 다음 60 분 동안 실온에서 인큐베이션하였다. 인큐베이션 후 염소 항-인간 FC 2차 항체 (HRP) (Sinobiological, SSA001)를 1:100000의 비로 첨가하였고 재차 60 분 동안 실온에서 인큐베이션하였다. 세정 이후, 플레이트를 HRP 기질로서 TMB 용액 (Sigma, T0440)으로 처리하였고, 반응을 1 M H_2SO_4로 중단하였다. 각 웰에 대한 흡광도를 450 nm 파장에서 검출하였다.

[0785] 이 분석의 결과를 도 1.2에 도시한다. 결과는 ADC-2가 GQhRS7 및 트로델비와 유사한 결합 친화도를 가짐을 입증한다.

[0786] 3.5 내재화 활성

[0787] 양호한 생존력으로 NCI-N87을 트립신화하였고, 수집하였고, 냉 FACS 완충액 (DPBS + 2% FBS)에 현탁하였다. 세포를 얼음 위에 1 시간 동안 50 μg/ml의 최종 농도로 테스트된 약물 용액을 이용해 인큐베이션하였다. 항체-세포 혼합물을 냉 FACS 완충액에 의해 2회 세정하여 과잉 항체를 제거하였다. 항체 결합된 세포를 30 분 동안 500 배 희석된 빙냉 항-인간-IgG-Fc-AF647 2차 항체 용액과 혼합함으로써 형광 표지화하였다. 형광 표지화 후, 항체-세포 혼합물을 재차 2회 세정하였다. 세포를 10 분, 30 분, 60 분, 90 분, 150 분 및 210 분 동안 테스트된 약물 내재화를 위하여 37℃에 인큐베이션하였다. 세포를 퀀치 완충액 (150 mM NaCl + 100 mM 글리신, pH=2.0 내지 2.5)에 의해 현탁하여 세포 표면에서 결합된 항체를 해리하였다. 산성화 후, 세포를 냉 FACS 완충액에 의해 2회 세정하였고 유세포 분석에 의해 APC 채널에서 분석하였다.

[0788] MFI 데이터를 아래 공식에 포함하였고, 결과를 Prism8에서 1 상 지수 연관 함수에 의해 분석하였다. 내재화 양: A=MFI(I)-MFI(MIN). 내재화 비: R=[MFI(I)-MFI(MIN)]/[MFI(MAX)-MFI(바탕)]×100%

[0789] 도 1.3에 도시된 대로, ADC2는 NCI-N87에서 DS1062, 트로델비 및 GQhRS7과 비교가능한 내재화 활성을 보여준다.

[0790] 효과 예 1 BxPC-3/HepG2에서 접합체의 방관자 사멸 효과

[0791] 효과 예 1.1 BxPC-3/HepG2 공-배양 검정에서 HepG2에 대한 ADC-1의 방관자 사멸 효과

[0792] Trop2-양성 세포 BxPC-3 및 Trop2-음성 세포 HepG2의 세포 농도를 1 x 10^6 세포/mL로 조정하였고, 200 μL / 웰 (세포 부피 BxPC-3 : HepG2 = 4 : 1)을 6-웰 플레이트에 씨딩하였고, 2.8 mL의 45% RPMI-1640 + 45% DMEM + 10% FBS 배지를 보충하였다. 세포를 37℃, 5% CO_2에 세포 인큐베이터에서 밤새 인큐베이션하였다. 3 mL의 20 nM ADC-1 및 DS1062a를 밤새 배양된 세포 (10 nM / 웰의 최종 약물 농도) 각각에 첨가하였다. 음성 대조군 그룹을 설정하였다: 3 mL의 45% RPMI-1640 + 45% DMEM + 10% FBS 배지를 각 웰에 첨가하였다. 처리 후, 세포를 인큐베이터로 이동하였고 96 시간 동안 인큐베이션하였다. 인큐베이션 후, 세포를 소화하였고, 1X PBS로 1회 세정하였고, 그 다음 유동 튜브로 옮겼고, 2000 rpm으로 3 분 동안 원심분리하였다. 상청액을 그 다음 폐기하였고, 세포 양 및 세포 생존력을 검출하였다. 특정 양의 세포를 1X PBS로 세정하였고, 상청액을 원심분리 후 폐기하였고, 200 μL의 100 nM 항-인간 Trop2 항체를 첨가하였고, 세포를 혼합하였고 30 분 동안 4℃에 인큐베이션하였다. 세포를 1X PBS로 세정하였고, 상청액을 원심분리 후 폐기하였고, 200 μL의 5 μg/mL 인간 IgG Fc 항체를 첨가하였고, 생성된 세포를 혼합 후 30 분 동안 4℃에 계속해서 인큐베이션하였다. 최종적으로, 세포를 1X PBS로 세정하였고, 상청액을 원심분리 후 폐기하였고, 세포를 PBS에 재현탁하였고, 유세포 분석에 의해 검출하였고 FlowJo 소프트웨어에 의해 분석하였다. 결과는 표 4에 나타난 바와 같다.

표 4 ADC-1 및 DS1062a 의 방관자 사멸 테스트 결과

그룹	생존가능한 세포의 수 (10^4)	세포 분율 (%)		세포의 양 (10^4)	
		BxPC-3	HepG2	BxPC-3	HepG2
대조군	259.0	22.5	77.5	58.28	200.73
DS1062a	44.6	24.4	75.6	10.88	33.72
ADC-1	59.3	33.4	66.6	19.81	39.49

[0793]

[0794] 효과 예 1.2 BxPC-3/HepG2 공-배양 검정에서 HepG2에 대한 ADC-2의 방관자 사멸 효과

[0795] Trop2-양성 세포 BxPC-3 및 Trop2-음성 HepG2 세포의 세포 농도를 1 x 10^6 세포/mL로 조정하였고, 300 μL / 웰 (세포 부피 BxPC-3 : HepG2 = 2 : 1)을 6-웰 플레이트에 접종하였고, 2.7 mL의 45% RPMI-1640 + 45% DMEM + 10% FBS 배지를 보충하였다. 세포를 37℃, 5% CO_2에 세포 인큐베이터에서 밤새 인큐베이션하였다. 3 mL의 20 nM ADC-2 및 DS1062a를 밤새 배양된 세포 (10 nM / 웰의 최종 약물 농도) 각각에 첨가하였다. 그리고 다음 과정을 위와 동일한 과정으로 사용하여 ADC-2 및 DS1062a의 방관자 사멸 효과를 평가하였다. 결과는 표 5에 나타난 바와 같다.

표 5. ADC-2 및 DS1062a 의 방관자 사멸 테스트 결과

그룹	생존가능한 세포의 수 (10^4)	세포 분율 (%)		세포의 양 (10^4)	
		BxPC-3	HepG2	BxPC-3	HepG2
대조군	452.0	22.4	77.6	101.25	350.75
DS1062a	157.0	7.8	92.2	12.25	144.75
ADC-2	70.0	21.8	78.2	15.26	54.74

[0796]

[0797] 효과 예 1.3 BxPC-3/HepG2 공-배양 검정에서 HepG2에 대한 ADC-6의 방관자 사멸 효과

[0798] 효과 예 1.2와 동일한 과정을 사용하여 대조군 (다토포타맙), DS1062a, ADC-1, ADC-2, ADC-4 및 ADC-6의 방관자 사멸 효과를 평가하였다. 결과는 표 6에 나타난 바와 같다.

표 6 ADC-6 의 방관자 사멸 테스트 결과

그룹	생존가능한 세포의 수 (10^4)	세포 분율 (%)		세포의 양 (10^4)	
		BxPC-3	HepG2	BxPC-3	HepG2
대조군	452.0	22.4	77.6	101.25	350.75
DS1062a	157.0	7.8	92.2	12.25	144.75
ADC-4	156.0	9.9	90.2	15.37	140.63
ADC-1	177.0	9.0	91.0	15.86	161.14
ADC-2	70.0	21.8	78.2	15.26	54.74
ADC-6	66.4	21.5	78.5	14.28	52.12

[0799]

[0800] 결론

[0801] 효과 예 1.1의 실험적 결과는 양쪽 ADC-1 및 DS1062a 유사성이 방관자 사멸 효과를 가졌고, 그들의 효능에서 유의한 차이가 없음을 보여주었다.

[0802] 효과 예 1.2의 실험적 결과는 ADC-2의 방관자 사멸 효과가 DS1062a의 것보다 양호함을 보여주었다.

[0803] 효과 예 1.3의 실험적 결과는 ADC-1, ADC-2, ADC-4, ADC-6 및 DS1062a 유사성 모두가 방관자 사멸 효과를 가졌음을 보여주었다. ADC-2 및 ADC-6의 방관자 사멸 효과는 DS1062a의 것보다 양호하였다. ADC-6의 방관자 사멸 효과는 ADC-4의 것보다 유의하게 양호하였다.

[0804] 효과 예 2: 세포 증식에 관한 TROP2를 표적화하는 접합체의 효과

[0805] 효과 예 2.1 종양 세포 증식에 관한 ADC-7 및 ADC-1의 억제성 효과

[0806] 효과 예 2.1.1 인간 인두 편평 세포 암종 FaDu의 증식에 관한 ADC-7의 억제성 효과

[0807] TROP2 발현이 높은 2천개 인간 인두 편평 세포 암종 FaDu를 웰당 100 μL의 배양 배지로 96-웰 플레이트에 씨딩하였고, 37℃ 및 5% CO_2에 세포 인큐베이터에서 밤새 인큐베이션하였다. 100 μL의 상이한 농도 (200 nM, 40 nM, 8 nM, 1.6 nM, 0.32 nM, 0.064 nM, 0.0128 nM, 0.00256 nM, 0.000512 nM, 및 0.0001024 nM)의 ADC-7 및

DS1062a를 각 웰 (각 농도에 대하여 3개 복제물 웰)에 첨가하였다. 양성 대조군 그룹을 설정하였다: 10 μg/mL의 농도로 100 μL 퓨로마이신을 각 웰에 첨가하였다. 음성 대조군 그룹을 설정하였다: 100 μL의 완전 배지의 FaDu 세포를 각 웰에 첨가하였다. 투여를 완료한 후, 세포를 인큐베이터로 이동하였고 96 시간 동안 인큐베이션하였다. 96-웰 플레이트를 37℃ 세포 인큐베이터로부터 제거하였고 30 분 동안 실온으로 평형화하였다. 배지를 폐기한 후, 100 μL의 DMEM 및 50 μL의 CellTiter Glo 시약을 각 웰에 첨가하였고, 세포를 암실에서 200 rpm으로 15 분 동안 진탕하였고, 세포 생존력을 반영하는 발광성 신호를 마이크로플레이트 판독기에 의해 검출하였다. 인간 인두 편평 세포 암종 FaDu의 증식에 관한 테스트된 약물의 억제성 효과는 도 2 및 표 7에 나타난 바와 같다.

표 7 인두 편평 세포 암종 FaDu 의 증식에 관한 ADC-7 및 DS1062a 의 억제성 효과

약물	IC_{50} (nM)
ADC-7	0.4617
DS1062a	0.5508

[0808]

[0809] 효과 예 2.1.2 인간 췌장암 세포 BxPC-3의 증식에 관한 ADC-1의 억제성 효과

[0810] 실시예 2.1.1에서 인간 인두 편평 세포 암종 FaDu를 인간 췌장암 세포 BxPC-3 (2000개 세포를 함유하는 웰당 100 μL)로 대체하였고, ADC-1의 억제성 효과를 동일한 과정을 사용하여 평가하였다. 인간 췌장암 세포 BxPC-3의 증식에 관한 테스트된 약물의 억제성 효과는 도 3 및 표 8에 나타난 바와 같다.

표 8 인간 췌장암 세포 BxPC-3 의 증식에 관한 ADC-1 및 DS1062a 의 억제성 효과

약물	IC_{50} (nM)
ADC-1	0.4741
DS1062a	0.5835

[0811]

[0812] 효과 예 2.1.3 인간 유방암 세포 MDA-MB-468의 증식에 관한 ADC-1의 억제성 효과

[0813] 실시예 2.1.1에서 인간 인두 편평 세포 암종 FaDu를 인간 유방암 세포 MDA-MB-468 (4000개 세포를 함유하는 웰당 100 μL)로 대체하였고, ADC-1의 억제성 효과를 동일한 과정을 사용하여 평가하였다. 인간 유방암 세포 MDA-MB-468의 증식에 관한 테스트된 약물의 억제성 효과는 도 4 및 표 9에 나타난 바와 같다.

표 9 인간 유방암 세포 MDA-MB-468 의 증식에 관한 ADC-1 및 DS1062a 의 억제성 효과

약물	IC_{50} (nM)
ADC-1	3.347
DS1062a	2.501

[0814]

[0815] 효과 예 2.1.4 인간 위암 세포 NCI-N87의 증식에 관한 ADC-7의 억제성 효과

[0816] 실시예 2.1.1에서 인간 인두 편평 세포 암종 FaDu를 인간 위암 세포 NCI-N87 (5000개 세포를 함유하는 웰당 100 μL)로 대체하였고, ADC-7의 억제성 효과를 동일한 과정을 사용하여 평가하였다. 인간 위암 세포 NCI-N87의 증식에 관한 테스트된 약물의 억제성 효과는 도 5 및 표 10에 나타난 바와 같다.

표 10 위암 세포 NCI-N87 의 증식에 관한 ADC-7 및 DS1062a 의 억제성 효과

약물	IC_{50} (nM)
ADC-7	1.518
DS1062a	1.262

[0817]

[0818] 효과 예 2.2 종양 세포 증식에 관한 ADC-2 및 ADC-3의 억제성 효과

[0819] 효과 예 2.2.1 인간 인두 편평 세포 암종 FaDu의 증식에 관한 ADC-2 및 ADC-3의 억제성 효과

[0820] 실시예 2.1.1에서 ADC-1 및 DS1062a의 테스트된 약물을 ADC-2, ADC-3 및 ADC-1로 대체하였고, 억제성 효과를 동일한 과정을 사용하여 평가하였다. 인간 인두 편평 세포 암종 FaDu의 증식에 관한 테스트된 약물의 억제성 효과는 도 6 및 표 11에 나타난 바와 같다.

표 11 인두 편평 세포 암종 FaDu의 증식에 관한 ADC-2, ADC-3 및 ADC-1의 억제성 효과

약물	IC_{50} (nM)
ADC-2	0.2376
ADC-3	0.1761
ADC-1	0.1618

[0821]

[0822] 효과 예 2.2.2 인간 췌장암 세포 BxPC-3의 증식에 관한 ADC-2 및 ADC-3의 억제성 효과

[0823] 실시예 2.2.1에서 인간 인두 편평 세포 암종 FaDu를 인간 췌장암 세포 BxPC-3으로 대체하였고, ADC-2의 억제성 효과를 동일한 과정을 사용하여 평가하였다. 인간 췌장암 세포 BxPC-3의 증식에 관한 테스트된 약물의 억제성 효과는 도 7.1 및 표 12에 나타난 바와 같다.

표 12 인간 췌장암 세포 BxPC-3의 증식에 관한 ADC-2, ADC-3 및 ADC-1의 억제성 효과

약물	IC_{50} (nM)
ADC-2	0.4526
ADC-3	0.6909
ADC-1	0.8316

[0824]

[0825] 효과 예 2.3 BxPC-3, FaDu 및 NCI-N87의 증식에 관한 ADC-2 및 DS-1062a의 억제성 효과

[0826] 세포독성 검정을 Trop2 양성 암 세포 BxPC-3 (도 7.2), FaDu (도 7.3), 및 NCI-N87 (도 7.4)을 사용하여 수행하여, 종양 세포 증식에 관한 접합체의 효과를 분석하였다. 테스트된 약물은 접합체 ADC2, DS1062a 및 GQhRS7을 포함하였다. 간략히, 3000 내지 5000개 세포를 96-웰 플레이트에 플레이팅하였고, 세포를 밤새 부착할 수 있었다. 세포를 168 시간 동안 다양한 농도로 지시된 약물을 이용해 처리하였다. 세포 생존력을 CellTiter-Glo® 발광성 세포 생존력 검정에 의해 시험하였고, 세포 생존력의 백분율을 계산하였다.

[0827] Trop2 양성 BxPC-3, FaDu 및 NCI-N87에서, ADC2는 DS1062a보다 더욱 강력한 세포독성을 나타냈다. ADC2의 IC_{50} 값은 DS1062a보다 낮다 (아래 표 참조).

약물 \ 세포주	IC_{50} (nM)		
	BxPC-3	**FaDu**	**NCI-N87**
ADC2	0.2260	0.1282	0.7416
DS1062a	0.6922	0.1701	2.101

[0828]

[0829] 결론

[0830] 효과 예 2.1.1의 결과는 양쪽 ADC-7 및 DS1062a가 FaDu 세포의 증식을 억제할 수 있음을 보여주었고, ADC-7의 억제성 효과는 약간 더욱 양호하였다.

[0831] 효과 예 2.1.2의 결과는 양쪽 ADC-1 및 DS1062a가 BxPC-3 세포의 증식을 억제할 수 있음을 보여주었다.

[0832] 효과 예 2.1.3의 결과는 양쪽 ADC-1 및 DS1062a가 MDA-MB-468 세포의 증식을 억제할 수 있음을 보여주었다.

[0833] 효과 예 2.1.4의 결과는 양쪽 ADC-7 및 DS1062a가 NCI-N87 세포의 증식을 억제할 수 있음을 보여주었다.

[0834] 효과 예 2.2.1의 결과는 ADC-2, ADC-3 및 ADC-1이 FaDu 세포의 증식을 억제할 수 있음을 보여주었다.

[0835] 효과 예 2.2.2의 결과는 ADC-2, ADC-3 및 ADC-1이 BxPC-3 세포의 증식을 억제할 수 있음을 보여주었고, ADC-2의 억제성 효과는 ADC-3 및 ADC-1의 것보다 약간 더욱 양호하였다.

[0836] 효과 예 2.3의 결과는 ADC-2가 BxPC-3 세포, FaDu 세포 및 NCI-N87 세포의 증식을 억제할 수 있음을 보여주었고, ADC-2의 억제성 효과는 DS1062a의 것보다 더욱 양호하였다.

[0837] 효과 예 3 생체내 효능 평가 테스트

[0838] 효과 예 3.1 ADC-1의 생체내 효능 평가

[0839] 효과 예 3.1.1 BxPC-3 세포에 관한 ADC-1의 생체내 효능 평가

[0840] I. 대수적 성장기 BxPC-3을 수집하였고 세포 밀도를 매트리겔 완충액 (PBS : 매트리겔 = 1:1)을 이용해 10 x 10^6 세포/mL로 조정하였다. 0.2 mL의 제조된 BxPC-3 세포 현탁액을 6-8 주령 SPF 암컷 BALB/c 누드 마우스의 오른쪽 견갑골에 피하로 주사하였다.

[0841] II. 종양 직경을 버니어 캘리퍼스로 측정하였고 종양 부피를 공식 V = 0.5 a x b^2 (식중 a는 종양의 최장 직경이고 b는 종양의 최단 직경임)에 따라 계산하였다. 세포 접종 6 일 후, 평균 종양 부피가 약 151 mm^3인 때, 동물을, 각 그룹에서 6마리 동물로, 비히클 대조군 그룹, DS1062a 3 mg/kg 그룹 및 ADC-1 3 mg/kg 그룹으로 무작위로 분할하였다. 각 그룹에서 동물을 꼬리 정맥 주사에 의해 투여하였고, 대조군 그룹에 똑같은 부피의 비히클을 제공하였다. 각 그룹에서 동물의 종양 부피를 투여 후 35 일 내에서 1주에 2회 측정하였고, 35 일차에 동물의 종양 부피를 그룹들 사이 비교하였다. T/C 및 TGI 값을 종양 부피를 사용하여 계산하였다. 계산 공식은 다음과 같다: T/C% = T_{RTV} / C_{RTV} × 100 % (T_{RTV}: 치료 그룹의 RTV; C_{RTV}: 비히클 대조군 그룹의 RTV). 상대 종양 부피 (RTV)를 종양 측정의 결과에 기반하여 계산하였고, 계산 공식은 RTV = V_t / V_0이었고, 식중 V_0은 그룹화의 시간 (즉, D0)에 측정된 평균 종양 부피이었고, V_t는 1 측정에 평균 종양 부피이었고, T_{RTV} 및 C_{RTV}는 동일한 날의 데이터를 포함하였다. TGI (%)의 계산: TGI (%)=[1 - (치료 그룹의 투여의 끝에 평균 종양 부피 - 치료 그룹의 투여의 시작에 평균 종양 부피) / (비히클 대조군 그룹의 치료의 끝에 평균 종양 부피 - 비히클 대조군 그룹의 치료의 시작에 평균 종양 부피)] × 100%.

[0842] III. 35 일의 투여 후, 648 mm^3 및 847 mm^3, 각각의 평균 종양 부피를 가진 ADC-1 3 mg/kg 그룹 (T/C = 49.05%, TGI = 57.56%, p = 0.002) 및 DS1062a 3 mg/kg 그룹 (T/C = 64.05%, TGI =40.54%, p = 0.010). 결과는 도 8 및 표 13에 나타난 바와 같았다.

표 13 BxPC-3 마우스 이종이식 종양에 관한 ADC-1 의 억제성 효과

투여 그룹	종양 부피 (mm^3) 0 일차	종양 부피 (mm^3) 35 일차	T/C (%)	TGI (%)	*p* 값
비히클	151 ± 13	1,322 ± 58	--	-	--
DS1062a, 3 mg/kg	151 ± 12	847 ± 104	64.05	40.54	0.010
ADC-1, 3 mg/kg	151 ± 11	648 ± 109	49.05	57.56	0.002

[0843]

[0844] 결론

[0845] 효과 예 3.1.1의 결과에 따라, 대조군 그룹과 비교하여, 양쪽 ADC-1 3 mg/kg 그룹 및 DS1062a 3 mg/kg 그룹은 종양 성장을 유의하게 억제할 수 있었다.

[0846] 효과 예 3.1.2 NCI-N87 위암 세포에 관한 ADC-1의 생체내 효능 평가

[0847] 실시예 3.1.1에서 BxPC-3 세포를 NCI-N87 위암 세포로 대체하였고, 세포 접종 7 일 후, 평균 종양 부피가 약 227 mm^3인 때, 동물을, 각 그룹에서 6마리 동물로, 비히클 대조군 그룹, IMMU-132 (트로델비) 3 mg/kg 그룹, DS1062a 3 mg/kg 그룹 및 ADC-1 3 mg/kg 그룹으로 무작위로 분할하였다. ADC-1의 생체내 효능 평가를 효과 예 3.1.1과 유사한 과정을 사용하여 평가하였고, 결과는 도 9 및 표 14에 나타난 바와 같다.

표 14 NCI-N87 마우스 이종이식 종양에 관한 ADC-1 의 억제성 효과

투여 그룹	종양 부피 (mm^3) 0 일차	종양 부피 (mm^3) 32 일차	T/C (%)	TGI (%)	*p* 값
비히클	227 ± 24	1,307 ± 117	--	--	--
IMMU-132(BIW*6, 3 mg/kg)	227 ± 21	864 ± 114	65.85	41.10	0.006
DS1062a(단일 용량, 3 mg/kg)	228 ± 20	658 ± 43	49.98	60.23	<0.001
ADC-1 (단일 용량, 3 mg/kg)	227 ± 24	697 ± 34	57.17	55.09	<0.001

[0848]

[0849] 결론

[0850] 32 일의 투약 후, 697 mm^3 및 658 mm^3, 각각의 평균 종양 부피를 가진, ADC-1 3 mg/kg 그룹 (T/C = 57.17%, TGI = 55.09%, p < 0.001) 및 DS1062a 3 mg/kg 그룹 (T/C = 49.98%, TGI = 60.23%, p < 0.001)의 양쪽은 종양 성장

을 유의하게 억제할 수 있었다.

[0851] 효과 예 3.1.3 인간 유방암 BR-05-0028에 관한 ADC-1의 생체내 효능 평가

[0852] 인간 유방암 BR-05-0028 모델 (IHC 3+)은 임상 수술에서 절제된 종양 샘플에서 유래되었다. 종양 샘플을 P0 세대에서 누드 마우스에 접종하였고, 이 예에서 사용된 종양 조직은 P5 세대이었다. 약 30 mm^3의 부피를 가진 종양 조직을 6-8 주령 SPF 암컷 BALB/c 누드 마우스의 오른쪽 등쪽에 피하로 접종하였다. 종양 조직 접종 28 일 후, 평균 종양 부피가 약 171 mm^3인 때, 동물을, 각 그룹에서 6마리 동물로, 비히클 대조군 그룹, IMMU-132 5 mg/kg 그룹, DS1062a 5 mg/kg 그룹, ADC-1 5 mg/kg 그룹으로 무작위로 분할하였다. ADC-1의 생체내 효능 평가를 효과 예 3.1.1과 유사한 과정을 사용하여 평가하였고, 결과는 도 10 및 표 15에 나타난 바와 같다.

표 15 BR-05-0028 마우스 이종이식 종양에 관한 ADC-1 의 억제성 효과

투여 그룹	종양 부피 (mm^3) 0 일차	종양 부피 (mm^3) 21 일차	T/C (%)	TGI (%)	*p* 값
비히클	171 ± 26	1,576 ± 362	--	--	--
IMMU-132 (BIW*6, 5 mg/kg)	171 ± 29	5 ± 2	0.35	111.76	0.037
DS1062a (단일 용량, 5 mg/kg)	171 ± 23	8 ± 1	0.48	111.60	0.037
ADC-1 (단일 용량, 5 mg/kg)	171 ± 25	4 ± 2	0.23	111.88	0.037
ADC-1 (단일 용량, 10 mg/kg)	171 ± 22	4 ± 1	0.23	111.88	0.037

[0853]

[0854] 결론

[0855] 21 일의 투여 후, IMMU-132 5 mg/kg 그룹 (T/C = 0.35%, TGI = 111.76%, p = 0.037), DS1062a 5 mg/kg 그룹 (T/C = 0.48%, TGI = 111.60%, p = 0.037), ADC-1 5 mg/kg 그룹 (T/C = 0.23%, TGI = 111.88%, p = 0.037) 및 ADC-1 10 mg/kg 그룹 (T/C = 0.23%, TGI = 111.88%, p = 0.037)은 종양 성장을 유의하게 억제할 수 있었다.

[0856] 효과 예 3.2 ADC-2 및 ADC-3의 생체내 효능 평가

[0857] 효과 예 3.2.1 BxPC-3 세포에 관한 ADC-2 및 ADC-3의 생체내 효능 평가

[0858] 세포 접종 6 일 후, 평균 종양 부피가 약 151 mm^3인 때, 동물을, 각 그룹에서 6마리 동물로, 비히클 대조군 그룹, DS1062a 3 mg/kg 그룹, ADC-1 3 mg/kg 그룹, ADC-2 3 mg/kg 그룹 및 ADC-3 3 mg/kg 그룹으로 무작위로 분할하였다. ADC-2 및 ADC-3의 생체내 효능 평가를 효과 예 3.1.1과 유사한 과정을 사용하여 평가하였고, 결과는 도 11 및 표 16에 나타난 바와 같다.

표 16 BxPC-3 마우스 이종이식 종양에 관한 ADC-2 및 ADC-3 의 억제성 효과

투여 그룹	종양 부피 (mm^3) 0 일차	종양 부피 (mm^3) 28 일차	T/C (%)	TGI (%)	*p* 값
비히클	151 ± 13	906 ± 82	--	-	--
ADC-1, 3 mg/kg	151 ± 11	355 ± 80	38.20	72.94	0.005
ADC-2, 3 mg/kg	151 ± 12	116 ± 21	12.72	104.54	0.001
ADC-3, 3 mg/kg	151 ± 13	225 ± 51	23.44	90.25	0.001
DS1062a, 3 mg/kg	151 ± 12	540 ± 74	58.49	48.52	0.049

[0859]

[0860] 결론

[0861] 28 일의 투여 후, 116 mm^3 및 540 mm^3, 각각의 평균 종양 부피를 가진, ADC-2 3 mg/kg 그룹 (T/C = 12.72%, TGI = 104.54%, p = 0.001) 및 DS1062a 3 mg/kg 그룹 (T/C = 58.49 %, TGI = 48.52%, p = 0.049)은 ADC-2 3 mg/kg 그룹이 종양 성장을 유의하게 억제할 수 있음을 나타냈다.

[0862] 효과 예 3.2.2 NCI-N87 위암 세포에 관한 ADC-2 및 ADC-3의 생체내 효능 평가

[0863] 실시예 3.2.1에서 BxPC-3 췌장암 세포를 NCI-N87 위암 세포로 대체하였고, 세포 접종 8 일 후, 평균 종양 부피가 약 188 mm^3인 때, 동물을, 각 그룹에서 6마리 동물로, 비히클 대조군 그룹, DS1062a 3 mg/kg 그룹, ADC-1 3 mg/kg 그룹, ADC-2 3 mg/kg 그룹 및 ADC-3 3 mg/kg 그룹으로 무작위로 분할하였다. ADC-2의 생체내 효능 평가를 효과 예 3.2.1과 유사한 과정을 사용하여 평가하였고, 결과는 도 12 및 표 17에 나타난 바와 같다.

표 17 NCI-N87 마우스 이종이식 종양에 관한 ADC-2 의 억제성 효과

투여 그룹	종양 부피 (mm^3) 0 일차	종양 부피 (mm^3) 28 일차	T/C (%)	TGI (%)	*p* 값
비히클	189 ± 8	634 ± 84	--	--	--
ADC-2, 3 mg/kg	188 ± 11	89 ± 21	14.08	122.25	<0.001
ADC-3, 3 mg/kg	188 ± 9	212 ± 21	33.43	94.72	<0.001
ADC-1, 3 mg/kg	189 ± 10	293 ± 63	46.15	76.62	<0.001
DS1062a, 3 mg/kg	188 ± 11	255 ± 35	40.30	84.96	<0.001

[0864]

[0865] 결론

[0866] 28 일의 투여 후, 89, 212, 293 및 255 mm^3, 각각의 평균 종양 부피를 가진, ADC-2 3 mg/kg 그룹 (T/C = 14.08%, TGI = 122.25%, p < 0.001), ADC-3 3 mg/kg 그룹 (T/C = 33.43%, TGI = 94.72%, p < 0.001), ADC-1 3 mg/kg 그룹 (T/C = 46.15%, TGI = 76.62%, p < 0.001) 및 DS1062a 3 mg/kg 그룹 (T/C = 40.30%, TGI = 84.96%, p < 0.001)은 모든 테스트된 약물이 NCI-N87 종양 성장을 유의하게 억제할 수 있음을 나타냈다.

[0867] 효과 예 3.2.3 인간 인두 편평 세포 암종 FaDu에 관한 ADC-2 및 ADC-3의 생체내 효능 평가

[0868] 실시예 3.2.1에서 BxPC-3 세포를 인간 인두 편평 세포 암종 FaDu로 대체하였고, 세포 접종 11 일 후, 평균 종양 부피가 약 123 mm^3인 때, 동물을, 각 그룹에서 6마리 동물로, 비히클 대조군 그룹, DS1062a 3 mg/kg 그룹, ADC-1 3 mg/kg 그룹, ADC-2 3 mg/kg 그룹 및 ADC-2 3 mg/kg 그룹으로 무작위로 분할하였다. ADC-2의 생체내 효능 평가를 효과 예 3.2.1과 유사한 과정을 사용하여 평가하였고, 결과는 도 13.1 및 표 18에 나타난 바와 같다.

표 18 FaDu 마우스 이종이식 종양에 관한 ADC-2 의 억제성 효과

투여 그룹	종양 부피 (mm^3) 0 일차	종양 부피 (mm^3) 28 일차	T/C (%)	TGI (%)	*p* 값
비히클	123 ± 12	1,676 ± 211	--	--	--
ADC-2, 3 mg/kg	123 ± 12	0 ± 0	0.00	107.90	0.003
ADC-3, 3 mg/kg	123 ± 10	4 ± 3	0.25	107.63	0.003
ADC-1, 3 mg/kg	123 ± 13	21 ± 6	1.23	106.59	0.003
DS1062a, 3 mg/kg	123 ± 13	28 ± 14	1.68	106.11	0.003

[0869]

[0870] 결론

[0871] 28 일의 투여 후, 0, 4, 21 및 28 mm^3, 각각의 평균 종양 부피를 가진, ADC-2 3 mg/kg 그룹 (T/C = 0.00%, TGI = 107.90%, p = 0.003), ADC-3 3 mg/kg 그룹 (T/C = 0.25%, TGI = 107.63%, p = 0.003), ADC-1 3 mg/kg 그룹 (T/C = 1.23%, TGI = 106.59%, p = 0.003) 및 DS1062a 3 mg/kg 그룹 (T/C = 1.68%, TGI = 106.11%, p = 0.003)은 모든 테스트된 약물이 FaDu 종양 성장을 유의하게 억제할 수 있음을 나타냈다. 이외에도, 실험의 끝에, ADC-2 3 mg/kg 그룹에서 6마리 마우스 및 ADC-3 3 mg/kg 그룹에서 3마리 마우스는 각각 완전한 종양 퇴행이 있었다.

[0872] 효과 예 3.2.4 MDA-MB-468에 관한 ADC-2의 생체내 효능 평가

[0873] MDA-MB-468 종양 세포 (ATCC, HTB-132)를 공기 중 0% CO_2의 분위기에서 37℃에 10% 태아 소 혈청 및 1% 항생제-항진균제가 보충된 L-15 배지에서 단층 배양으로 시험관내 유지하였다. 지수적 성장기에서 성장하는 세포를 수확하였고 종양 접종을 위하여 계수하였다. 생체내 항-종양 효능 연구를 위하여, 매트리겔 (1:1)과 0.2 mL의 PBS에서 $10x10^6$ MDA-MB-468 인간 유방암 세포 (Trop2 양성)를 BALB/c 누드 마우스의 오른쪽 옆구리에서 피하로 접종하였다. 24 일 후, 종양 부피가 평균으로 187 mm^3에 도달한 때, 종양 보유 마우스에 0.5 mg/kg, 1.5 mg/kg 및 4.5 mg/kg으로 ADC-2, 4.5 mg/kg으로 트로델비 및 4.5 mg/kg으로 DS1062a를 할당하였고 정맥내로 투여하였다. 종양 부피를 캘리퍼스로 주간 2회 측정하였다. T/C 및 TGI 값을 종양 부피를 사용하여 계산하였다.

[0874] 결론

[0875] 35 일의 투여 후, ADC-2 4.5 mg/kg 그룹 (T/C =0.00%, TGI = 137.93%), DS1062a 4.5 mg/kg 그룹 (T/C =

1.35%, TGI =136.06%) 및 트로델비 4.5 mg/kg 그룹 (T/C = 78.73%). 결과는 아래 도 13.2 및 표에 나타난 바와 같았다. ADC-2는 트로델비보다 유의하면서 더욱 양호한 효능 그리고 DS1062a보다 약간 더욱 양호한 효능을 보여주었다.

MDA-MB-468 마우스 이종이식 종양에 관한 ADC-2 의 억제성 효과

처리	N	종양 부피 (mm^3) on 35 일차	T/C (%)	TGI (%)	*p* 값
비히클	6	678 ± 68	--	--	--
트로델비, 4.5 mg/kg	6	535 ± 60	78.73	29.24	0.701
DS1062a, 4.5 mg/kg	6	9 ± 9	1.35	136.06	0.001
ADC-2, 0.5 mg/kg	5	588 ± 85	86.04	18.65	0.975
ADC-2, 1.5 mg/kg	6	202 ± 41	29.77	96.85	0.004
ADC-2, 4.5 mg/kg	6	0 ± 0	0.00	137.93	0.002

[0876]

[0877] 효과 예 3.3 ADC-5 및 ADC-6의 생체내 효능 평가

[0878] 효과 예 3.3.1 BxPC-3 췌장암 세포에 관한 ADC-5 및 ADC-6의 생체내 효능 평가

[0879] 세포 접종 6 일 후, 평균 종양 부피가 약 159 mm^3인 때, 동물을, 각 그룹에서 6마리 동물로, 비히클 대조군 그룹, ADC-5 3 mg/kg 그룹, ADC-6 3 mg/kg 그룹, 및 DS1062a 3 mg/kg 그룹으로 무작위로 분할하였다. ADC-5 및 ADC-6의 생체내 효능 평가를 효과 예 3.1.1과 유사한 과정을 사용하여 평가하였고, 결과는 도 14 및 표 19에 나타난 바와 같다.

표 19 BxPC-3 마우스 이종이식 종양에 관한 ADC-5 및 ADC-6 의 억제성 효과

투여 그룹	종양 부피 (mm^3) 0 일차	종양 부피 (mm^3) 42 일차	T/C (%)	TGI (%)	*p* 값
비히클	159 ± 5	1,088 ± 145	--	--	--
ADC-5, 3 mg/kg	159 ± 7	8 ± 7	0.75	116.20	0.003
ADC-6, 3 mg/kg	159 ± 9	27 ± 11	2.48	114.17	0.003
DS1062a, 3 mg/kg	159 ± 11	302 ± 73	27.69	84.60	0.007

[0880]

[0881] 결론

[0882] 42 일의 투여 후, 8 mm^3, 27 mm^3 및 302 mm^3, 각각의 평균 종양 부피를 가진, ADC-5 3 mg/kg 그룹 (T/C = 0.75%, TGI =116.20%, p = 0.003), ADC-6 3 mg/kg 그룹 (T/C = 2.48%, TGI =114.17 %, p = 0.003) 및 DS1062a 3 mg/kg 그룹 (T/C = 27.69%, TGI = 84.60%, p = 0.007)은 모든 테스트된 약물이 종양 성장을 유의하게 억제할 수 있음을 나타냈고; ADC-5 및 ADC-6의 억제성 효과는 DS1062a의 억제성 효과보다 훨씬 더욱 양호하였다.

[0883] 효과 예 3.3.2 NCI-N87 위암 세포에 관한 ADC-5 및 ADC-6의 생체내 효능 평가

[0884] 실시예 3.3.1에서 BxPC-3 췌장암 세포를 NCI-N87 위암 세포로 대체하였고, 세포 접종 6 일 후, 평균 종양 부피가 약 196 mm^3인 때, 동물을, 각 그룹에서 6마리 동물로, 비히클 대조군 그룹, ADC-5 3 mg/kg 그룹, ADC-6 3 mg/kg 그룹, 및 DS1062a 3 mg/kg 그룹으로 무작위로 분할하였다. ADC-5 및 ADC-6의 생체내 효능 평가를 효과 예 3.3.1과 유사한 과정을 사용하여 평가하였고, 결과는 도 15 및 표 20에 나타난 바와 같다.

표 20 NCI-N87 마우스 이종이식 종양에 관한 ADC-5 및 ADC-6 의 억제성 효과

투여 그룹	종양 부피 (mm^3) 0 일차	종양 부피 (mm^3) 42 일차	T/C (%)	TGI (%)	*p* 값
비히클	196 ± 11	1,226 ± 102	--	--	--
ADC-5, 3 mg/kg	196 ± 15	133 ± 51	10.88	106.06	< 0.001
ADC-6, 3 mg/kg	196 ± 12	48 ± 19	3.89	114.36	< 0.001
DS1062a, 3 mg/kg	196 ± 14	437 ± 89	35.67	76.58	< 0.001

[0885]

[0886] 결론

[0887] 42 일의 투여 후, 133 mm^3, 48 mm^3 및 437 mm^3, 각각의 평균 종양 부피를 가진, ADC-5 3 mg/kg 그룹 (T/C = 10.88%, TGI = 106.06%, p < 0.001), ADC-6 3 mg/kg 그룹 (T/C = 3.89%, TGI = 114.36 %, p < 0.001) 및

DS1062a 3 mg/kg 그룹 (T/C = 35.67%, TGI = 76.58%, p < 0.001)은 모든 테스트된 약물이 종양 성장을 유의하게 억제할 수 있음을 나타냈고; ADC-5 및 ADC-6의 억제성 효과는 DS1062a의 억제성 효과보다 훨씬 더욱 양호하였다.

[0888] 효과 예 3.3.3 인간 인두 편평 세포 암종 FaDu에 관한 ADC-5 및 ADC-6의 생체내 효능 평가

[0889] 실시예 3.3.1에서 BxPC-3 췌장암 세포를 인간 인두 편평 세포 암종 FaDu로 대체하였고, 세포 접종 10 일 후, 평균 종양 부피가 약 119 mm^3인 때, 동물을, 각 그룹에서 6마리 동물로, 비히클 대조군 그룹, ADC-5 2 mg/kg 그룹, ADC-6 2 mg/kg 그룹, 및 DS1062a 2 mg/kg 그룹으로 무작위로 분할하였다. ADC-5 및 ADC-6의 생체내 효능 평가를 효과 예 3.3.1과 유사한 과정을 사용하여 평가하였고, 결과는 도 16 및 표 21에 나타난 바와 같다.

표 21 FaDu 마우스 이종이식 종양에 관한 ADC-5 및 ADC-6 의 억제성 효과

투여 그룹	종양 부피 (mm^3) 0 일차	종양 부피 (mm^3) 31 일차	T/C (%)	TGI (%)	*p* 값
비히클	119 ± 10	1,911 ± 279	--	--	--
ADC-5, 2 mg/kg	119 ± 11	217 ± 216	11.34	94.56	0.004
ADC-6, 2 mg/kg	119 ± 12	1 ± 0	0.05	106.60	0.004
DS1062a, 2 mg/kg	119 ± 11	296 ± 125	15.47	90.15	0.005

[0890]

[0891] 결론

[0892] 31 일의 투여 후, 217 mm^3, 1 mm^3 및 296 mm^3, 각각의 평균 종양 부피를 가진, ADC-5 2 mg/kg 그룹 (T/C = 11.34%, TGI = 94.56%, p = 0.004), ADC-6 2 mg/kg 그룹 (T/C = 0.05%, TGI = 106.60 %, p = 0.004) 및 DS1062a 2 mg/kg 그룹 (T/C = 15.47%, TGI = 90.15%, p = 0.005)은 모든 테스트된 약물이 종양 성장을 유의하게 억제할 수 있음을 나타냈고; ADC-6의 억제성 효과는 DS1062a의 억제성 효과보다 훨씬 더욱 양호하였다.

[0893] 효과 예 4 ADC-1의 혈청 안정성

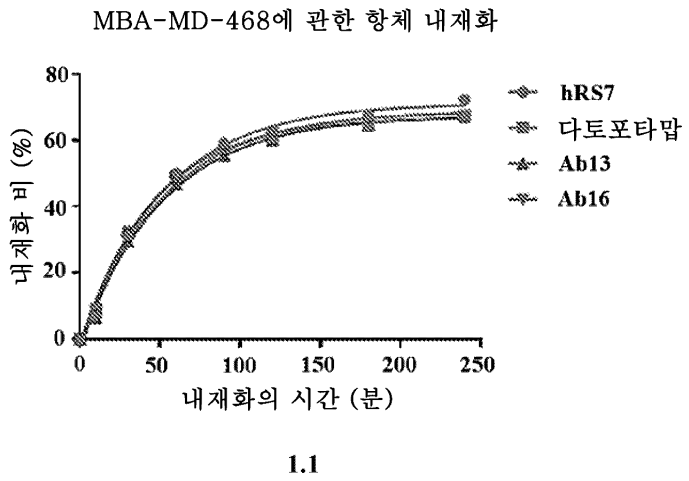
[0894] 적절한 양의 Trop 2를 공유 커플링에 의해 CNBr-활성화된 아가로스 미소구체에 결합하여 부동화된 항원을 형성하였다. 차단 후, 혈장으로 사전-인큐베이션된 안정한 샘플을 특정 비율로 첨가하였고, 진탕하면서 인큐베이션하였다. 매트릭스에서 ADC-1 및 DS1062a (ADC 약물)를 부동화된 항원에 의해 특이적으로 포획하여 고체-상 항원/항체 복합체를 형성할 것이고, 미결합된 서브스턴스를 세정에 의해 제거한다. 인큐베이션 후, N-글리코시다제를 사용하여 ADC 약물 항체의 Fc 영역의 커플링된 당 쇄를 절제하였고, 그 다음 ADC를 포름산 용출에 의해 회수하였고, DAR을 LC-MS에 의해 검출하였다. 결과는 도 17에 도시된 바와 같았다.

[0895] 결론

[0896] 결과는 ADC-1의 혈청 안정성이 DS1062a의 것보다 유의하게 더욱 양호하였음을 보여주었다.

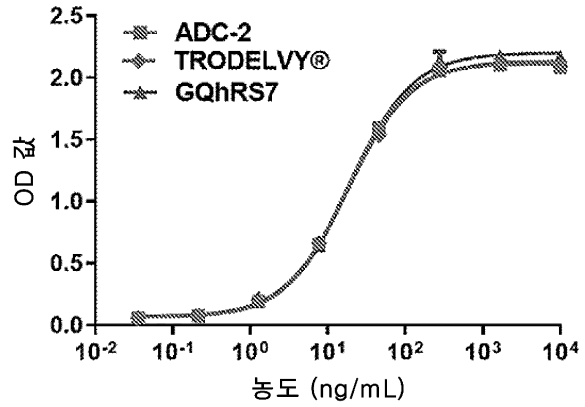
도면

도면1a



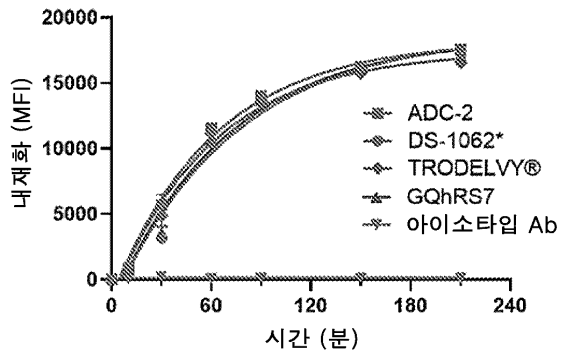
1.1

도면1b



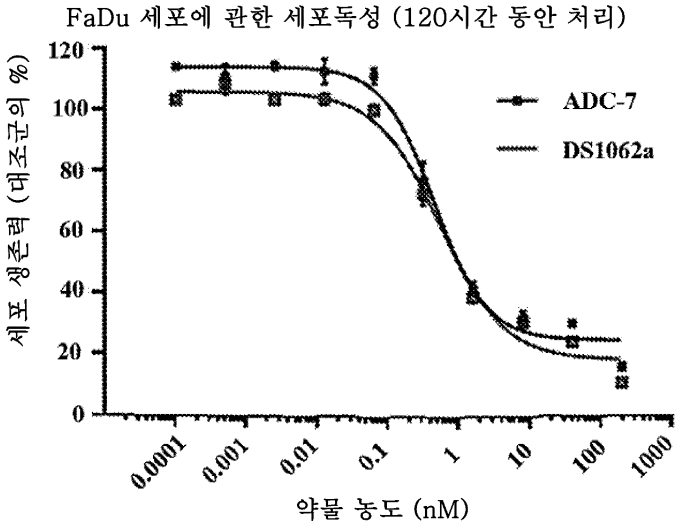
1.2

도면1c

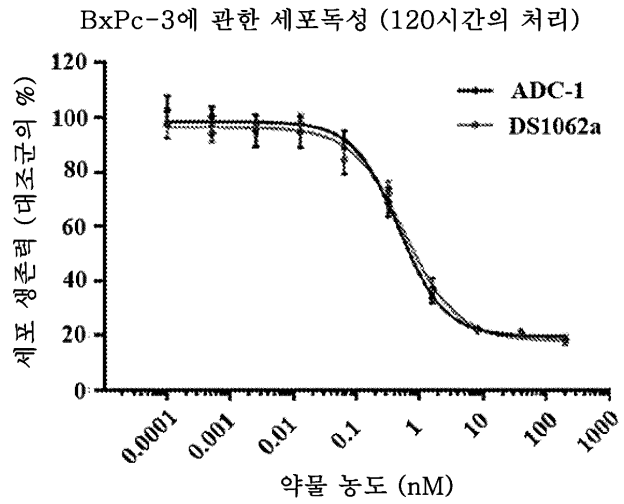

20000
15000
10000
5000
0
내재화 (MFI)
0
60
120
180
240
시간 (분)
ADC-2
DS-1062*
TRODELVY®
GQhRS7
아이소타입 Ab

1.3

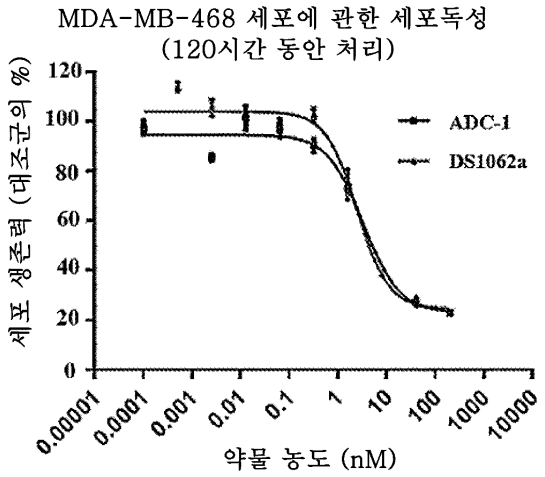
도면2


FaDu 세포에 관한 세포독성 (120시간 동안 처리)
120
100
80
60
40
20
0
세포 생존력 (대조군의 %)
0.0001
0.001
0.01
0.1
1
10
100
1000
약물 농도 (nM)
ADC-7
DS1062a

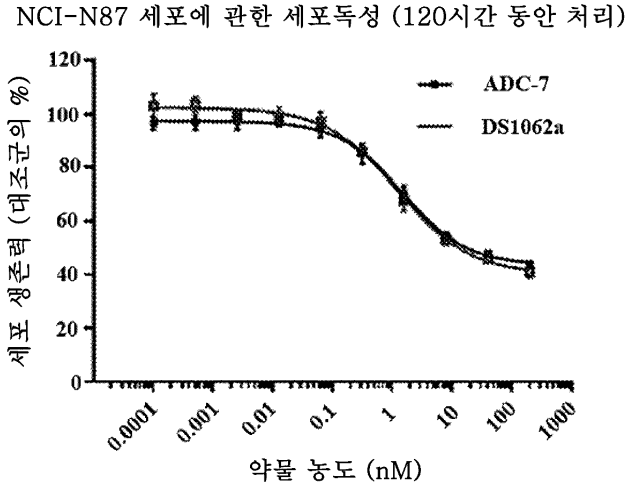
도면3


BxPc-3에 관한 세포독성 (120시간의 처리)
세포 생존력 (대조군의 %)
120
100
80
60
40
20
0
ADC-1
DS1062a
0.0001
0.001
0.01
0.1
1
10
100
1000
약물 농도 (nM)

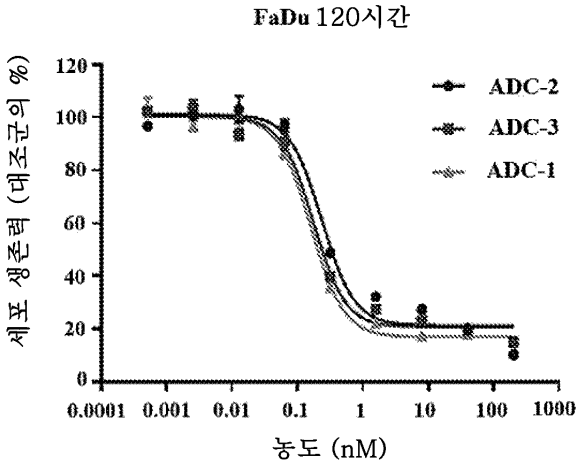
도면4


MDA-MB-468 세포에 관한 세포독성
(120시간 동안 처리)
세포 생존력 (대조군의 %)
120
100
80
60
40
20
0
ADC-1
DS1062a
0.00001
0.0001
0.001
0.01
0.1
1
10
100
1000
10000
약물 농도 (nM)

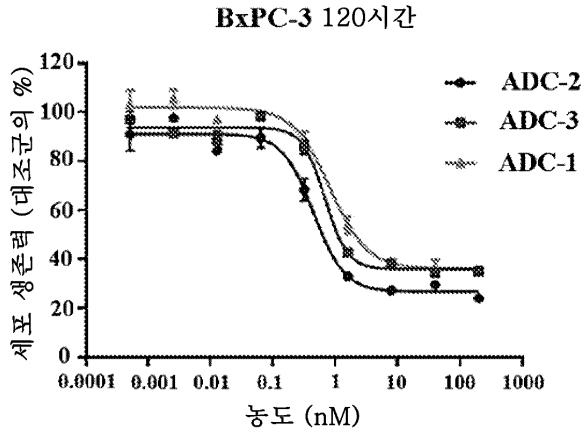
도면5


NCI-N87 세포에 관한 세포독성 (120시간 동안 처리)
세포 생존력 (대조군의 %)
120
100
80
60
40
20
0
ADC-7
DS1062a
0.0001
0.001
0.01
0.1
1
10
100
1000
약물 농도 (nM)

도면6

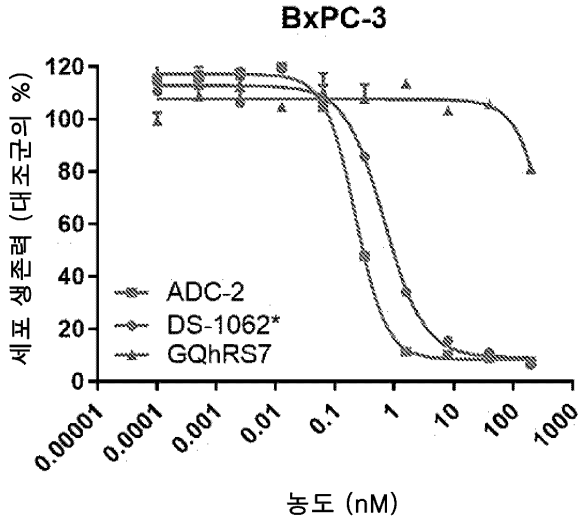

FaDu 120시간
세포 생존력 (대조군의 %)
120
100
80
60
40
20
0
0.0001
0.001
0.01
0.1
1
10
100
1000
농도 (nM)
ADC-2
ADC-3
ADC-1

도면7a


BxPC-3 120시간
세포 생존력 (대조군의 %)
120
100
80
60
40
20
0
0.0001
0.001
0.01
0.1
1
10
100
1000
농도 (nM)
ADC-2
ADC-3
ADC-1

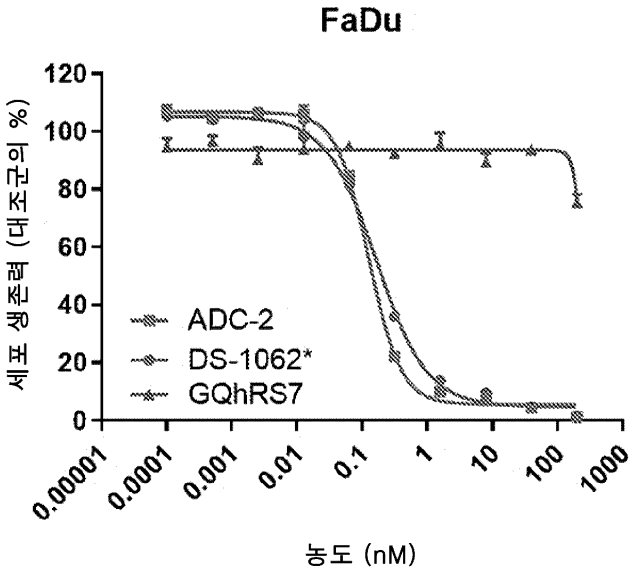
7.1

도면7b



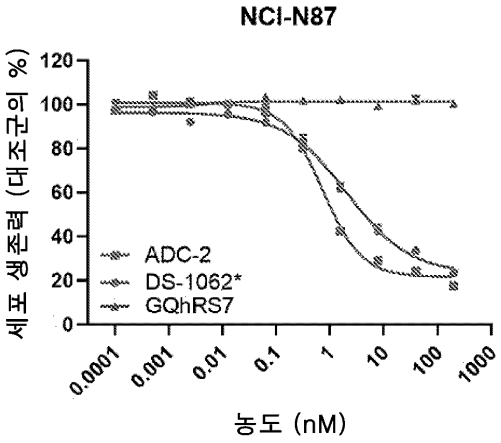
7.2

도면7c



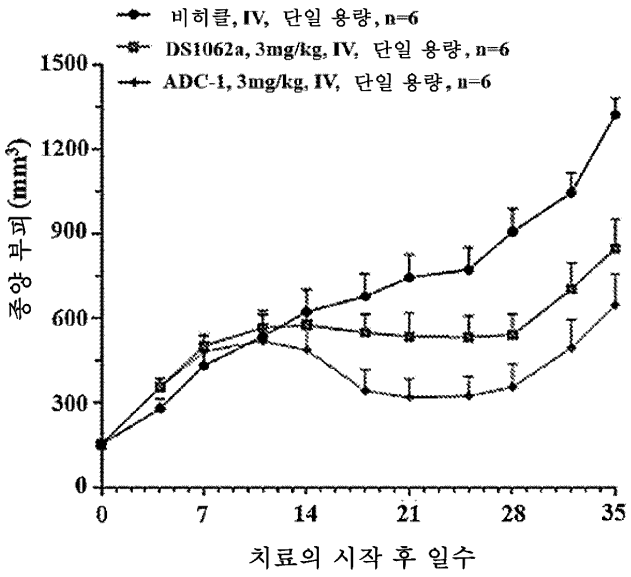
7.3

도면7d

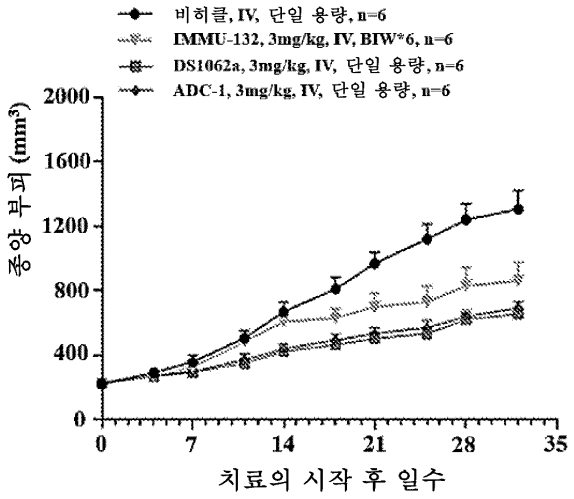

NCI-N87
세포 생존력 (대조군의 %)
120
100
80
60
40
20
0
ADC-2
DS-1062*
GQhRS7
0.0001
0.001
0.01
0.1
1
10
100
1000
농도 (nM)

7.4

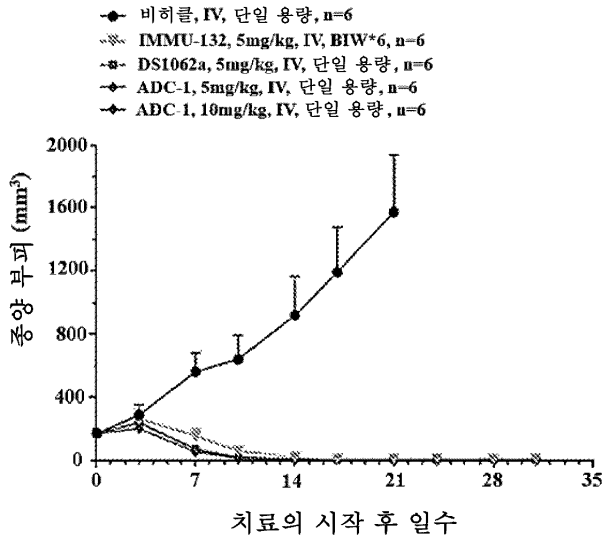
도면8


비히클, IV, 단일 용량, n=6
DS1062a, 3mg/kg, IV, 단일 용량, n=6
ADC-1, 3mg/kg, IV, 단일 용량, n=6
종양 부피 (mm3)
1500
1200
900
600
300
0
0
7
14
21
28
35
치료의 시작 후 일수

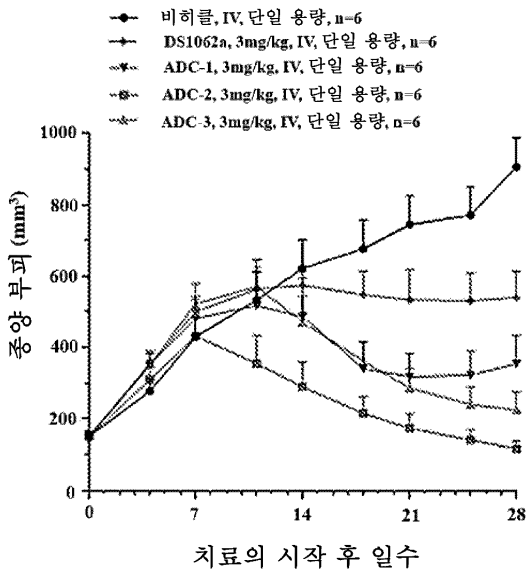
도면9


비히클, IV, 단일 용량, n=6
IMMU-132, 3mg/kg, IV, BIW*6, n=6
DS1062a, 3mg/kg, IV, 단일 용량, n=6
ADC-1, 3mg/kg, IV, 단일 용량, n=6
종양 부피 (mm³)
2000
1600
1200
800
400
0
0
7
14
21
28
35
치료의 시작 후 일수

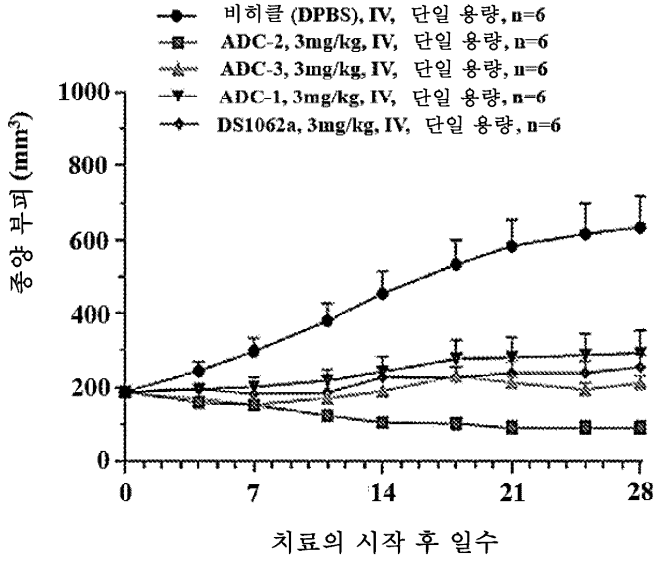
도면10


비히클, IV, 단일 용량, n=6
IMMU-132, 5mg/kg, IV, BIW*6, n=6
DS1062a, 5mg/kg, IV, 단일 용량, n=6
ADC-1, 5mg/kg, IV, 단일 용량, n=6
ADC-1, 10mg/kg, IV, 단일 용량, n=6
종양 부피 (mm³)
2000
1600
1200
800
400
0
0
7
14
21
28
35
치료의 시작 후 일수

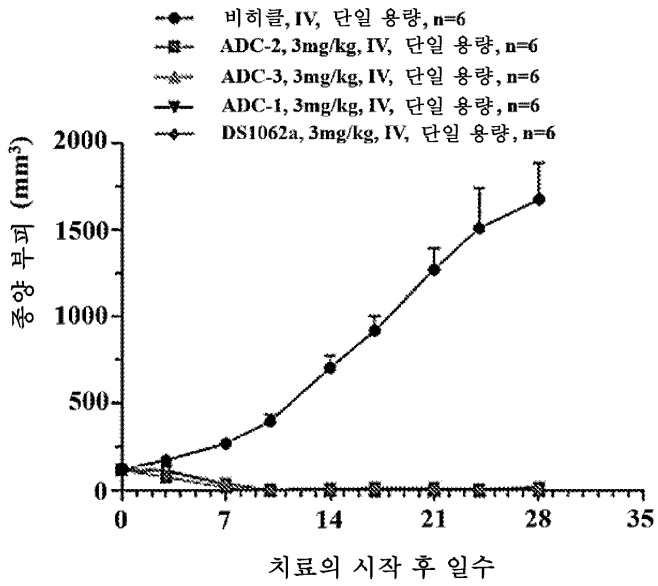
도면11


비히클, IV, 단일 용량, n=6
DS1062a, 3mg/kg, IV, 단일 용량, n=6
ADC-1, 3mg/kg, IV, 단일 용량, n=6
ADC-2, 3mg/kg, IV, 단일 용량, n=6
ADC-3, 3mg/kg, IV, 단일 용량, n=6
종양 부피 (mm3)
1000
800
600
400
200
0
0
7
14
21
28
치료의 시작 후 일수

도면12

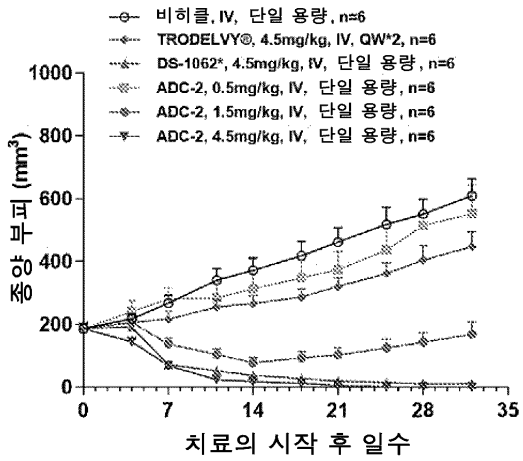

비히클 (DPBS), IV, 단일 용량, n=6
ADC-2, 3mg/kg, IV, 단일 용량, n=6
ADC-3, 3mg/kg, IV, 단일 용량, n=6
ADC-1, 3mg/kg, IV, 단일 용량, n=6
DS1062a, 3mg/kg, IV, 단일 용량, n=6
종양 부피 (mm3)
1000
800
600
400
200
0
0
7
14
21
28
치료의 시작 후 일수

도면13a



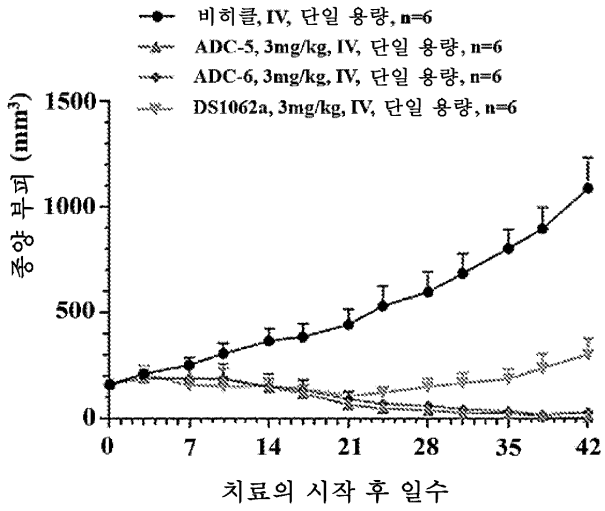
13.1

도면13b

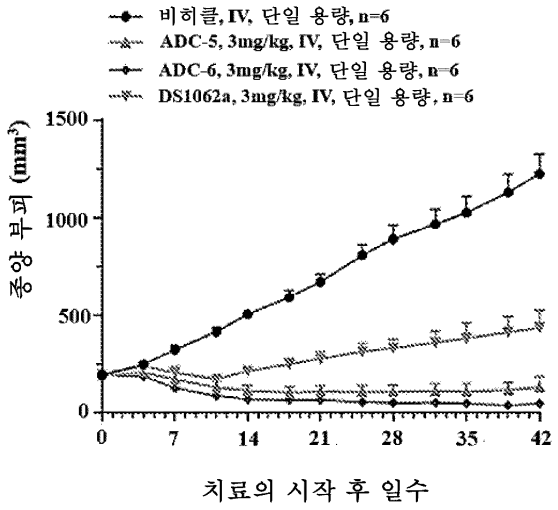


13.2

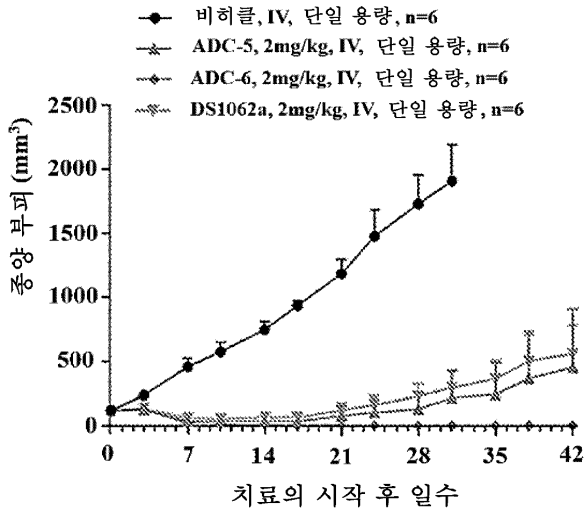
도면14


비히클, IV, 단일 용량, n=6
ADC-5, 3mg/kg, IV, 단일 용량, n=6
ADC-6, 3mg/kg, IV, 단일 용량, n=6
DS1062a, 3mg/kg, IV, 단일 용량, n=6
종양 부피 (mm³)
1500
1000
500
0
0
7
14
21
28
35
42
치료의 시작 후 일수

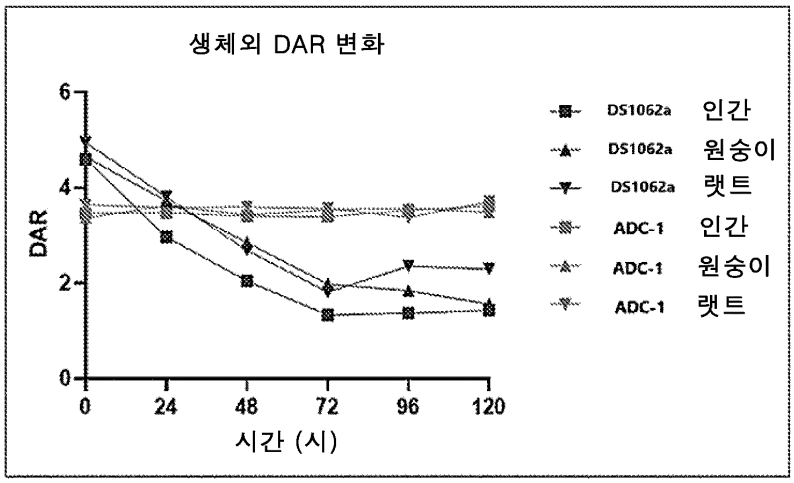
도면15


비히클, IV, 단일 용량, n=6
ADC-5, 3mg/kg, IV, 단일 용량, n=6
ADC-6, 3mg/kg, IV, 단일 용량, n=6
DS1062a, 3mg/kg, IV, 단일 용량, n=6
종양 부피 (mm³)
1500
1000
500
0
0
7
14
21
28
35
42
치료의 시작 후 일수

도면16


비히클, IV, 단일 용량, n=6
ADC-5, 2mg/kg, IV, 단일 용량, n=6
ADC-6, 2mg/kg, IV, 단일 용량, n=6
DS1062a, 2mg/kg, IV, 단일 용량, n=6
종양 부피 (mm3)
2500
2000
1500
1000
500
0
0
7
14
21
28
35
42
치료의 시작 후 일수

도면17


생체외 DAR 변화
DAR
6
4
2
0
0
24
48
72
96
120
시간 (시)
DS1062a 인간
DS1062a 원숭이
DS1062a 랫트
ADC-1 인간
ADC-1 원숭이
ADC-1 랫트

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.