



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2020-0095477
(43) 공개일자 2020년08월10일

- | | |
|--|--|
| <p>(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
 <i>A61K 47/68</i> (2017.01) <i>A61K 38/19</i> (2006.01)
 <i>A61P 1/00</i> (2006.01) <i>A61P 17/06</i> (2006.01)
 <i>A61P 19/02</i> (2006.01) <i>A61P 29/00</i> (2006.01)
 <i>C07K 16/24</i> (2006.01)</p> <p>(52) CPC특허분류
 <i>A61K 47/6889</i> (2017.08)
 <i>A61K 38/191</i> (2013.01)</p> <p>(21) 출원번호 10-2020-7015633</p> <p>(22) 출원일자(국제) 2018년11월29일
 심사청구일자 없음</p> <p>(85) 번역문제출일자 2020년06월01일</p> <p>(86) 국제출원번호 PCT/IB2018/059482</p> <p>(87) 국제공개번호 WO 2019/106609
 국제공개일자 2019년06월06일</p> <p>(30) 우선권주장
 62/593,776 2017년12월01일 미국(US)
 62/595,054 2017년12월05일 미국(US)</p> | <p>(71) 출원인
 애브비 인코포레이티드
 미국 일리노이주 60064 놀스 시카고 놀스 위키건
 로드 1</p> <p>(72) 발명자
 홉슨 아드리안 디.
 미국 매사추세츠주 01545 슈루스버리 홀맨 스트리트 25
 맥퍼슨 마이클 제이.
 미국 매사추세츠주 01431 애쉬비 필스버리 로드 287
 (뒷면에 계속)</p> <p>(74) 대리인
 장훈</p> |
|--|--|

전체 청구항 수 : 총 11 항

(54) 발명의 명칭 글루코코르티코이드 수용체 작용제 및 이의 면역접합체

(57) 요약

글루코코르티코이드 수용체 작용제 면역접합체, 글루코코르티코이드 수용체 작용제 및 이들의 사용 방법이 본원에 제공된다.

(52) CPC특허분류

A61K 47/6803 (2017.08)
A61K 47/6845 (2017.08)
A61P 1/00 (2018.01)
A61P 17/06 (2018.01)
A61P 19/02 (2018.01)
A61P 29/00 (2018.01)
C07K 16/241 (2013.01)
C07K 16/249 (2013.01)
C07K 2317/21 (2013.01)

(72) 발명자

왜겔 웬디

미국 매사추세츠주 01506 브룩필드 라이스 코너 로드 7

고스 크리스티안

미국 매사추세츠주 01566 스타브리지 매서포그 로드 112

허난데즈 악셀 주니어

미국 매사추세츠주 01507 찰턴 로리 레인 14

왕 루

미국 매사추세츠주 01532 노쓰보로 스트라턴 웨이 14

왕 루

미국 매사추세츠주 01581 웨스트보로 닙먹 드라이브 12

마빈 크리스토퍼 시.

미국 일리노이주 60030 그레이슬레이크 브락스톤 웨이 242

산토라 링 시.

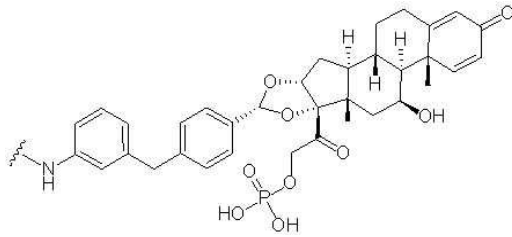
미국 매사추세츠주 01545 슈루스버리 토로우 서클 7

명세서

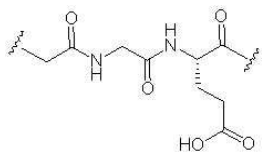
청구범위

청구항 1

- (a) 서열번호 3으로 제시된 중쇄 및 서열번호 4로 제시된 경쇄를 포함하는 항-TNF α 항체와,
(b) 하기 화학식으로 표시되는 라디칼을 포함하는 글루코코르티코이드 수용체 작용제를 포함하며

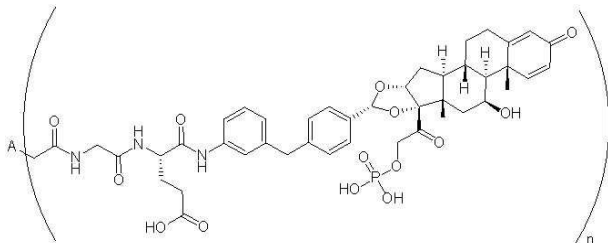


상기 항체가 하기 화학식으로 표시되는 링커를 통해 글루코코르티코이드 수용체 작용제에 접합되어 있는, 항체 약물 접합체:



청구항 2

제1항에 있어서, 하기 화학식에 따른 항체 약물 접합체:



[식 중, A는 항체이고, n은 1 내지 10의 정수임].

청구항 3

제2항에 있어서, n이 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 또는 10인, 항체 약물 접합체.

청구항 4

제2항에 있어서, n이 4인, 항체 약물 접합체.

청구항 5

제2항에 있어서, n이 2인, 항체 약물 접합체.

청구항 6

제4항의 항체 약물 접합체와 약학적으로 허용 가능한 담체를 포함하는 약학적 조성물.

청구항 7

유효량의 제4항의 항체 약물 접합체를 대상에게 투여하는 것을 포함하는, 대상에서 류마티스성 관절염, 강직성 척추염, 건선성 관절염, 판상형 건선, 궤양성 대장염, 성인 크론병, 소아 크론병, 포도막염, 화농성 한선염 및

소아 특발성 관절염으로부터 선택되는 병태를 치료하는 방법.

청구항 8

(a) 제4항의 항체 약물 접합체 또는 제6항의 약학적 조성물을 포함하는 용기와,

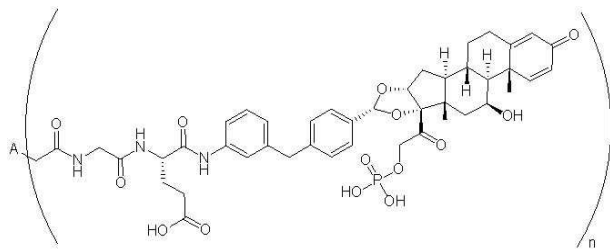
(b) 상기 항체 약물 접합체 또는 약학적 조성물이 류마티스성 관절염, 강직성 척추염, 건선성 관절염, 관상형 건선, 궤양성 대장염, 성인 크론병, 소아 크론병, 포도막염, 화농성 한선염 및 소아 특발성 관절염으로부터 선택되는 병태를 치료하는데 사용됨을 나타내는, 하나 이상의 용기 상의 또는 이와 결합된 라벨 또는 포장 삽입물을 포함하는 키트.

청구항 9

TNF α -발현 세포를 제4항의 항체 약물 접합체와 접촉시키는 단계를 포함하는, 글루코코르티코이드 수용체 작용제를 TNF α -발현 세포에 전달하는 방법.

청구항 10

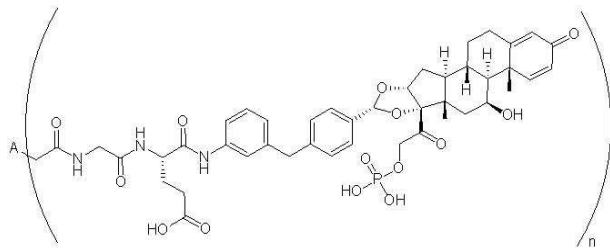
하기 화학식에 따른 항체 약물 접합체:



[식 중, A는 아달리무맙(adalimumab)이고, n은 4임].

청구항 11

하기 화학식에 따른 항체 약물 접합체:



[식 중, A는 아달리무맙이고, n은 2임].

발명의 설명

기술 분야

[0001]

관련 출원

[0002]

본 출원은 2017년 12월 1일자 출원된 미국 가출원 제62/593,776호 및 2017년 12월 5일자 출원된 미국 가출원 제62/595,054호를 우선권 주장하며, 상기 문헌들은 각각 그 전문이 본원에 참조로서 인용된다.

[0003]

서열목록

[0004]

본 출원은 ASCII 형식으로 전자문서로 제출된 서열목록을 포함하며, 상기 서열목록은 그 전체가 본원에 참조로서 인용된다. 2018년 11월 28일자에 작성된 상기 ASCII 사본의 파일명은 A103017_1490W0_SL.txt이며, 크기는 14,758 바이트이다.

[0005]

기술분야

[0006] 중양 피사 인자 α (TNF α)는 몇몇 인간 장애의 병태생리학에서 중심적인 역할을 하며, 항-TNF α 작용제는 류마티스성 관절염, 건선 및 염증성 장질환과 같은 자가면역 및 염증성 장애의 치료에서 임상적으로 입증된 치료 유용성이 있다. 임상에서의 성공에도 불구하고, 항-TNF α 생물제제는 여전히 환자에서 달성할 수 있는 최대 효능에 제한이 있어, 보다 강력하고 효과적인 치료제의 규명 및 개발이 필요하다. 항-TNF α 생물제제로 치료받은 환자는 또한 치료제에 대한 면역원성 반응을 발달시켜 이의 효과를 제한할 수 있다. 따라서, 낮은 면역원성과 높은 효능을 갖는 항-TNF α 요법이 질환을 추가로 제어하는데 유용할 수 있다.

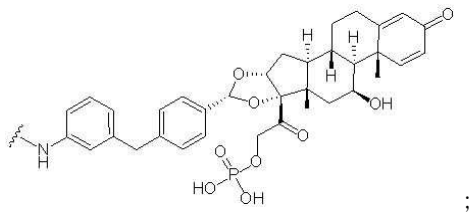
[0007] 합성 글루코코르티코이드 수용체 작용제는 염증성 장애의 치료에 사용되는 강력한 소분자 부류이지만, 질환의 만성 치료에서 이의 유용성은 심각한 부작용으로 인해 제한적이다. 항-TNF 항체와 비교하여 증강된 효능 및 더 긴 작용 지속기간을 갖고, 원치않는 부작용이 최소화된 치료제를 개발할 필요가 있다.

발명의 내용

[0008] 본 개시내용은 자가면역 질환을 치료하는데 유용한 글루코코르티코이드 수용체 작용제 면역접합체를 제공한다.

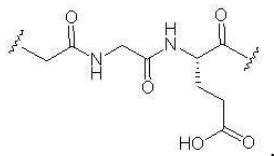
[0009] 하나의 양태에서, 본 개시내용은

[0010] (a) 서열번호 3으로 제시된 중쇄 및 서열번호 4로 제시된 경쇄를 포함하는 항-TNF α 항체와, (b) 하기 화학식으로 표시되는 라디칼을 포함하는 글루코코르티코이드 수용체 작용제를 포함하며



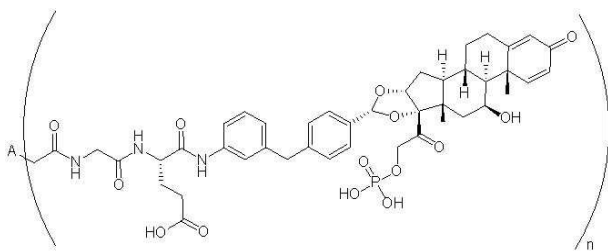
[0011] ;

[0012] 상기 항체가 하기 화학식으로 표시되는 링커를 통해 글루코코르티코이드 수용체 작용제에 접합되어 있는, 항체-약물 접합체를 제공한다:



[0013] .

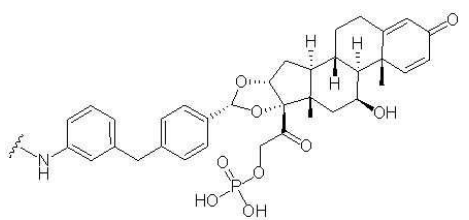
[0014] 하나의 구현예에서, 본 개시내용은 하기 화학식에 따른 항체-약물 접합체를 제공한다:



[0015] [식 중, A는 항체이고, n은 1 내지 10의 정수임].

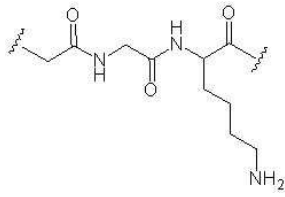
[0017] 하나의 양태에서, 본 개시내용은

[0018] (a) 서열번호 3으로 제시된 중쇄 및 서열번호 4로 제시된 경쇄를 포함하는 항-TNF α 항체와, (b) 하기 화학식으로 표시되는 라디칼을 포함하는 글루코코르티코이드 수용체 작용제를 포함하며



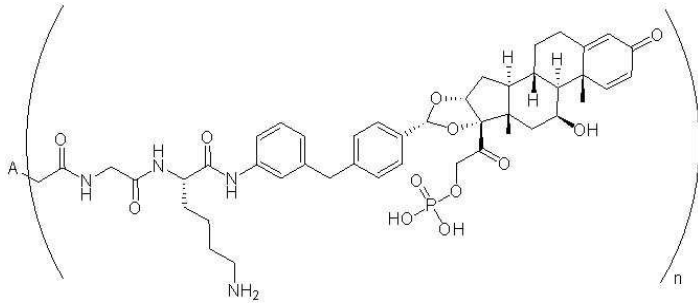
[0019] ;

[0020] 상기 항체가 하기 화학식으로 표시되는 링커를 통해 글루코코르티코이드 수용체 작용제에 접합되어 있는, 항체 약물 접합체를 제공한다:



[0021]

[0022] 하나의 구현예에서, 본 개시내용은 하기 화학식에 따른 항체 약물 접합체를 제공한다:

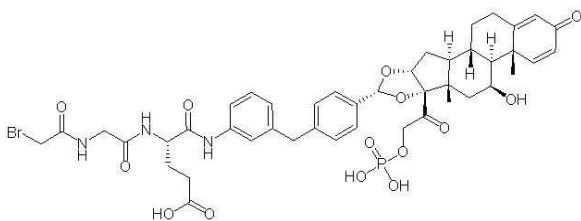


[0023]

[0024] [식 중, A는 항체이고, n은 1 내지 10의 정수임].

[0025] 하나의 구현예에서, 본 개시내용은 약물 로딩(drug loading)이 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 또는 10인, 임의의 상기 구현예의 항체 약물 접합체를 제공한다. 하나의 구현예에서, 본 개시내용은 약물 로딩이 4이고, 예를 들어 상기 항체 약물 접합체 화학식에서 n이 4인, 임의의 상기 구현예의 항체 약물 접합체를 제공한다. 하나의 구현예에서, 본 개시내용은 약물 로딩이 2이고, 예를 들어 상기 항체 약물 접합체 화학식에서 n이 2인, 임의의 상기 구현예의 항체 약물 접합체를 제공한다.

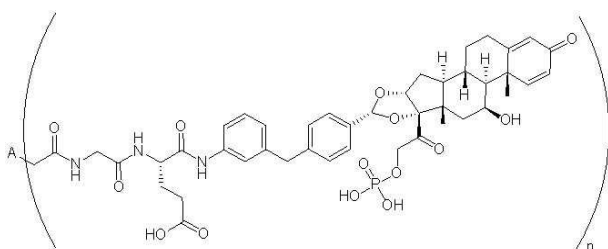
[0026] 하나의 구현예에서, 본 개시내용은 상기 항체를 글루코코르티코이드 수용체 작용제에 접합시키는 단계를 포함하는, 임의의 상기 구현예의 항체 약물 접합체의 제조 방법을 제공한다. 하나의 구현예에서, 본 개시내용은 상기 항체를 글루코코르티코이드 수용체 작용제에 접합시키기 전에 글루코코르티코이드 수용체 작용제 상에 PO₄ 모이더티를 도입하는 단계를 추가로 포함하는, 상기 구현예의 방법을 제공한다. 하나의 구현예에서, 본 개시내용은 상기 접합시키는 단계가 상기 항체를 부분적으로 환원시키고, 부분적으로 환원된 항체를 하기 화학식에 따른 화합물로 알킬화시키는 것을 포함하는, 임의의 상기 구현예의 방법을 제공한다:



[0027]

[0028] 하나의 구현예에서, 본 개시내용은 임의의 상기 구현예의 항체 약물 접합체와 약학적으로 허용 가능한 담체를 포함하는 약학적 조성물을 제공한다. 하나의 구현예에서, 본 개시내용은 약물 대 항체 비(drug to antibody ratio, DAR)가 1 내지 10인, 임의의 상기 구현예의 약학적 조성물을 제공한다.

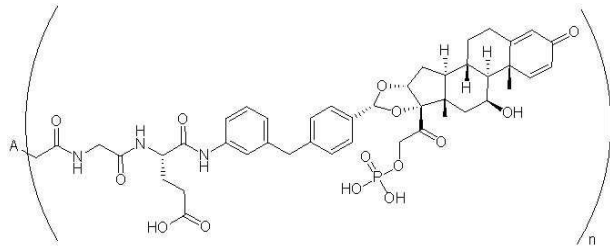
[0029] 하나의 바람직한 구현예에서, 본 개시내용은 하기 화학식에 따른 항체 약물 접합체를 제공한다:



[0030]

[0031] [식 중, A는 아달리무맙(adalimumab)이고, n은 4임].

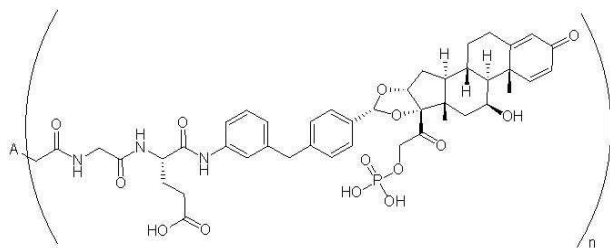
[0032] 하나의 바람직한 구현예에서, 본 개시내용은 하기 화학식에 따른 항체 약물 집합체를 제공한다:



[0033]

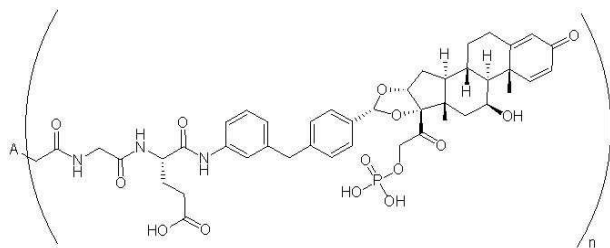
[0034] [식 중, A는 서열번호 3으로 제시된 중쇄 및 서열번호 4로 제시된 경쇄를 포함하는 항-TNF α 항체이고, n은 4임].

[0035] 또 다른 바람직한 구현예에서, 본 개시내용은 하기 화학식에 따른 항체 약물 집합체를 제공한다:



[0036]

[0037] [식 중, A는 아달리무맙이고, n은 2임]. 또 다른 바람직한 구현예에서, 본 개시내용은 하기 화학식에 따른 항체 약물 집합체를 제공한다:



[0038]

[0039] [식 중, A는 서열번호 3으로 제시된 중쇄 및 서열번호 4로 제시된 경쇄를 포함하는 항-TNF α 항체이고, n은 2임].

[0040] 하나의 바람직한 구현예에서, 본 개시내용은 약물 대 항체 비 (DAR)가 2.0인, 임의의 상기 구현예의 약학적 조성물을 제공한다.

[0041] 하나의 바람직한 구현예에서, 본 개시내용은 약물 대 항체 비 (DAR)가 4.0인, 임의의 상기 구현예의 약학적 조성물을 제공한다.

[0042] 하나의 구현예에서, 본 개시내용은 유효량의 임의의 상기 구현예의 항체 약물 집합체 또는 임의의 상기 구현예의 약학적 조성물을 대상에게 투여하는 것을 포함하는, 대상에서 류마티스성 관절염, 강직성 척추염, 건선성 관절염, 판상형 건선, 궤양성 대장염, 성인 크론병, 소아 크론병, 포도막염, 화농성 한선염 및 소아 특발성 관절염으로부터 선택되는 병태를 치료하는 방법을 제공한다.

[0043] 하나의 구현예에서, 본 개시내용은 류마티스성 관절염, 강직성 척추염, 건선성 관절염, 판상형 건선, 궤양성 대장염, 성인 크론병, 소아 크론병, 포도막염, 화농성 한선염 및 소아 특발성 관절염으로부터 선택되는 병태의 치료에 사용하기 위한, 임의의 상기 구현예의 항체 약물 집합체 또는 임의의 상기 구현예의 약학적 조성물을 제공한다.

[0044] 하나의 구현예에서, 본 개시내용은 류마티스성 관절염, 강직성 척추염, 건선성 관절염, 판상형 건선, 궤양성 대장염, 성인 크론병, 소아 크론병, 포도막염, 화농성 한선염 및 소아 특발성 관절염으로부터 선택되는 병태의 치료를 위한 약제의 제조를 위한, 임의의 상기 구현예의 항체 약물 집합체 또는 임의의 상기 구현예의 약학적 조

성물을 제공한다.

[0045] 하나의 구현예에서, 본 개시내용은 (a) 임의의 상기 구현예의 항체 약물 접합체 또는 임의의 상기 구현예의 약학적 조성물을 포함하는 용기와, (b) 상기 항체 약물 접합체 또는 약학적 조성물이 류마티스성 관절염, 강직성 척추염, 건선성 관절염, 판상형 건선, 궤양성 대장염, 성인 크론병, 소아 크론병, 포도막염, 화농성 한선염 및 소아 특발성 관절염으로부터 선택되는 병태를 치료하는데 사용됨을 나타내는, 하나 이상의 용기 상의 또는 이와 결합된 라벨 또는 포장 삽입물을 포함하는 키트를 제공한다.

[0046] 하나의 구현예에서, 본 개시내용은 TNF α -발현 세포를 임의의 상기 구현예의 항체 약물 접합체와 접촉시키는 단계를 포함하는, 글루코코르티코이드 수용체 작용제를 TNF α -발현 세포에 전달하는 방법을 제공한다. 하나의 구현예에서, 본 개시내용은 (a) TNF α -발현 세포와 임의의 상기 구현예의 항체 약물 접합체를 접촉시키는 단계; 및 (b) 대조군 세포와 비교하여 상기 세포로부터의 전염증성 사이토카인의 방출을 결정하는 단계를 포함하는, 항체 약물 접합체의 항염증 활성을 결정하는 방법을 제공한다.

도면의 간단한 설명

[0047] 도 1은, 실시예 7에서 수행되고 이에 기재된 바와 같은, BrAc-Gly-Glu-글루코코르티코이드 수용체 조절제 (GRM)-PO₄의 크로마토그래피 분리를 제공한다. 도시된 바와 같이, ADC는 2개의 약물 링커 분자가 부착된 ADC와 4개의 약물 링커 분자가 부착된 ADC를 함유하는 이중 ADC 혼합물이다.

도 2는, BrAc-Gly-Glu-글루코코르티코스테로이드-PO₄가 접합된 아달리무맙의 디콘볼루션된(deconvoluted) MS 데이터를 제시한다. 도시된 바와 같이, 접합이 달성되었다.

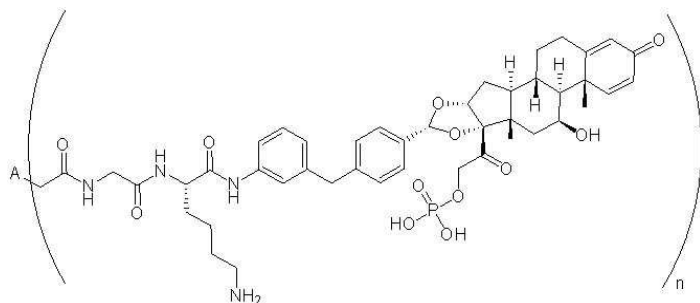
도 3은, 실시예 7에서 수행되고 이에 기재된 바와 같이, 관절염의 마우스 콜라겐-유도 관절염 (CIA) 모델에서, 항-TNF α mAb (고용량) 또는 비히클과 비교하여 고용량 및 저용량의 ADC1 효능을 나타내는 그래프를 제공한다. 도시된 바와 같이, 단일 용량의 항-TNF α 글루코코르티코스테로이드 ADC1은 항-TNF α mAb 또는 비히클 단독과 비교하여 약 28일 동안 발바닥 부종의 개선을 통해 연장된 작용 지속기간을 나타냈다.

도 4는, 실시예 7에서 수행되고 이에 기재된 바와 같은, 시간의 경과에 따른 시노몰구스 원숭이에서의 폐환 및 개환 ADC에 대한 농도 (ug/ml)의 그래프이다. 도시된 바와 같이, 폐환 형태는 역 마이클(Michael) 반응 및 생체 내 링커-약물의 후속 손실에 취약하다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0048] 글루코코르티코이드 수용체 작용제 면역접합체, 글루코코르티코이드 수용체 작용제, 및 이들을 제조하고 사용하는 방법이 본원에 제공된다.

[0049] 하기 화학식에 따른 항체 약물 접합체가 본원에 제공된다:



[0050]

[0051] [식 중, A는 아달리무맙이고, n은 4임]. 하기 실시예 7에서 입증된 바와 같이, 이러한 ADC (즉, 하기 ADC4)는 시험관내 활성, 혈장 내 안정성 및 최소 응집을 나타낸다.

[0052] 또한, ADC4를 제조하고 사용하는 방법이 제공된다.

I. 정의

[0054] 본 개시내용의 이해를 용이하게 하기 위해, 다수의 용어 및 구절이 하기에 정의된다.

[0055] "항-TNF α 단백질"이라는 용어는, (i) TNF α 에 결합할 수 있고, (ii) 세포 표면 TNF 수용체 (p55 및/또는 p7

5)에 대한 가용성 TNF α 의 결합 및/또는 보체의 존재 하 시험관내 표면 TNF α 또는 TNF α 수용체 발현 세포의 용해를 저해할 수 있는 단백질을 나타낸다. 일부 구현예에서, 항-TNF 항체는 세포 표면 상의 TNF 알파에 결합하여 내재화될 수 있다. 예를 들어, US 2014/0294813 (이는 그 전문이 본원에 참조로서 인용됨)에는, 세포 표면 인간 TNF에의 결합 시 세포 내재화를 나타내는 항-TNF 항체가 개시되어 있다. 항-TNF α 단백질은, 예를 들어 항-TNF α 항체 (예를 들어, 아달리무맙, 인플릭시맙(infliximab) 및 골리무맙(golimumab))를 포함한다. 항-TNF α 항체는 단백질 유래 DC에서 막관통TNF에의 결합 시 능동적으로 내재화되어 리소좀으로 신속하게 진입하고, 리소좀에서 분해된다. ([Deora et.al. MABS, 2017, Vol. 9, No. 4, 680-694]).

[0056] 본원에 사용된 "항체"라는 용어는, 디슬파이드 결합에 의해 서로 연결된 2개의 중쇄 (H)와 2개의 경쇄 (L)인 4개의 폴리펩티드 쇄로 구성된 면역글로불린 분자를 나타낸다. 각각의 중쇄는 중쇄 가변 영역 (본원에서 HCVR 또는 VH로 약칭됨) 및 중쇄 불변 영역으로 구성된다. 중쇄 불변 영역은 CH1, CH2 및 CH3의 3개의 도메인으로 구성된다. 각각의 경쇄는 경쇄 가변 영역 (본원에서 LCVR 또는 VL로 약칭됨) 및 경쇄 불변 영역으로 구성된다. 경쇄 불변 영역은 CL의 하나의 도메인으로 구성된다. VH 및 VL 영역은 프레임워크(framework) 영역 (FR)으로 지칭되는 더 보존되는 영역 사이에 배치된, 상보성 결정 영역 (CDR)으로 지칭되는 추가변 영역으로 추가로 세분될 수 있다. 각각의 VH 및 VL은 아미노-말단에서 카르복시-말단까지 FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, FR4의 순서로 배열된 3개의 CDR과 4개의 FR로 구성된다.

[0057] "항-TNF α 항체" 또는 "TNF α 에 결합하는 항체"라는 용어는, TNF α 와 결합할 수 있는 항체, 예를 들어 TNF α 를 표적으로 하는 치료제로서 유용하도록 충분한 친화성을 갖는 항체를 나타낸다. 관련되지 않은 비(非)TNF α 단백질에 대한 항-TNF α 항체의 결합 정도는, 예를 들어 방사면역측정법 (RIA)에 의해 측정 시, TNF α 에 대한 항체의 결합의 약 10% 미만일 수 있다. 특정 구현예에서, TNF α 에 결합하는 항체는 $\leq 1 \mu\text{M}$, $\leq 100 \text{ nM}$, $\leq 10 \text{ nM}$, $\leq 1 \text{ nM}$ 또는 $\leq 0.1 \text{ nM}$ 의 해리 상수 (Kd)를 갖는다.

[0058] 본원에 사용된 "면역접합체", "접합체", "항체-약물 접합체" 또는 "ADC"라는 용어는, 세포 결합제 (예를 들어, 항-TNF α 항체)와 같은 단백질에 접합된 화합물 또는 이의 유도체를 나타낸다. 이러한 면역접합체는 일반식 (SM-L-Q)_n-A로 정의될 수 있으며, 식 중 SM은 소분자 글루코코르티코이드 수용체 작용제에서 유도된 라디칼, 예를 들어 글루코코르티코스테로이드이고, L은 링커이고, Q는 이중2관능성(heterobifunctional)기이거나 존재하지 않고, A는 단백질 (예를 들어, 항체)이고, n은 1 내지 10이다. 면역접합체는 또한 역순으로 일반식 A-(Q-L-SM)_n으로 정의될 수 있다.

[0059] 본 개시내용에서, "링커"라는 용어는, 항-TNF α 단백질 (예를 들어, 항체)을 글루코코르티코스테로이드에 연결할 수 있는 화학적 모이어티를 나타낸다. 링커는 절단되기 쉬워 ("절단 가능한 링커"), 글루코코르티코스테로이드의 방출을 용이하게 할 수 있다. 예를 들어, 이러한 절단 가능한 링커는 글루코코르티코스테로이드 및/또는 항체가 활성을 유지하는 조건에서 펩티다아제-유도 절단에 취약할 수 있다.

[0060] 특히, 본원에 개시된 절단 가능한 링커 구성요소는 2 내지 3개의 아미노산 잔기를 포함하는 펩티드 (디펩티드 또는 트리펩티드), 및 구체적으로 알라닌-알라닌 (Ala-Ala), 글리신-글루탐산 (Gly-Glu), 글루탐산-알라닌-알라닌 (Glu-Ala-Ala) 및 글리신-리신 (Gly-Lys)으로 이루어지는 군으로부터 선택되는 디펩티드 및 트리펩티드를 포함한다. 펩티드는 프로테아제에 의한 링커의 절단을 가능하게 함으로써, 리소좀 효소와 같이, 세포내 프로테아제에의 노출 시 글루코코르티코스테로이드의 방출을 용이하게 한다 ([Doronina et al. (2003) *Nat. Biotechnol.* 21:778-784]).

[0061] 본 개시내용에서, "글루코코르티코스테로이드"라는 용어는, 글루코코르티코이드 수용체와 상호작용하는 자연 발생 또는 합성 스테로이드 호르몬을 나타내며, 특정 글루코코르티코스테로이드가 본원에 상세하게 개시되어 있다. "글루코코르티코스테로이드의 라디칼"은 모 글루코코르티코스테로이드로부터 1개 이상의 수소 원자의 제거에 의해 유도된다. 수소 원자(들)의 제거는 링커에의 모 글루코코르티코스테로이드의 부착을 용이하게 한다. 본 개시내용에서, 수소 원자는 모 글루코코르티코스테로이드의 임의의 적합한 -NH₂ 기로부터 제거된다. 특히, "글루코코르티코스테로이드의 라디칼"은 모 글루코코르티코스테로이드로부터 1개의 수소 원자의 제거에 의해 유도된 1가 라디칼이다.

[0062] 본 개시내용에서, "이중2관능성기"라는 용어는, 링커와 항-TNF α 단백질 (예를 들어, 항체)을 연결하는 화학적 모이어티를 나타낸다. 이중2관능성기는 화학적 모이어티의 양쪽 말단에 상이한 반응성기를 갖는 것을 특징으로 한다.

[0063] "약물 항체 비(drug antibody ratio)" 또는 "DAR"이라는 용어는, A (예를 들어, 항체)에 연결된 SM (예를

들어, 소분자 글루코코르티코이드 수용체 작용제에서 유도된 라디칼, 예를 들어 글루코코르티코스테로이드)의 수를 나타낸다. 따라서, 일반식 (SM-L-Q)_n-A를 갖는 면역접합체에서, DAR은 항체 약물 접합체 당 약물 로딩, 예를 들어 "n"으로 정의된다.

[0064] 개별 면역접합체를 나타내는 화학식 (SM-L-Q)_n-A를 갖는 화합물을 언급할 때, "화합물 DAR"이라는 용어는, 개별 A에 연결된 SM의 수 (예를 들어, 1 내지 10의 정수로서의 약물 로딩 또는 n)를 나타낸다.

[0065] 면역접합체의 집단을 나타내는 화학식 (SM-L-Q)_n-A를 갖는 화합물을 언급할 때, "집단 DAR"이라는 용어는, A에 연결된 SM의 평균 수 (예를 들어, 1 내지 10 ±0.5, ±0.4, ±0.3, ±0.2, ±0.1의 정수 또는 분수로서의 약물 로딩 또는 n)를 나타낸다.

[0066] "대상"이라는 용어는, 특정 치료의 수용자가 되는 인간, 비(非)인간 영장류 등을 나타낸다. 전형적으로, "대상"과 "환자"라는 용어는, 인간 대상과 관련하여 본원에서 상호교환적으로 사용된다.

[0067] "약학적 제형"이라는 용어는, 활성 성분의 생물학적 활성이 유효하게 되는 형태이며, 제형이 투여될 대상에게 허용 가능하지 않은 독성을 갖는 추가 구성요소를 함유하지 않는 제제를 나타낸다. 상기 제형은 멸균될 수 있다.

[0068] 본원에 개시된 면역접합체의 "유효량"은, 구체적으로 언급된 목적을 달성하기에 충분한 양이다. "유효량"은 언급된 목적과 관련하여 결정될 수 있다.

[0069] "치료적 유효량"이라는 용어는, 대상 또는 포유류에서 질환 또는 장애를 "치료"하는데 효과적인 면역접합체의 양을 나타낸다. "예방적 유효량"은, 목적하는 예방적 결과를 달성하는데 효과적인 양을 나타낸다.

[0070] "치료하는" 또는 "치료" 또는 "치료하다" 또는 "완화시키는" 또는 "완화시키다"라는 용어는, 진단된 병리학적 병태 또는 장애를 치유, 둔화, 이의 하나 이상의 증상을 경감시키고/시키거나, 이의 진행을 둔화 또는 중단시키는 치료적 조치 ("치료적 치료")를 나타낸다. 따라서, 치료적 치료를 필요로 하는 대상은, 장애를 갖는 것으로 이미 진단되었거나 의심되는 대상을 포함한다. 예방적 조치는 표적화된 병리학적 병태 또는 장애의 발달을 예방하는 조치 ("예방적 치료")를 나타낸다. 따라서, 예방적 치료를 필요로 하는 대상은 장애를 갖기 쉬운 대상 및 장애가 예방되어야 하는 대상을 포함한다.

[0071] II. 글루코코르티코이드 수용체 작용제에의 연결을 위한 단백질

[0072] 본 개시내용은 단백질, 예를 들어 항체에 연결된 글루코코르티코이드 수용체 작용제를 함유하는 면역접합체를 제공한다. 일부 구현예에서, 상기 항체는 인간, 인간화, 키메라 또는 찢과 항체이다. 일부 구현예에서, 상기 단백질, 예를 들어 항체는 세포 표면 상의 표적에 결합하여 내재화될 수 있다.

[0073] 본 개시내용은 또한 항-TNF α 단백질에 연결된 글루코코르티코이드 수용체 작용제를 함유하는 면역접합체를 제공한다. 특정 구현예에서, 상기 항-TNF α 단백질은 항체이다. 특정 구현예에서, 상기 항-TNF α 단백질은 TNF α (예를 들어, 가용성 TNF α 및/또는 막결합 TNF α)에 결합하는 항체이다. 특정 구현예에서, 상기 항-TNF α 단백질은 가용성 TNF 수용체 단백질, 예를 들어 중쇄 불변 영역에 융합된 가용성 TNF 수용체 단백질이다. 일부 구현예에서, 상기 항-TNF α 단백질, 예를 들어 항-TNF α 항체는 세포 표면 상의 TNF α에 결합하여 내재화된다. 예를 들어, 미국 특허출원 공개 제2014/0294813호 (이는 본원에 참조로서 인용됨)에는, 세포 표면 인간 TNF α에의 결합 시 세포 내재화를 나타내는 항-TNF α 단백질이 개시되어 있다.

[0074] 특정 구현예에서, 상기 항체는 인간 및/또는 마우스 TNF α에 결합한다.

[0075] 막결합 인간 TNF α에 대한 전장 아미노산 서열은 하기와 같다:

[0076] MSTESMIRDVELAEALPKKTGGPQGSRRCLFLSLFSFLIVAGATTFLCLHFGVIGPQREEFPRDLSLISPLAQAVRSSSRTPSDKPAHVHVPQAEGQLQWLNRRANALLANGVELRDNLVVPSEGLYLIYSQVLFGKGQCPSTHVLTHTSIRIAVSQYTKVNLLSAIKSPCQRETPEGAELKPWYEPYIYLGGVFQLEKGDRLSAEINRPDYLDFAESGQVYFGIIAL (서열번호 1). 가용성 인간 TNF α는 서열번호 1의 아미노산 77 내지 233을 함유한다. 막결합 찢과 TNF α에 대한 전장 아미노산 서열은 하기와 같다:

[0077] MSTESMIRDVELAEALPQKMGGFQNSRRCLCLSLFSFLIVAGATTFLCLNFGVIGPQREKFPNGLPLISSMAQTLTLRSSQNSSDKPAHVHVPANHQVEEQLEWLSQRANALLANGMDLKDNLVVPADGLYLVYSQVLFGKGQCPDYVLLTHTVSRFAISYQEKVNLLSAVKSPCKDTPGEAELKPWYEPYIYLGGVFQLEKGDQLSAEVLNPKYLDFAESGQVYFGVIAL (서열번호 2). 가용성 찢과 TNF α는 서열번호 2의 아미노산 80 내지 235를 함유한다.

- [0078] 일부 구현예에서, 상기 항-TNF α 항체는 인간 TNF α 에 결합한다.
- [0079] 일부 구현예에서, 상기 항-TNF α 항체는 쥐와 TNF α 에 결합한다.
- [0080] 특정 구현예에서, 상기 항-TNF α 항체는 하기 효과 중 하나 이상을 갖는다: 시험관내 L929 검정에서 인간 TNF α 세포독성을 1×10^{-7} M 이하의 IC₅₀으로 중화시킴; TNF α 와 p55 및 p75 세포 표면 수용체의 상호작용을 차단함; 및/또는 보체의 존재 하 시험관내 표면 TNF 발현 세포를 용해시킴.
- [0081] 특정 구현예에서, 상기 항-TNF α 항체는 TNF-베타에 결합하지 않는다.
- [0082] 항-TNF α 항체는, 예를 들어 재조합 인간 항체인 아달리무맴을 포함한다. 아달리무맴의 CDR 및 가변 영역에 상응하는 아미노산 서열은, 항체 D2E7에 관하여 미국 특허 제6,258,562호, 즉 서열번호 1 내지 8에 기재되어 있다.
- [0083] 국제 일반명 (INN)인 아달리무맴은 WHO INN 목록 사이트: 2000년, 목록 44 (WHO Drug Information (2000) Vol. 14(3))에 제시되어 있다.
- [0084] 특정 구현예에서, 항-TNF α 항체는 아달리무맴의 서열, 예를 들어 상보성 결정 영역 (CDR), 가변 중쇄 도메인 (VH) 및/또는 가변 경쇄 도메인 (VL)을 포함한다. 예시적인 서열은 표 1에 제시되어 있다.

표 1

표 1: 예시적인 아달리무맴 항체 영역 서열

항체 영역	아미노산 서열
중쇄	EVQLVESGGGLVQPGSRSLRSCAASGFTFDDYAMHWVRQAPGKG LEWVSAITWNSGHIDYADSVETRFTISRDNKNSLYLQMNSLRAE DTAVYYCAKVSYLSTASSLDYWGQGTLLTVSSASTKGPSVFPLAP SSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSS SGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDK THTCPPCPAPELGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHE DPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQD WLNKGKEYCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDEL TKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSF FLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (서열번호 3)
경쇄	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQGIRNYLAWYQQKPGKAPKL LIYAASLTQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDVATYYCQRYNR APYTFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFY PREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSSTYSLSSTLTLSKAD YEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (서열번호 4)
중쇄 가변 영역	EVQLVESGGGLVQPGSRSLRSCAASGFTFDDYAMHWVRQAPGKG LEWVSAITWNSGHIDYADSVETRFTISRDNKNSLYLQMNSLRAE DTAVYYCAKVSYLSTASSLDYWGQGTLLTVSS (서열번호 5)
경쇄 가변 영역	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQGIRNYLAWYQQKPGKAPKL LIYAASLTQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDVATYYCQRYNR APYTFGQGTKVEIK (서열번호 6)
VH-CDR1	DYAMH (서열번호 7) 또는 GFTFDDYAMH (서열번호 8)
VH-CDR2	AITWNSGHIDYADSVET (서열번호 9)
VH-CDR3	VSYLSTASS (서열번호 10) 또는 VSYLSTASSLDY (서열번호 11)
VL-CDR1	RASQGIRNYLA (서열번호 12)
VL-CDR2	AASLTQS (서열번호 13)
VL-CDR3	QRYNRAPYT (서열번호 14)

- [0085]
- [0086] 특정 구현예에서, 상기 항-TNF α 항체는 서열번호 3 및 4의 CDR을 포함한다. 일부 구현예에서, 상기 CDR은 서열번호 7 또는 8, 9, 10 또는 11, 12, 13 및 14를 포함한다. 특정 구현예에서, 상기 항-TNF α 항체는 서열번호 3의 중쇄 및/또는 서열번호 4의 경쇄를 포함한다.
- [0087] 본 개시내용은 본원에 제시된 항-TNF α 항체와 실질적으로 상동성인 변이체 또는 등가물을 추가로 포함한다. 이는, 예를 들어 보존적 치환 돌연변이, 즉, 하나 이상의 아미노산의 유사한 아미노산으로의 치환을 함유할 수 있

다. 예를 들어, 보존적 치환은, 예를 들어 하나의 산성 아미노산의 또 다른 산성 아미노산으로의 치환, 하나의 염기성 아미노산의 또 다른 염기성 아미노산으로의 치환, 또는 하나의 중성 아미노산의 또 다른 중성 아미노산으로의 치환과 같은 하나의 아미노산의 동일한 일반 부류 내 또 다른 아미노산으로의 치환을 나타낸다. 보존적 아미노산 치환에 의해 의도된 바는 당업계에 널리 공지되어 있다.

[0088] 본원에 기재된 단리된 항-TNF α 항체는 당업계에 공지된 임의의 적합한 방법에 의해 제조될 수 있다. 이러한 방법은 직접 단백질 합성 방법에서, 단리된 폴리펩티드 서열을 인코딩하고 이러한 서열을 적합한 형질변환된 숙주에서 발현시키는 DNA 서열 구축 방법에 이르기까지 다양하다. 일부 구현예에서, DNA 서열은 야생형 관심 단백질을 인코딩하는 DNA 서열을 단리하거나 합성하는 재조합 기술을 사용하여 구축된다. 선택적으로, 상기 서열은 부위-특이적 돌연변이 유발에 의해 돌연변이화되어, 이의 기능적 유사체를 제공할 수 있다. 예를 들어 [Zoeller et al., *Proc. Nat'l. Acad. Sci. USA* 81:5662-5066 (1984)] 및 미국 특허 제4,588,585호를 참조한다.

[0089] 일부 구현예에서, 관심 항체를 인코딩하는 DNA 서열은 올리고뉴클레오타이드 합성기를 사용하여 화학적 합성에 의해 구축될 수 있다. 이러한 올리고뉴클레오타이드는 목적하는 폴리펩티드의 아미노산 서열을 기반으로, 관심 재조합 폴리펩티드가 생성되는 숙주 세포에서 선호되는 코돈을 선택함으로써 설계될 수 있다. 단리된 관심 폴리펩티드를 인코딩하는 단리된 폴리뉴클레오타이드 서열을 합성하기 위해 표준 방법이 적용될 수 있다.

[0090] 특정 구현예에서, 재조합 발현 벡터는 항-TNF α 항체를 인코딩하는 DNA를 증폭 및 발현시키는데 사용된다. 광범위한 발현 숙주/벡터 조합이 이용될 수 있다. 진핵생물 숙주에 유용한 발현 벡터에는, 예를 들어 SV40, 소 유두종 바이러스, 아데노바이러스 및 거대세포바이러스로부터의 발현 제어 서열을 포함하는 벡터가 포함된다. 박테리아 숙주에 유용한 발현 벡터에는, pCR-1, pBR322, pMB9 및 이들의 유도체를 포함하는 대장균(*Escherichia coli*)으로부터의 플라스미드와 같은 공지된 박테리아 플라스미드, M13 및 사상(filamentous) 단일 가닥 DNA 파지와 같은 더 넓은 숙주 범위의 플라스미드가 포함된다.

[0091] 항-TNF α 항체의 발현에 적합한 숙주 세포에는, 적절한 프로모터의 제어 하의 원핵생물, 효모, 곤충 또는 고등 진핵생물 세포가 포함된다. 원핵생물에는, 그람 음성 또는 그람 양성 유기체, 예를 들어 대장균 또는 바실러스가 포함된다. 고등 진핵생물 세포에는, 포유류 기원의 확립된 세포주가 포함된다. 무세포 번역 시스템이 또한 이용될 수 있다. 박테리아, 진균, 효모 및 포유류 세포 숙주를 이용하여 사용하기에 적절한 클로닝 및 발현 벡터는 Pouwels 등의 [Cloning Vectors: A Laboratory Manual, Elsevier, N.Y., 1985]에 기재되어 있다. 항체 제조를 포함하는 단백질 제조 방법에 관한 추가의 정보는, 예를 들어 미국 특허출원 공개 2008/0187954호, 미국 특허 제6,413,746호 및 제6,660,501호, 및 국제 특허출원 공개 WO 04009823호에서 확인할 수 있다.

[0092] III. 글루코코르티코이드 수용체 작용제를 함유하는 면역접합체

[0093] 글루코코르티코이드 수용체 작용제를 함유하는 면역접합체가 또한 제공된다. 일부 구현예에서, 면역접합체는 Fc 감마 수용체에 결합한다. 일부 구현예에서, 면역접합체는 GRE 막관통 TNF α 리포터 검정에서 활성이다 (본원에 사용된 "GRE 막관통 TNF α 리포터 검정"은 하기 실시예 7에 사용된 검정을 나타냄). 일부 구현예에서, 면역접합체는 면역접합체 내 단백질 (예를 들어, 항체) 단독과 비교하여 감소된 면역원성 (감소된 항약물 면역 반응 (ADA))을 나타낸다.

[0094] 하나의 구현예에서, 화학식 I-a를 갖는 화합물이 본원에 개시된다:

[0095] $(SM-L-Q)_n-A$ I-a

[0096] [식 중,

[0097] A는 항종양 괴사 인자 (TNF) α 항체, 항-TNF α 단일클론 항체 또는 아달리무맙이고;

[0098] L은 링커이고;

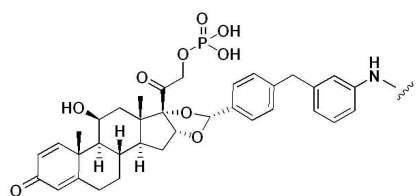
[0099] Q는 이중2관능성기이거나, 또는

[0100] Q는 존재하지 않고;

[0101] n은 1 내지 10이고;

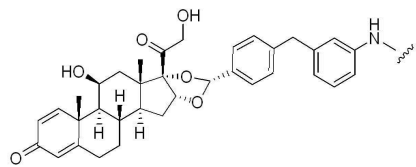
[0102] SM은 하기 (1) 내지 (4) 중 어느 하나를 갖는 글루코코르티코스테로이드의 1가 라디칼임:

[0103] (1) 화학식 II-a:



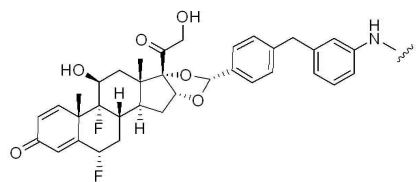
II-a;

(2) 화학식 II-b:



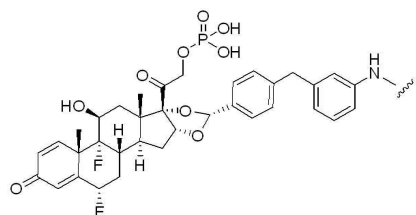
II-b;

(3) 화학식 II-c:



II-c; 또는

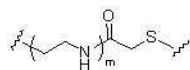
(4) 화학식 II-d:



II-d.

또 다른 구현예에서, SM이 화학식 II-a, II-b, II-c 또는 II-d 중 어느 하나를 갖는 글루코코르티코스테로이드의 1가 라디칼이고, L이 디펩티드 또는 트리펩티드를 포함하는 절단 가능한 링커이고, Q가 이중2관능성기이거나 존재하지 않고, n이 1 내지 10인, 화학식 I-a를 갖는 화합물이 본원에 개시된다. 특히, L은 알라닌-알라닌 (Ala-Ala), 글리신-글루탐산 (Gly-Glu), 글루탐산-알라닌-알라닌 (Glu-Ala-Ala) 및 글리신-리신 (Gly-Lys)으로 이루어지는 군으로부터 선택되는 디펩티드 또는 트리펩티드를 포함한다.

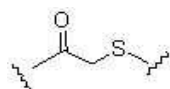
또 다른 구현예에서, SM이 화학식 II-a, II-b, II-c 및 II-d 중 어느 하나를 갖는 글루코코르티코스테로이드의 1가 라디칼이고, Q가 하기 화학식으로 표시되는 이중2관능성기이고,



Q-1

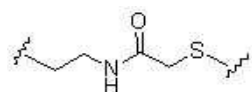
여기서 m은 0 또는 1인, 화학식 I-a를 갖는 화합물이 본원에 개시된다.

또 다른 구현예에서, m은 0이고, Q는 하기 화학식으로 표시된다:



Q-1a.

또 다른 구현예에서, m은 1이고, Q는 하기 화학식으로 표시된다:

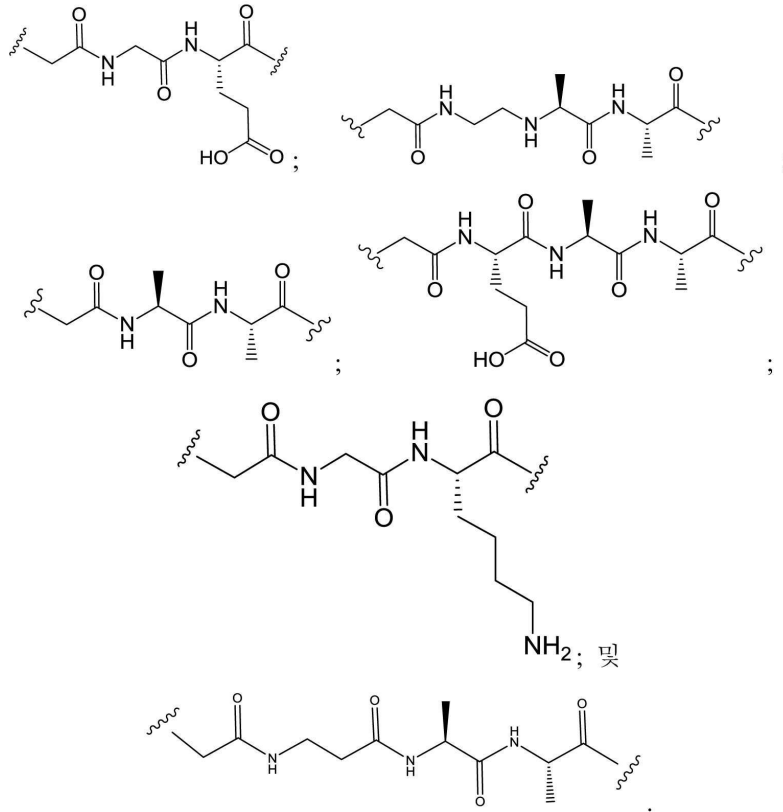


Q-1b.

또 다른 구현예에서, SM이 화학식 II-a, II-b, II-c 및 II-d 중 어느 하나를 갖는 글루코코르티코스테로이드의 1가 라디칼이고, -L-Q-가 표 2의 화학 구조 중 어느 하나인, 화학식 I-a를 갖는 화합물이 본원에 개시된다:

표 2

표 2



[0120]

[0121] 또 다른 구현예에서, 화학식 I-a를 갖는 화합물, 예를 들어 SM이 화학식 II-a, II-b, II-c 및 II-d 중 어느 하나를 갖는 글루코코르티코스테로이드의 1가 라디칼이고, n이 2 내지 8인 화학식 I-a를 갖는 화합물이 본원에 개시된다. 또 다른 구현예에서, n은 1 내지 5이다. 또 다른 구현예에서, n은 2 내지 5이다. 또 다른 구현예에서, n은 1이다. 또 다른 구현예에서, n은 2이다. 또 다른 구현예에서, n은 3이다. 또 다른 구현예에서, n은 4이다. 또 다른 구현예에서, n은 5이다. 또 다른 구현예에서, n은 6이다. 또 다른 구현예에서, n은 7이다. 또 다른 구현예에서, n은 8이다.

[0122] 또 다른 구현예에서, 화학식 I-a를 갖는 화합물, 예를 들어 SM이 화학식 II-a, II-b, II-c 및 II-d 중 어느 하나를 갖는 글루코코르티코스테로이드의 1가 라디칼이고, A가 항체인 화학식 I-a를 갖는 화합물이 본원에 개시된다.

[0123] 또 다른 구현예에서, 화학식 I-a를 갖는 화합물, 예를 들어 SM이 화학식 II-a, II-b, II-c 및 II-d 중 어느 하나를 갖는 글루코코르티코스테로이드의 1가 라디칼이고, 항체가 쥐과, 키메라, 인간화 또는 인간 항체인 화학식 I-a를 갖는 화합물이 본원에 개시된다.

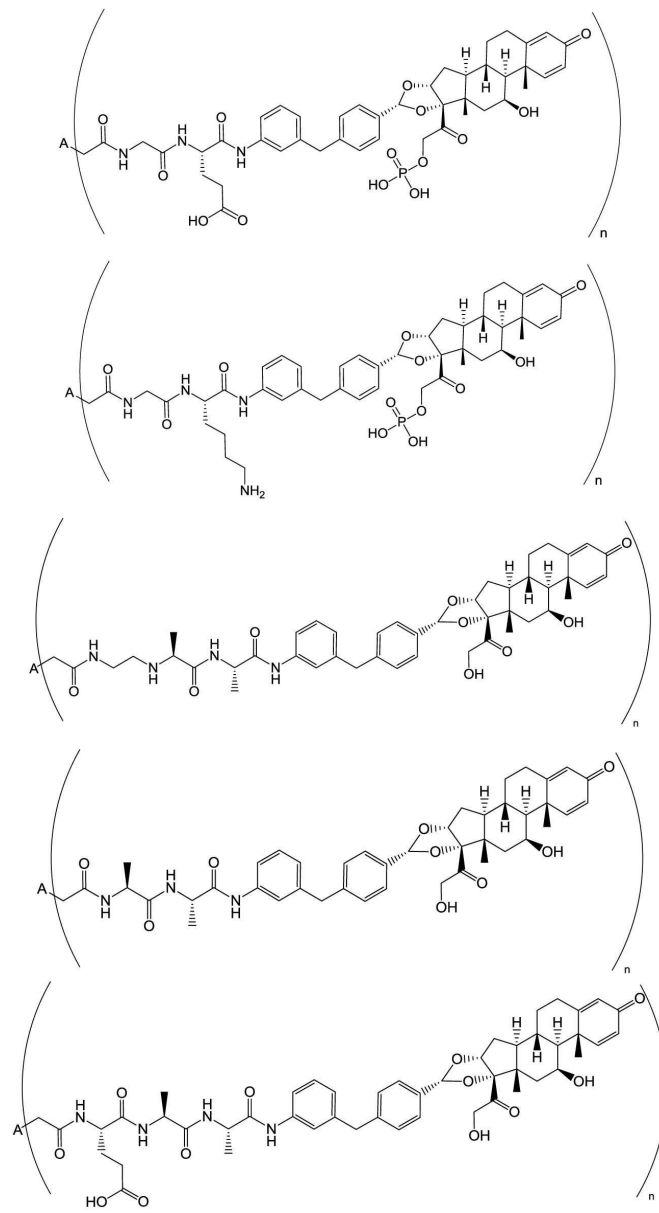
[0124] 또 다른 구현예에서, 화학식 I-a를 갖는 화합물, 예를 들어 SM이 화학식 II-a, II-b, II-c 및 II-d 중 어느 하나를 갖는 글루코코르티코스테로이드의 1가 라디칼이고, A가 아달리무맙, 인플릭시맙, 세르톨리주맙 페골 (certolizumab pegol) 및 골리무맙으로 이루어지는 군으로부터 선택되는 항체의 TNF α에 대한 결합을 경쟁적으로 저해하는 화학식 I-a를 갖는 화합물이 본원에 개시된다.

[0125] 또 다른 구현예에서, 화학식 I-a를 갖는 화합물, 예를 들어 SM이 화학식 II-a, II-b, II-c 및 II-d 중 어느 하나를 갖는 글루코코르티코스테로이드의 1가 라디칼이고, A가 아달리무맙, 인플릭시맙, 세르톨리주맙 페골, 아펠리모맙(afelimomab), 네렐리모맙(nerelimomab), 오조랄리주맙(ozoralizumab), 플라쿨루맙(placulumab) 및 골리무맙으로 이루어지는 군으로부터 선택되는 항체와 동일한 TNF α 에피토프에 결합하는 화학식 I-a를 갖는 화합물이 본원에 개시된다.

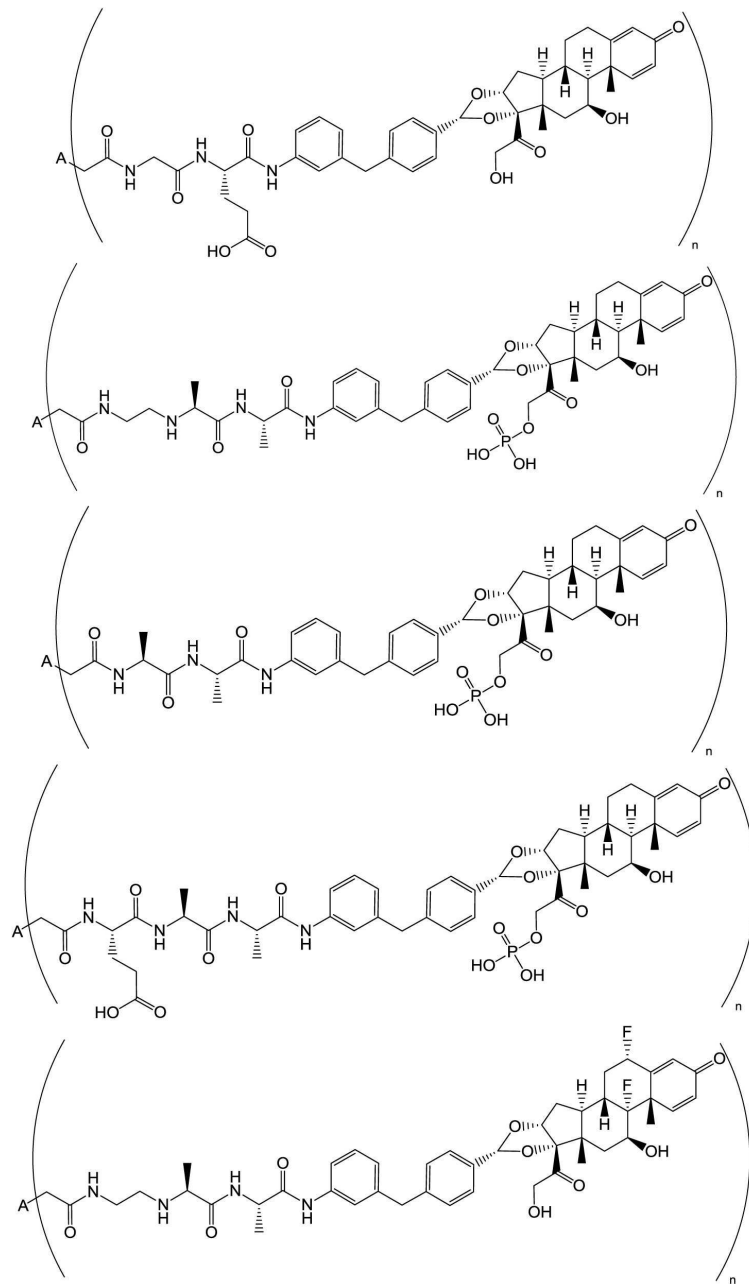
- [0126] 또 다른 구현예에서, 화학식 I-a를 갖는 화합물, 예를 들어 SM이 화학식 II-a, II-b, II-c 및 II-d 중 어느 하나를 갖는 글루코코르티코스테로이드의 1가 라디칼이고, A가 각각, 서열번호 7 또는 8, 서열번호 9, 및 서열번호 10 또는 11의 가변 중쇄 CDR1, CDR2 및 CDR3 서열, 및 각각, 서열번호 12, 서열번호 13 및 서열번호 14의 가변 경쇄 CDR1, CDR2 및 CDR3 서열을 포함하는 화학식 I-a를 갖는 화합물이 본원에 개시된다.
- [0127] 또 다른 구현예에서, 화학식 I-a를 갖는 화합물, 예를 들어 SM이 화학식 II-a, II-b, II-c 및 II-d 중 어느 하나를 갖는 글루코코르티코스테로이드의 1가 라디칼이고, A가 서열번호 5로 제시된 중쇄 가변 영역과 서열번호 6으로 제시된 경쇄 가변 영역을 포함하는 항-TNF α 항체인 화학식 I-a를 갖는 화합물이 본원에 개시된다.
- [0128] 또 다른 구현예에서, 화학식 I-a를 갖는 화합물, 예를 들어 SM이 화학식 II-a, II-b, II-c 및 II-d 중 어느 하나를 갖는 글루코코르티코스테로이드의 1가 라디칼이고, A가 서열번호 3으로 제시된 중쇄와 서열번호 4로 제시된 경쇄를 포함하는 항-TNF α 항체인 화학식 I-a를 갖는 화합물이 본원에 개시된다.
- [0129] 또 다른 구현예에서, 화학식 I-a를 갖는 화합물, 예를 들어 SM이 화학식 II-a, II-b, II-c 및 II-d 중 어느 하나를 갖는 글루코코르티코스테로이드의 1가 라디칼이고, A가 TNF α 와 p55 및 p75 세포 표면 수용체의 상호작용을 차단하는 화학식 I-a를 갖는 화합물이 본원에 개시된다.
- [0130] 또 다른 구현예에서, 화학식 I-a를 갖는 화합물, 예를 들어 SM이 화학식 II-a, II-b, II-c 및 II-d 중 어느 하나를 갖는 글루코코르티코스테로이드의 1가 라디칼이고, A가 보체의 존재 하 시험관내 표면 TNF 발현 세포를 용해시키는 화학식 I-a를 갖는 화합물이 본원에 개시된다.
- [0131] 또 다른 구현예에서, 화학식 I-a를 갖는 화합물, 예를 들어 SM이 화학식 II-a, II-b, II-c 및 II-d 중 어느 하나를 갖는 글루코코르티코스테로이드의 1가 라디칼이고, A가 에타네르셉트(etanercept)인 화학식 I-a를 갖는 화합물이 본원에 개시된다.
- [0132] 또 다른 구현예에서, 화학식 I-a를 갖는 화합물, 예를 들어 SM이 화학식 II-a, II-b, II-c 및 II-d 중 어느 하나를 갖는 글루코코르티코스테로이드의 1가 라디칼이고, A가 아달리무맙인 화학식 I-a를 갖는 화합물이 본원에 개시된다.
- [0133] 또 다른 구현예에서, 표 3의 화학 구조 중 어느 하나인 화학식 I-a를 갖는 화합물이 본원에 개시된다:

표 3

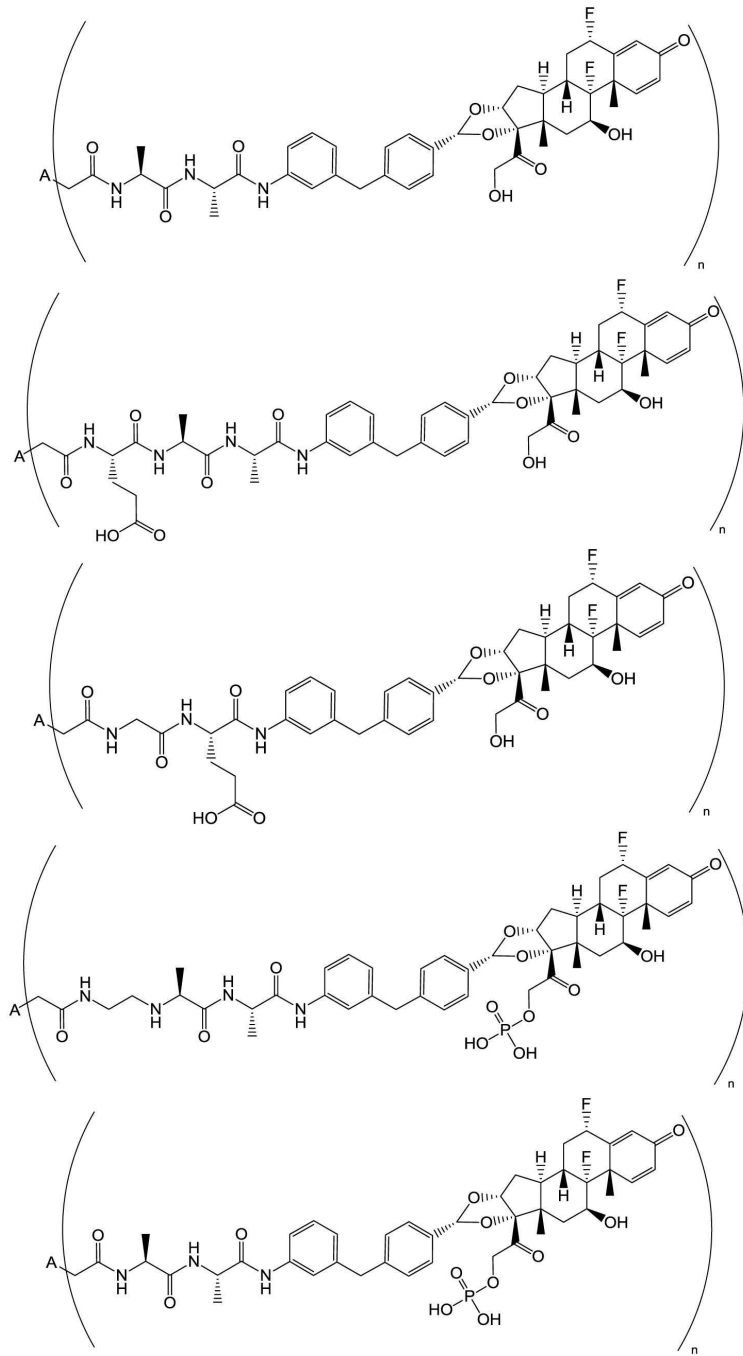
표 3



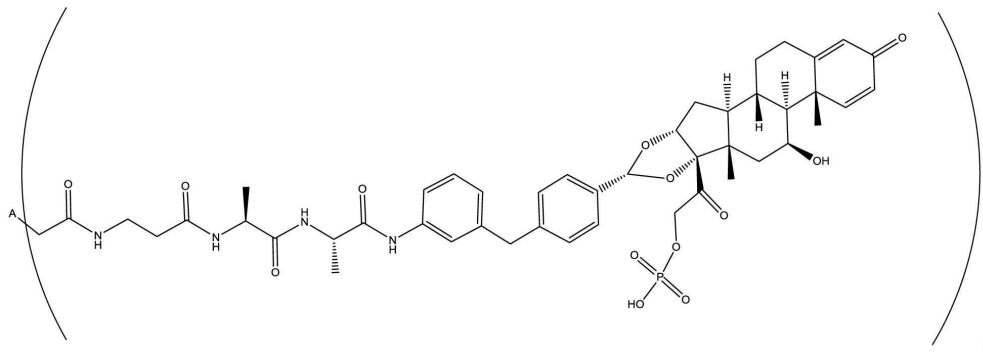
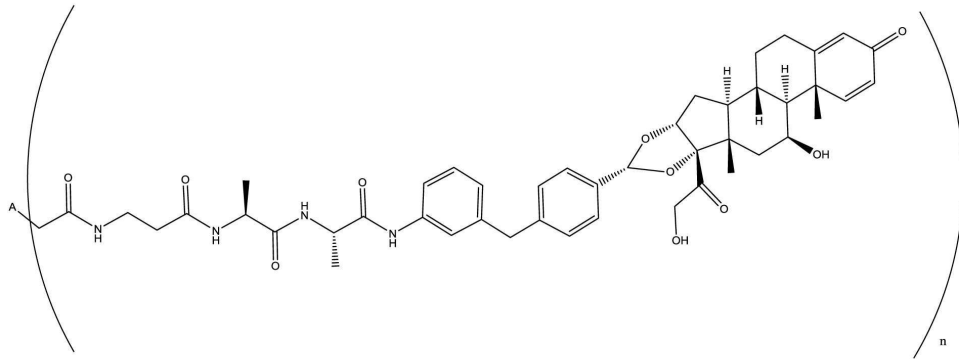
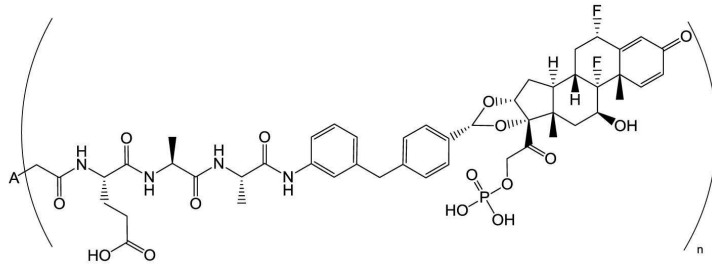
[0134]



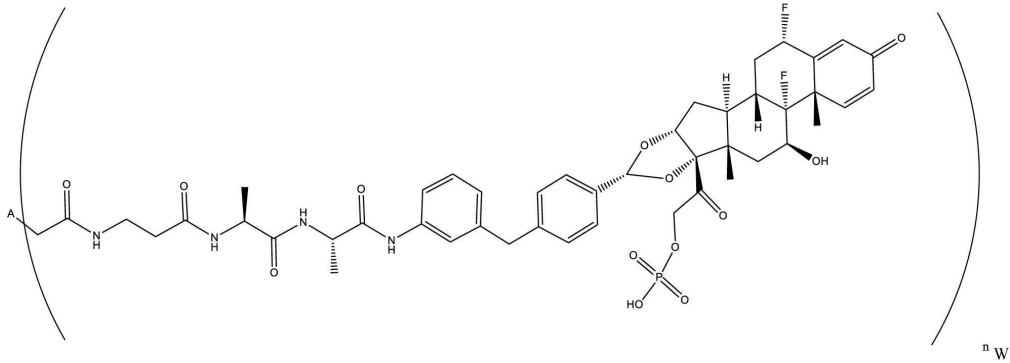
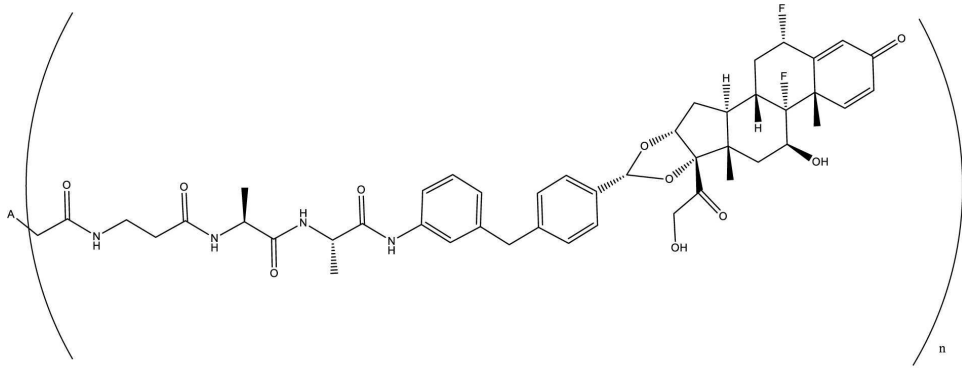
[0135]



[0136]



[0137]



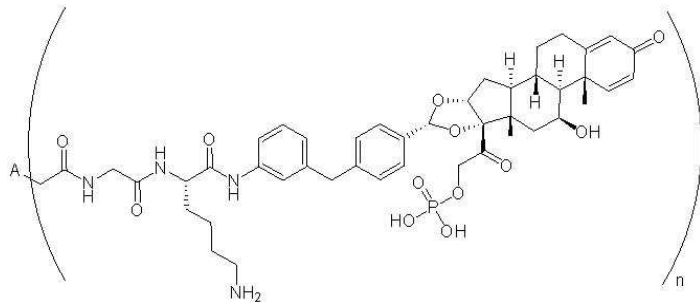
[0138]

[0139]

[식 중, n 은 1 내지 5이고, A는 아달리무맙임].

[0140]

또 다른 구현예에서, 하기 화학식에 따른 항체 약물 접합체가 본원에 개시된다:



[0141]

[0142]

[식 중, A는 아달리무맙이고, n 은 4임]. 하기 실시예 7에서 입증된 바와 같이, 이러한 ADC (즉, 하기 ADC4)는 시험관내 활성, 혈장 내 안정성 및 최소 응집을 나타낸다.

[0143]

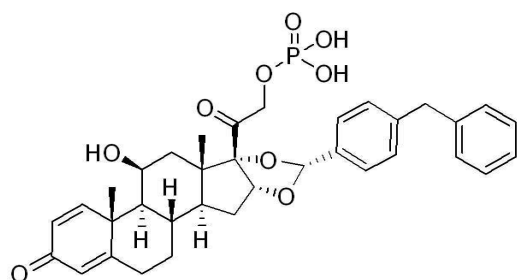
IV. 면역접합체의 제조 방법 및 합성 중간체

[0144]

본 개시내용의 다양한 면역접합체의 일반적인 합성은 하기 화학식 III-a, III-b, III-c 또는 III-d 중 임의의 것의 NH_2 -관능화된 소분자 (SM)를 링커 부분과 반응시키고, 생성된 화합물을 관능화시켜 브로모아세트아미드-관능화된 중간체를 제공하는 것을 포함한다. 이어서, 브로모아세트아미드-관능화된 중간체를 HS-A와 반응시키며, 여기서 HS-A는 제한된 수의 환원된 쇠간 디설파이드 결합을 갖는 항체, 예를 들어 아달리무맙이다.

[0145]

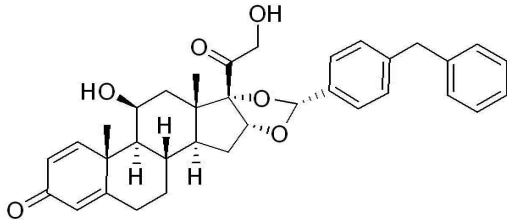
(1) 화학식 III-a:



[0146]

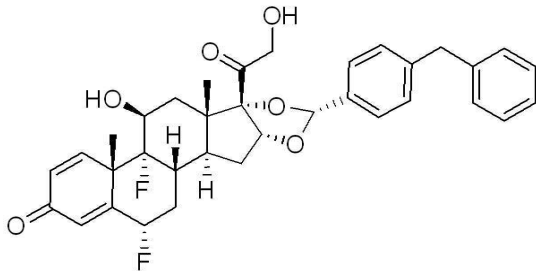
III-a;

[0147] (2) 화학식 III-b:



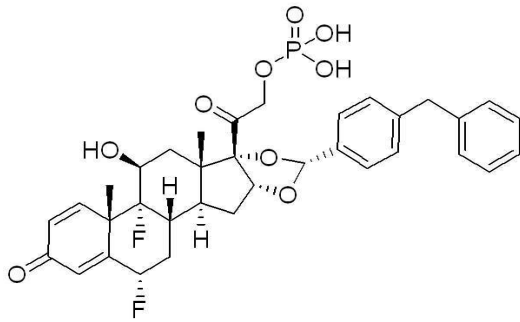
[0148] III-b;

[0149] (3) 화학식 III-c:



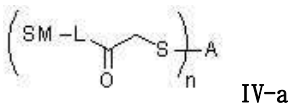
[0150] III-c; 또는

[0151] (4) 화학식 III-d:



[0152] III-d.

[0153] 또 다른 구현예에서, 화학식 IV-a를 갖는 화합물의 제조 방법으로서,



[0154] IV-a

[0155] [식 중,

[0156] A는 아달리무맙이고;

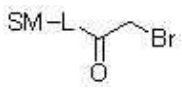
[0157] L은 링커이고;

[0158] n은 1 내지 10이고;

[0159] SM은 화학식 III-a 내지 III-d 중 어느 하나를 갖는 글루코코르티코스테로이드의 라디칼임];

[0160] 상기 방법은,

[0161] a) 화학식 V를 갖는 화합물을



[0162] V

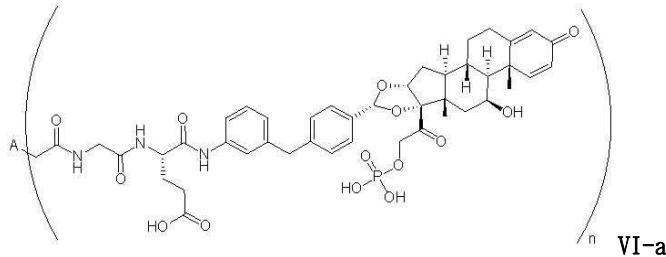
[0163] 항종양 괴사 인자 (TNF) α 단백질 또는 단백질과 접합시키는 단계; 및

[0164] b) 화학식 IV-a를 갖는 화합물을 분리하는 단계를 포함하는, 화학식 IV-a를 갖는 화합물의 제조 방법이 제공된다.

[0165] 일부 구현예에서, 상기 개시된 방법은 화학식 **IV-a**의 화합물을 정제하는 단계를 추가로 포함한다. 특정 구현예에서, 음이온 교환 크로마토그래피 (AEC)가 사용되며, 이는 (일부 구현예에서 링커의 펩티드 부분 상의 하전된 모이어티 및/또는 일부 구현예에서 SM 상의 포스페이트기로 인해) 상이한 DAR 종의 효율적인 분리를 제공할 수 있다.

[0166] 일부 구현예에서, 상기 개시된 방법은 표준 말레이미드계 링커 화학에 의존한 방법보다 적은 합성 단계를 필요로 한다. 특히, 표준 말레이미드계 링커 화학에 의존한 방법은 적절한 DAR 종의 정제 후 수행되는 후속 숙신이미드 개환 가수분해 단계를 필요로 할 수 있다. 이와 같이, 특정 구현예에서, 상기 개시된 방법은 표준 말레이미드계 링커 화학에 대한 집합 프로토콜을 유의하게 단축시킨다.

[0167] 또 다른 구현예에서, 화학식 **VI-a**를 갖는 화합물의 제조 방법으로서,



[0168]

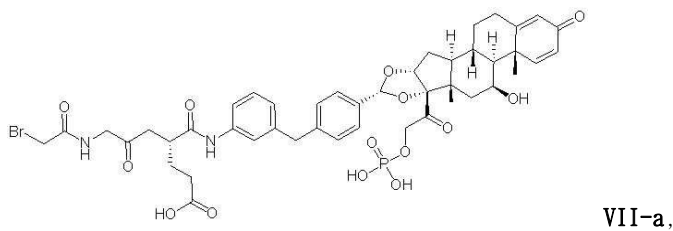
[0169] [식 중,

[0170] A는 아달리무맙이고;

[0171] n은 1 내지 10임];

[0172] 상기 방법은,

[0173] a) 화학식 **VII-a**의 화합물을



[0174]

[0175] 부분적으로 환원된 아달리무맙과 접합시키는 단계; 및

[0176] b) 화학식 **VI-a**를 갖는 화합물을, 예를 들어 크로마토그래피로 분리하는 단계를 포함하는, 화학식 **VI-a**를 갖는 화합물의 제조 방법이 본원에 개시된다.

[0177] 또 다른 구현예에서, n이 1 내지 7인 화학식 **IV-a** 또는 화학식 **VI-a**의 화합물의 제조 방법이 본원에 개시된다. 또 다른 구현예에서, n은 1 내지 5이다. 또 다른 구현예에서, n은 2 내지 4이다. 또 다른 구현예에서, n은 1이다. 또 다른 구현예에서, n은 2이다. 또 다른 구현예에서, n은 3이다. 또 다른 구현예에서, n은 4이다. 또 다른 구현예에서, n은 5이다. 또 다른 구현예에서, n은 6이다. 또 다른 구현예에서, n은 7이다. 또 다른 구현예에서, n은 8이다.

[0178] 또 다른 구현예에서, 하기와 같은 화학식 **IV-a** 또는 화학식 **VI-a**의 화합물이 본원에 개시된다:

[0179] A는 아달리무맙이고;

[0180] n은 1 내지 10임.

[0181] 또 다른 구현예에서, n이 1 내지 7인 화학식 **IV-a** 또는 화학식 **VI-a**의 화합물이 본원에 개시된다. 또 다른 구현예에서, n은 1 내지 5이다. 또 다른 구현예에서, n은 2 내지 4이다. 또 다른 구현예에서, n은 1이다. 또 다른 구현예에서, n은 2이다. 또 다른 구현예에서, n은 3이다. 또 다른 구현예에서, n은 4이다. 또 다른 구현예에서, n은 5이다. 또 다른 구현예에서, n은 6이다. 또 다른 구현예에서, n은 7이다. 또 다른 구현예에서, n은 8이다.

[0182] 또한, 면역접합체의 제조에 유용한 합성 중간체가 본원에 제공된다.

- [0183] 하나의 구현예에서, 본원에 개시된 합성 중간체는 화학식 V 또는 화학식 VII-a 중 어느 하나를 갖는 화합물이다.
- [0184] **VI. 사용 방법 및 약학적 조성물**
- [0185] 시험관 내 또는 생체 내에서 사용될 수 있는 화학식 I-a (예를 들어, 표 3에 제시된 화학식을 가짐)를 갖는 접합체가 본원에 제공된다. 따라서, 또한, 생리학적으로 허용 가능한 담체, 부형제 또는 안정화제에서 목적하는 정도의 순도를 갖는 접합체 또는 글루코코르티코이드 수용체 작용제를 포함하는 조성물, 예를 들어 특정 생체내 사용을 위한 약학적 조성물이 제공된다 (Remington's Pharmaceutical Sciences (1990) Mack Publishing Co., Easton, PA). 허용 가능한 담체, 부형제 또는 안정화제는 이용되는 투여량 및 농도에서 수용자에게 무독성이다.
- [0186] 생체내 투여에 사용되는 조성물 (예를 들어, 약학적 조성물)은 멸균될 수 있으며, 이는, 예를 들어 멸균 여과막을 통한 여과에 의해 달성될 수 있다. 생체내 투여에 사용되는 조성물 (예를 들어, 약학적 조성물)은 보존제를 포함할 수 있다.
- [0187] 본원에 기재된 항체 약물 접합체 및/또는 항체 약물 접합체를 포함하는 약학적 조성물은, 세포 발현 표면 TNF α (시험관내 또는 생체내)를 용해시키고/시키거나 증가된 TNF α (예를 들어, 혈액 내 증가된 TNF α)를 특징으로 하는 질환 또는 장애를 치료하는데 유용할 수 있다. 일부 구현예에서, 상기 항체 약물 접합체 및/또는 조성물은 사이토카인 방출 (시험관내 또는 생체내)의 저해 및/또는 자가면역 또는 염증성 질환의 치료에 유용하다. 일부 구현예에서, 상기 항체 약물 접합체 및/또는 조성물은 크론병(Crohn's disease)의 치료 (예를 들어, 회장 및/또는 상행 결장을 포함하는 중등도 내지 중증 활동성 크론병, 및/또는 최대 3개월 동안 회장 및/또는 상행 결장을 포함하는 중등도 내지 중증 활동성 크론병의 임상 관해의 유지)에 사용된다. 일부 구현예에서, 상기 항체 약물 접합체 및/또는 조성물은 궤양성 대장염의 치료 (예를 들어, 활동성의 중등도 내지 중증 궤양성 대장염을 앓고 있는 환자에서 관해의 유도)에 사용된다. 일부 구현예에서, 상기 항체 약물 접합체 및/또는 조성물은 류마티스성 관절염 (RA)의 치료에 사용된다. 일부 구현예에서, 상기 항체 약물 접합체 및/또는 조성물은 소아 특발성 관절염 (JA)의 치료에 사용된다. 일부 구현예에서, 상기 항체 약물 접합체 및/또는 조성물은 건선성 관절염 (PsA)의 치료에 사용된다. 일부 구현예에서, 상기 항체 약물 접합체 및/또는 조성물은 강직성 척추염 (AS) 또는 축형 척추관절염 (axSpA)과 같은 척추관절증의 치료에 사용된다. 일부 구현예에서, 상기 항체 약물 접합체 및/또는 조성물은 성인 크론병 (CD)의 치료에 사용된다. 일부 구현예에서, 상기 항체 약물 접합체 및/또는 조성물은 소아 크론병의 치료에 사용된다. 일부 구현예에서, 상기 항체 약물 접합체 및/또는 조성물은 궤양성 대장염 (UC)의 치료에 사용된다. 일부 구현예에서, 상기 항체 약물 접합체 및/또는 조성물은 판상형 건선 (Ps)의 치료에 사용된다. 일부 구현예에서, 상기 항체 약물 접합체 및/또는 조성물은 화농성 한선염 (HS)의 치료에 사용된다. 일부 구현예에서, 상기 항체 약물 접합체 및/또는 조성물은 포도막염의 치료에 사용된다. 일부 구현예에서, 상기 항체 약물 접합체 및/또는 조성물은 베체트병(Behcets disease)의 치료에 사용된다. 일부 구현예에서, 상기 항체 약물 접합체 및/또는 조성물은 판상형 건선을 포함하는 건선의 치료에 사용된다. 일부 구현예는 본원에 기재된 질환 또는 장애를 치료하기 위한 약제의 제조를 위한 약물 접합체 및/또는 약학적 조성물의 용도를 포함한다.
- [0188] 일부 구현예는 글루코코르티코이드 수용체 작용제를 TNF α -발현 세포에 전달하는 방법을 포함한다. 이러한 방법은 TNF α -발현 세포를 본원에 기재된 바와 같은 항체 약물 접합체와 접촉시키는 단계를 포함할 수 있다. 일부 구현예는 글루코코르티코이드 수용체 작용제를 TNF α -발현 세포에 전달하는 시험관내 방법을 포함한다.
- [0189] 또한, 항체 약물 접합체의 항염증 활성을 결정하는 방법이 제공된다. 이러한 방법은 TNF α -발현 세포를 본원에 기재된 바와 같은 항체 약물 접합체와 접촉시키는 단계를 포함할 수 있다. 일부 구현예는 TNF α -발현 세포를 본원에 기재된 바와 같은 항체 약물 접합체와 접촉시키는 단계, 및 대조군 세포와 비교하여 상기 세포로부터의 전염증성 사이토카인의 감소된 방출을 결정하는 단계를 포함한다. 일부 구현예는 항체 약물 접합체의 항염증 활성을 결정하는 시험관내 방법을 포함한다.
- [0190] 일부 구현예는 세포 (예를 들어, TNF α -발현 세포)를 항체 약물 접합체와 직접 또는 간접적으로 접촉시키는 단계, 및 예를 들어 세포 형태 또는 생존능의 변화, 마커의 발현, 분화 또는 탈분화, 세포 호흡, 미토콘드리아 활성, 막 완전성, 성숙, 증식, 생존능, 아포토시스 또는 세포 사멸에 의해 반영되는, 항체 약물 접합체가 세포의 활성 또는 기능을 조절하는지 여부를 결정하는 단계를 포함하는, 스크리닝 방법 (예를 들어, 시험관내 방법)을 포함한다. 직접 상호작용의 하나의 예는 물리적 상호작용이며, 간접 상호작용은, 예를 들어 결국 참조된 개체 (예를 들어, 세포 또는 세포 배양물)에 작용하는 중재자 분자에 대한 조성물의 작용을 포함한다.

[0191] VII. 제조 물품

[0192] 본 개시내용은 또한 하나 이상의 용기를 포함하는 약학적 팩 및 키트를 포함하며, 여기서 용기는 본원에 기재된 바와 같은 항체 약물 접합체 또는 조성물의 1회 이상의 용량을 포함할 수 있다. 특정 구현예에서, 상기 팩 또는 키트는 하나 이상의 추가 작용제의 존재 또는 부재 하의 선결된 양의 조성물 또는 항체 약물 접합체를 의미하는 단위 투여량을 함유한다.

[0193] 상기 키트는 하나 또는 다수의 용기, 및 동봉된 조성물이 선택된 질환 병태를 치료하는데 사용됨을 나타내는 용기(들) 내의, 상의 또는 이에 결합된 라벨 또는 포장 삽입물을 포함할 수 있다. 적합한 용기에는, 예를 들어 병, 바이알, 시린지 등이 포함된다. 상기 용기는 유리 또는 플라스틱과 같은 다양한 재료로 형성될 수 있다. 상기 용기(들)은 멸균 접근 포트를 포함할 수 있으며, 예를 들어 용기는 정맥내 용액 백, 또는 피하 주사 바늘에 의해 관통될 수 있는 마개를 갖는 바이알일 수 있다.

[0194] 일부 구현예에서, 상기 키트는 항체 및 임의의 선택적 구성요소를 환자에서 투여하기 위한 수단, 예를 들어 하나 이상의 바늘 또는 시린지 (사전 충전된 또는 비어있는), 점안액, 피펫, 또는 제형이 대상에게 주사 또는 도입될 수 있거나, 또는 신체의 병든 영역에 적용될 수 있는 다른 이와 같은 장치를 함유할 수 있다. 본 개시내용의 키트는 또한 바이알 등을 함유하기 위한 수단, 및 예를 들어 목적하는 바이알 및 다른 장치가 배치되고 보유되는 취입 성형된 플라스틱 용기와 같은 상업적으로 판매를 위해 완전히 밀폐되어 있는 다른 구성요소를 포함할 것이다.

[0195] 실시예

[0196] 본원에 기재된 실시예 및 구현예는 단지 예시적인 목적으로, 이에 비추어 다양한 변형 또는 변경이 당업자에게 제안될 것이며, 이러한 변형 또는 변경은 본 개시내용의 사상 및 범위 내에 포함되는 것으로 이해된다.

[0197] 출발 물질은 상업적으로 입수 가능하며, 본원에 기재된 절차, 문헌 절차 또는 유기 화학 분야의 당업자에게 널리 공지된 절차에 따라 제조될 수 있다. 주어진 시약/반응물 명칭은 상업용 병에 명명된 바, 또는 IUPAC 협약, CambridgeSoft[®] ChemDraw Ultra 12.0, CambridgeSoft[®] Chemistry E-Notebook 11 또는 AutoNom 2000에 의해 생성된 바와 같다. 본원에 기재된 실시예 및 구현예는 단지 예시적인 목적으로, 이에 비추어 다양한 변형 또는 변경이 당업자에게 제안될 것이며, 이러한 변형 또는 변경은 본 개시내용의 사상 및 범위 내에 포함되는 것으로 이해된다.

[0198] 화합물 합성 및 특징분석을 위한 분석 방법

[0199] 분석 데이터는 하기 절차, 일반 절차의 예시 또는 실시예의 표에 포함되어 있다. 달리 언급되지 않는 한, 모든 ¹H 및 ¹³C NMR 데이터는 Varian Mercury Plus 400 MHz 또는 Bruker AVIII 300 MHz 기기 상에서 수집되었으며; 화학적 이동은 백만분을 (ppm)로 표시된다. HPLC 분석 데이터는 실험 내에 상세화되어 있거나, 표 4에 제공된 방법을 사용하여 LC/MS 및 HPLC 조건의 표를 참조한다.

표 4

표 4

방법	조건
a	구배는 3.4 분 내 1→90% B, 0.45 분 내 90→100% B, 0.01 분 내 100→1% B 였고, 그 후 0.65 분 동안 1% B (유량 0.8 mL/분)에서 유지되었다. 이동상 A 는 H ₂ O 중 0.0375% TFA 였고, 이동상 B 는 MeCN 중 0.018% TFA 였다. 크로마토그래피에 사용된 컬럼은 2.0 x 50 mm Phenomenex Luna-C18 컬럼 (5 μm 입자)이었다. 검출 방법은 DAD 와 ELSD, 및 양극 전기분무 이온화였다.

[0200]

[0201] 하기 실시예에 사용된 약어는 다음과 같다:

ACTH	부신피질자극 호르몬	HIC	소수성 상호작용 크로마토그래피
BrAc	브로모아세트아미드	HPLC	고성능 액체 크로마토그래피
CV	컬럼 용량	LCMS	액체 크로마토그래피 질량 분석법
DAD	다이오드 어레이	MeCN	아세트니트릴
DAR	약물 대 항체 비	MEM	최소 필수 배지
DBP	디부틸프탈레이트	MeOH	메탄올
DCM	디클로로메탄	MS	질량 분석법
DMA	디메틸아세트아미드	NEAA	비필수 아미노산
DMF	디메틸포름아미드	NMR	핵 자기 공명
DMSO	디메틸설폭사이드	PBS	인산염 완충 식염수
DTT	디티오프레이톨	PE	석유 에테르
EEDQ	2-에톡시-1-에톡시카르보닐-1,2-디히드로퀴놀린	PINP	제 1 형 프로콜라겐 아미노-말단 프로펩티드
ELSD	증기화 광 산란 검출기	rt	실온
Eq	당량	RPMI	로스웰 파크 종합 암센터(Roswell Park Memorial Institute)
EtOAc	에틸아세테이트	SEC	크기 배제 크로마토그래피
FBS	태아 소 혈청	TCEP	(트리스(2-카르복시에틸)포스핀)
Fmoc	9-플루오레닐메틸옥시카르보닐	TFA	트리플루오로아세트산

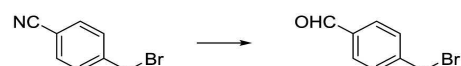
[0202]

[0203]

실시예 1: (2S,6aS,6bR,7S,8aS,8bS,10S,11aR,12aS,12bS)-10-(4-(3-아미노벤질)페닐)-2,6b-디플루오로-7-히드록시-8b-(2-히드록시아세틸)-6a,8a-디메틸-1,2,6a,6b,7,8,8a,8b,11a,12,12a,12b-도데카히드로-4H-나프토[2',1':4,5]인덴노[1,2-d][1,3]디옥솔-4-온의 합성

[0204]

단계 1: 4-(브로모메틸)벤즈알데히드의 합성



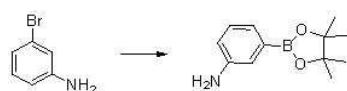
[0205]

[0206]

다이소부틸알루미늄 히드라이드 (153 mL, 153 mmol, 톨루엔 중 1 M)를 0℃의 톨루엔 (400 mL) 중 4-(브로모메틸)벤조니트릴 (20 g, 102 mmol)의 용액에 1시간에 걸쳐 적가하였다. 2개의 추가 바이알을 상기 기재된 바와 같이 준비하였다. 3개의 반응 혼합물을 모두 조합하였다. 상기 혼합물에 10% 수성 HCl (1.5 L)을 첨가하였다. 상기 혼합물을 DCM (3 x 500 mL)으로 추출하였다. 유기 층을 Na₂SO₄ 상에서 건조시키고, 여과하고, 감압 하에서 농축시켰다. 잔류물을 실리카겔 상에서 컬럼 크로마토그래피 (PE:EtOAc = 10:1로 용리함)로 정제하여, 표제 화합물 (50 g, 수율 82%)을 백색 고체로서 수득하였다. ¹H NMR (400MHz, CDCl₃) δ 10.02 (s, 1H), 7.91 - 7.82 (m, 2H), 7.56 (d, J=7.9 Hz, 2H), 4.55 - 4.45 (m, 2H).

[0207]

단계 2: 3-(4,4,5,5-테트라메틸-1,3,2-디옥사보롤란-2-일)아닐린의 합성



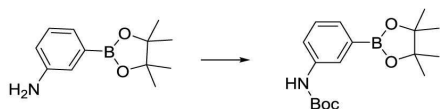
[0208]

[0209]

1,4-디옥산 (480 mL) 중의 3-브로모아닐린 (40 g, 233 mmol)의 용액에, 4,4,4',4',5,5,5',5'-테트라메틸-2,2'-바이(1,3,2-디옥사보롤란) (94 g, 372 mmol), 아세트산칼륨 (45.6 g, 465 mmol), 2-디시클로헥실포스포피노-2',4',6'-트리-*i*-프로필-1,1'-바이페닐 (8.07 g, 13.95 mmol) 및 트리스(디벤질리덴아세톤)디팔라듐(0) (8.52 g, 9.30 mmol)을 첨가하였다. 생성된 혼합물을 질소 하 80℃에서 4시간 동안 가열하였다. 추가의 바이알을 상기 기재된 바와 같이 준비하였다. 2개의 반응 혼합물을 조합하고, 농축시키고, 잔류물을 실리카겔 상에서 컬럼 크

로마토그래피 (PE:EtOAc = 10:1로 용리함)로 정제하여, 표제 화합물 (60 g, 수율 55.4%)을 연황색 고체로서 수득하였다. ^1H NMR (400MHz, CDCl_3) δ 7.23 - 7.13 (m, 3H), 6.80 (d, $J=7.5$ Hz, 1H), 3.82 - 3.38 (m, 2H), 1.34 (s, 12H).

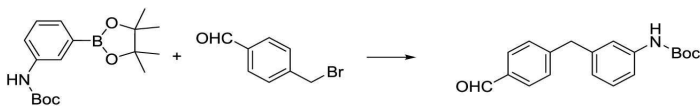
[0210] **단계 3:** tert-부틸 (3-(4,4,5,5-테트라메틸-1,3,2-디옥사보롤란-2-일)페닐)카르바메이트의 합성



[0211]

[0212] 3-(4,4,5,5-테트라메틸-1,3,2-디옥사보롤란-2-일)아닐린 (실시예 1, 단계 2) (30 g, 137 mmol)과 디-tert-부틸 디카르보네이트 (38.9 g, 178 mmol)를 톨루엔 (600 mL) 중에서 100℃에서 24시간 동안 혼합하였다. 또 다른 바이알을 상기 기재된 바와 같이 준비하였다. 2개의 반응 혼합물을 조합하고, 상기 혼합물을 증발시키고, EtOAc (1.5 L)에 용해시키고, 0.1 N HCl (3 x 2 L)과 염수 (3 L)로 세정하고, Na_2SO_4 상에서 건조시키고, 여과하고, 감압 하에서 농축시켜, 표제 화합물 (50 g, 수율 57%)을 적색 고체로서 수득하였다. ^1H NMR (400MHz, CDCl_3) δ 7.63 (br m, 2H), 7.48 (d, $J=7.1$ Hz, 1H), 7.37 - 7.28 (m, 1H), 1.52 (s, 9H), 1.34 (s, 12H).

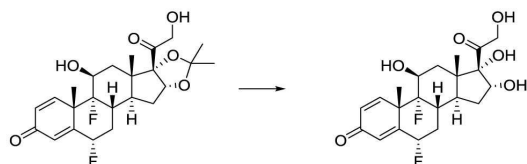
[0213] **단계 4:** tert-부틸 (3-(4-포르밀벤질)페닐)카르바메이트의 합성



[0214]

[0215] 테트라히드로푸란 (400 mL) 중의 4-(브로모메틸)벤즈알데히드 (실시예 1, 단계 1) (24.94 g, 125 mmol), 1,1'-비스(디페닐포스포노)페로센디클로로 팔라듐(II) DCM 복합체 (13.75 g, 18.80 mmol), tert-부틸 (3-(4,4,5,5-테트라메틸-1,3,2-디옥사보롤란-2-일)페닐)카르바메이트 (실시예 1, 단계 3) (20 g, 62.7 mmol) 및 탄산칼륨 (43.3 g, 313 mmol)의 혼합물을 12시간 동안 80℃까지 가열하였다. 또 다른 바이알을 상기 기재된 바와 같이 준비하였다. 2개의 반응 혼합물을 조합하고, 물 (500 mL)로 희석하였다. 수성 혼합물을 EtOAc (3 x 500 mL)로 추출하였다. 유기 층을 조합하고, Na_2SO_4 상에서 건조시키고, 여과하고, 감압 하에서 농축시켰다. 잔류물을 실리카겔 상에서 컬럼 크로마토그래피 (PE:EtOAc = 10:1로 용리함)로 정제하여, 표제 화합물 (15 g, 수율 38.4%)을 백색 고체로서 수득하였다. ^1H NMR (400MHz, CDCl_3) δ 9.95 (s, 1H), 7.78 (d, $J=7.9$ Hz, 2H), 7.33 (d, $J=7.9$ Hz, 2H), 7.27 - 7.13 (m, 3H), 6.82 (d, $J=7.1$ Hz, 1H), 6.47 (br. s., 1H), 4.00 (s, 2H), 1.48 (s, 9H).

[0216] **단계 5:** (6S,8S,9R,10S,11S,13S,14S,16R,17S)-6,9-디플루오로-11,16,17-트리히드록시-17-(2-히드록시아세틸)-10,13-디메틸-6,7,8,9,10,11,12,13,14,15,16,17-도데카히드로-3H-시클로펜타[a]페난트렌-3-온의 합성

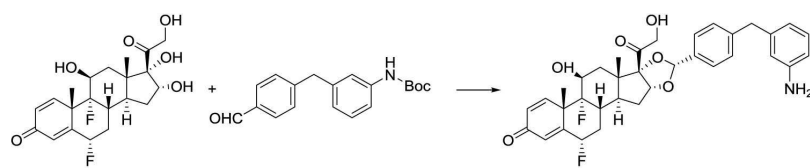


[0217]

[0218] (2S,6aS,6bR,7S,8aS,8bS,11aR,12aS,12bS)-2,6b-디플루오로-7-히드록시-8b-(2-히드록시아세틸)-6a,8a,10,10-테트라메틸-1,2,6a,6b,7,8,8a,8b,11a,12,12a,12b-도데카히드로-4H-나프토[2',1':4,5]인데노[1,2-d][1,3]디옥솔-4-온 (20 g, 44.2 mmol)을 40% 수성 HBF_4 (440 mL)에 현탁시키고, 혼합물을 25℃에서 48시간 동안 교반하였다. 반응이 완결된 후, 2 L의 물을 첨가하고, 여과하여 고체를 수집하였다. 이러한 고체를 물 (1 L) 및 이어서 MeOH (200 mL)로 세정하여, 표제 화합물 (11 g, 수율 60.3%)을 백색 고체로서 수득하였다. ^1H NMR (400MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ 7.25 (d, $J=10.1$ Hz, 1H), 6.28 (d, $J=10.1$ Hz, 1H), 6.10 (s, 1H), 5.73 - 5.50 (m, 1H), 5.39 (br. s., 1H), 4.85 - 4.60 (m, 2H), 4.50 (d, $J=19.4$ Hz, 1H), 4.20 - 4.04 (m, 2H), 2.46 - 2.06 (m, 6H), 1.87 - 1.75 (m, 1H), 1.56 - 1.30 (m, 6H), 0.83 (s, 3H).

[0219] **단계 6:** (2S,6aS,6bR,7S,8aS,8bS,10R,11aR,12aS,12bS)-10-(4-(3-아미노벤질)페닐)-2,6b-디플루오로-7-히드록시

-8b-(2-히드록시아세틸)-6a,8a-디메틸-1,2,6a,6b,7,8,8a,8b,11a,12,12a,12b-도데카히드로-4H-나프토[2',1':4,5]인덴노[1,2-d][1,3]디옥솔-4-온의 합성.



[0220]

[0221]

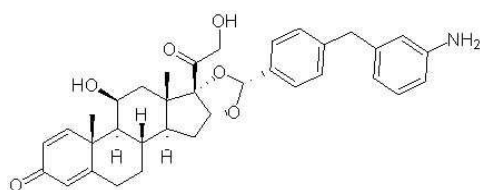
MeCN (100 mL) 중의 (6S,8S,9R,10S,11S,13S,14S,16R,17S)-6,9-디플루오로-11,16,17-트리히드록시-17-(2-히드록시아세틸)-10,13-디메틸-6,7,8,9,10,11,12,13,14,15,16,17-도데카히드로-3H-시클로펜타[a]페난트렌-3-온 (실시예 1, 단계 5) (4.4 g, 10.67 mmol) 및 MgSO_4 (6.42 g, 53.3 mmol)의 현탁액을 20℃에서 1시간 동안 교반하였다. MeCN (100 mL) 중의 tert-부틸 (3-(4-포르밀벤질)페닐)카르바메이트 (실시예 1, 단계 4) (3.65 g, 11.74 mmol)의 용액을 한번에 첨가하였다. 얼음 배스를 사용하여 내부 온도를 25℃ 미만으로 유지하면서, 트리플루오로메탄술포산 (9.01 mL, 53.3 mmol)을 적가하였다. 첨가 후, 혼합물을 20℃에서 2시간 동안 교반하였다. 3개의 추가 바이알을 상기 기재된 바와 같이 준비하였다. 4개의 반응 혼합물을 모두 조합하고, 농축시키고, 잔류물을 분취용 HPLC로 정제하여, 표제 화합물 (4.5 g, 수율 14.2%)을 황색 고체로서 수득하였다. LCMS (방법 a, 표 4) R_t = 2.65 분; MS m/z = 606.2 (M+H)⁺; ¹H NMR (400MHz, DMSO-d₆) δ 7.44 - 7.17 (m, 5H), 6.89 (t, J =7.7 Hz, 1H), 6.44 - 6.25 (m, 4H), 6.13 (br. s., 1H), 5.79 - 5.52 (m, 2H), 5.44 (s, 1H), 5.17 - 4.89 (m, 3H), 4.51 (d, J =19.4 Hz, 1H), 4.25 - 4.05 (m, 2H), 3.73 (s, 2H), 3.17 (br. s., 1H), 2.75 - 2.55 (m, 1H), 2.36 - 1.97 (m, 3H), 1.76 - 1.64 (m, 3H), 1.59 - 1.39 (m, 4H), 0.94 - 0.78 (m, 3H). 분취용 HPLC 방법: 기기: Gilson 281 반분취용 HPLC 시스템; 이동상: A: 포름산/H₂O=0.01% v/v; B: MeCN; 컬럼: Luna C18 150*25 5 미크론; 유량: 25 mL/분; 모니터 파장: 220 및 254 nm.

시간	0.0	10.5	10.6	10.7	13.7	13.8	15.0
B%	15	35	35	100	100	10	10

[0222]

[0223]

실시예 2: (6aR,6bS,7S,8aS,8bS,10R,11aR,12aS,12bS)-10-(4-(3-아미노벤질)페닐)-7-히드록시-8b-(2-히드록시아세틸)-6a,8a-디메틸-1,2,6a,6b,7,8,8a,8b,11a,12,12a,12b-도데카히드로-4H-나프토[2',1':4,5]인덴노[1,2-d][1,3]디옥솔-4-온의 합성.



[0224]

[0225]

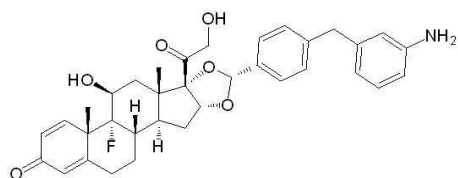
(8S,9S,10R,11S,13S,14S,16R,17S)-11,16,17-트리히드록시-17-(2-히드록시아세틸)-10,13-디메틸-6,7,8,9,10,11,12,13,14,15,16,17-도데카히드로-3H-시클로펜타[a]페난트렌-3-온을 사용하여 실시예 1과 유사한 절차로 실시예 2를 합성하였다.

[0226]

¹H NMR (400MHz, DMSO-d₆) δ 7.36 (d, J =7.9 Hz, 2H), 7.31 (d, J =10.1 Hz, 1H), 7.20 (d, J =7.9 Hz, 2H), 6.89 (t, J =7.9 Hz, 1H), 6.39 - 6.28 (m, 3H), 6.16 (dd, J =1.5, 9.9 Hz, 1H), 5.93 (s, 1H), 5.39 (s, 1H), 5.08 (t, J =5.7 Hz, 1H), 4.98 - 4.87 (m, 3H), 4.78 (d, J =3.1 Hz, 1H), 4.49 (dd, J =6.2, 19.4 Hz, 1H), 4.29 (br. s., 1H), 4.17 (dd, J =5.5, 19.6 Hz, 1H), 3.74 (s, 2H), 2.61 - 2.53 (m, 1H), 2.36 - 2.26 (m, 1H), 2.11 (d, J =11.0 Hz, 1H), 2.07 (s, 1H), 2.02 (d, J =12.8 Hz, 1H), 1.83 - 1.54 (m, 5H), 1.39 (s, 3H), 1.16 - 0.96 (m, 2H), 0.85 (s, 3H). LCMS (방법 a, 표 4) R_t = 2.365 분; m/z = 570.2 (M+H)⁺.

[0227]

실시예 3: (6aS,6bR,7S,8aS,8bS,10R,11aR,12aS,12bS)-10-(4-(3-아미노벤질)페닐)-6b-플루오로-7-히드록시-8b-(2-히드록시아세틸)-6a,8a-디메틸-1,2,6a,6b,7,8,8a,8b,11a,12,12a,12b-도데카히드로-4H-나프토[2',1':4,5]인덴노[1,2-d][1,3]디옥솔-4-온의 합성.



[0228]

[0229]

(8S,9R,10S,11S,13S,14S,16R,17S)-9-플루오로-11,16,17-트리히드록시-17-(2-히드록시아세틸)-10,13-디메틸-6,7,8,9,10,11,12,13,14,15,16,17-도데카히드로-3H-시클로펜타[a]페난트렌-3-온을 사용하여 실시예 1과 유사한 절차로 실시예 3을 합성하였다.

[0230]

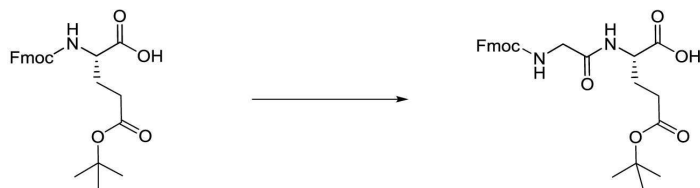
^1H NMR (400MHz, DMSO- d_6) δ 7.37 - 7.26 (m, 3H), 7.21 (d, $J=7.9$ Hz, 2H), 6.89 (t, $J=7.7$ Hz, 1H), 6.43 - 6.30 (m, 3H), 6.23 (d, $J=10.1$ Hz, 1H), 6.04 (s, 1H), 5.75 (s, 1H), 5.44 (s, 2H), 5.09 (t, $J=5.7$ Hz, 1H), 4.93 (br. s., 3H), 4.50 (dd, $J=6.2, 19.4$ Hz, 1H), 4.28 - 4.09 (m, 2H), 3.74 (s, 2H), 2.73 - 2.54 (m, 2H), 2.35 (d, $J=13.2$ Hz, 1H), 2.25 - 2.12 (m, 1H), 2.05 (d, $J=15.0$ Hz, 1H), 1.92 - 1.77 (m, 1H), 1.74 - 1.58 (m, 3H), 1.50 (s, 3H), 1.45 - 1.30 (m, 1H), 0.87 (s, 3H). LCMS (방법 a, 표 4) R_t = 2.68 분; m/z = 588.1 (M+H) $^+$.

[0231]

실시예 4: (S)-4-(2-(2-브로모아세트아미도)아세트아미도)-5-((3-(4-((6aR,6bS,7S,8aS,8bS,10R,11aR,12aS,12bS)-7-히드록시-6a,8a-디메틸-4-옥소-8b-(2-(포스포노옥시)아세틸)-2,4,6a,6b,7,8,8a,8b,11a,12,12a,12b-도데카히드로-1H-나프토[2',1':4,5]인덴노[1,2-d][1,3]디옥솔-10-일)벤질)페닐)아미노)-5-옥소펜탄산의 합성

[0232]

단계 1: (S)-2-(2-(((9H-플로오렌-9-일)메톡시)카르보닐)아미노)아세트아미도)-5-(tert-부톡시)-5-옥소펜탄산의 합성.



[0233]

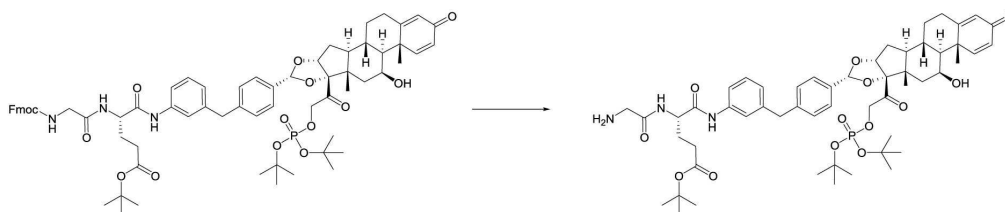
[0234]

무수 DCM (200 mL) 중의 2-클로로트리틸 클로라이드 수지 (30 g, 92 mmol), 트리에틸아민 (46.4 g, 458 mmol) 및 (S)-2-(((9H-플로오렌-9-일)메톡시)카르보닐)아미노)-5-(tert-부톡시)-5-옥소펜탄산 (25.5 g, 60 mmol)의 혼합물에 20°C에서 8시간 동안 N_2 를 버블링하였다. 혼합물을 여과하고, 수지를 DCM (2 x 200 mL), MeOH (2 x 200 mL) 및 DMF (2 x 200 mL)로 세정하였다. 수지를 피페리딘:DMF (1:4, 400 mL)의 용액에 첨가하고, 혼합물에 8분 동안 N_2 를 버블링한 후, 여과하였다. 이러한 작업을 5회 반복하여, Fmoc 보호기의 제거를 완료하였다. 수지를 DMF (5 x 500 mL)로 세정하여, 수지 결합된 (S)-2-아미노-5-(tert-부톡시)-5-옥소펜탄산을 제공하였다. DMF (200 mL) 중의 2-(((9H-플로오렌-9-일)메톡시)카르보닐)아미노)아세트산 (13.38 g, 45.0 mmol), *N,N*-디이소프로필에틸아민 (7.86 mL, 45 mmol), 히드록시벤조트리아졸 (6.89 g, 45 mmol), 2-(6-클로로-1H-벤조[d][1,2,3]트리아졸-1-일)-1,1,3,3-테트라메틸이소우로늄 헥사플루오로포스페이트 (V) (18.62 g, 45.0 mmol)의 혼합물을 20°C에서 30분 동안 교반하였다. 상기 혼합물에, 수지 결합된 (S)-2-아미노-5-(tert-부톡시)-5-옥소펜탄산을 첨가하고, 생성된 혼합물에 25°C에서 1.5시간 동안 N_2 를 버블링하였다. 상기 혼합물을 여과하고, 수지를 DMF (4 x 500 mL) 및 DCM (2 x 500 mL)로 세정하였다. 상기 혼합물에, 1% TFA/DCM (5 x 500 mL)를 첨가하고, 5분 동안 N_2 를 버블링하였다. 상기 혼합물을 여과하고, 여과액을 $NaHCO_3$ 포화 용액 (200 mL)에 직접 첨가하였다. 조합한 혼합물을 분리하고, 유기 상을 시트르산 포화 수용액 (4 x 400 mL) 및 염수 (2 x 300 mL)로 세정하였다. 최종 유기 용액을 Na_2SO_4 (20 g) 상에서 건조시키고, 여과하고, 감압 하에서 농축시켜, 표제 화합물 (10 g, 수율 20%)을 연황색 고체로서 수득하였다.

[0235]

^1H NMR: (CDCl $_3$, 400 MHz) δ = 7.75 (d, J = 7.5 Hz, 2H), 7.59 (br d, J = 7.5 Hz, 2H), 7.41 - 7.36 (m, 2H), 7.30 (t, J = 7.0 Hz, 2H), 5.82 (br s, 1H), 4.57 (br d, J = 4.8 Hz, 1H), 4.38 (br d, J = 7.5 Hz, 2H), 4.27 - 4.15 (m, 1H), 4.06 - 3.83 (m, 2H), 2.50 - 2.29 (m, 2H), 2.26 - 2.13 (m, 1H), 2.06 - 2.02

[0244] **단계 4:** tert-부틸 (S)-4-(2-아미노아세트아미도)-5-((3-(4-((6aR,6bS,7S,8aS,8bS,10R,11aR,12aS,12bS)-8b-(2-((디-tert-부톡시포스포릴)옥시)아세틸)-7-히드록시-6a,8a-디메틸-4-옥소-2,4,6a,6b,7,8,8a,8b,11a,12,12a,12b-도데카히드로-1H-나프토[2',1':4,5]인덴노[1,2-d][1,3]디옥솔-10-일)벤질)페닐)아미노)-5-옥소펜타노에이트의 합성.

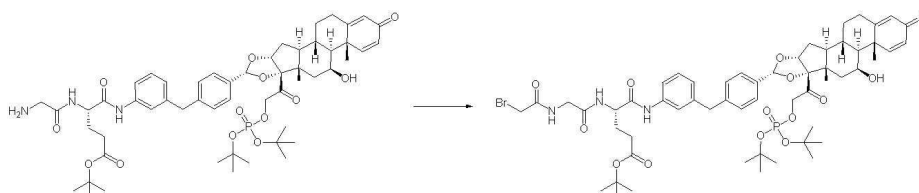


[0245]

[0246] MeCN (6 mL) 중의 tert-부틸 (S)-4-(2-(((9H-플로오렌-9-일)메톡시)카르보닐)아미노)아세트아미도)-5-((3-(4-((6aR,6bS,7S,8aS,8bS,10R,11aR,12aS,12bS)-8b-(2-((디-tert-부톡시포스포릴)옥시)아세틸)-7-히드록시-6a,8a-디메틸-4-옥소-2,4,6a,6b,7,8,8a,8b,11a,12,12a,12b-도데카히드로-1H-나프토[2',1':4,5]인덴노[1,2-d][1,3]디옥솔-10-일)벤질)페닐)아미노)-5-옥소펜타노에이트 (실시예 4, 단계 3) (1.1 g, 0.897 mmol)의 용액에, 25°C에서 피페리딘 (0.75 mL, 7.58 mmol)을 첨가하였다. 반응액을 실온에서 20분 동안 교반한 후, LCMS는 반응이 완결되었음을 나타냈다. 3개의 추가 바이알을 상기 기재된 바와 같이 준비하였다. 4개의 반응 혼합물을 모두 조합하였다. 상기 혼합물을 농축시켜 잔류물을 수득하고, 이를 교반 하에서 2시간 동안 PE (10 mL)로 처리하였다. 생성된 고체를 여과에 의해 수득하고, 감압 하에서 건조시켜, 표제 화합물 (3.8 g, 수율 90%)을 황색 고체로서 수득하였다.

[0247] LCMS (방법 a, 표 4) $R_t = 1.16$ 분; m/z 1004.6 (M+H)⁺.

[0248] **단계 5:** tert-부틸 (S)-4-(2-(2-브로모아세트아미도)아세트아미도)-5-((3-(4-((6aR,6bS,7S,8aS,8bS,10R,11aR,12aS,12bS)-8b-(2-((디-tert-부톡시포스포릴)옥시)아세틸)-7-히드록시-6a,8a-디메틸-4-옥소-2,4,6a,6b,7,8,8a,8b,11a,12,12a,12b-도데카히드로-1H-나프토[2',1':4,5]인덴노[1,2-d][1,3]디옥솔-10-일)벤질)페닐)아미노)-5-옥소펜타노에이트의 합성.

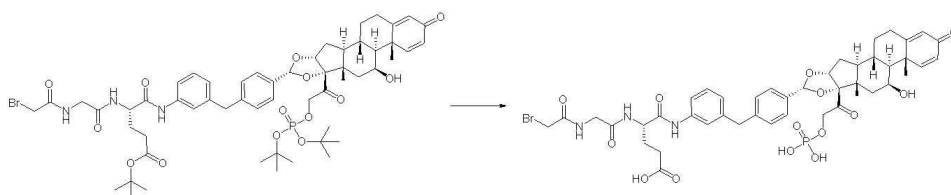


[0249]

[0250] DMF (2.5 mL) 중의 2-브로모아세트산 (97 mg, 0.697 mmol)의 용액에, 실온에서 EEDQ (172 mg, 0.697 mmol)를 첨가하였다. 혼합물을 실온에서 1시간 동안 교반하였다. tert-부틸 (S)-4-(2-아미노아세트아미도)-5-((3-(4-((6aR,6bS,7S,8aS,8bS,10R,11aR,12aS,12bS)-8b-(2-((디-tert-부톡시포스포릴)옥시)아세틸)-7-히드록시-6a,8a-디메틸-4-옥소-2,4,6a,6b,7,8,8a,8b,11a,12,12a,12b-도데카히드로-1H-나프토[2',1':4,5]인덴노[1,2-d][1,3]디옥솔-10-일)벤질)페닐)아미노)-5-옥소펜타노에이트 (실시예 4, 단계 4) (350 mg, 0.349 mmol)를 첨가하고, 생성된 용액을 2.5시간 동안 교반한 후, LCMS는 반응이 완결되었음을 나타냈다. 7개의 추가 바이알을 상기 기재된 바와 같이 준비하였다. 8개의 모든 반응 혼합물을 조합하였다. 반응액을 DCM (100 mL)으로 희석하고, 수성 HBr (1 M, 2 x 80 mL), 수성 NaHCO₃ (60 mL) 및 염수 (60 mL)로 세정하였다. 유기 층을 Na₂SO₄ 상에서 건조시키고, 여과하고, 감압 하에서 농축시켜, 표제 화합물 (2 g, 수율 63.7%)을 황색 오일로서 수득하였다.

[0251] LCMS (방법 a, 표 4) $R_t = 1.30$ 분; m/z 1124.2, 1125.9 (M+H)⁺.

[0252] **단계 6:** (S)-4-(2-(2-브로모아세트아미도)아세트아미도)-5-((3-(4-((6aR,6bS,7S,8aS,8bS,10R,11aR,12aS,12bS)-7-히드록시-6a,8a-디메틸-4-옥소-8b-(2-(포스포노옥시)아세틸)-2,4,6a,6b,7,8,8a,8b,11a,12,12a,12b-도데카히드로-1H-나프토[2',1':4,5]인덴노[1,2-d][1,3]디옥솔-10-일)벤질)페닐)아미노)-5-옥소펜타노산의 합성



[0253]

[0254]

DCM (16 mL) 중의 tert-부틸 (S)-4-(2-(2-브로모아세트아미도)아세트아미도)-5-((3-(4-((6aR,6bS,7S,8aS,8bS,10R,11aR,12aS,12bS)-8b-(2-((디-tert-부톡시포스포릴)옥시)아세틸)-7-히드록시-6a,8a-디메틸-4-옥소-2,4,6a,6b,7,8,8a,8b,11a,12,12a,12b-도데카히드로-1H-나프토[2',1':4,5]인덴노[1,2-d][1,3]디옥솔-10-일)벤질)페닐)아미노)-5-옥소펜타노에이트 (실시예 4, 단계 5) (2 g, 1.778 mmol)의 용액에, TFA (8 mL, 104 mmol)를 첨가하고, 생성된 혼합물을 실온에서 40분 동안 교반한 후, LCMS는 반응이 완결되었음을 나타냈다. 용매를 감압 하에서 제거하였다. 생성된 잔류물을 분취용 HPLC로 정제하였다. 이동상을 바로 동결 건조시켜, 표제 화합물 (640 mg, 수율 35.3%)을 황색 고체로서 수득하였다. 분취용 HPLC 방법: 기기: Shimadzu LC-8A 분취용 HPLC; 컬럼: Phenomenex Luna C18 200*40 mm*10 μ m; 이동상: A: H₂O (0.09% TFA) 및 B: MeCN; 구배: 20분 내 B 30% → 40%; 유량: 60 mL/분; 파장: 220 및 254 nm.

[0255]

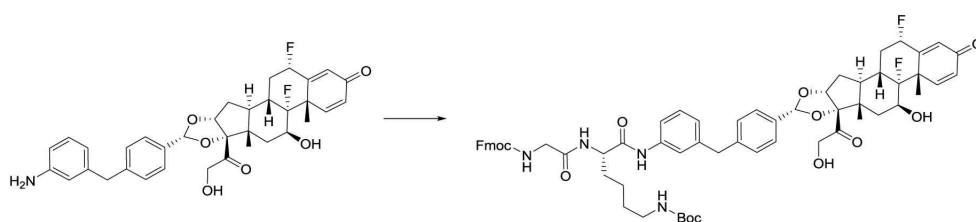
¹H NMR: (DMSO-d₆, 400 MHz) δ = 9.88 (s, 1H), 8.52 (s, 1H), 8.24 (br d, J = 8.4 Hz, 1H), 7.46 (br d, J = 7.9 Hz, 1H), 7.42 (s, 1H), 7.36 (br d, J = 7.9 Hz, 2H), 7.30 (br d, J = 9.7 Hz, 1H), 7.23 - 7.17 (m, 3H), 6.90 (br d, J = 6.8 Hz, 1H), 6.16 (br d, J = 10.4 Hz, 1H), 5.93 (s, 1H), 5.47 (s, 1H), 4.96 - 4.85 (m, 3H), 4.58 (br dd, J = 7.9, 18.7 Hz, 1H), 4.38 (br d, J = 5.3 Hz, 1H), 4.29 (br s, 1H), 3.93 (s, 2H), 3.89 (s, 2H), 3.80 (br s, 2H), 2.30 - 2.22 (m, 2H), 2.16 - 1.91 (m, 4H), 1.85 - 1.62 (m, 6H), 1.39 (s, 3H), 1.00 (br s, 2H), 0.87 (s, 3H). LCMS (방법 a, 표 4) R_t = 2.86 분; m/z 956.0, 958.0 (M+H)⁺.

[0256]

실시예 5: 2-((2S,6aS,6bR,7S,8aS,8bS,10R,11aR,12aS,12bS)-10-(4-(3-((S)-6-아미노-2-(2-(2-브로모아세트아미도)아세트아미도)헥산아미도)벤질)페닐)-2,6b-디플루오로-7-히드록시-6a,8a-디메틸-4-옥소-1,2,4,6a,6b,7,8,8a,11a,12,12a,12b-도데카히드로-8bH-나프토[2',1':4,5]인덴노[1,2-d][1,3]디옥솔-8b-일)-2-옥소에틸 디히드로젠 포스페이트의 합성.

[0257]

단계 1: tert-부틸 ((S)-5-(2-((((9H-플로오렌-9-일)메톡시)카르보닐)아미노)아세트아미도)-6-((3-(4-((2S,6aS,6bR,7S,8aS,8bS,10R,11aR,12aS,12bS)-2,6b-디플루오로-7-히드록시-8b-(2-히드록시아세틸)-6a,8a-디메틸-4-옥소-2,4,6a,6b,7,8,8a,8b,11a,12,12a,12b-도데카히드로-1H-나프토[2',1':4,5]인덴노[1,2-d][1,3]디옥솔-10-일)벤질)페닐)아미노)-6-옥소헥실)카르바메이트의 합성.



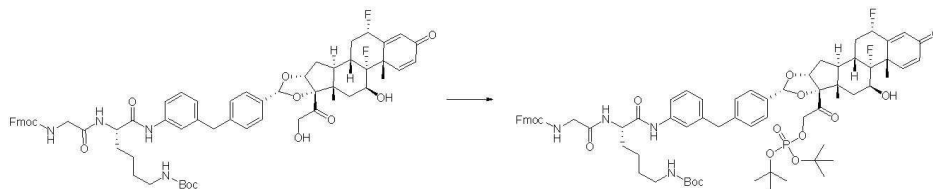
[0258]

[0259]

0°C의 DMF (60 mL) 중의 N²-((((9H-플로오렌-9-일)메톡시)카르보닐)글리실)-N6-(tert-부톡시카르보닐)-L-리신 (5.58 g, 8.26 mmol)의 용액에, 2,4,6-트리프로필-1,3,5,2,4,6-트리옥사트리포스피란 2,4,6-트리옥시드 (10.51 g, 16.51 mmol) 및 트리에틸아민 (3.45 mL, 24.77 mmol)을 첨가하였다. 생성된 혼합물을 실온에서 1시간 동안 교반하였다. (2S,6aS,6bR,7S,8aS,8bS,10R,11aR,12aS,12bS)-10-(4-(3-아미노벤질)페닐)-2,6b-디플루오로-7-히드록시-8b-(2-히드록시아세틸)-6a,8a-디메틸-1,2,6a,6b,7,8,8a,8b,11a,12,12a,12b-도데카히드로-4H-나프토[2',1':4,5]인덴노[1,2-d][1,3]디옥솔-4-온 (실시예 1, 단계 6) (5 g, 8.26 mmol)을 첨가하였다. 생성된 혼합물을 실온에서 5시간 동안 교반한 후, LCMS는 반응이 완결되었음을 나타냈다. 6개의 추가 바이알을 상기 기재된 바와 같이 준비하였다. 7개의 모든 반응 혼합물을 조합하였다. 상기 반응액을 역상 컬럼으로 정제하여, 표제 화합물 (24 g, 수율 24.62%)을 백색 고체로서 수득하였다. 역상 컬럼 방법: 기기: Shimadzu LC-8A prep HPLC; 컬럼: Phenomenex Luna C18 200*40 mm*10 μ m; 이동상: A: H₂O (0.05% TFA) 및 B: MeCN; 구배: 30분 내 B 30% → 100%; 유량: 60 mL/분; 파장: 220 및 254 nm.

[0260] LCMS (방법 a, 표 4) $R_t = 1.29$ 분; m/z 1095.6 (M+H)⁺.

[0261] **단계 2:** tert-부틸 ((S)-5-(2-(((9H-플로오렌-9-일)메톡시)카르보닐)아미노)아세트아미도)-6-((3-(4-((2S,6aS,6bR,7S,8aS,8bS,10R,11aR,12aS,12bS)-8b-(2-((디-tert-부톡시포스포릴)옥시)아세틸)-2,6b-디플루오로-7-히드록시-6a,8a-디메틸-4-옥소-2,4,6a,6b,7,8,8a,8b,11a,12,12a,12b-도데카히드로-1H-나프토[2',1':4,5]인테노[1,2-d][1,3]디옥솔-10-일)벤질)페닐)아미노)-6-옥소헥실)카르바메이트의 합성.

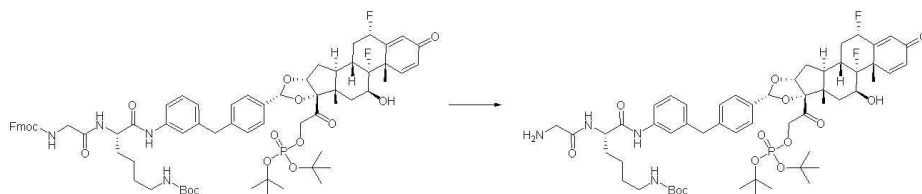


[0262]

[0263] DMF (30 mL) 중의 tert-부틸 ((S)-5-(2-(((9H-플로오렌-9-일)메톡시)카르보닐)아미노)아세트아미도)-6-((3-(4-((2S,6aS,6bR,7S,8aS,8bS,10R,11aR,12aS,12bS)-2,6b-디플루오로-7-히드록시-8b-(2-히드록시아세틸)-6a,8a-디메틸-4-옥소-2,4,6a,6b,7,8,8a,8b,11a,12,12a,12b-도데카히드로-1H-나프토[2',1':4,5]인테노[1,2-d][1,3]디옥솔-10-일)벤질)페닐)아미노)-6-옥소헥실)카르바메이트 (실시예 5, 단계 1) (3 g, 2.69 mmol)의 용액에, 1H-테트라졸 (1.888 g, 26.9 mmol) 및 디-tert-부틸 디에틸포스포르아미다이트 (8.06 g, 32.3 mmol)를 첨가하고, 반응액을 실온에서 3.5시간 동안 교반하였다. 과산화수소 (224 mg, 1.97 mmol)를 상기 반응액에 첨가하고, 0.5시간 동안 교반한 후, LCMS는 반응이 완결되었음을 나타냈다. 6개의 추가 바이알을 상기 기재된 바와 같이 준비하였다. 7개의 모든 반응 혼합물을 조합하였다. 상기 반응액을 역상 컬럼으로 정제하여, 표제 화합물 (10 g, 순도: 78%, 수율 37.1%)을 백색 고체로서 수득하였다. 역상 컬럼 방법: 기기: Shimadzu LC-8A prep HPLC; 컬럼: Phenomenex Luna C18 200*40mm*10 μ m; 이동상: A: H₂O 및 B: MeCN; 구배: 30분 내 B 50% → 100%; 유량: 60 mL/분; 파장: 220 및 254 nm.

[0264] LCMS (방법 a, 표 4) $R_t = 1.42$ 분; m/z 1305.7 (M+H)⁺.

[0265] **단계 3:** tert-부틸 ((S)-5-(2-아미노아세트아미도)-6-((3-(4-((2S,6aS,6bR,7S,8aS,8bS,10R,11aR,12aS,12bS)-8b-(2-((디-tert-부톡시포스포릴)옥시)아세틸)-2,6b-디플루오로-7-히드록시-6a,8a-디메틸-4-옥소-2,4,6a,6b,7,8,8a,8b,11a,12,12a,12b-도데카히드로-1H-나프토[2',1':4,5]인테노[1,2-d][1,3]디옥솔-10-일)벤질)페닐)아미노)-6-옥소헥실)카르바메이트의 합성.



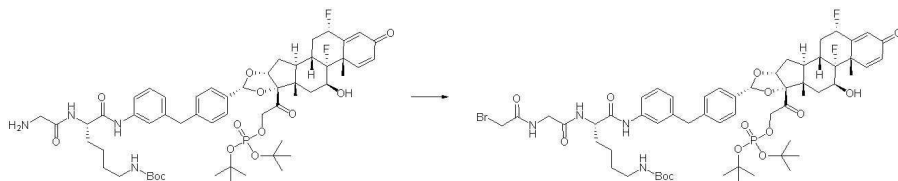
[0266]

[0267] MeCN (10 mL) 중의 tert-부틸 ((S)-5-(2-(((9H-플로오렌-9-일)메톡시)카르보닐)아미노)아세트아미도)-6-((3-(4-((2S,6aS,6bR,7S,8aS,8bS,10R,11aR,12aS,12bS)-8b-(2-((디-tert-부톡시포스포릴)옥시)아세틸)-2,6b-디플루오로-7-히드록시-6a,8a-디메틸-4-옥소-2,4,6a,6b,7,8,8a,8b,11a,12,12a,12b-도데카히드로-1H-나프토[2',1':4,5]인테노[1,2-d][1,3]디옥솔-10-일)벤질)페닐)아미노)-6-옥소헥실)카르바메이트 (실시예 5, 단계 2) (2.5 g, 1.969 mmol)의 용액에, 피페리딘 (2 mL, 1.969 mmol)을 첨가하고, 반응액을 실온에서 1시간 동안 교반한 후, LCMS는 반응이 완결되었음을 나타냈다. 3개의 추가 바이알을 상기 기재된 바와 같이 준비하였다. 4개의 반응 혼합물을 모두 조합하였다. 상기 반응액을 농축시켜 미정제 생성물을 수득하고, 이를 PE (30 mL) 중에서 2시간 동안 교반하였다. 생성된 고체를 여과에 의해 수집하고, 감압 하에서 건조시켜, 표제 화합물 (7 g, 순도: 83%, 수율 70.4%)을 황색 고체로서 수득하였다.

[0268] LCMS (방법 a, 표 4) $R_t = 1.17$ 분; m/z 1083.5 (M+H)⁺.

[0269] **단계 4:** tert-부틸 ((S)-5-(2-(2-브로모아세트아미도)아세트아미도)-6-((3-(4-((2S,6aS,6bR,7S,8aS,8bS,10R,11aR,12aS,12bS)-8b-(2-((디-tert-부톡시포스포릴)옥시)아세틸)-2,6b-디플루오로-7-히드록시-6a,8a-디메틸-4-옥소-2,4,6a,6b,7,8,8a,8b,11a,12,12a,12b-도데카히드로-1H-나프토[2',1':4,5]인

데노[1,2-d][1,3]디옥솔-10-일)벤질)페닐)아미노)-6-옥소헥실)카르바메이트의 합성.



[0270]

[0271]

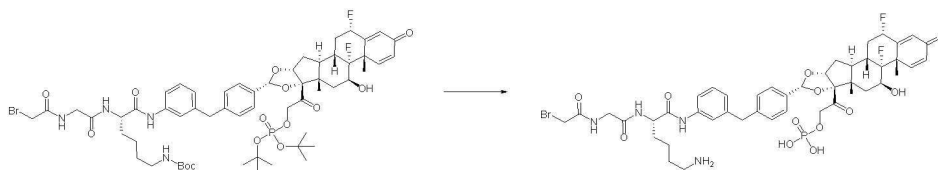
DMF (35 mL) 중의 2-브로모아세트산 (0.929 g, 6.68 mmol)의 용액에, 2-에톡시-1-에톡시카르보닐-1,2-디히드로퀴놀린 (1.653 g, 6.68 mmol)을 첨가하고, 생성된 혼합물을 실온에서 1시간 동안 교반하였다. 실시예 5, 단계 3 으로부터의 생성물 (3.5 g, 3.34 mmol)을 첨가하고, 생성된 혼합물을 실온에서 2시간 동안 교반하였다. LCMS는 반응이 완결되었음을 나타냈다. 반응액을 DCM (100 mL)으로 희석하고, 수성 HBr (1 M, 2 x 80 mL), 수성 NaHCO₃ (60 mL) 및 염수 (60 mL)로 세정하였다. 유기 층을 Na₂SO₄ 상에서 건조시키고, 여과하고, 감압 하에서 농축시켜, 표제 화합물 (2 g, 수율 51.2%)을 황색 오일로서 수득하였다.

[0272]

LCMS (방법 a, 표 4) R_t = 1.32 분; m/z 1205.5 (M+H)⁺.

[0273]

단계 5:
2-((2S,6aS,6bR,7S,8aS,8bS,10R,11aR,12aS,12bS)-10-(4-(3-((S)-6-아미노-2-(2-(2-브로모아세트아미도)아세트아미도)헥산아미도)벤질)페닐)-2,6b-디플루오로-7-히드록시-6a,8a-디메틸-4-옥소-1,2,4,6a,6b,7,8,8a,11a,12,12a,12b-도데카히드로-8bH-나프토[2',1':4,5]인덴노[1,2-d][1,3]디옥솔-8b-일)-2-옥소에틸 디히드로젠 포스페이트의 합성.



[0274]

[0275]

DCM (10 mL) 중의 tert-부틸 ((S)-5-(2-아미노아세트아미도)-6-((3-(4-((2S,6aS,6bR,7S,8aS,8bS,10R,11aR,12aS,12bS)-8b-(2-(2-(2-브로모아세트아미도)아세트아미도)헥산아미도)벤질)페닐)-2,6b-디플루오로-7-히드록시-6a,8a-디메틸-4-옥소-2,4,6a,6b,7,8,8a,8b,11a,12,12a,12b-도데카히드로-1H-나프토[2',1':4,5]인덴노[1,2-d][1,3]디옥솔-10-일)벤질)페닐)아미노)-6-옥소헥실)카르바메이트 (실시예 5, 단계 3) (2 g, 1.661 mmol)의 용액에, TFA (5 mL, 64.9 mmol)를 첨가하고, 반응액을 실온에서 40분 동안 교반한 후, LCMS는 반응이 완결되었음을 나타냈다. 용매를 감압 하에서 제거하고, 미정제 생성물을 분취용 HPLC로 정제하였다. 이동상을 바로 동결건조시켜, 표제 화합물 (550 mg, 순도: 96.9%, 수율 32.3%)을 희백색 고체로서 수득하였다. 분취용 HPLC 방법: 기기: Shimadzu LC-8A prep HPLC; 컬럼: Phenomenex Luna C18 200*40 mm*10 μm; 이동상: A: H₂O (0.09% TFA) 및 B: MeCN; 구배: 20분 내 B 30% → 40%; 유량: 60 mL/분; 파장: 220 및 254 nm.

[0276]

¹H NMR: (DMSO-d₆, 400 MHz) δ ppm 0.90 (s, 3 H) 1.19 - 1.41 (m, 2 H) 1.43 - 1.62 (m, 7 H) 1.64 - 1.77 (m, 3 H) 1.84 (br d, J=14.55 Hz, 1 H) 1.95 - 2.07 (m, 1 H) 2.18 - 2.36 (m, 3 H) 2.65 - 2.78 (m, 3 H) 3.71 - 3.86 (m, 3 H) 3.89 (s, 2 H) 3.93 (s, 2 H) 4.20 (br d, J=9.48 Hz, 1 H) 4.33 - 4.41 (m, 1 H) 4.59 (br dd, J=18.41, 8.05 Hz, 1 H) 4.81 (br dd, J=18.52, 8.60 Hz, 1 H) 4.94 (d, J=4.63 Hz, 1 H) 5.50 (s, 1 H) 5.54 - 5.76 (m, 1 H) 6.13 (s, 1 H) 6.29 (dd, J=10.14, 1.32 Hz, 1 H) 6.95 (d, J=7.72 Hz, 1 H) 7.15 - 7.28 (m, 4 H) 7.30 - 7.41 (m, 3 H) 7.51 (br d, J=7.94 Hz, 1 H) 7.72 (br s, 3 H) 8.21 (br d, J=7.72 Hz, 1 H) 8.54 (t, J=5.62 Hz, 1 H) 9.93 (br d, J=2.65 Hz, 1 H). LCMS (방법 a, 표 4) R_t = 2.31 분.

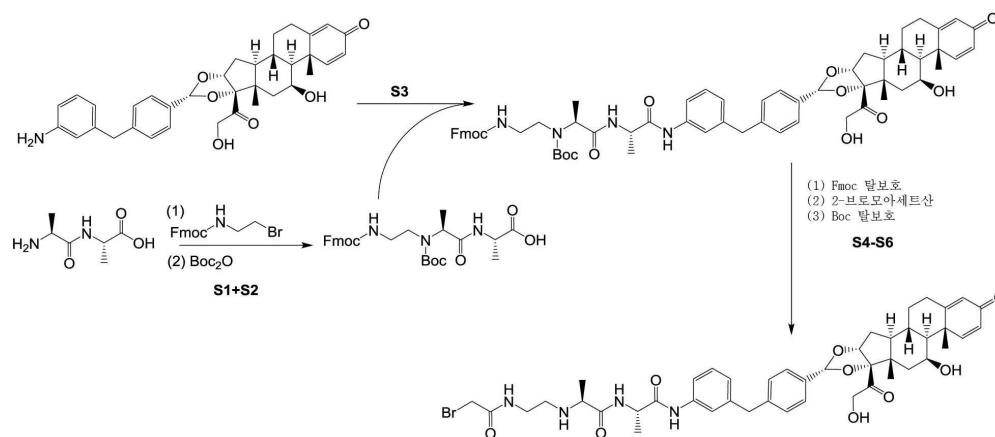
[0277]

실시예 6: (S)-2-((2-(2-브로모아세트아미도)에틸)아미노)-N-((S)-1-((3-(4-((6aR,6bS,7S,8aS,8bS,10R,11aR,12aS,12bS)-7-히드록시-8b-(2-히드록시아세틸)-6a,8a-디메틸-4-옥소-2,4,6a,6b,7,8,8a,8b,11a,12,12a,12b-도데카히드로-1H-나프토[2',1':4,5]인덴노[1,2-d][1,3]디옥솔-10-일)벤질)페닐)아미노)-1-옥소프로판-2-일)프로판아미드의 합성.

[0278]

N-(2-(((9H-플로오렌-9-일)메톡시)카르보닐)아미노)에틸)-N-(tert-부톡시카르보닐)-L-알라닌-L-알라닌 (하기 단계 S1 및 S2의 생성물)을 실시예 2의 아미노 생성물에 커플링한 후, 단계 S4 내지 S6: (1) Fmoc 탈보호, (2)

2-브로모아세트산과의 커플링, 및 (3) Boc 탈보호를 수행하여, 실시예 6 생성물을 합성할 수 있다. Fmoc = 플루오레닐메틸옥시카르보닐; Boc = tert부톡시카르보닐.



일반적인 시스테인 접합 프로토콜

대략 5 내지 20 mg/mL의 목적하는 항체 용액을 PBS 완충액 (pH 6 내지 7.4) 중에 제조하였다. TCEP와 같은 선택된 환원제를 H₂O, DMSO, DMA 또는 DMF와 같은 용매에 희석하거나 용해시켜, 1 내지 25 mM의 농도 범위를 갖는 용액을 수득하였다. 이어서, 약 2 내지 3.5 당량의 환원제를 첨가하고, 간단히 혼합하고, 0 내지 4°C에서 밤새 인큐베이션하여, 항체 (항-hTNF hIgG1 (D2E7) 또는 항-mTNF mIgG2a (8C11; [McRae BL et al. *J Crohns Colitis* 10 (1): 69-76 (2016)]))를 부분적으로 환원시켰다. 이어서, 트리스(Tris) 완충액 (pH 8 내지 8.5) (20 내지 50 mM)을 첨가한 후, DMSO 또는 DMA 중의 링커-약물 (총 15% 미만)을 첨가하고, 혼합물을 실온에서 2 내지 3시간 동안 인큐베이션하였다. 이어서, 과량의 링커-약물과 유기 용매를 정제에 의해 제거하였다. 이어서, 정제된 ADC 샘플을 SEC, HIC 및 환산 질량 분석법으로 분석하였다.

ADC 분석 절차

ADC를 음이온 교환 크로마토그래피 (AEC) 또는 소수성 상호작용 크로마토그래피 (HIC)로 프로파일링하여, ADC의 접합 및 순도의 정도를 결정하였다.

AEC. 대략 20 µg의 ADC를 4 x 250 mm PropacTM WAX-10 컬럼 (Tosoh Bioscience, cat. 054999)이 장착된 Ultimate 3000 Dual LC 시스템 (Thermo Scientific) 상에 로딩하였다. 컬럼을 100% 완충액 A를 이용하여 평형화시키고, 18분에 걸쳐 1.0 mL/분의 유량으로 100% 완충액 A → 100% 완충액 B의 선형 구배를 사용하여 용리하였다 (여기서 완충액 A는 20 mM MES (pH 6.7)이고, 완충액 B는 20 mM MES, 500 mM 염화나트륨 (pH 6.7)임).

HIC. 대략 20 µg의 ADC를 4.6 x 35 mm 부틸-NPR 컬럼 (Tosoh Bioscience, cat. 14947)이 장착된 Ultimate 3000 Dual LC 시스템 (Thermo Scientific) 상에 로딩하였다. 컬럼을 100% 완충액 A를 이용하여 평형화시키고, 12분에 걸쳐 0.8 mL/분의 유량으로 100% 완충액 A → 100% 완충액 B의 선형 구배를 사용하여 용리하였다 (여기서 완충액 A는 25 mM 인산나트륨, 1.5M 황산암모늄 (pH 7.0)이고, 완충액 B는 25 mM 인산나트륨, 25% 이소프로판올 (pH 7.0)임).

SEC. ADC의 크기 분포는 7.8 x 300 mm TSK-gel 3000SWXL 컬럼 (Tosoh Bioscience, cat. 08541)이 장착된 Ultimate 3000 Dual LC 시스템 (Thermo Scientific)을 사용하여 크기 배제 SEC로 프로파일링하였다. 대략 20 µg의 ADC를 컬럼 상에 로딩하고, 17분에 걸쳐 1.0 mL/분의 유량으로 100 mM 황산나트륨, 100 mM 인산나트륨 (pH 6.8)의 등용매 구배를 사용하여 용리하였다.

MS. 환원된 샘플 (10 µL)을 온도 제어된 (5°C) CTC 자동 샘플러를 통해 Agilent 6550 QToF LC/MS 시스템에 주입하였다. 샘플 용리는 Waters C-4, 3.5 µm, 300 Å, 2.1 x 50 mm i.d. HPLC 컬럼 상에서 달성하였다. 이동상은 A: 물 중 0.1% 포름산 및 B: MeCN 중 0.1% 포름산이었으며, 유량은 0.45 mL/분이었으며, 컬럼 구획은 40°C로 유지시켰다.

HPLC 구배는 표 5에 제시된 바와 같다:

표 5

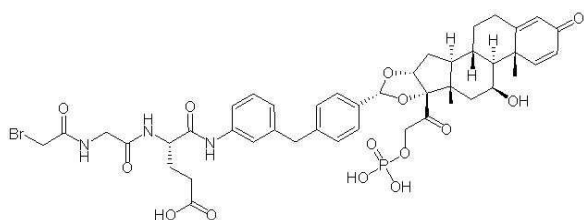
표 5

시간 (분)	%A	%B
0	95	5
0.6	95	5
1.1	10	90
2.2	10	90
2.4	95	5
3.5	95	5

[0289]

[0290] **실시예 7:** 항체 약물 접합체를 제공하기 위한 글루코코르티코스테로이드와 접합된 아달리무맙의 제조

[0291] 집단 DAR 4.0을 갖는 아달리무맙 BrAc-Gly-Glu-스테로이드-PO₄ ADC는 2단계 화학 공정으로 제조하였다: 아달리무맙의 디설파이드 환원, 이어서 브로모아세트아미도 글리신-글루탐산 스테로이드 (실시예 4)를 이용한 알킬화 (접합).



[0292]

[0293] 농도 20 mg/mL의 아달리무맙 100 mg을 디페닐포스포아세트산 (2.9 내지 3.0 당량)을 이용하여 0℃에서 밤새 환원시켰다. 이어서, 부분적으로 환원된 아달리무맙을 DMSO 중에서 실온에서 3시간 동안 실시예 4 (10 당량)에 접합시켰다. 접합 혼합물을 먼저 다수의 NAP 25 탈염화 컬럼을 사용하여 20 mM 트리스 완충액, 50 mM NaCl (pH 7.8)로 완충액 교환하였다. 탈염된 ADC 용액을 AEC로 정제하여, ADC의 DAR4 구성요소를 수득하였다. AEC 크로마토그래피 방법: 기기: Akta pure; 컬럼: 2X Hitrap Q HP 5 mL; 이동상: A: 20 mM 트리스 완충액 (pH 7.8); B: 20 mM 트리스 완충액, 1 M NaCl (pH 7.8); 구배: 60분 내 B 0% → 25%; 유량: 5 mL/분; 파장: 280 및 214 nm.

[0294] 생성된 ADC 제제의 크로마토그래피 분리를 나타내는 도 1을 참조하면, ADC는 환원된 쇠간 디설파이드 결합의 수에 따라, 2개의 약물 링커 분자 부착 ("DAR2" 피크), 4개의 약물 링커 분자 부착 ("DAR4" 피크)을 갖는 항체를 함유하는 이중 혼합물이다. 도 1에 사용된 AEC 조건은 하기와 같았다:

[0295] 컬럼은 PropacTM WAX-10, 4 x 250 mm (Thermo Fisher Scientific, cat. 054999)이었고, 컬럼 온도는 37℃였다. 파장은 280 nm였고, 실행 시간은 18분이었고, 주입량은 20 µg이었으며, 유량은 1.0 mL/분이었다. 이동상 A: 20 mM MES (pH 6.7), 이동상 B: 20 mM MES, 500 mM NaCl (pH 6.7). 구배 프로파일 (표 6):

표 6

표 6

시간 (분)	이동상 A (%)	이동상 B (%)
0	75	25
14	5	95
16	0	100
18	0	100

[0296]

[0297] 도 2는, 정제된 ADC의 디콘볼루션된 질량 스펙트럼을 나타낸다. 이러한 ADC는 각각의 항체에 접합된 4개의 약물 링커 분자를 갖는다. 좌측 피크의 분자량은 24284.74 Da이며, 이는 단일 경쇄에 부착된 하나의 약물 링커의 결과이다. 우측 피크의 분자량은 51513.96 Da이며, 이는 단일 중쇄에 부착된 하나의 약물 링커의 결과이다. 표 7

MC208048) 3 μ g 및 PLUS 시약 (Invitrogen: 10964-021) 3 mL를 Opti-MEM (Gibco: 31985-070) 244 μ L에 희석하고, 실온에서 15분 동안 인큐베이션하였다. 인큐베이션 후, 희석된 DNA 용액을 1:1 리포펙타민 LTX 용액 (Invitrogen: 94756) (13.2 μ L + 256.8 μ L Opti-MEM)과 함께 예비인큐베이션하고, 25분 동안 인큐베이션하여 DNA-리포펙타민 LTX 복합체를 형성하였다. 인큐베이션 후, 500 μ L의 DNA-리포펙타민 복합체를 셀을 함유하는 웰에 직접 첨가하였다. 모 K562 pGL4.36[Luc2P/MMTV/Hygro]_pGL4.75[hRLuc/CMV] 세포를 37°C, 5% CO₂에서 24시간 동안 트랜스펙션시켰다. 인큐베이션 후, 세포를 3 mL의 PBS로 세정하고, 125 μ g/mL의 히그로마이신 B (Invitrogen: 10687-010) 및 250 μ g/mL G418 (Gibco: 10131-027)을 함유한 완전 성장 배지를 이용하여 2주 동안 선별하였다. "K562 마우스 FL-TNF α GRE (pGL4.36[luc2P/MMTV/Hygro])" 세포가 생성되었다.

[0304] 인간 막관통 TNF-알파 GRE 리포터 세포주를 생성하기 위해, 모 세포인 K562 pGL4.36[Luc2P/MMTV/Hygro]_pGL4.75[hRLuc/CMV]를 플라스미드 hTNF 델타 1-12 C-Myc pcDNA3.1(-) 플라스미드 구조체로 트랜스펙션시켰다. 이러한 플라스미드는 tace 내성 막관통 TNF (즉, 아미노산 77 내지 88이 결여된 서열번호 1)를 인코딩하는 pcDNA 3.1 (Thermofisher cat# V79020)이다. (tace 내성 막관통 TNF에 대하여 논의된 [Perez C et al. Cell 63 (2): 251-8 (1990)] 참조). 이어서, 이러한 세포주를 후속 실시예에 기재된 TNF-알파 리포터 검정에 사용하였다.

[0305] **GRE 막관통 TNF-알파 리포터 검정에서 항-TNF-알파 면역접합체의 활성**

[0306] K562 모 GRE (pGL4.36[luc2P/MMTV/Hygro]) 세포와, K562 mFL-TNF- α 또는 hTNF 델타 1-12 GRE (pGL4.36[luc2P/MMTV/Hygro]) 세포를 50 μ L의 검정 배지 (RPMI, 1% CSFBS, 1% L-글루타민, 1% Na 피루베이트 및 1% MEAA) 중에 웰 당 50,000개의 세포로 96 웰 조직 배양액 처리 백색 플레이트 (Costar: 3917) 상에 플레이트팅하였다. 세포를 25 μ L의 검정 배지 중 3회 연속 희석된 컷과 또는 인간 항-TNF- α 항체 약물 접합체, 스테로이드 화합물 또는 배지 단독으로 처리하고, 37°C, 5% CO₂에서 48시간 동안 인큐베이션하였다. 인큐베이션 48시간 후, 세포를 75 μ L의 Dual-Glo 루시퍼라아제 검정 시스템 (Promega-E2920)으로 10분 동안 처리하고, Microbeta (PerkinElmer)를 사용하여 발광에 대하여 분석하였다. 데이터를 4-매개변수 곡선 피팅을 사용하여 분석하여, EC₅₀ 값을 얻었다. 최대 활성%를 100 nM 텍사메탄손으로 정규화하였다. 컷과 TNF-알파 세포주를 사용한 결과는 하기 표 9에 제시되어 있으며, 인간 TNF-알파 세포주를 사용한 결과는 하기 표 10에 제시되어 있다. 하기 표 9에서, ADC 중 항체는 항-컷과 TNF α 항체 8C11이다. 하기 표 10에서, ADC 중 항체는 항-인간 TNF α 항체 아달리무맙이다. 단량체 백분율(%)은 상기 기재된 바와 같이 SEC로 결정하였다 (ADC 분석 절차 참조).

표 9

표 9: 마우스 막관통 TNF α GRE 리포터 검정에서 항-컷과 TNF α 항체 약물 접합체의 시험관내 활성

ADC	단량체 %	mTNF α GRE EC ₅₀ (μ g/mL)	mTNF α GRE (최대 %)	K562 GRE EC ₅₀ (μ g/mL)	K562 GRE (최대 %)
ADC1	99.9	0.06	150	>50	63
ADC2	99.3	0.39	164	>50	72
ADC3	100	0.04	104	3.9	84

[0307]

표 10

표 10: 인간 막관통 TNF α GRE 리포터 검정에서 항-인간 TNF α 항체 약물 접합체의 시험관내 활성

ADC	단량체 %	hTNF α GRE EC ₅₀ (μ g/mL)	hTNF α GRE (최대 %)	K562 GRE EC ₅₀ (μ g/mL)	K562 GRE (최대 %)
ADC4	99.9	0.03	118	>50	63
ADC5	100	0.03	126	>50	28
ADC6	100	0.05	97	>50	83

[0308]

[0309] **지질다당류 자극된 인간 PBMC 사이토카인 방출 검정에서 항-hTNF 알파 면역접합체의 활성**

[0310] 1차 인간 말초 혈액 단핵 세포 (PBMC)를 Biological Specialty Corporation (cat# 214-00-10)에서 구입하고, 50 mL PBS로 세정하고, 5% DMSO를 포함하는 FBS에 재현탁시키고, 분취하고, 사용 시까지 액체 질소에 동결보존하였다. PBMC를 해동하고, 2% FBS 및 1% 페니실린-스트렙토마이신이 보충된 RPMI 배지에 재현탁시키고, 세포 검정 플레이트 (Costar #3799)에 플레이팅하였다. 이어서, 세포를 37℃ 및 5% CO₂에서 4시간 동안 다양한 농도의 항-TNF ADC와 함께 인큐베이션하였다. 이어서, 세포를 100 ng/mL LPS로 밤새 자극하였다. 다음날, 플레이트를 1000 rpm으로 5분 동안 회전시키고, 100 μL의 상청액 배지를 추가의 96-웰 플레이트로 바로 옮기고, IL-6 (MSD, #K151AKB) 및 IL-1 베타 (MSD, #K151AGB) 농도에 대하여 분석하였다. 용량 반응 데이터를 비선형 회귀를 사용하여 S자형 곡선으로 피팅하고, IC₅₀ 값을 GraphPad 5.0 (GraphPad Software, Inc.)를 이용하여 계산하였다. 표 11에 제시된 결과는, 항-TNF ADC가 활성화된 1차 면역 세포로부터 전염증성 사이토카인 IL-6 및 IL-1베타의 방출을 저해하는데 강력한 활성을 갖는다는 것을 입증한다.

표 11

표 11. 자극된 PBMC 사이토카인 방출 검정에서 항-TNF 스테로이드 ADC의 시험관내 활성

ADC	IL-1 베타 IC ₅₀ (ng/mL)	IL-6 IC ₅₀ (ng/ml)
ADC4	44	265

[0312] **접촉 과민증 모델에서 항-mTNF-알파 면역접합체의 활성**

[0313] 항-TNF α 스테로이드 ADC를 감작제 (폴루오레세인 이소티오시아네이트 (FITC))의 적용을 통한 지연형 과민증 (DTH) 반응 (T-세포 유래)을 사용하여 급성 접촉 과민증 모델에서 급성 피부 염증의 유발을 평가하였다. 항-TNFα 스테로이드 ADC의 효능은 귀 부종을 감소시키는 능력으로 측정하였다. 스테로이드 바이오마커 코르티코스테론과 제1형 프로콜라겐 N-말단 프로펩티드 (P1NP)를, 각각, 시상하부-뇌하수체-부신(Hypothalamus-Pituitary-Adrenal, HPA) 축과 골 교체율에 대한 항-TNFα 스테로이드 ADC 치료의 추정되는 영향을 평가하기 위한 관독값으로 포함시켰다.

[0314] **귀 부종**

[0315] 0일차에, 마우스를 전신 마취 하에 두고, 복부를 면도하였다. 마이크로피펫을 사용하여, 마우스의 복부에 400 μL의 FITC 용액 (1:1 아세톤:DBP 중 1.5% 용액)을 경피 적용하여 감작화시켰다. 6일 후, FITC의 귀 접종 1시간 전 마우스에게 비히클 또는 치료제를 투약하였다. 귀 접종을 위해, 마우스를 전신 마취 하에 두고, 20 μL FITC를 우측 귀에 접종하였다. 접종 24시간 후, 마우스를 전신 마취 하에 두고, 이의 귀 두께를 캘리퍼로 측정하였다. 접종된 귀와 접종되지 않은 귀 사이의 차이를 계산하였다. 귀 접종 72시간 후, 마우스에게 ACTH를 1 mpk IP로 주사하고, ACTH 30분 후 말단에서 출혈을 유발시켰다. 혈장을 수집하고, P1NP, 코르티코스테론, 유리 스테로이드 및 대분자 수준을 분석하였다.

[0316] **방출된 유리 스테로이드 및 내인성 코르티코스테론의 정량화**

[0317] 마우스 혈장에서 8개의 상이한 농도 수준에서 0.03 nM 내지 0.1 μM의 최종 농도로 스테로이드의 보정 곡선을 생성하였다. 0.3 nM 내지 1 μM의 최종 코르티코스테론 농도 범위의 코르티코스테론 보정 곡선을 PBS 완충액 중 70 mg/mL 소 혈청 알부민 용액에서 생성하였다. 0.1% 포름산을 함유한 MeCN 용액 160 μL를 연구 혈장 샘플 또는 보정 표준물 40 μL에 첨가하였다. 상청액을 증류수로 희석하고, LC/MS 분석을 위해 최종 샘플 용액 30 μL를 주입하였다.

[0318] 방출된 유리 스테로이드 및 코르티코스테론의 정량화는 양이온 모드로 작동하는 전기분무 이온화 공급원과 인터페이스된 Shimadzu AC20 HPLC 시스템에 연결된 AB Sciex 5500 삼중 사중극자 질량 분석계 상에서 수행하였다. Waters XBridge BEH C18, 2.1x30mm, 3.5 μm 컬럼을 크로마토그래피 분리기에 사용하였다. 이동상 A는 Milli Q HPLC 물 중 0.1% 포름산이었고, 이동상 B는 MeCN 중 0.1% 포름산이었다. 0.6 내지 1.2분에서 2%의 이동상 B → 98% 이동상 B의 선형 구배를 적용하였다. 총 실행 시간은 0.8 mL/분의 유량으로 2.6분이었다. 질량 분석계는 700℃의 공급원 온도에서 양이온 MRM 모드로 작동시켰다.

[0319] 혈장 PINP의 정량화

[0320] 혈장 PINP의 정량화는 단백질 트립신 소화를 기반으로 하는 LCMS 플랫폼 상에서 수행하였다. 혈장 샘플을 부분적으로 침전시키고, MeCN/0.1M 탄산수소암모늄/DTT 혼합물을 첨가하여 완전히 환원시켰다. 상청액을 수집하고, 요오도아세트산을 첨가하여 알킬화시켰다. 알킬화된 단백질을 트립신으로 소화시키고, 생성된 트립신 펩티드를 LCMS로 분석하였다. 말 혈청 (비(非)간접 대용 매트릭스)에 투여된 합성 트립신 펩티드를 사용하여 보정 곡선을 생성하였다. 안정한 동위원소 표지된 측면 펩티드 (트립신 펩티드의 양쪽 말단에 3 내지 6개의 아미노산 연장)를 MeCN/DTT 단백질 침전 혼합물에 첨가된 내부 표준물질로서 사용하여, 소화 효율 및 LCMS 주입 둘 모두를 정규화하였다.

[0321] Columnex Chromenta BB-C18, 2.1x150 mm, 5 μ m 컬럼을 크로마토그래피 분리에 사용하였다. 이동상 A는 Milli Q HPLC 물 중 0.1% 포름산이었고, 이동상 B는 MeCN 중 0.1% 포름산이었다. 0.6 내지 3분에서 이동상 B 2% $\rightarrow$ 이동상 B 65%의 선형 구배를 적용하였다. 총 실행 시간은 0.45 mL/분의 유량으로 8분이었다. AB Sciex 4000Q 트랩 질량 분석계를 700°C의 공급원 온도에서 양이온 MRM 모드로 사용하여 PINP 펩티드를 정량화하였다.

[0322] 결과

[0323] 결과는 하기 표 12에 제시되어 있다:

표 12

표 12: 염증의 CHS 모델에서 귀 부종 및 스테로이드 바이오마커에 대한 항-mTNF 알파 스테로이드 ADC 활성의 비교

ADC	귀 부종 (10mpk $\pm$ SEM에서의 저해율%)	PINP (10mpk $\pm$ SEM에서의 저해율%)	코르티코스테론 (10mpk $\pm$ SEM에서의 저해율%)
ADC1	82.8 $\pm$ 2.3	32.6 $\pm$ 3.8	4.7 $\pm$ 10.5

[0324]

[0325] 콜라겐-유도 관절염에서의 항-mTNF-알파 면역접합체의 활성

[0326] 질환에 영향을 미치는 항-mTNF α 스테로이드 ADC (ADC1)의 능력을 관절염의 콜라겐-유도 관절염 (CIA) 모델에서 평가하였다.

[0327] 이러한 실험에서, 수컷 DBA/1J 마우스는 Jackson Labs (Bar Harbor, ME)에서 입수하였다. 6 내지 8주령의 마우스를 사용하였다. 모든 동물들을 12시간 명/암 주기 하 일정한 온도 및 습도에서 유지시키고, 설치류 먹이 (Lab Diet 5010 PharmaServ, Framingham, MA)와 임의로 물을 공급하였다. AbbVie는 인가된 AAALAC (국제 실험 동물 관리 평가 인증 협회(Association for Assessment and Accreditation of Laboratory Animal Care))이고, 모든 절차는 동물 실험 윤리 위원회(Institutional Animal Care and Use Committee, IACUC)에 의해 승인되었으며, 주치 의사가 모니터링하였다. 체중 및 상태를 모니터링하고, 20% 초과 체중 손실을 나타내는 경우 동물을 안락사시켰다.

[0328] 수컷 DBA/J 마우스를 0.1 N 아세트산에 용해시킨 100 μ g의 제2형 소 콜라겐 (MD Biosciences) 및 200 μ g의 열불활성화된 결핵균(*Mycobacterium tuberculosis*) H37Ra (Complete Freund's Adjuvant, Difco, Laurence, KS)을 함유하는 100 μ L의 에멀전으로 꼬리의 기저부에 피내 (i.d.) 면역화시켰다. 콜라겐으로의 면역화 21일 후, 마우스를 PBS 중의 1 mg의 지모산(Zymosan) A (Sigma, St. Louis, MO)로 IP 부스팅하였다. 부스팅 후, 마우스를 관절염에 대하여 주당 3 내지 5회 모니터링하였다. 뒷발을 Dyer 스프링 캘리퍼(spring caliper) (Dyer 310-115)를 사용하여 발 부종에 대하여 평가하였다.

[0329] 마우스를 질환의 제1 임상 징후에서 24 내지 28일 사이에 등록하고, 동등한 관절염 중증도 군으로 분류하였다. 초기 치료적 치료는 등록 시 시작하였다.

[0330] 동물에게 0.9% 식염수 중 항-mTNF mAb (고용량) 또는 항-mTNF 스테로이드 ADC (고용량 및 저용량 - mpk)를 1회 복강내 (i.p.) 투여하였다. 투여 24 및 72시간 후 항체 노출을 위해 꼬리에 칼로 상처를 내어 혈액을 수집하였다. 조직병리학을 위해 마지막에 발을 수집하였다. 완전 혈구 측정을 위해 심장 천자 (Sysmex XT-2000iV)로 마

지막에 혈액을 수집하였다. 통계적 유의성은 ANOVA로 결정하였다.

[0331] 결과는 도 3에 제시되어 있으며, 이는 단일 용량의 항-TNFα 스테로이드 ADC가 항-TNFα mAb 또는 비히클 단독과 비교하여 약 28일 동안 발 부종의 완화를 통해 작용의 연장된 지속기간을 나타낼 수 있음을 입증한다.

[0332] 혈장 내 ADC 안정성

[0333] 가수분해가 말레이미드계 링커의 생체내 안정성을 증가시키기 위해 이용되었지만, 이는 일반적으로 염기성 pH에 의 노출을 필요로 하며, 이는 항체의 변형 (예를 들어, 탈아미드화), 증가된 이질성, 감소된 수율 등을 유도할 수 있다. [Shen et al., *Nature Biotechnology* 30:184-189 (2012)] (말레이미드의 가수분해는 약물의 조기 방출 및 약물에의 전신 노출을 회피함); [Strop et al., *Chemistry & Biology* 20(2):161-167 (2013)] (유사한 연구); [Tumey et al., *Bioconjugate Chem* 25(10):1871-1880 (2014)] (염기성 조건 하에서 고리 가수분해를 가능하게 하기 위한 근접 PEG 사슬의 사용); [Lyon et al., *Nature Biotechnology* 32:1059-1062 (2014)] (가수분해된 숙신이미드의 생성을 용이하게 하는 과정); [Christie et al., *J Control Release* 220(PtB):660-70 (28 Dec 2015)] (염기성 조건 하에서 숙신이미드 고리 가수분해를 용이하게 하기 위한 N-아릴 말레이미드의 사용); [Dovgan et al., *Scientific Reports* 6:1 (2016)] (연장된 기간 동안 약염기성 조건 하에서 고리 가수분해를 용이하게 하기 위한 2-(말레이미도메틸)-1,3-디옥산의 사용); 및 [J Pharm Sci 2013: 102 (6) 1712-1723] (완충액 유형, pH 및 온도에 따른 아스파라긴 탈아미드화). 대조적으로, 브로모아세트아미드를 사용하는 접합을 위한 전형적인 조건은, 말레이미드 (염기성 pH에서의 접합 및 후속 고리 가수분해)의 경우 수일에 비해, 몇시간 내에 완료된다. 또한, 시스테인과 브로모아세트아미드의 반응 동안 형성된 2-메르캅토아세트아미드는 역 마이클 반응에 영향을 받지 않으며, ADC4에 대하여 하기 표 13에 입증된 바와 같이 항체에 대한 링커의 안정한 부착을 제공한다.

표 13

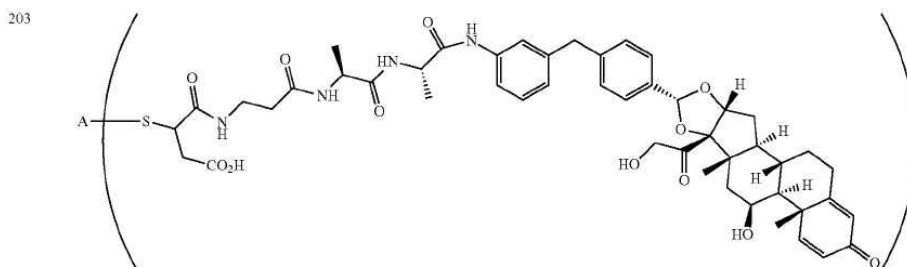
표 13

37°C에서 4 일 후 혈장 중 ADC로부터 방출된 SM%				
PBSIX 완충액	마우스	랫트	시노몰구스 원숭이	인간
BLQ	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ

[0334] BLQ- 정량 한계 미만 (<1.0nM)

[0335] 용액 중 ADC 안정성

[0336] 장기 안정성을 평가하기 위해, 생물제제를 가속 스트레스 시험에 적용시켰다. 이러한 시험의 프로토콜은 40°C에서 21일 동안 15 mM 히스티딘 중의 100 mg/mL의 생물제제이다. ADC4를 이러한 시험에 적용했을 때, 응집체의 증가%는 5% 미만이었으며, 이에 비해 ADC203은 18%의 응집 증가를 나타냈다 (2018년 5월 10일자 공개된 미국 특허 출원 공개 제2018/012600호의 표 14 참조). 이는, 페이로드(payload)의 포스페이트 전구약물과 함께 Gly-Glu 링커에 의해 ADC4에 부여된 개선된 특성을 입증한다. US2018/0126000의 ADC203은 하기와 같다:



[0337]

[0338] [식 중, n은 4이고, A는 항-인간 TNFα 항체 아달리무맙을 나타냄].

표 14

표 14

ADC	5°C에서 21 일 동안의 단량체 손실	25°C에서 21 일 동안의 단량체 손실	40°C에서 21 일 동안의 단량체 손실
ADC203	1.43%	2.26%	17.56%
ADC4	<0.5%	<0.5%	3.46%

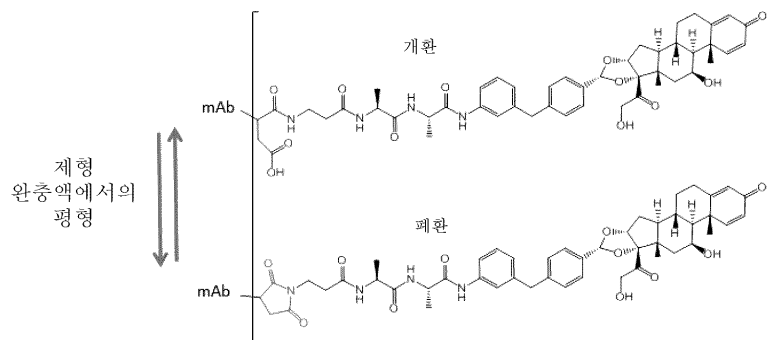
[0339]

[0340]

포스페이트 전구약물의 추가의 이점은, DAR 정제를 위한 음이온 교환 크로마토그래피의 사용을 가능하게 한다는 점이다. 이는 소수성 상호작용 크로마토그래피와 비교하여 개선된 피크 분리도를 유도함으로써, 더 높은 수율의 DAR 정제된 ADC를 유도한다.

[0341]

제형 완충액에서, ADC203의 가수분해된 숙신이미드 고리는 폐환 형태와 평형을 이룬다. 이러한 폐환 형태는 시노물구스 원승이에서 역 마이클 반응 및 생체내 링커-약물의 후속 손실에 취약하다 (도 4).



[0342]

[0343]

공칭 액체 저장 조건 하에서, 개환 형태의 숙신이미드 부착은 6개월 후 폐환 형태를 5°C에서 5% 초과 및 25°C에서 15% 초과로 변형시킬 것이다 (표 15).

표 15

표 15

시간/온도	폐환 형태의 숙신이미드 %	
	경쇄	중쇄
3 개월/ 5°C	2.2	4.6
6 개월/ 5°C	3.2	6.9
3 개월/ 25°C	10.1	13.3
6 개월/ 25°C	16.6	24.1
3 개월/ 40°C	26.2	33.7
3 개월/ 40°C	26.8	39.0

[0344]

[0345]

개요 및 요약서 섹션이 아닌 상세한 설명 섹션이, 청구범위를 설명하기 위해 사용된 것이라고 이해되어야 한다. 개요 및 요약서 섹션은 발명자(들)에 의해 고려된 바와 같이, 본 개시내용의 하나 이상이지만, 전부는 아닌 예시적인 구현예를 제시하는 것이며, 따라서 어떤 방식으로든 본 개시내용 및 첨부된 청구범위를 제한하고자 하는 것이 아니다.

[0346]

본 개시내용은 명시된 기능 및 이의 관계의 구현을 예시하는 기능적 빌딩 블록을 이용하여 상기 기재되어 있다. 이러한 기능적 빌딩 블록의 경계는 설명의 편의를 위해 본원에 임의로 정의되어 있다. 명시된 기능 및 이의 관계가 적절하게 수행되는 한, 대안적인 경계가 정의될 수 있다.

[0347]

상기 특정 구현예의 설명은, 당업자가, 과도한 실험 없이, 본 개시내용의 일반 개념을 벗어나지 않으면서, 본

기술 분야 내 지식을 적용함으로써, 특정 구현예와 같은 다양한 적용에 대하여 용이하게 변형 및/또는 조정할 수 있는, 본 개시내용의 일반적인 특성을 충분히 밝힐 것이다. 따라서, 이러한 조정 및 변형은 본원에 제시된 교시 및 지침을 기반으로 개시된 구현예와 동등한 의미 및 범위 내에 속하는 것으로 의도된다. 본원의 문구 또는 용어는 제한하고자 하는 것이 아닌 설명의 목적으로, 본 명세서의 용어 또는 문구는 교시 및 지침에 비추어 당업자에 의해 해석되어 함을 이해해야 한다.

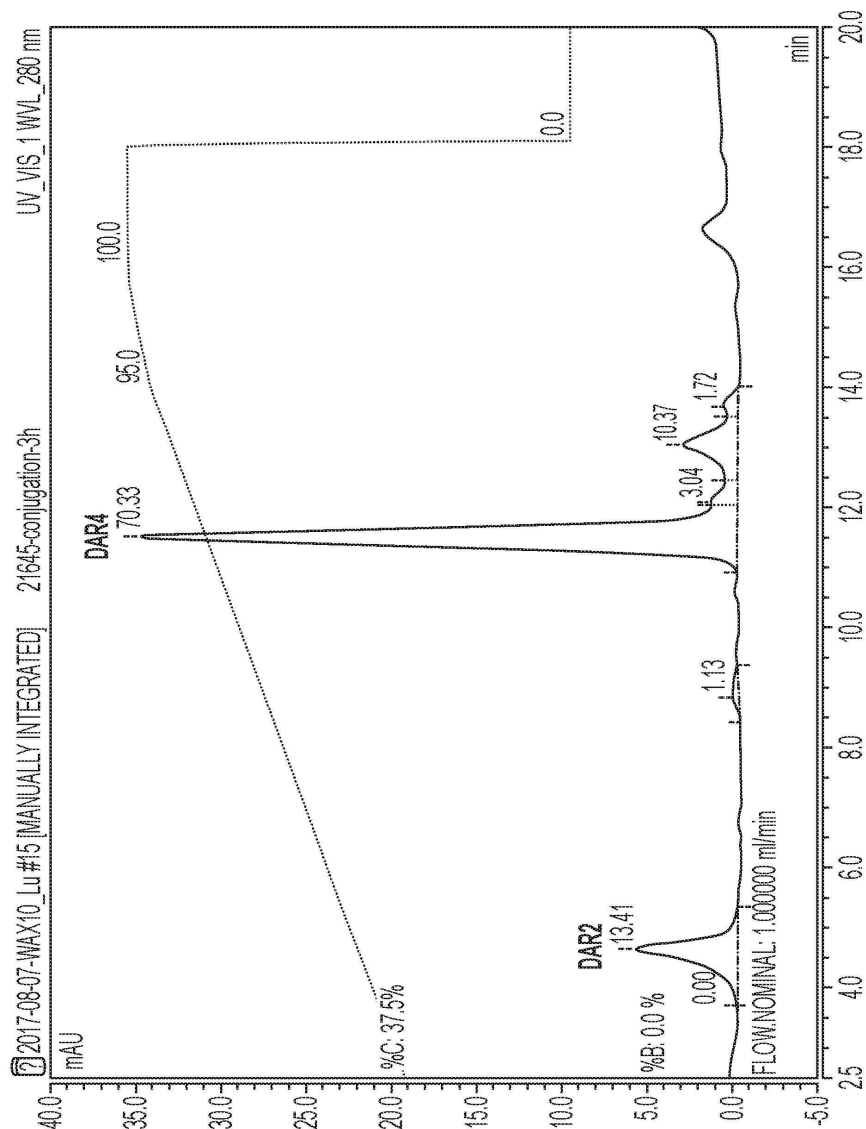
[0348] 본 개시내용의 폭 및 범위는 상기 기재된 임의의 예시적인 구현예에 의해 제한되어서는 안되며, 하기 청구범위 및 이의 등가물에 의해서만 정의되어 한다.

[0349] **참조로서의 인용**

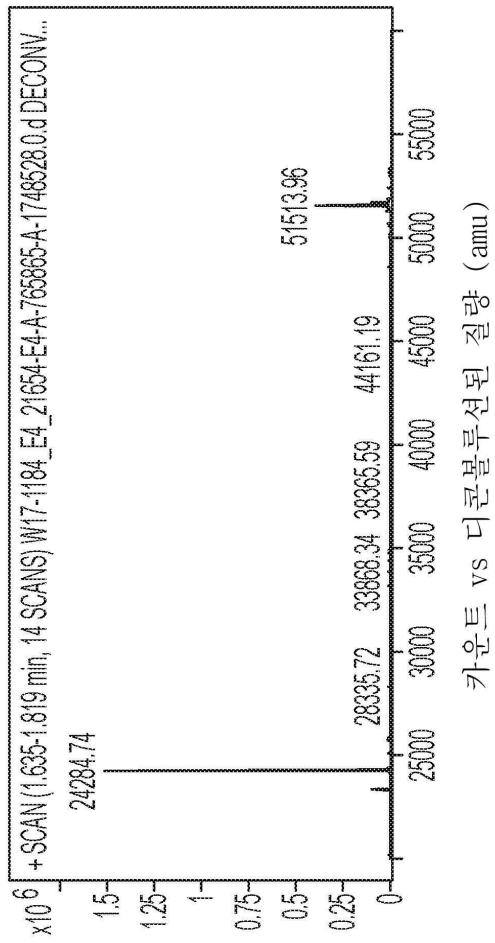
[0350] 상세한 설명에 언급된 특허 및 공개된 출원을 포함하는 모든 출판물은 그 전문이 본원에 참조로서 인용된다.

도면

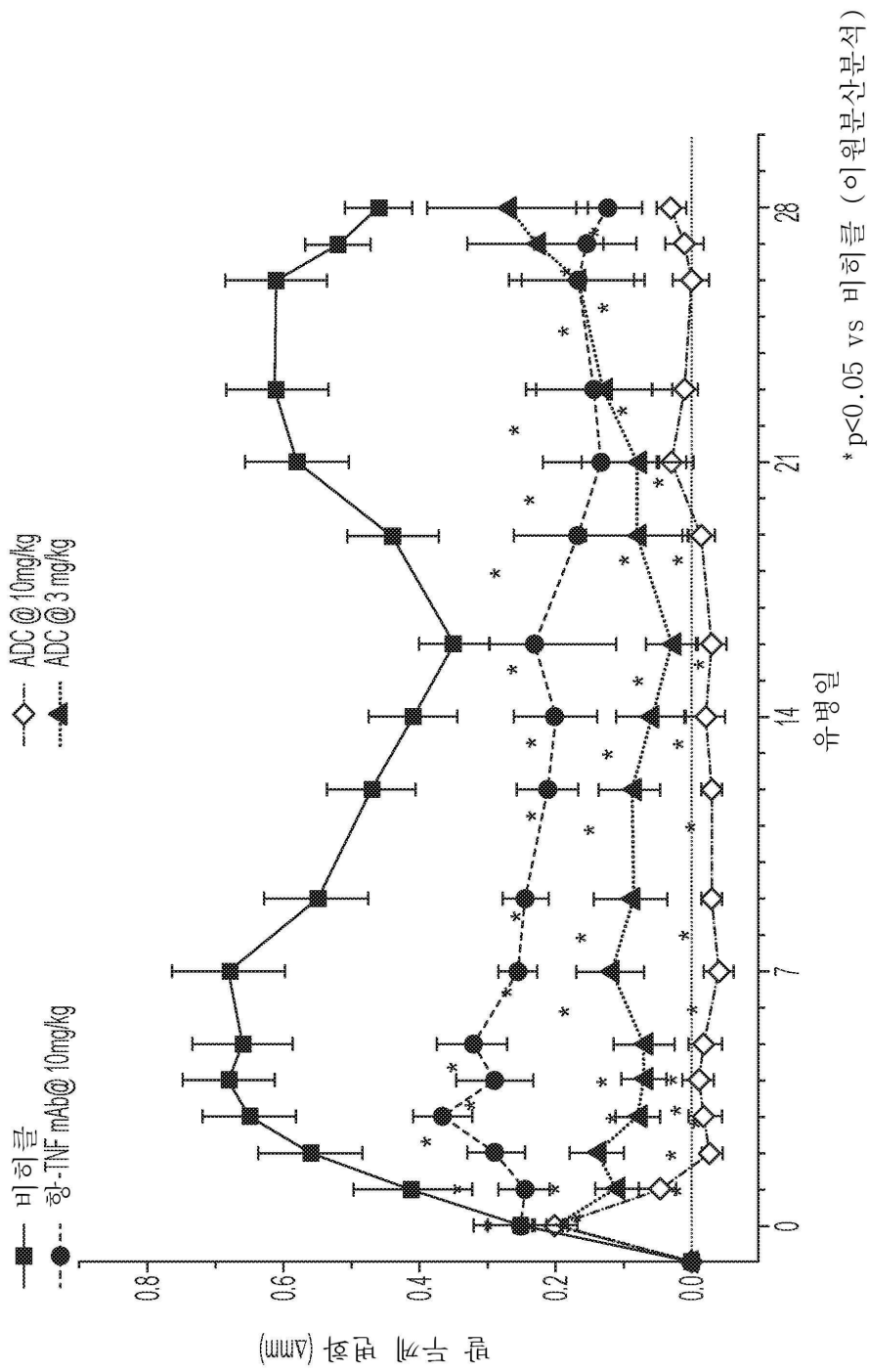
도면1



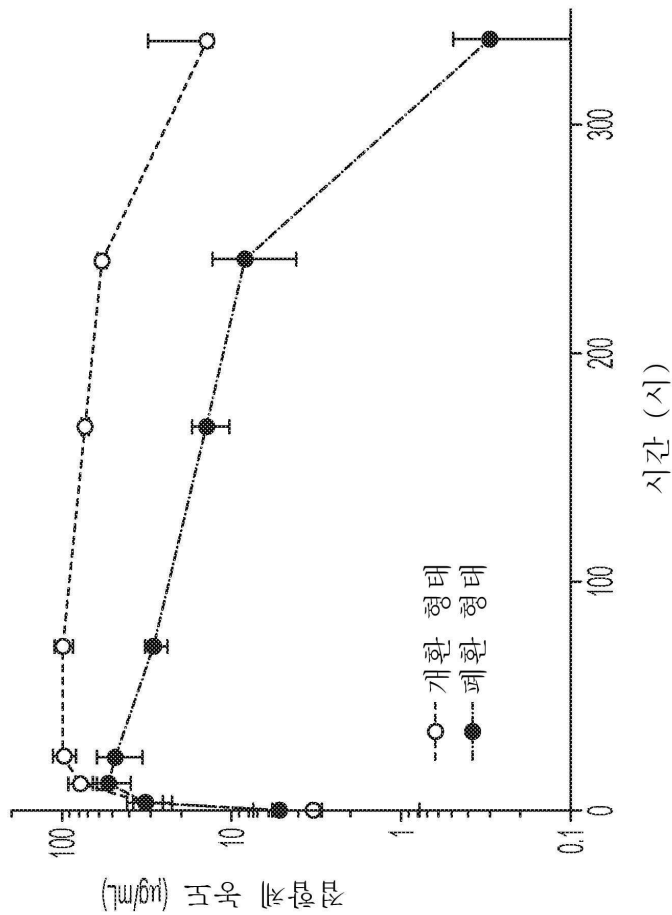
도면2



도면3



도면4



서열 목록

SEQUENCE LISTING

<110> ABBVIE INC.

<120> GLUCOCORTICOID RECEPTOR AGONIST AND IMMUNOCONJUGATES THEREOF

<130> A103017 1490W0

<150> 62/595,054

<151> 2017-12-05

<150> 62/593,776

<151> 2017-12-01

<160> 14

<170> KoPatentIn 3.0

<210> 1

<211> 233

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 1

Met Ser Thr Glu Ser Met Ile Arg Asp Val Glu Leu Ala Glu Glu Ala

1 5 10 15

Leu Pro Lys Lys Thr Gly Gly Pro Gln Gly Ser Arg Arg Cys Leu Phe

20 25 30

Leu Ser Leu Phe Ser Phe Leu Ile Val Ala Gly Ala Thr Thr Leu Phe

35 40 45

Cys Leu Leu His Phe Gly Val Ile Gly Pro Gln Arg Glu Glu Phe Pro

50 55 60

Arg Asp Leu Ser Leu Ile Ser Pro Leu Ala Gln Ala Val Arg Ser Ser

65 70 75 80

Ser Arg Thr Pro Ser Asp Lys Pro Val Ala His Val Val Ala Asn Pro

85 90 95

Gln Ala Glu Gly Gln Leu Gln Trp Leu Asn Arg Arg Ala Asn Ala Leu

100 105 110

Leu Ala Asn Gly Val Glu Leu Arg Asp Asn Gln Leu Val Val Pro Ser

115 120 125

Glu Gly Leu Tyr Leu Ile Tyr Ser Gln Val Leu Phe Lys Gly Gln Gly

130 135 140

Cys Pro Ser Thr His Val Leu Leu Thr His Thr Ile Ser Arg Ile Ala

145 150 155 160

Val Ser Tyr Gln Thr Lys Val Asn Leu Leu Ser Ala Ile Lys Ser Pro

165 170 175

Cys Gln Arg Glu Thr Pro Glu Gly Ala Glu Ala Lys Pro Trp Tyr Glu

180 185 190

Pro Ile Tyr Leu Gly Gly Val Phe Gln Leu Glu Lys Gly Asp Arg Leu

195 200 205

Ser Ala Glu Ile Asn Arg Pro Asp Tyr Leu Asp Phe Ala Glu Ser Gly

210 215 220

Gln Val Tyr Phe Gly Ile Ile Ala Leu

225 230

<210> 2

<211> 235

<212> PRT

<213> Mus sp.

<400> 2

```

Met Ser Thr Glu Ser Met Ile Arg Asp Val Glu Leu Ala Glu Glu Ala
1           5           10           15
Leu Pro Gln Lys Met Gly Gly Phe Gln Asn Ser Arg Arg Cys Leu Cys
           20           25           30
Leu Ser Leu Phe Ser Phe Leu Leu Val Ala Gly Ala Thr Thr Leu Phe

           35           40           45
Cys Leu Leu Asn Phe Gly Val Ile Gly Pro Gln Arg Asp Glu Lys Phe
           50           55           60
Pro Asn Gly Leu Pro Leu Ile Ser Ser Met Ala Gln Thr Leu Thr Leu
65           70           75           80
Arg Ser Ser Ser Gln Asn Ser Ser Asp Lys Pro Val Ala His Val Val
           85           90           95
Ala Asn His Gln Val Glu Glu Gln Leu Glu Trp Leu Ser Gln Arg Ala

           100          105          110
Asn Ala Leu Leu Ala Asn Gly Met Asp Leu Lys Asp Asn Gln Leu Val
           115          120          125
Val Pro Ala Asp Gly Leu Tyr Leu Val Tyr Ser Gln Val Leu Phe Lys
           130          135          140
Gly Gln Gly Cys Pro Asp Tyr Val Leu Leu Thr His Thr Val Ser Arg
145          150          155          160
Phe Ala Ile Ser Tyr Gln Glu Lys Val Asn Leu Leu Ser Ala Val Lys

           165          170          175
Ser Pro Cys Pro Lys Asp Thr Pro Glu Gly Ala Glu Leu Lys Pro Trp
           180          185          190
Tyr Glu Pro Ile Tyr Leu Gly Gly Val Phe Gln Leu Glu Lys Gly Asp
           195          200          205
Gln Leu Ser Ala Glu Val Asn Leu Pro Lys Tyr Leu Asp Phe Ala Glu

```

210 215 220
 Ser Gly Gln Val Tyr Phe Gly Val Ile Ala Leu
 225 230 235

 <210> 3
 <211> 451
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><221> source
 <223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
 polypeptide"
 <400> 3
 Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Arg
 1 5 10 15
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Asp Asp Tyr
 20 25 30
 Ala Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45

 Ser Ala Ile Thr Trp Asn Ser Gly His Ile Asp Tyr Ala Asp Ser Val
 50 55 60
 Glu Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser Leu Tyr
 65 70 75 80
 Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Lys Val Ser Tyr Leu Ser Thr Ala Ser Ser Leu Asp Tyr Trp Gly
 100 105 110

 Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser
 115 120 125
 Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala
 130 135 140
 Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val
 145 150 155 160
 Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala

165	170	175
Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val		
180	185	190
Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His		
195	200	205
Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys		
210	215	220
Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly		
225	230	235
		240
Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met		
245	250	255
Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His		
260	265	270
Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val		
275	280	285
His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr		
290	295	300
Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly		
305	310	315
Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile		
325	330	335
Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val		
340	345	350
Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser		
355	360	365
Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu		
370	375	380
Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro		
385	390	395
Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val		
405	410	415

Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met
420 425 430

His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser
435 440 445

Pro Gly Lys
450

<210> 4

<211> 214

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
polypeptide"

<400> 4

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Gly Ile Arg Asn Tyr

20 25 30

Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
35 40 45

Tyr Ala Ala Ser Thr Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80

Glu Asp Val Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Arg Tyr Asn Arg Ala Pro Tyr

85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala
100 105 110

Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly
115 120 125

Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala
130 135 140

Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln

145 150 155 160

Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser

165 170 175

Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr

180 185 190

Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser

195 200 205

Phe Asn Arg Gly Glu Cys

210

<210> 5

<211> 121

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
polypeptide"

<400> 5

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Arg

1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Asp Asp Tyr

20 25 30

Ala Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val

35 40 45

Ser Ala Ile Thr Trp Asn Ser Gly His Ile Asp Tyr Ala Asp Ser Val

50 55 60

Glu Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser Leu Tyr

65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys

85 90 95

Ala Lys Val Ser Tyr Leu Ser Thr Ala Ser Ser Leu Asp Tyr Trp Gly

100 105 110

Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser

115 120

<210> 6

<211> 107

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
polypeptide"

<400> 6

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly

1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Gly Ile Arg Asn Tyr

20 25 30

Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile

35 40 45

Tyr Ala Ala Ser Thr Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly

50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro

65 70 75 80

Glu Asp Val Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Arg Tyr Asn Arg Ala Pro Tyr

85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys

100 105

<210> 7

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
peptide"

<400> 7

Asp Tyr Ala Met His

1 5

<210> 8

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
peptide"

<400> 8

Gly Phe Thr Phe Asp Asp Tyr Ala Met His

1 5 10

<210> 9

<211> 17

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
peptide"

<400> 9

Ala Ile Thr Trp Asn Ser Gly His Ile Asp Tyr Ala Asp Ser Val Glu

1 5 10 15

Gly

<210> 10

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
peptide"

<400> 10

Val Ser Tyr Leu Ser Thr Ala Ser Ser

1 5

<210> 11

<211> 12

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide"

<400> 11

Val Ser Tyr Leu Ser Thr Ala Ser Ser Leu Asp Tyr

1 5 10

<210> 12

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide"

<400> 12

Arg Ala Ser Gln Gly Ile Arg Asn Tyr Leu Ala

1 5 10

<210> 13

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide"

<400> 13

Ala Ala Ser Thr Leu Gln Ser

1 5

<210> 14

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
peptide"

<400> 14

Gln Arg Tyr Asn Arg Ala Pro Tyr Thr

1

5