



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2023-0154892
(43) 공개일자 2023년11월09일

- (51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 47/68 (2017.01) A61P 35/00 (2006.01)
C07K 16/32 (2006.01)
- (52) CPC특허분류
A61K 47/68037 (2023.08)
A61K 47/6855 (2017.08)
- (21) 출원번호 10-2023-7032898
- (22) 출원일자(국제) 2022년02월25일
심사청구일자 없음
- (85) 번역문제출일자 2023년09월25일
- (86) 국제출원번호 PCT/IB2022/051660
- (87) 국제공개번호 WO 2022/180581
국제공개일자 2022년09월01일
- (30) 우선권주장
63/153,530 2021년02월25일 미국(US)

- (71) 출원인
메디보스턴 리미티드
중국 홍콩 코즈웨이 베이 하이산 애비뉴 33 리 가
든 원 19에프 룸 1902
- (72) 발명자
리, 웨이
미국 01720 매사추세츠 액턴 놀턴 드라이브 6
- (74) 대리인
특허법인 남앤남

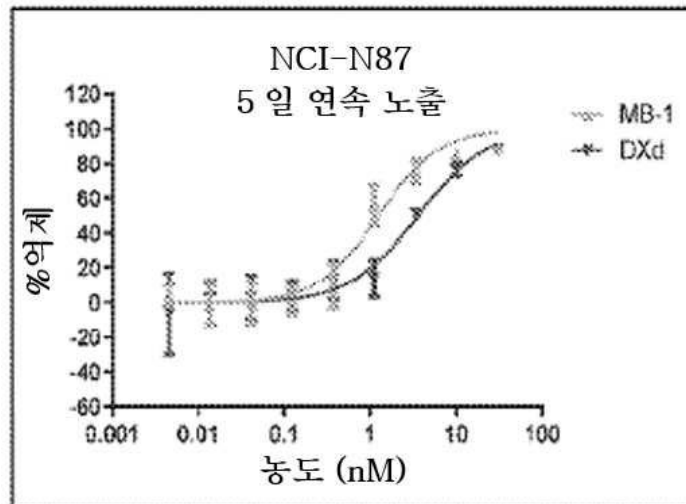
전체 청구항 수 : 총 51 항

(54) 발명의 명칭 항-HER2 항체-약물 접합체 및 이의 용도

(57) 요약

치료적 사용을 위한 독소로서, 캄프토테신 유도체에 접합된 신규 항-HER2 ADC가 개시된다. 식 (PL-A)의 ADC(예를 들어, 화합물 MB-2a 및 MB-3a(트라스투주맙 메디테칸))의 항종양 효과는 이들 화합물이 암과 같은 세포 증식성 질환을 치료하는 데 유용하게 한다.

대표도 - 도1a



(52) CPC특허분류

A61K 47/6863 (2017.08)

A61P 35/00 (2018.01)

C07K 16/32 (2013.01)

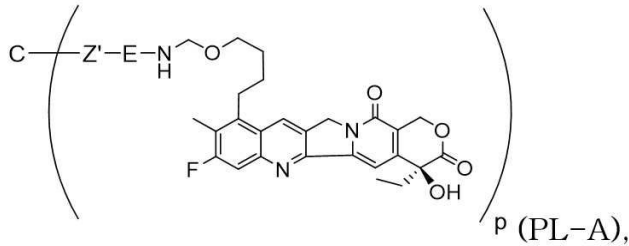
C07K 2317/77 (2013.01)

명세서

청구범위

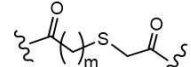
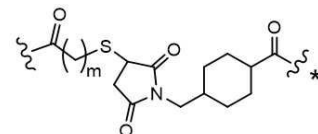
청구항 1

하기 식 PL-A의 구조를 갖는 화합물:



또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염으로서, 식 중,

E는 2 내지 8개의 아미노산을 포함하는 펩티드이고; 여기에서, **E**는 하나 이상의 폴리올로 선택적으로 치환되고; 상기 펩티드의 N 말단은 **Z'**에 공유 부착되며;

Z'은 $-C(=O)-L^1-Y'$,  또는  이고; 식 중 m은 1 내지 10의 정수를 나타내고, *는 상기 C에 공유 연결된 부위를 나타내며;

L^1 은 $-(C_1-C_{10} \text{ 알킬렌})-$, $-\text{CH}_2\text{CH}_2(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_n\text{N}(\text{R}_1)\text{C}(=\text{O})-\text{L}^2-*$, 또는

$-\text{CH}_2(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_n\text{N}(\text{R}_1)\text{C}(=\text{O})-\text{L}^2-*$ 이고; 식 중 n은 1 내지 10의 정수를 나타내고; *는 **Y'**에 공유 연결된 부위를 나타내며;

L^2 는 $-(C_1-C_{10} \text{ 알킬렌})-$ 이고; **R**₁은 -H 또는 -CH₃이며;

Y'은 세포 결합체 **C** 상에 존재하는 반응성 친핵성 기와 친전자성 기의 반응에 의해 형성된 기이며;

p는 약 2 내지 10인 평균 수인 약물 대 항체 비율(DAR)이며;

C는 Her2를 표적화하는 결합체로서:

서열번호 1에 대해 적어도 약 80%의 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하는 중쇄; 및

서열번호 2에 대해 적어도 약 80%의 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하는 경쇄를 포함하는, 화합물 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염.

청구항 2

제1항에 있어서, **C**는,

서열번호 1에 대해 적어도 약 85%, 90%, 또는 95%의 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하는 중쇄; 및

서열번호 2에 대해 적어도 약 85%, 90%, 또는 95%의 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하는 경쇄를 포함하는 결합체인, 화합물.

청구항 3

제1항 또는 제2항에 있어서, **C**는,

서열번호 1의 중쇄 아미노산 서열; 및

서열번호 2의 경쇄 아미노산 서열을 포함하는 결합제인, 화합물.

청구항 4

제1항 내지 제3항 중 어느 한 항에 있어서, C는 항체 또는 이의 항원 결합 단편인 결합제인, 화합물.

청구항 5

제1항 내지 제4항 중 어느 한 항에 있어서, C는 트라스투주맙(Herceptin), 트라스투주맙-dkst(Ogivri), 트라스투주맙-pkrb(Herzuma), 트라스투주맙-dtb(Ontruzant), 트라스투주맙-qyyp(Trazimera), 또는 트라스투주맙-anns(Kanjinti)인 결합제인, 화합물.

청구항 6

제1항 내지 제5항 중 어느 한 항에 있어서, L¹은 -(C₁-C₁₀ 알킬렌)-인, 화합물.

청구항 7

제1항 내지 제5항 중 어느 한 항에 있어서, L¹은 -CH₂CH₂(OCH₂CH₂)_nN(R₁)C(=O)-L²-* 또는 -CH₂(OCH₂CH₂)_nN(R¹)C(=O)-L²-*이고, 식 중 n은 1 내지 10의 정수 이고; *는 Y'에 공유 부착된 부위를 나타내는, 화합물.

청구항 8

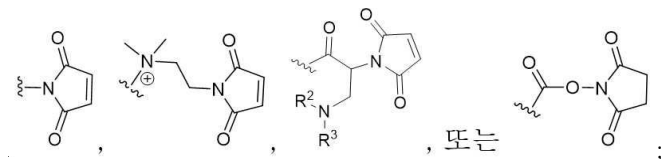
제1항 내지 제7항 중 어느 한 항에 있어서, L¹은 -CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂-, -CH₂CH₂-, -CH₂-, -CH₂CH₂OCH₂CH₂OCH₂CH₂NHC(=O)CH₂CH₂-, 또는 -CH₂OCH₂CH₂OCH₂CH₂NHC(=O)CH₂CH₂-*이고, 식 중 *는 Y'에 공유 연결된 부위를 나타내는, 화합물.

청구항 9

제1항 내지 제8항 중 어느 한 항에 있어서, Y'은 마이클 수용체 기, 숙신이미드, 에폭시드, 또는 할로겐으로부터 형성되는, 화합물.

청구항 10

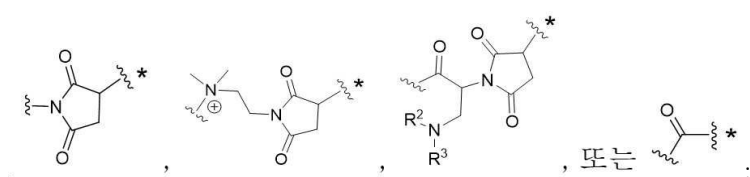
제1항 내지 제9항 중 어느 한 항에 있어서, Y'은 하기 식으로부터 형성되고:



식 중 R² 및 R³은 각각 독립적으로 -H 또는 C₁-C₃ 알킬인, 화합물.

청구항 11

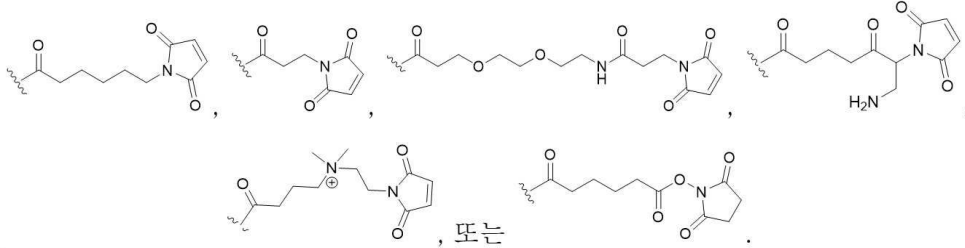
제1항 내지 제9항 중 어느 한 항에 있어서, Y'은 하기 식과 같고:



식 중, R^2 및 R^3 은 각각 독립적으로 -H 또는 C_1-C_3 알킬이고, *는 상기 C에 공유 연결된 부위를 나타내는, 화합물.

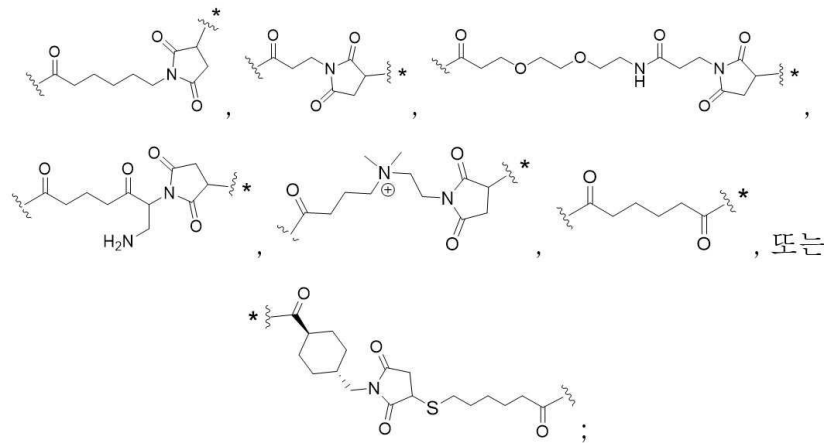
청구항 12

제1항 내지 제11항 중 어느 한 항에 있어서, Z'은 하기 식으로부터 형성되는, 화합물:



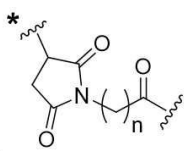
청구항 13

제1항 내지 제12항 중 어느 한 항에 있어서, Z'은 하기 식과 같고:

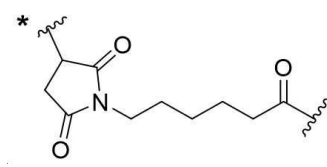


식 중 *는 C에 공유 결합되는 부위를 나타내는, 화합물.

청구항 14

제1항에 있어서, Z'는  이고; 식 중 *는 C에 대한 공유 부착을 나타내고, n은 2 내지 10의 정수인, 화합물.

청구항 15

제14항에 있어서, Z'는  이고; 식 중 *는 C에 대한 공유 부착을 나타내는, 화합물.

청구항 16

제1항 내지 제15항 중 어느 한 항에 있어서, E는 2, 3, 4 또는 5개의 아미노산의 펩티드인, 화합물.

청구항 17

제16항에 있어서, **E**는 2, 3, 또는 4개의 아미노산의 펩티드인, 화합물.

청구항 18

제16항 또는 제17항에 있어서, 상기 펩티드 내의 각각의 아미노산은 L 아미노산이거나, 상기 펩티드 내의 적어도 하나의 아미노산은 D 아미노산인, 화합물.

청구항 19

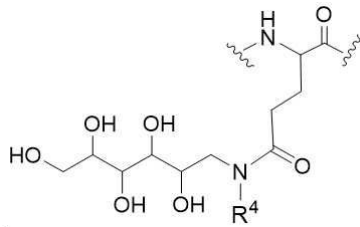
제1항 내지 제18항 중 어느 한 항에 있어서, **E**는 글리신, 알라닌, 발린, 글루타민, 글루탐산, 페닐알라닌, 및 류신으로부터 선택된 하나 이상의 아미노산을 포함하고, 상기 글루타민 또는 글루탐산은 폴리올에 의해 선택적으로 치환되는, 화합물.

청구항 20

제19항에 있어서, **E**는 글리신, 알라닌, 발린, 글루타민, 글루탐산, 페닐알라닌, 및 류신으로부터 선택된 아미노산을 포함하고, 상기 글루타민 또는 글루탐산은 폴리올에 의해 선택적으로 치환되는, 화합물.

청구항 21

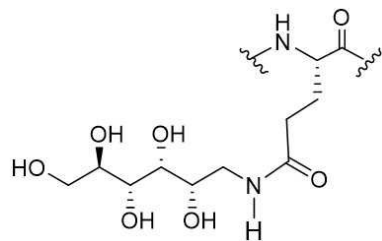
제1항내지 제20항 중 어느 한 항에 있어서, **E**는 하기 구조를 갖는 아미노산을 포함하고,



식 중, R^4 는 -H 또는 C_1-C_6 알킬인, 화합물.

청구항 22

제21항에 있어서, **E**는 하기 구조를 갖는 아미노산을 포함하는, 화합물:



청구항 23

제1항 내지 제20항 중 어느 한 항에 있어서, **E**는, -Ala-Val-*, -Val-Ala-*, -Gly-Gly-*, -Val-Cit-*, -Cit-Val-*, -Leu-Ala-*, -Ala-Leu-*, -Leu-Cit-*, -Cit-Leu-*, -Leu-Ala-*, -Ala-Leu-*, -Lys-Lys-*, -Ala-Lys-*, -Lys-Ala-*, -Val-Lys-*, -Lys-Val-*, -Tyr-Arg-*, -Arg-Tyr-*, -Arg-Arg-*, -Ala-Ala-*, -Phe-Lys-*, -Lys-Phe-*, -Thr-Thr-*, -Thr-Met-*, -Met-Thr-*, -Met-Tyr-*, -Tyr-Met-*, -Phe-Gln-*, -Gln-Phe-*, -Gly-Ser-*, -Leu-Gln-*, -Gln-Leu-*, -Ser-Ala-*, -Ser-Gly-*, -Val-Thr-*, -Thr-Val-*, -Val-Gln-*, -Ser-Val-*, -Val-Ser-*, -Ala-Met-*, -Met-Ala-*, -Val-Arg-*, -Arg-Val-*, -Phe-Ala-*, -Ala-Phe-*, -Cit-Val-*, -Gln-Val-*, -Phe-Arg-*, -Arg-Phe-*, -Ala-Ala-Ala-*, -Gly-Gly-Gly-*, -Ala-Val-Ala-*, -Gly-Val-Gly-*, -Ala-Val-Gly-*, -Gly-Phe-Lys-*, -Lys-Phe-Gly-*, -Leu-Ala-Leu-*, -Val-Ala-Leu-*, -Leu-Ala-Val-*, -Val-Ala-Val-*, -Ala-Val-Ala-Gly-* (서열번호 10), -Gly-Phe-Gly-Gly-* (서열번호 11), -Gly-Gly-Phe-Gly-* (서열번호 12), -Ala-Val-Gly-Gly-* (서열번호 13), -Ala-Ala-Ala-Ala-* (서열번호 14), -Ala-Val-Ala-Ala-* (서열번호 15), -Ala-Leu-Ala-Leu-* (서열번호 16), -Leu-Ala-Leu-Ala-* (서열번호 17), -Gly-Phe-Leu-Gly-* (서열번호 18) 및 -Gly-

Leu-Phe-Gly-* (서열번호 19)로 이루어진 군으로부터 선택되고,
식 중 *는 Z'에 공유 부착된 펩티드의 N-말단을 나타내는, 화합물.

청구항 24

제23항에 있어서, E는, -L-Ala-D-Val-*, -L-Val-D-Ala-*, -L-Val-D-Lys-*, -L-Val-D-Arg-*, -L-Val-D-Cit-*, -L-Val-D-Arg-*, -L-Val-D-Cit-*, -L-Val-D-Lys-*, -L-Val-D-Arg-*, -L-Arg-D-Arg-*, -L-Ala-D-Ala-*, -L-Ala-D-Lys-*, -L-Ala-D-Arg-*, -L-Ala-D-Ala-L-Ala-*, -L-Ala-D-Val-L-Ala-*, -L-Ala-D-Ala-Gly-*, 및 -L-Ala-D-Val-Gly-*로 이루어진 군으로부터 선택되고,

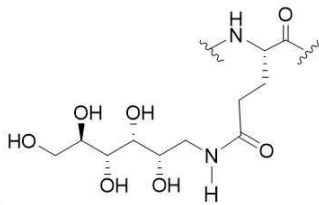
식 중 *는 Z'에 공유 부착된 펩티드의 N-말단을 나타내는, 화합물.

청구항 25

제1항 내지 제20항 중 어느 한 항에 있어서, E는 -(L-Val)-(L-Ala)-를 포함하는, 화합물.

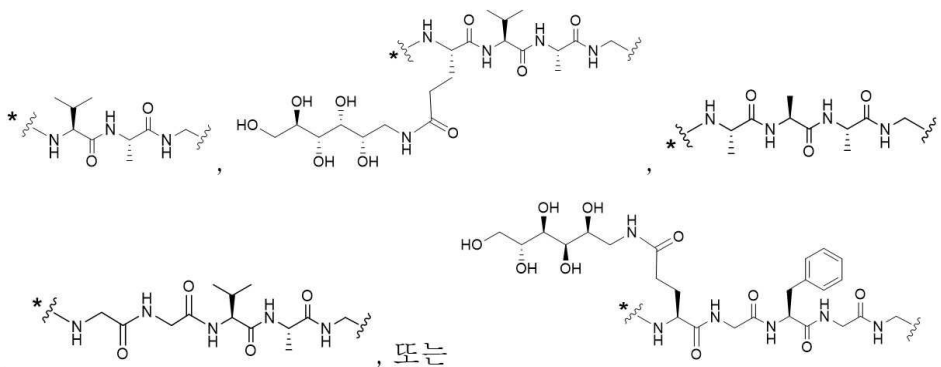
청구항 26

제25항에 있어서, E는 하기 구조를 갖는 아미노산을 추가로 포함하는, 화합물:



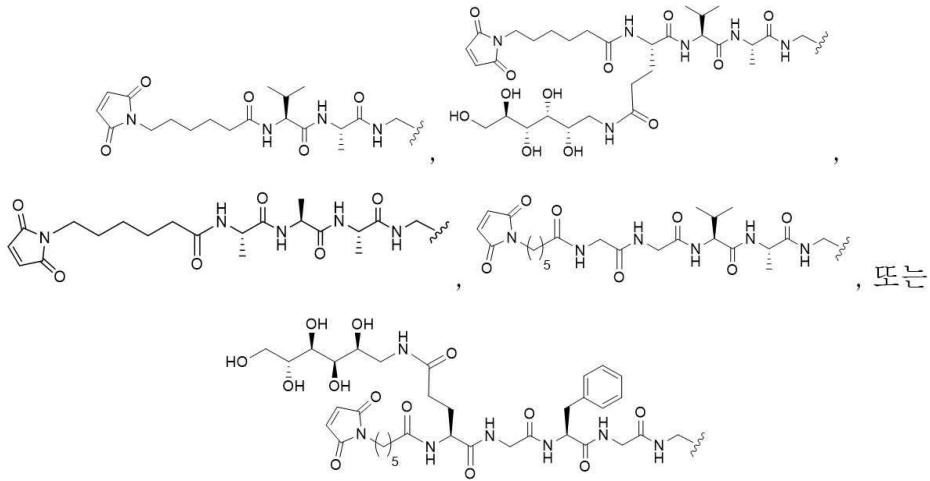
청구항 27

제1항 내지 제15항 중 어느 한 항에 있어서, 은 하기 구조 중 하나를 가지며, 식 중 *는 Z'에 공유 부착된 펩티드의 N-말단을 나타내는, 화합물:



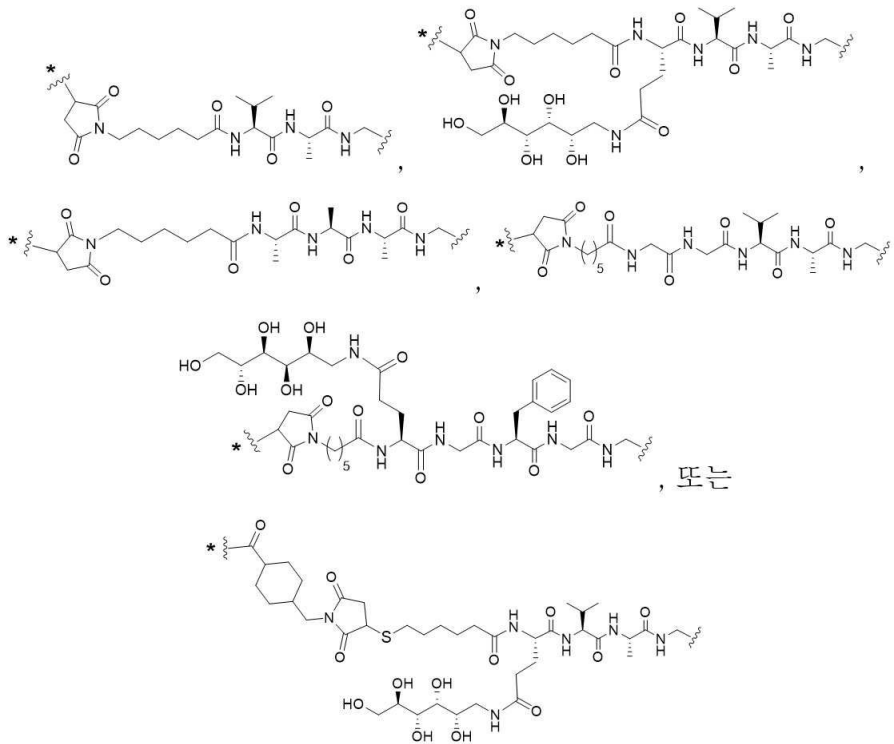
청구항 28

제1항 내지 제5항 중 어느 한 항에 있어서, 은 하기 구조 중 하나로부터 형성되는, 화합물:



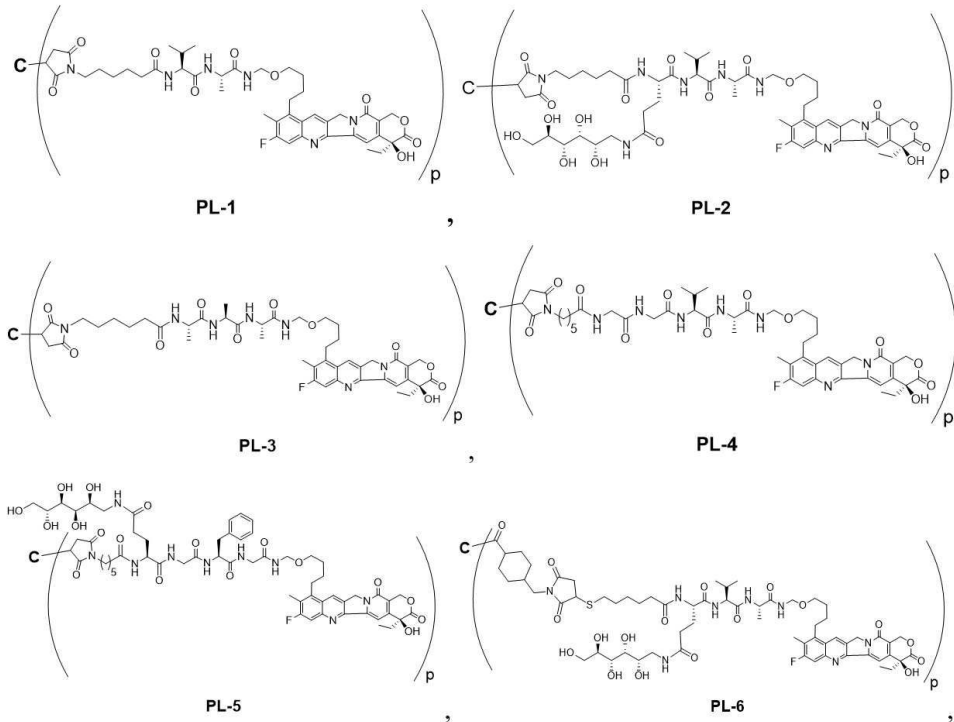
청구항 29

제1항 내지 제5항 중 어느 한 항에 있어서, $\text{---Z}^1\text{---E---NH---}$ 은 하기 구조 중 하나이고, 식 중 *는 C에 대한 부착 지점을 나타내는, 화합물:



청구항 30

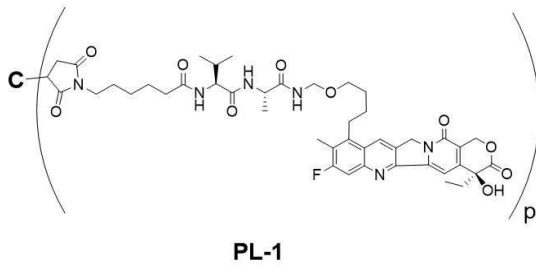
제1항에 있어서, 화합물은 하기 구조 중 하나이거나, 이의 약학적으로 허용 가능한 염이며:



식 중 p는 약 2 내지 10, 4 내지 8 또는 7 내지 8인, 화합물.

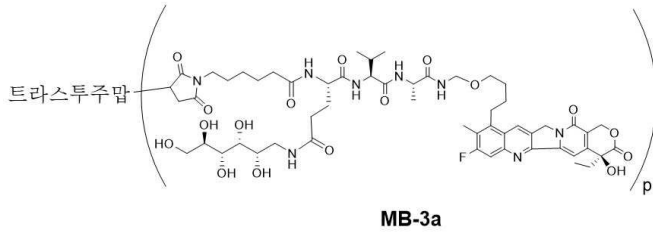
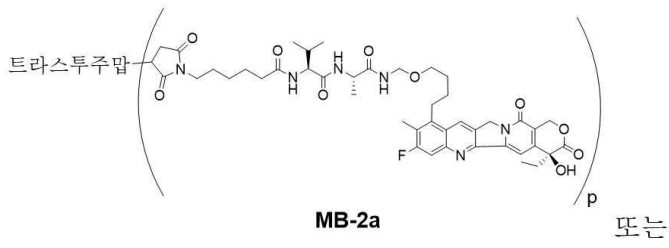
청구항 31

제30항에 있어서, 화합물은 하기 구조 중 하나, 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염인, 화합물:



청구항 32

제1항 및 제30항 또는 제31항 중 어느 한 항에 있어서, 화합물은 하기 구조 중 하나, 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염인, 화합물:



(식 중 p 는 약 4 내지 8, 또는 7 내지 8임).

청구항 33

제30항 내지 제32항 중 어느 한 항에 있어서, p 는 약 7 내지 8인, 화합물.

청구항 34

제30항 내지 제33항 중 어느 한 항에 있어서, p 는 8인, 화합물.

청구항 35

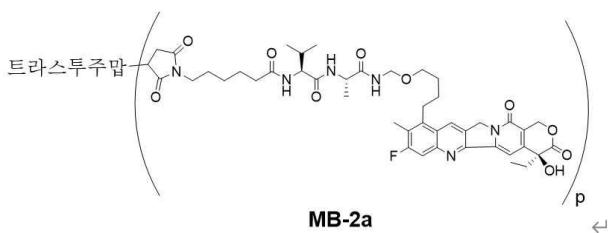
제1항 내지 제34항 중 어느 한 항의 화합물 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염을 포함하는, 약학적 조성물.

청구항 36

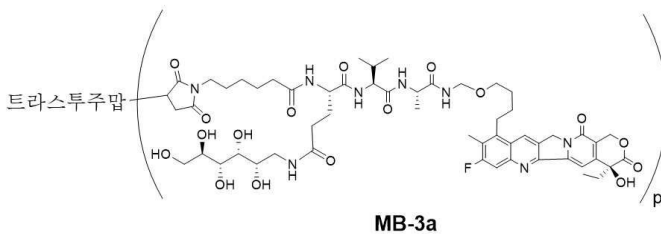
암을 치료하는 방법으로서, 제1항 내지 제34항 중 어느 한 항의 화합물 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염을 필요로 하는 대상체에게 투여하는 단계를 포함하는, 방법.

청구항 37

제36항에 있어서, 상기 화합물은:



또는←



또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염인, 화합물.

청구항 38

제37항에 있어서, p는 약 4 내지 8, 또는 7 내지 8인, 방법.

청구항 39

제38항에 있어서, p는 약 7 내지 8인, 방법.

청구항 40

제39항에 있어서, p는 8인, 방법.

청구항 41

제36항 내지 제40항 중 어느 한 항에 있어서, 암은, 폐암, 요로상피암, 결장암, 전립선암, 난소암, 췌장암, 유방암, 방광암, 위암, 위장 기질 종양, 자궁 경부암, 식도암, 편평 세포 암종, 복막암, 간암, 간세포암, 대장암, 직장암, 결장암, 자궁내막암, 자궁암, 침샘암, 신장암, 외음부암, 갑상선암, 음경암, 백혈병, 악성 림프종, 형질세포종, 골수종, 또는 육종인, 방법.

청구항 42

제36항 내지 제41항 중 어느 한 항에 있어서, 암은 유방암인, 방법.

청구항 43

제36항 내지 제41항 중 어느 한 항에 있어서, 암은 위암인, 방법.

청구항 44

제36항 내지 제41항 중 어느 한 항에 있어서, 암은 폐암인, 방법.

청구항 45

제44항에 있어서, 폐암은 비소세포 폐암인, 방법.

청구항 46

제36항 내지 제41항 중 어느 한 항에 있어서, 암은 난소암인, 방법.

청구항 47

제36항 내지 제46항 중 어느 한 항에 있어서, 암은 전이성인, 방법.

청구항 48

제36항 내지 제46항 중 어느 한 항에 있어서, 암은 낮은 Her2-발현을 특징으로 하는, 방법.

청구항 49

제36항 내지 제46항 중 어느 한 항에 있어서, 암은 중등도의 Her2-발현을 특징으로 하는, 방법.

청구항 50

제36항 내지 제46항 중 어느 한 항에 있어서, 암은 높은 Her2-발현을 특징으로 하는, 방법.

청구항 51

제36항 내지 제50항 중 어느 한 항에 있어서, 암은 트라스투주맙 내성인, 방법.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 관련 출원에 대한 상호 참조

[0002] 본 출원은 2021년 2월 25일자로 출원된 미국 특허 가출원 제63/153,530호의 이익을 주장하며, 그 전체는 참조로서 본원에 통합된다.

[0003] 서열 목록

[0004] 본 출원은 ASCII 형식으로 전자 제출된 서열 목록을 포함하고 그 전체는 본원에 참조로서 포함된다. 2022년 2월 17일에 생성된 전술한 ASCII 사본의 명칭은 MDB-002WO_SL.txt이며 그 크기는 10,140바이트이다.

배경 기술

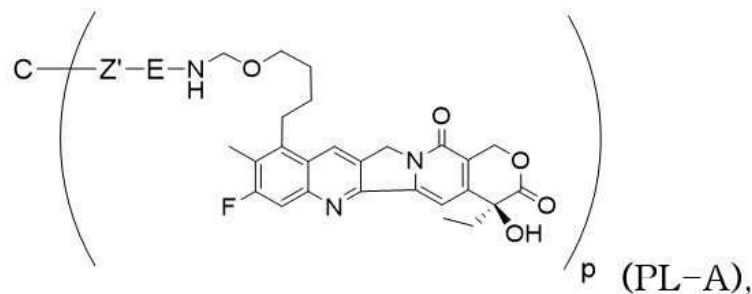
[0005] HER2(인간 표피 성장 인자 수용체 2)는 유방암과 같은 암의 발생에 있어서의 그 역할 때문에 중요한 치료 표적으로 대두되었다. 예를 들어, HER2 유전자의 과발현은 유방암 사례의 최대 25 내지 30%에서 발견될 뿐만 아니라, 일부 위암 및 위식도암 사례에서도 발견된다. HER2의 과발현은 보다 빠른 성장 속도 및 더 불량한 예후와 연관될 수 있으므로, 새롭고 효과적인 항-HER2 치료제에 대한 필요성이 존재한다.

발명의 내용

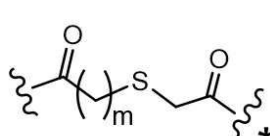
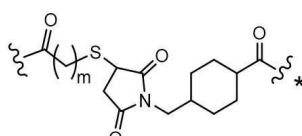
[0006] 항체 약물 접합체(ADC)는 새로운 부류의 치료제로서 상당한 관심을 끌어들였다. 예를 들어, ADC는 종양 세포를 표적화하여 세포독성제를 전달하기 위해 단클론 항체(mAb)를 이용함으로써, 종래의 비표적화 모드로는 사용할 수 없는 세포독성이 강한 약물을 사용할 수 있게 한다. 일반적으로 링커를 통해 세포독성제를 항체에 부착하는 것을 특징으로 하는 ADC를 설계하는 것은, 약물을 링커에 부착하기 위한 약물의 접합 핸들의 존재 및 조건부로 안정한 모드에서 약물을 항체에 부착하기 위한 링커 기술을 포함하는, 다양한 인자에 대한 고려를 수반한다. 비최적 설계는 ADC 효능 감소, 접합체의 면역학적 특이성 부족, 접합체로부터 약물의 비특이적 방출로 인한 독성 증가를 초래할 수 있다.

[0007] 본 발명은, 적어도 부분적으로는, 치료적 사용을 위한 독소로서 캄프토테신 유도체에 접합된 항-HER2 ADC의 항종양 치료 효과에 기초한다. 본원에 기술된 ADC는 암과 같은 세포 증식성 질환을 치료하는 데 유용하다.

[0008] 일 양태에서, 본 발명은 다음의 식 PL-A의 구조를 갖는 화합물,



[0009] 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염을 특징으로 하며, 식 중,
 [0010] E는 2 내지 8개의 아미노산을 포함하는 펩티드이고; 여기에서, E는 하나 이상의 폴리올로 선택적으로 치환되고; 펩티드의 N 말단은 Z'에 공유 부착되며;

[0011] Z'은 $-C(=O)-L^1-Y'$, 또는  또는  이고; 식 중 m은 1 내지 10의 정수를 나타내고, *는 전술한 C에 공유 연결된 부위를 나타내며;

[0012] L¹은 $-(C_1-C_{10} \text{ 알킬렌})-$, $-\text{CH}_2\text{CH}_2(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_n\text{N}(\text{R}_1)\text{C}(=\text{O})-\text{L}^2-*$, 또는 $-\text{CH}_2(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_n\text{N}(\text{R}_1)\text{C}(=\text{O})-\text{L}^2-*$ 이고; 식 중 n은 1 내지 10의 정수를 나타내고; *는 Y'에 공유 연결된 부위를 나타내며;

[0013] L²는 $-(C_1-C_{10} \text{ 알킬렌})-$ 이고; R₁은 -H 또는 -CH₃이며;

- [0015] Y'은 세포 결합체 C 상에 존재하는 반응성 친핵성 기와 친전자성 기의 반응에 의해 형성된 기이며;
- [0016] p는 약 2 내지 10인 평균 수인 약물 대 항체 비율(DAR)이며;
- [0017] C는 Her2를 표적화하는 결합체로서:
- [0018] 서열번호 1에 대해 적어도 약 80%의 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하는 중쇄; 및
- [0019] 서열번호 2에 대해 적어도 약 80%의 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하는 경쇄를 포함한다.
- [0020] 구현예에서, C는 결합체로서: 또는 95%의 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하는 경쇄를 포함한다.
- [0021] 구현예에서, C는 결합체로서:
- [0022] 서열번호 1의 중쇄 아미노산 서열; 및
- [0023] 서열번호 2의 경쇄 아미노산 서열을 포함한다.
- [0024] 식 (PL-A)에 따른 예시적인 화합물은 본원에 기
- [0025] 서열번호 1에 대해 적어도 약 85%, 90%, 또는 95%의 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하는 중쇄; 및
- [0026] 서열번호 2에 대해 적어도 약 85%, 90%, 술된 바와 같은 MB-2a 및 MB-3a(트라스투주맙 메디테칸)를 포함한다.
- [0027] 구현예에서, C는 항체 또는 이의 항원 결합 단편인 결합체이다.
- [0028] 구현예에서, C는 트라스투주맙(Herceptin), 트라스투주맙-dkst(Ogivri), 트라스투주맙-pkrb(Herzuma), 트라스투주맙-dtb(Ontruzant), 트라스투주맙-qyyp(Trazimera), 또는 트라스투주맙-anns(Kanjinti)인 결합체이다.
- [0029] 구현예에서, L¹은 -(C₁-C₁₀ 알킬렌)-이다.

[0030] 구현예에서, L¹은 -CH₂CH₂(OCH₂CH₂)_nN(R₁)C(=O)-L²-* 또는 -CH₂(OCH₂CH₂)_n(R₁)C(=O)-L²-*이고, 식 중 n은 1 내지 10의 정수를 나타내고, *는 Y'에 공유 연결된 부위를 나타낸다.

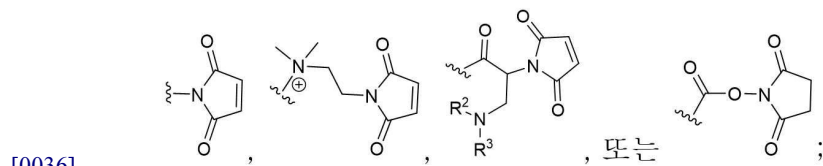
[0031] 구현예에서, L¹은 -CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂-, -CH₂CH₂-, -CH₂-,

[0032] -CH₂CH₂OCH₂CH₂OCH₂CH₂NHC(=O)CH₂CH₂-* 또는

[0033] -CH₂OCH₂CH₂OCH₂CH₂NHC(=O)CH₂CH₂-*이고, 식 중 *는 Y'에 공유 연결된 부위를 나타낸다.

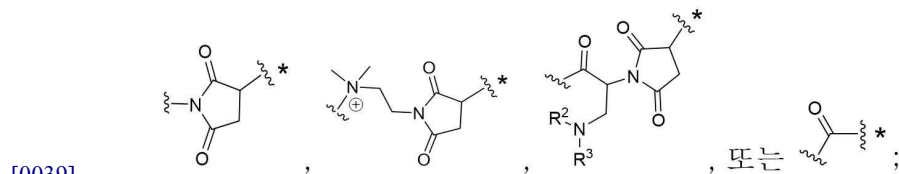
[0034] 구현예에서, Y'은 마이클(Michael) 수용체 기, 숙신이미드, 에폭시드, 또는 할로겐으로부터 형성된다.

[0035] 구현예에서, Y'은 다음으로부터 형성되고



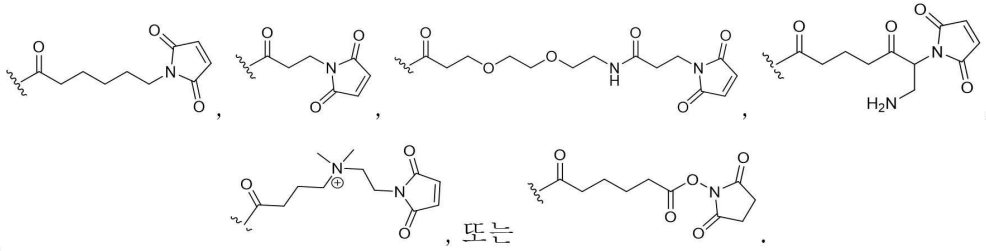
[0037] 식 중 R² 및 R³은 각각 독립적으로 -H 또는 C₁-C₃ 알킬이다.

[0038] 구현예에서, Y'은 다음과 같고,



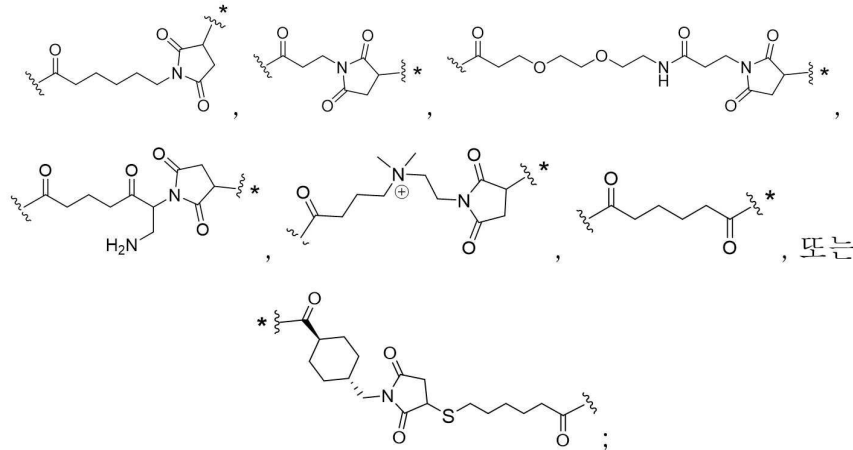
[0040] 식 중, R² 및 R³은 각각 독립적으로 -H 또는 C₁-C₃ 알킬이고, *는 전술한 C에 공유 연결된 부위를 나타낸다.

[0041] 구현예에서, Z'은 다음으로부터 형성된다:



[0042]

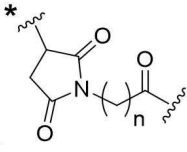
[0043] 구현예에서, Z'은 다음과 같고:



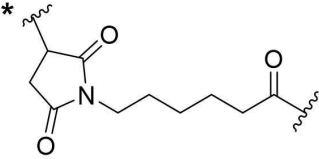
[0044]

[0045] 식 중 *는 C에 공유 결합되는 부위를 나타낸다.

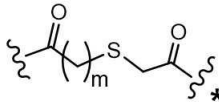
[0046]

구현예에서, Z'은  이고; 식 중 *는 C에 대한 공유 부착 지점을 나타내고, n은 2 내지 10의 정수이다.

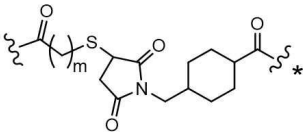
[0047]

구현예에서, Z'은  이고; 식 중 *는 C에 대한 공유 부착 지점을 나타낸다.

[0048]

구현예에서, Z'은  이고, *는 전술한 C에 공유 연결된 부위를 나타낸다. 구현예에서, m은 1이다. 구현예에서 m은 2이다. 구현예에서 m은 3이다. 구현예에서 m은 4이다. 구현예에서 m은 5이다. 구현예에서 m은 6이다. 구현예에서 m은 7이다. 구현예에서 m은 8이다. 구현예에서 m은 9이다. 구현예에서 m은 10이다.

[0049]

구현예에서, Z'은  이고, *는 전술한 C에 공유 연결된 부위를 나타낸다. 구현예에서, m은 1이다. 구현예에서 m은 2이다. 구현예에서 m은 3이다. 구현예에서 m은 4이다. 구현예에서 m은 5이다. 구현예에서 m은 6이다. 구현예에서 m은 7이다. 구현예에서 m은 8이다. 구현예에서 m은 9이다. 구현예에서 m은 10이다.

[0050] 구현예에서, **E**는 2, 3, 4 또는 5개의 아미노산으로 이루어진 펩티드이다.

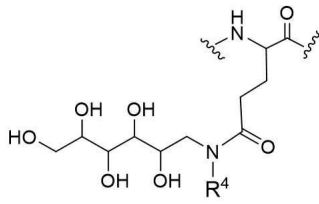
[0051] 구현예에서, **E**는 2, 3, 또는 4개의 아미노산으로 이루어진 펩티드이다.

[0052] 구현예에서, 전술한 펩티드 내의 각각의 아미노산은 L 아미노산이거나, 전술한 펩티드 내의 적어도 하나의 아미노산은 D 아미노산이다.

[0053] 구현예에서, **E**는 글리신, 알라닌, 발린, 글루타민, 글루탐산, 페닐알라닌, 및 류신으로부터 선택된 하나 이상의 아미노산을 포함하되, 상기 글루타민 또는 글루탐산은 폴리올로 선택적으로 치환된다.

[0054] 구현예에서, **E**는 글리신, 알라닌, 발린, 글루타민, 글루탐산, 페닐알라닌, 및 류신으로부터 선택된 아미노산을 포함하되, 상기 글루타민 또는 글루탐산은 폴리올로 선택적으로 치환된다.

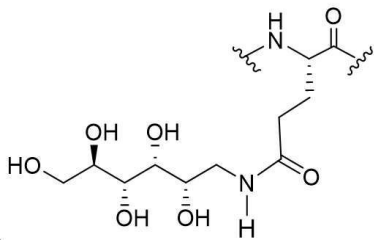
[0055] 구현예에서, **E**는 다음의 구조를 갖는 아미노산을 포함하고,



[0056]

[0057] 식 중, R^4 는 -H 또는 C_1-C_6 알킬이다.

[0058] 구현예에서, **E**는 다음의 구조를 갖는 아미노산을 포함한다:



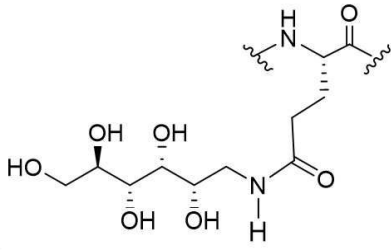
[0059]

[0060] 구현예에서, **E**는, -Ala-Val-*, -Val-Ala-*, -Gly-Gly-*, -Val-Cit-*, -Cit-Val-*, -Leu-Ala-*, -Ala-Leu-*, -Leu-Cit-*, -Cit-Leu-*, -Leu-Ala-*, -Ala-Leu-*, -Lys-Lys-*, -Ala-Lys-*, -Lys-Ala-*, -Val-Lys-*, -Lys-Val-*, -Tyr-Arg-*, -Arg-Tyr-*, -Arg-Arg-*, -Ala-Ala-*, -Phe-Lys-*, -Lys-Phe-*, -Thr-Thr-*, -Thr-Met-*, -Met-Thr-*, -Met-Tyr-*, -Tyr-Met-*, -Phe-Gln-*, -Gln-Phe-*, -Gly-Ser-*, -Leu-Gln-*, -Gln-Leu-*, -Ser-Ala-*, -Ser-Gly-*, -Val-Thr-*, -Thr-Val-*, -Val-Gln-*, -Ser-Val-*, -Val-Ser-*, -Ala-Met-*, -Met-Ala-*, -Val-Arg-*, -Arg-Val-*, -Phe-Ala-*, -Ala-Phe-*, -Cit-Val-*, -Gln-Val-*, -Phe-Arg-*, -Arg-Phe-*, -Ala-Ala-Ala-*, -Gly-Gly-Gly-*, -Ala-Val-Ala-*, -Gly-Val-Gly-*, -Ala-Val-Gly-*, -Gly-Phe-Lys-*, -Lys-Phe-Gly-*, -Leu-Ala-Leu-*, -Val-Ala-Leu-*, -Leu-Ala-Val-*, -Val-Ala-Val-*, -Ala-Val-Ala-Gly-* (서열번호 10), -Gly-Phe-Gly-Gly-* (서열번호 11), -Gly-Gly-Phe-Gly-* (서열번호 12), -Ala-Val-Gly-Gly-* (서열번호 13), -Ala-Ala-Ala-Ala-* (서열번호 14), -Ala-Val-Ala-Ala-* (서열번호 15), -Ala-Leu-Ala-Leu-* (서열번호 16), -Leu-Ala-Leu-Ala-* (서열번호 17), -Gly-Phe-Leu-Gly-* (서열번호 18) 및 -Gly-Leu-Phe-Gly-* (서열번호 19)로 이루어진 군으로부터 선택되며, 식 중 *는 **Z'**에 공유 부착된 펩티드의 N-말단을 나타낸다.

[0061] 구현예에서, **E**는, -L-Ala-D-Val-*, -L-Val-D-Ala-*, -L-Val-D-Lys-*, -L-Val-D-Arg-*, -L-Val-D-Cit-*,

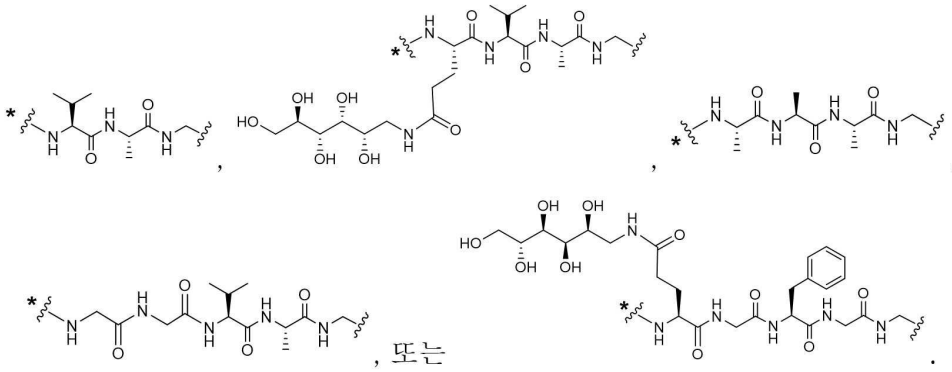
[0062] -L-Val-D-Arg-*, -L-Val-D-Cit-*, -L-Val-D-Lys-*, -L-Val-D-Arg-*, -L-Arg-D-Arg-*, -L-Ala-D-Ala-*, -L-Ala-D-Lys-*, -L-Ala-D-Arg-*, -L-Ala-D-Ala-L-Ala-*, -L-Ala-D-Val-L-Ala-*, -L-Ala-D-Ala-Gly-*, and -L-Ala-D-Val-Gly-*로 이루어진 군으로부터 선택되며, 식 중 *는 **Z'**에 공유 부착된 펩티드의 N-말단을 나타낸다.

[0063] 구현예에서, **E**는 -(L-Val)-(L-Ala)-를 포함한다. 구현예에서, **E**는 다음의 구조를 갖는 아미노산을 추가로 포함한다:



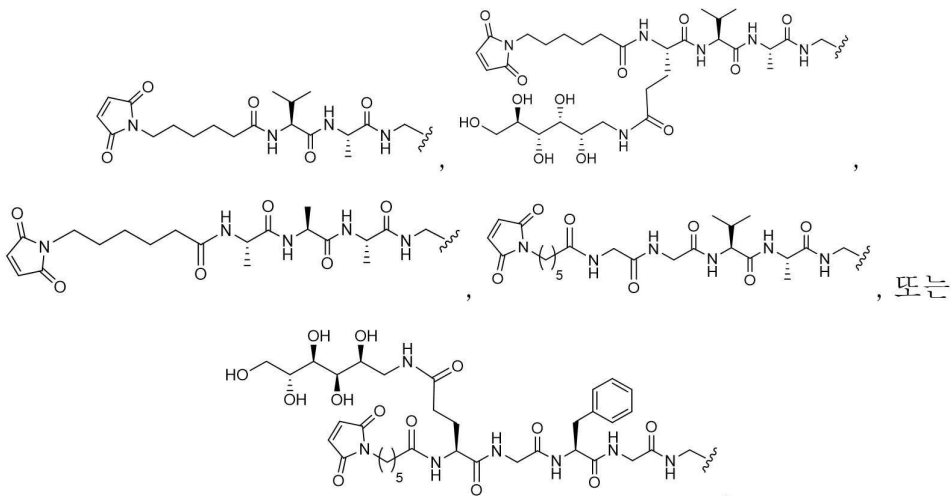
[0064]

[0065] 구현예에서, ---E-N--- 은 다음 구조 중 하나를 가지며, 식 중 *는 Z'에 공유 부착된 펩티드의 N-말단을 나타낸다:



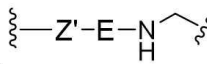
[0066]

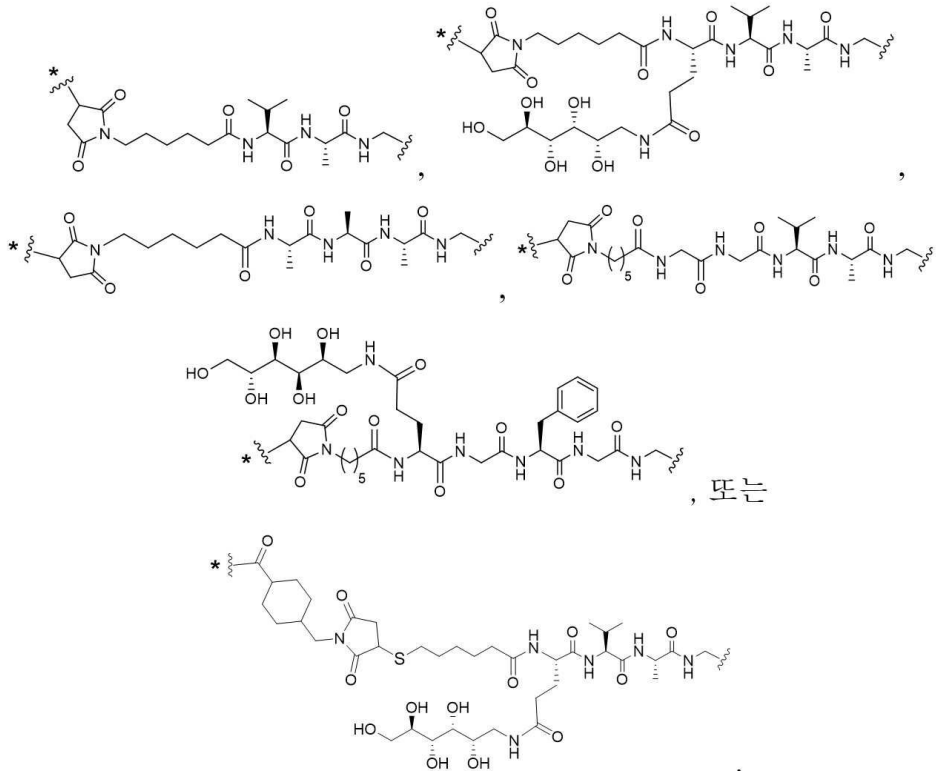
[0067] 구현예에서, Z'---E-N--- 은 다음 구조 중 하나로부터 형성된다:



[0068]

[0069]

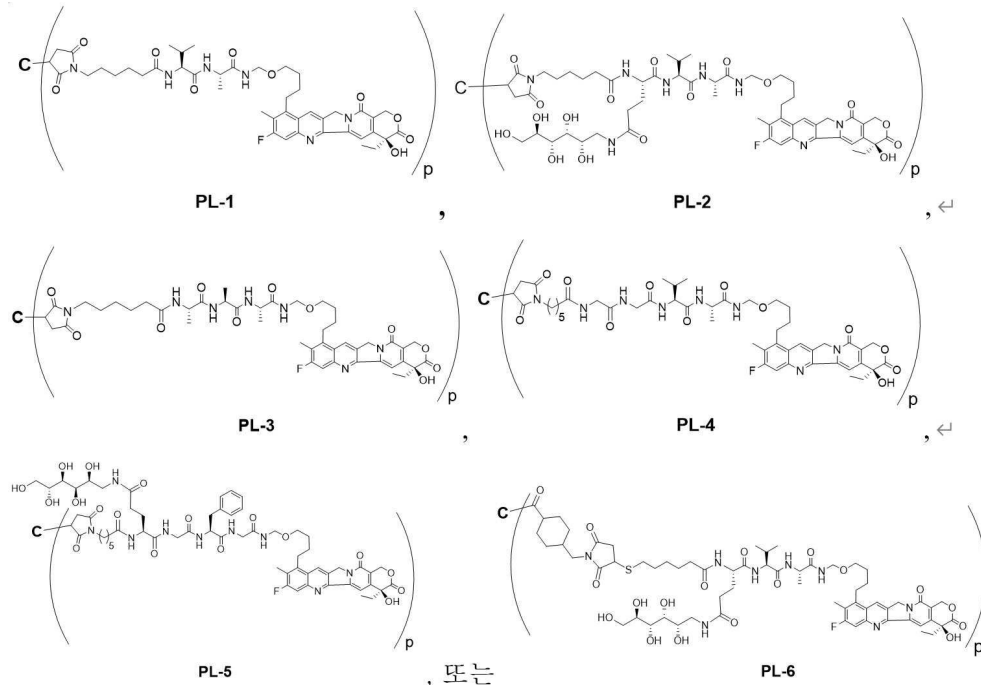
구현예에서,  은 다음 구조 중 하나이고, 식 중 *는 C에 대한 부착점을 나타낸다:



[0070]

[0071]

구현예에서, 화합물은 다음 구조 중 하나이거나, 이의 약학적으로 허용가능한 염이며:

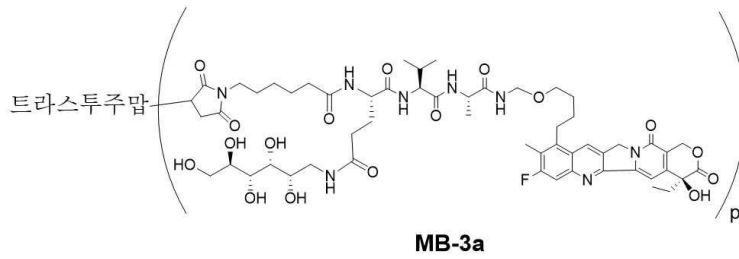
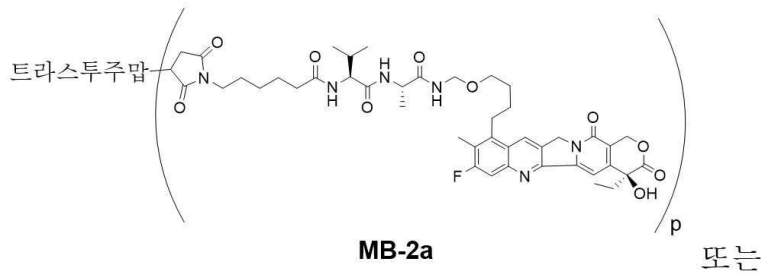


[0072]

[0073]

식 중 p는 약 2 내지 10, 4 내지 8 또는 7 내지 8이다.

[0074] 구현예에서, 화합물은 다음 구조 중 하나이거나, 이의 약학적으로 허용가능한 염이며:



[0075]

[0076] 식 중 **p**는 약 4 내지 8, 또는 7 내지 8이다.

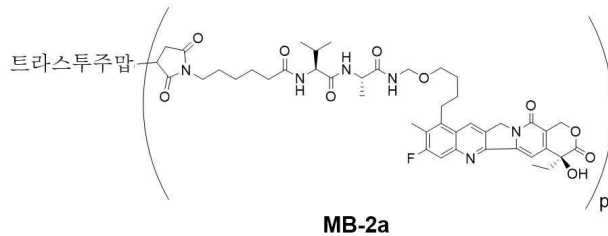
[0077] 구현예에서, **p**는 약 7 내지 8이다.

[0078] 구현예에서, **p**는 8이다.

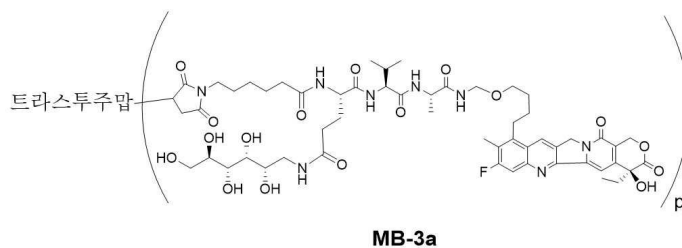
[0079] 또 다른 양태에서, 본 발명은 본원에 기술된 임의의 화합물 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염을 포함하는 약학적 조성물을 포함한다.

[0080] 또 다른 양태에서, 본 발명은 암을 치료하는 방법을 포함하며, 방법은 본원에 기술된 임의의 화합물 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염을 대상체에게 투여하는 단계를 포함한다.

[0081] 구현예에서, 전술한 화합물은,



또는



[0082]

[0083] 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염이다.

[0084] 구현예에서, **p**는 약 4 내지 8, 또는 7 내지 8이다.

[0085] 구현예에서, **p**는 약 7 내지 8이다.

[0086] 구현예에서, **p**는 8이다.

[0087] 구현예에서, 암은, 폐암, 요로상피암, 결장암, 전립선암, 난소암, 췌장암, 유방암, 방광암, 위암, 위장 기질 중

양, 자궁 경부암, 식도암, 편평 세포 암종, 복막암, 간암, 간세포암, 대장암, 직장암, 결장암, 자궁내막암, 자궁암, 침샘암, 신장암, 외음부암, 갑상선암, 음경암, 백혈병, 악성 림프종, 형질세포종, 골수종, 또는 육종이다.

- [0088] 일부 구현예에서, 암은 유방암이다.
- [0089] 구현예에서, 암은 위암이다.
- [0090] 일부 구현예에서, 암은 폐암(예를 들어, 비소세포 폐암)이다.
- [0091] 구현예에서, 암은 난소암이다.
- [0092] 구현예에서, 암은 전이성이다.
- [0093] 구현예에서, 암은 낮은 HER2-발현을 특징으로 한다.
- [0094] 구현예에서, 암은 중등도의 HER2-발현을 특징으로 한다.
- [0095] 구현예에서, 암은 높은 HER2-발현을 특징으로 한다.
- [0096] 구현예에서, 암은 트라스투주맙 내성이다.

도면의 간단한 설명

[0097] **도 1a-1f**는 NCI-N87 세포주(**도 1a**); JIMT-1 세포주(**도 1b**); MDA-MB-468 세포주(**도 1c**); SK-OV-3 세포주(**도 1d**); SK-Br-3 세포주(**도 1e**); 및 MCF-7 세포주(**도 1f**)에서 ADC 대사물의 시험관 내 세포 성장 억제 활성의 예시적인 결과를 보여준다. DXd는 세포에서 DS-8201a(Enhertu)의 대사물이고, **MB-1**은 본원에 기술된 특정 ADC의 대사물이다.

도 2a-2c는 MB-2a(**도 2a**); MB-3a(**도 2b**) 및 DS-8201a(Enhertu)(**도 2c**)에서 ADC의 HIC-HPLC를 도시한다.

도 3a-3d는 높은 Her2 발현 세포주 NCI-N87(**도 3a**); 트라스투주맙 차단을 갖는 NCI-N87(**도 3b**); 중등도의 Her2-발현을 가지며 트라스투주맙-내성 세포주인 JIMT-1(**도 3c**); 및 Her2 음성 세포주 MDA-MB-468(**도 3d**)에서 ADC의 시험관 내 세포 성장 억제 활성의 예시적인 결과를 보여준다.

도 4는 NCI-N87 CDX 모델에서 항체 약물 접합체(ADC)의 종양 성장 억제 효과를 도시한 것이다. MB-2a 및 MB-3a는 본 식에 포함되는 ADC이며, 이는 비히클 대조군, 트라스투주맙 및 ADC DS-8201a(Enhertu)와 함께 연구하였다. 본 도면에 도시된 바와 같이, MB-2a(1 mg/kg 및 4 mg/kg 투여량) 및 MB-3a(1 mg/kg 및 4 mg/kg 투여량)는 강력한 항종양 효과를 나타냈다. 비교를 위해 DS-8201a(Enhertu)를 연구에 포함시켰다.

도 5는 JIMT-1 CDX 모델에서 항체 약물 접합체(ADC)의 종양 성장 억제 효과를 도시한 것이다. 이 연구에서, 연구된 MB-2a 및 MB-3a(트라스투주맙 메디테칸)의 3가지 투여량 모두가 유의한 항종양 효과를 나타냈다. 비교를 위해 DS-8201a(Enhertu)를 연구에 포함시켰다.

도 6은 **도 5**로부터의 데이터 선택을 도시한 것으로서, MB-2a 및 MB-3a의 i.v. 단일 투여량 2.5 mg/kg를 사용했을 때의 항종양 효과를 보여준다.

도 7은 **도 5**로부터의 데이터 선택을 도시한 것으로서, MB-2a 및 MB-3a의 i.v. 단일 투여량 5 mg/kg를 사용했을 때의 항종양 효과를 보여준다.

도 8은 **도 5**로부터의 데이터 선택을 도시한 것으로서, MB-2a 및 MB-3a의 i.v. 단일 투여량 10 mg/kg를 사용했을 때의 항종양 효과를 보여준다.

도 9는 MB-3a, DS-8201a 및 트라스투주맙의 친수성 비교를 보여준다.

도 10은 MB-3a, DS-8201a, 및 트라스투주맙의 항원 결합 친화도를 보여준다.

도 11은 MB-3a, DS-8201a 및 T-DM1의 방관자 효과를 보여준다. 각각의 시험된 화합물에 대해, 그래프는 SK-BR-3 및 DAN-G-Luc 공배양에서의 Dan-G-Luc 생존력(좌측) 및 DAN-G-Luc 세포 단독에서의 Dan-G-Luc 생존력(우측)을 보여준다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0098] 본 발명은 링커 구조 모이어티를 통해 항-HER2 항체에 접합된 항종양 약물을 포함하는 항체-약물 접합체에 관한 것이다. 이러한 화합물은 HER2 과발현을 특징으로 할 수 있고/있거나 전이성 및/또는 트라스투주맙 내성일 수 있는 암(예를 들어, 유방암 및 위암)의 치료에 특히 유용할 수 있다.
- [0099] **정의**
- [0100] 달리 언급되지 않는 한, 본원에서 사용되는 다음의 용어 및 문구는 다음의 의미를 갖도록 의도된다. 상표명이 본원에서 사용될 때, 문맥에 의해 달리 명시되지 않는 한, 상표명은 상표명 완제의약품의 제형, 복제약(generic drug), 및 활성 약학적 성분(들)을 포함한다.
- [0101] 본원에서 사용되는 바와 같이, 용어 "**항체**"는 특정 항원에 특이적으로 결합하는 제제를 지칭한다. 일부 구현예에서, 상기 용어는 특이적 결합을 부여하기에 충분한 면역글로불린 구조 요소를 포함하는 임의의 폴리펩티드 또는 폴리펩티드 복합체를 포함한다. 예시적인 항체는 단클론 항체 또는 다클론 항체를 포함하지만, 이에 한정되지는 않는다. 일부 구현예에서, 항체는 마우스, 토끼, 영장류, 또는 인간 항체의 특징인 하나 이상의 불변 영역 서열을 포함할 수 있다. 일부 구현예에서, 항체는 당업계에 알려진 것과 같은 인간화, 영장류화, 키메라 등인 하나 이상의 서열 요소를 포함할 수 있다. 많은 구현예에서, 용어 "항체"는 대안을 제시할 때, 항체의 구조적 및 기능적 특징을 이용하기 위한 당업계에 알려져 있거나 당업계에서 개발된 작제물 또는 포맷 중 하나 이상을 지칭하도록 사용된다. 예를 들어, 구현예에서, 본 발명에 따라 사용되는 항체는 다음으로부터 선택되지만 이들로 한정되지 않는 포맷이다: 온전한 IgA, IgG, IgE, 또는 IgM 항체; 이중특이적 항체 또는 다중특이적 항체(예를 들어, Zybodies[®] 등); Fab 단편, Fab' 단편, F(ab')₂ 단편, Fd' 단편, Fd 단편, 및 단리된 CDR 또는 이의 세트와 같은 항체 단편; 단쇄 Fv; 폴리펩티드-Fc 융합물; 단일 도메인 항체(예: 상어 단일 도메인 항체, 예컨대 IgNAR 또는 이의 단편); 카멜로이드 항체; 마스킹된 항체(예를 들어, Probodyes[®]); 소형 모듈형 면역치료제 (Small Modular Immunopharmaceuticals, "SMIPs[®]"); 단쇄 또는 탠덤 디아바디(TandAb[®]); VHhs; Anticalins[®]; Nanobody[®] 미니바디; BiTE[®]; 안키린 반복 단백질 또는 DARPINs[®]; Avimers[®]; DART; TCR-유사 항체; Adnectins[®]; Affilins[®]; Trans-bodies[®]; Affibodies[®]; TrimerX[®]; 마이크로단백질; Fynomers[®], Centyrins[®]; 및 KALBITOR[®]. 일부 구현예에서, 항체는 자연적으로 생산됐다면 가질 수 있었던 공유 변형(예를 들어, 글리칸의 부착)이 결합될 수 있다. 일부 구현예에서, 항체는 공유 변형(예를 들어, 글리칸, 페이로드[예를 들어, 검출 가능한 모이어티, 치료 모이어티, 촉매 모이어티 등], 또는 다른 펜던트기[예를 들어, 폴리-에틸렌 글리콜 등]의 부착)을 함유할 수 있다. 많은 구현예에서, 항체는 당업자에 의해 상보성 결정 영역(CDR)으로서 인식되는 하나 이상의 구조적 요소를 포함하는 아미노산 서열을 가진 폴리펩티드이거나 이를 포함하고; 일부 구현예에서, 항체는 기준 항체에서 발견되는 것과 실질적으로 동일한 적어도 하나의 CDR(예를 들어, 적어도 하나의 중쇄 CDR 및/또는 적어도 하나의 경쇄 CDR)을 포함하는 아미노산 서열을 가진 폴리펩티드이거나 이를 포함한다. 일부 구현예에서, 항체 제제는 당업자에 의해 면역글로불린 가변 도메인으로서 인식되는 구조적 요소를 포함하는 아미노산 서열을 가진 폴리펩티드이거나 이를 포함한다. 일부 구현예에서, 항체 제제는 면역글로불린-결합 도메인과 상동이거나 대부분 상동인 결합 도메인을 갖는 폴리펩티드 단백질이다.
- [0102] 본원에서 사용되는 바와 같이, "**단클론 항체(monoclonal antibody)**"는 실질적으로 동종 항체(homogeneous antibody)의 모집단으로부터 획득된 항체를 지칭하며, 모집단을 포함하는 개별 항체들은 소량으로 존재할 수 있는 가능한 자연 발생 돌연변이를 제외하고는 동일하다. 단클론 항체는 고도로 특이적이며, 단일 항원 부위에 대해 유도된다. 수식어로서의 "단클론성(monoclonal)"은 실질적으로 동종 항체의 모집단으로부터 획득되는 항체의 특성을 나타내며, 항체가 임의의 특정 방법에 의해 생산되어야 하는 것으로 해석되지는 않아야 한다.
- [0103] 본원에서 사용되는 바와 같이, 용어 "**인간 항체**"는 인간 면역글로불린 서열로부터 생성(또는 조립)된 가변 및 불변 영역을 갖는 항체를 포함하도록 의도된다. 일부 구현예에서, 항체(또는 항체 성분)는, 이들의 아미노산 서열이 인간 생식선 면역글로불린 서열에 의해 암호화되지 않은 잔기 또는 요소를 예를 들어 하나 이상의 CDR 및 특히 CDR3에서 포함하더라도(예를 들어, 시험관 내 무작위 돌연변이 유발 또는 부위특이적 돌연변이 유발에 의해서, 또는 생체 내 체세포 돌연변이에 의해 (원래) 도입될 수 있었던 서열 변이를 포함하더라도), "인간"으로서 간주될 수 있다.
- [0104] 당업계에 공지된 바와 같이, 용어 "**인간화**"는, 일반적으로 비인간 종(예를 들어 마우스)에서 생성된 기준 항체 유래의 V_H 및 V_L 영역 서열을 포함하되, 기준 서열에 비해 이들 서열을 더 "인간과 유사하게", 즉 인간 생식선 서열과 더 유사하게 만들도록 의도된 변형도 이들 서열에 포함하는 아미노산 서열을 갖는 항체(또는 항체 성

분)를 지칭하도록 사용된다. 일부 구현예에서, "인간화" 항체(또는 항체 성분)는 관심 항원에 면역 특이적으로 결합하고, 인간 항체의 것과 실질적으로 같은 아미노산 서열을 갖는 프레임워크(FR) 영역, 및 비인간 항체의 것과 실질적으로 같은 아미노산 서열을 갖는 상보적 결정 영역(CDR)을 갖는 것이다. 인간화 항체는 CDR 영역의 전부 또는 실질적으로 전부가 비인간 면역글로불린(즉, 공여자 면역글로불린)의 CDR 영역의 전부 또는 실질적으로 전부와 상응하고 프레임워크 영역의 전부 또는 실질적으로 전부가 인간 면역글로불린 컨센서스 서열의 프레임워크 영역의 전부 또는 실질적으로 전부와 상응하는 적어도 하나, 일반적으로는 2개의 가변 도메인(Fab, Fab', F(ab')₂, FabC, Fv)의 모두를 포함한다. 일부 구현예에서, 인간화 항체는 또한, 면역글로불린 불변 영역(Fc)의 적어도 일부분, 일반적으로는 인간 면역글로불린 불변 영역의 적어도 일부분을 포함한다. 일부 구현예에서, 인간화 항체는 경쇄뿐만 아니라 적어도 중쇄의 가변 도메인도 함유한다. 항체는 또한, 중쇄 불변 영역의 CH₁, 힌지, CH₂, CH₃, 및 선택적으로 CH₄ 영역을 포함할 수 있다. 일부 구현예에서, 인간화 항체는 인간화 V_L 영역만을 함유한다. 일부 구현예에서, 인간화 항체는 인간화 V_H 영역만을 함유한다. 일부 소정의 구현예에서, 인간화 항체는 인간화 V_H 및 V_L 영역을 함유한다.

[0105] "온전한 항체"는, 항체 부류별로 적절한 경우에, 항원 결합 가변 영역뿐만 아니라 경쇄 불변 도메인(C_L) 및 중쇄 불변 도메인, C_{H1}, C_{H2}, C_{H3} and C_{H4} 또한 포함하는 항체이다. 불변 도메인은 천연 서열 불변 도메인(예를 들어, 인간 천연 서열 불변 도메인) 또는 이의 아미노산 서열 변이체일 수 있다.

[0106] "항체 단편"은 온전한 항체의 일부분으로서, 온전한 항체의 항원 결합 영역 또는 가변 영역을 포함하는 일부분을 포함한다. 항체 단편의 예는 Fab, Fab', F(ab')₂, 및 Fv 단편, 디아바디, 트리아바디, 테트라바디, 선형 항체, 단쇄 항체 분자, scFv, scFv-Fc, 항체 단편(들)으로부터 형성된 다중특이적 항체 단편, Fab 발현 라이브러리에 의해 생성된 단편(들), 또는 전술한 것 중 어느 하나의 에피토프 결합 단편으로서, 표적 항원(예를 들어 암세포 항원, 바이러스 항원, 또는 미생물 항원)에 면역특이적으로 결합하는 단편을 포함한다.

[0107] "항원"은 항체가 특이적으로 결합하는 엔티티이다.

[0108] 본원에서 사용되는 바와 같이, 용어 "**결합**"은 일반적으로 2개 이상의 엔티티 사이의 비공유 결합을 지칭한다는 것을 이해될 것이다. "직접" 결합은 엔티티들 또는 모이어티들 간의 물리적 접촉을 포함하며; 간접 결합은 하나 이상의 중간 엔티티와의 물리적 접촉에 의한 물리적 상호작용을 포함한다. 2개 이상의 엔티티들 간의 결합은 일반적으로 - 상호작용하는 엔티티 또는 모이어티가 단독으로 또는 더 복잡한 시스템의 맥락에서 연구되는 경우를 포함하여, 다양한 맥락 중 어느 하나에서 (예를 들어 담체 엔티티와 공유적으로 또는 달리 결합되는 동안) 평가되고/되거나 생물학적 시스템 또는 세포 내에서 평가될 수 있다. 일부 구현예에서, "결합"은 면역글로불린 분자와 면역글로불린이 특이적인 항원 사이에서 발생하는 유형의 비공유 상호작용을 지칭한다. 면역글로불린 결합 상호작용의 강도 또는 친화도는 상호 작용의 해리 상수(K_d)의 관점에서 표현될 수 있으며, 여기서 K_d가 작을수록 친화도는 더 크다. 선택된 폴리펩티드의 면역학적 결합 특성은 당업계에 잘 알려진 방법을 사용하여 정량화할 수 있다. 하나의 이러한 방법은 항원 결합 부위/항원 복합체 형성 및 해리의 속도를 측정하는 단계를 포함하며, 여기서 이들 속도는 복합체 파트너의 농도, 상호 작용의 친화도, 및 양 방향으로 속도에 동일한 영향을 미치는 기하학적 파라미터에 따라 달라진다. 따라서, "결합 속도 상수"(K_{on}) 및 "해리 속도 상수"(K_{off}) 둘 다는 농도, 및 결합과 해리의 실제 속도를 계산하여 결정될 수 있다. (Nature 361:186-87 (1993) 참조). K_{off}/K_{on}의 비율은 친화도와 무관한 모든 파라미터의 취소를 가능하게 하고, 해리 상수 K_d와 동일하다. (Davies 등의 문헌[(1990) Annual Rev Biochem. 59:439-473] 참조).

[0109] 용어 "**특이적 결합**" 및 "**특이적으로 결합하는**"은 항체 또는 항체 유도체가 다수의 다른 항원과 결합하지 않고 표적 항원의 상응하는 에피토프와 매우 선택적인 방식으로 결합하게 됨을 의미한다. 일반적으로, 항체 또는 항체 유도체는 적어도 약 1x10⁻⁷ M, 바람직하게는 10⁻⁸ M 내지 10⁻⁹ M, 10⁻¹⁰ M, 10⁻¹¹ M, 또는 10⁻¹² M의 친화도로 결합하고, 소정의 항원 또는 밀접하게 관련된 항원 이외의 비특이적 항원(예를 들어, BSA, 카제인)에 결합하기 위한 친화도보다 적어도 2배 더 큰 친화도로 소정의 항원에 결합한다. 용어 "**특이성**"은 세포 결합제(예를 들어 항체 또는 이의 단편과 같은 본원에 기술된 것과 같은 세포 결합제)가 주어진 표적 항원, 예를 들어 인간 표적 항원에 특이적으로 결합하는(예를 들어 표적 항원과 면역반응하는) 능력을 지칭한다.

[0110] 일반적으로, "**단백질**"은 폴리펩티드(즉, 펩티드 결합에 의해 서로 연결된 적어도 2개의 아미노산으로 이루어진 스트링)이다. 단백질은 아미노산 이외의 모이어티를 포함할 수 (예를 들어, 당단백질일 수) 있고/있거나 달리

가공되거나 변형될 수 있다. 당업자는 "단백질"이 (신호 서열의 여부와 상관없이) 세포에 의해 생산된 것과 같은 완전한 폴리펩티드 사슬일 수 있거나, 이의 기능적 부분일 수 있음을 이해할 것이다. 당업자는 단백질이, 예를 들어 하나 이상의 이황화 결합에 의해 연결되거나 다른 수단에 의해 결합된 둘 이상의 폴리펩티드 사슬을 때 때로 포함할 수 있다는 것을 추가로 이해할 것이다.

- [0111] 용어 "억제하는" 또는 "~의 억제"는 측정 가능한 양만큼 감소시키거나 완전히 방지하는 것을 의미한다.
- [0112] 용어 "실질적" 또는 "실질적으로"은 혼합물 또는 샘플의 대부분, 즉, 모집단의 >50%, 바람직하게는 모집단의 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 또는 99% 초과를 지칭한다.
- [0113] 용어 "세포독성 활성"은 약물 또는 캄프토테신 접합체, 캄프토테신 접합체의 세포내 대사산물의 세포 사멸 효과를 지칭한다. 세포독성 활성은, 세포의 절반이 생존하는 단위 부피당 농도(몰 또는 질량)인 IC₅₀ 값으로서 표현될 수 있다.
- [0114] 용어 "세포증식억제 활성"은 약물 또는 캄프토테신 접합체, 캄프토테신 접합체의 세포내 대사산물의 항증식 효과를 지칭한다.
- [0115] 본원에서 사용되는 용어 "세포 독성제"는 세포독성 활성을 가지며 세포의 파괴를 유발하는 물질을 지칭한다. 진술한 용어는 화학 요법제 및 독소, 예컨대 박테리아, 진균, 식물 또는 동물 기원의 소분자 독소 또는 효소 활성 독소 및 이들의 합성 유사체 및 유도체를 포함하도록 의도된다.
- [0116] 본원에서 사용되는 용어 "세포증식억제제"는 세포 성장 또는 증식을 포함하는, 세포의 기능을 억제하는 물질을 지칭한다. 세포증식억제제는 단백질 억제제와 같은 억제제, 예를 들어 효소 억제제를 포함한다. 세포증식억제제는 세포증식억제 활성을 갖는다.
- [0117] 용어 "암" 및 "암종"은 조절되지 않는 세포 성장을 전형적인 특징으로 하는 포유동물에서의 생리학적 병태 또는 장애를 지칭하거나 이를 기술한다. "종양"은 하나 이상의 암세포를 포함한다.
- [0118] 본원에서 사용되는 바와 같이, 용어 "환자" 또는 "대상체"는 본원에 기술된 화합물 또는 제공된 화합물이 본 발명에 따라 투여되는 임의의 유기체, 예를 들어 실험적, 진단적, 예방적 및/또는 치료적 목적을 위해 투여되는 임의의 유기체를 지칭한다. 일반적인 대상체는 동물을 포함한다. 용어 "동물"은 동물계의 임의의 구성원을 지칭한다. 일부 구현예에서, "동물"은 임의의 발달 단계에 있는 인간을 지칭한다. 일부 구현예에서, "동물"은 임의의 발달 단계에 있는 비인간 동물을 지칭한다. 소정의 구현예에서, 비인간 동물은 포유류(예: 설치류, 마우스, 랫트, 토끼, 원숭이, 개, 고양이, 양, 소, 영장류 및/또는 돼지)이다. 일부 구현예에서, 동물은 포유류, 조류, 파충류, 양서류, 어류, 곤충, 및/또는 벌레를 포함하되 이에 한정되지 않는다. 일부 구현예에서, 동물은 유전자 이식 동물, 유전자 조작 동물, 및/또는 클론일 수 있다. 구현예에서, 동물은 포유동물, 예컨대 마우스, 랫트, 토끼, 비인간 영장류, 및 인간; 곤충; 벌레 등이다. 구현예에서, 대상체는 인간이다. 일부 구현예에서, 대상체는 질환, 장애, 및/또는 병태(예: 암)를 앓고 있고/있거나 이에 쉽게 걸릴 수 있다. 본원에서 사용되는 바와 같이, "환자 모집단" 또는 "대상체 모집단"은 복수의 환자 또는 대상체를 지칭한다.
- [0119] 본원에서 사용되는 바와 같이, 용어 "정상"이 "개체" 또는 "대상체"를 변형시키는 데 사용될 때, 이는 특정 질환 또는 병태를 갖지 않고 질환 또는 병태의 보균자도 아닌 개체 또는 개체군을 지칭한다. 용어 "정상"은 또한, 정상 또는 야생형 개체 또는 대상체로부터 단리된 생물학적 시편 또는 샘플, 예를 들어 "정상적인 생물학적 샘플"의 적격성을 평가하도록 본원에서 사용된다.
- [0120] 질환, 장애, 및/또는 병태(예를 들어 본원에 기술된 임의의 암)을 "앓고 있는" 개체는 질환, 장애, 및/또는 병태로 진단 받았거나 이의 하나 이상의 증상을 나타낸다.
- [0121] 질환, 장애, 및/또는 병태에 "걸리기 쉬운" 개체는 질환, 장애, 및/또는 병태로 진단 받았고/받았거나 이의 증상을 나타낼 수 있다. 일부 구현예에서, 질환, 장애, 및/또는 병태(예를 들어 암)에 걸리기 쉬운 개체는 다음 중 하나 이상을 특징으로 할 수 있다: (1) 질환, 장애, 및/또는 병태의 발생과 연관된 유전자 돌연변이; (2) 질환, 장애, 및/또는 병태의 발생과 연관된 유전적 다형성; (3) 질환, 장애, 및/또는 병태와 연관된 단백질의 발현 및/또는 활성의 증가 및/또는 감소; (4) 질환, 장애, 및/또는 병태의 발생과 연관된 습관 및/또는 생활양식; (5) 질환, 장애, 및/또는 병태의 가족력; (6) 특정 박테리아 또는 바이러스에 대한 반응; (7) 특정 화학물질에 대한 노출. 일부 구현예에서, 질환, 장애, 및/또는 병태에 걸리기 쉬운 개체에서 질환, 장애, 및/또는 병태가 발생하게 된다. 일부 구현예에서, 질환, 장애, 및/또는 병태에 걸리기 쉬운 개체에서는 질환, 장애, 및/또는 병

태가 발생하지 않는다.

- [0122] 용어 "**치료(treat 또는 treatment)**"는 문맥상 달리 명시되지 않는 한, 특정 질환, 장애, 및/또는 병태(예를 들어, 암)를 부분적으로 또는 완전히 완화, 개선, 경감, 억제하거나, 이의 발생을 지연시키거나, 이의 진행을 지연시키거나, 이의 하나 이상의 증상 또는 특징의 중증도를 감소시키고/시키거나 이의 하나 이상의 증상 또는 특징의 발생을 감소시키는 임의의 치료 분자(예를 들어, 본원에 기술된 임의의 화합물)의 투여를 지칭한다. 이러한 치료는 관련 질환, 장애 및/또는 병태의 징후들을 발현하지 않는 대상체 및/또는 단지 질환, 장애 및/또는 병태의 초기 징후들만을 나타내는 대상체의 치료일 수 있다. 대안으로 또는 추가적으로, 이러한 치료는 관련 질환, 장애 및/또는 병태의 하나 이상의 확립된 징후들을 발현하는 대상체의 치료일 수 있다. 대안적으로, 약리학적 및/또는 생리학적 효과는 **예방적** 효과, 즉 질환 또는 이의 증상을 완전히 또는 부분적으로 예방하는 (예를 들어 질환 또는 이의 증상의 발생을 지연시키거나 진행을 늦추는) 효과일 수 있다. 이와 관련하여, 본 발명의 방법은 결합체의 "**예방적 유효량**"을 투여하는 단계를 포함한다. "**예방적 유효량**"은 원하는 예방적 결과를 달성하기 위해 필요한 기간 동안 투여량으로 유효한 양을 지칭한다. 따라서, 치료(예방적 치료 포함)의 목적은 암의 발생 또는 확산과 같은 원하지 않는 생리학적 변화 또는 장애를 억제하거나 늦추는 (감소시키는) 것이다. 본 발명의 목적을 위해, 유의하거나 바람직한 임상 결과는 검출가능한지 여부와 상관없이 증상 완화, 질환 정도의 경감, 안정화된 (즉 악화되지 않는) 질환 상태, 질환 진행의 지연 또는 둔화, 질환 상태의 개선 또는 완화, 및 관해(부분 관해 또는 완전 관해 여부와 무관함)를 포함하지만 이들로 한정되지는 않는다. 치료는 또한, 치료를 받지 않는 경우의 예상 생존 기간과 비교했을 때, 생존 기간을 연장하는 것을 포함할 수 있다. 치료를 필요로 하는 대상체들은 이미 병태 또는 장애를 가진 대상체들뿐만 아니라 병태 또는 장애를 가지기 쉬운 대상체들도 포함한다.
- [0123] 암의 맥락에서, 용어 "**치료**"는 다음 중 어느 하나 또는 전부를 포함한다: 종양 세포 사멸; 종양 세포, 암세포, 또는 종양의 성장 억제; 종양 세포 또는 암세포의 복제 억제; 전체 종양 부담의 경감 또는 암세포 수의 감소; 및 질환과 연관된 하나 이상의 증상의 완화.
- [0124] 자가면역 질환의 맥락에서, 용어 "**치료**"는 다음 중 어느 하나 또는 전부를 포함한다: 자가면역 질환 상태와 연관된 세포(자가면역 항체를 생산하는 세포를 포함하되 이에 한정되지 않음)의 복제 억제; 자가면역 항체 부담을 경감; 및 자가면역 질환의 하나 이상의 증상 완화.
- [0125] 용어 "**치료적 유효량**" 또는 "**유효량**"은 포유동물에서 (예를 들어 본원에 기술된 바와 같은) 질환 또는 장애를 치료 또는 예방하는 데 효과적인 접합체의 양을 지칭한다. 암의 경우, 접합체의 치료적 유효량은 암세포의 수를 감소시킬 수 있고; 종양 크기를 감소시킬 수 있고; 말초 기관으로의 암 세포 침윤을 억제(즉, 어느 정도 지연시키고, 바람직하게는 중단)할 수 있고; 종양 전이를 억제(즉, 어느 정도 지연시키고, 바람직하게는 중단)할 수 있고; 종양 성장을 어느 정도 억제할 수 있고/있거나; 암과 관련된 증상 중 어느 하나 이상을 어느 정도 완화시킬 수 있다. 접합체는 약물이 기존 암세포의 성장을 억제하고/하거나 사멸시킬 수 있는 정도까지는, 세포종식억제성 및/또는 세포독성일 수 있다. 암 요법의 경우, 효능은 예를 들어 질환 진행까지의 시간(TTP)을 평가하고/하거나 반응 속도(RR)를 결정함으로써 측정될 수 있다.
- [0126] 본원에서 사용되는 바와 같이, 용어 "**약학적으로 허용 가능한 형태**"는 약학적으로 허용 가능한 염, 에스테르, 수화물, 용매화물, 다형체, 이성질체, 전구약물, 및 이의 동위원소 표지된 유도체를 포함하지만 이에 한정되지 않는, 개시된 화합물의 형태를 지칭한다. 일 구현예에서, "**약학적으로 허용 가능한 형태**"는 약학적으로 허용 가능한 염, 에스테르, 전구약물, 및 이의 동위원소 표지된 유도체를 포함하지만 이에 한정되지는 않는다. 구현예에서, "**약학적으로 허용 가능한 형태**"는 약학적으로 허용 가능한 이성질체 및 입체이성질체, 전구약물, 및 이의 동위원소 표지된 유도체를 포함하지만 이에 한정되지는 않는다.
- [0127] 구현예에서, 약학적으로 허용 가능한 형태는 약학적으로 허용 가능한 염이다. 본원에서 사용되는 바와 같이, 용어 "**약학적으로 허용 가능한 염**"은 화합물의 약학적으로 허용 가능한 유기염 또는 무기염(예를 들어 캄프토테신, 캄프토테신 페이로드, 또는 캄프토테신 접합체)을 지칭한다. 일부 양태에서, 화합물은 적어도 하나의 아미노기를 함유할 수 있으며, 따라서 아미노산 부가염은 아미노기와 함께 형성될 수 있다. 예시적인 염은 황산염, 트리플루오로아세트레이트, 구연산염, 아세트산염, 옥살산염, 염화물, 브롬화물, 요오드화물, 질산염, 중황산염, 인산염, 산성 인산염, 이소니코틴산염, 젯산염, 살리실산염, 구연산, 타르타르산염, 올레산염, 타닌산염, 판토텐산염, 중주석산염, 아스코르브산염, 숙신산염, 말레산염, 겐티스산염, 푸마르산염, 글루콘산염, 글루쿠론산염, 당산염, 포름산염, 벤조산염, 글루탐산염, 메탄설폰산염, 에탄설폰산염, 벤젠설폰산염, p-톨루엔설폰산염, 및 파모에이트(즉, 1,1'-메틸렌-비스-(2-하이드록시-3-나프토에이트) 염)를 포함하지만 이들로 한정되지는

않는다. 약학적으로 허용 가능한 염은 아세트산염 이온, 숙신산염 이온, 또는 다른 반대이온과 같은 다른 분자의 포함을 포함할 수 있다. 반대이온은 부모 화합물 상에서 전하를 안정시키는 임의의 유기 또는 무기 모이어티일 수 있다. 또한, 약학적으로 허용 가능한 염은 둘 이상의 하전된 원자를 그의 구조 내에 가질 수 있다. 다수의 하전된 원자가 약학적으로 허용 가능한 염의 일부인 경우, 다수의 반대 이온을 가질 수 있다. 따라서, 약학적으로 허용 가능한 염은 하나 이상의 하전된 원자 및/또는 하나 이상의 반대이온을 가질 수 있다.

[0128] 본원에서 사용되는 바와 같이, 용어 "**약학적 조성물**"은 활성제(예를 들어, 본원에 기술된 것과 같은 식 (I) 내지 (III) 중 어느 하나에 따른 화합물)가 하나 이상의 약학적으로 허용 가능한 담체와 함께 제형화되는 조성물을 지칭한다. 일부 구현예에서, 활성제는 관련 집단에게 투여될 때 소정의 치료 효과를 달성할 통계적으로 유의한 확률을 나타내는 치료 요법으로 투여하기에 적절한 단위 투여량으로 존재한다. 일부 구현예에서, 약학적 조성물은 고형분 또는 액체 형태로 투여되도록 특수하게 제형화될 수 있고, 다음에 맞게 조정된 것들을 포함한다: 경구 투여, 예를 들어 물약(수성 또는 비수성 용액 또는 현탁액), 정제, 예를 들어 구강, 설하, 및 전신 흡수를 목표로 하는 것들, 볼루스, 분말, 과립, 혀에 도포하기 위한 페이스트; 예를 들어 멸균 용액 또는 현탁액 또는 서방형 제형으로서 비경구 투여, 예를 들어 피하, 근육내, 정맥내 또는 경막외 주입; 예를 들어 피부, 폐, 또는 구강에 도포하기 위한 크림, 연고, 또는 조절방출형 패치 또는 스프레이로서 국소 도포; 예를 들어 페서리, 크림, 또는 발포체로서 질내 또는 직장 내 투여; 설하 투여; 안구내 투여; 경피 투여; 또는 비강내, 폐내, 및 다른 점막 표면에 대한 투여.

[0129] 본원에서 사용되는 바와 같이, "**담체**" 또는 "**약학적으로 허용 가능한 담체**"는 조성물과 함께 투여되는 희석제, 보조제, 부형제, 또는 비히클을 지칭한다. 일부 예시적인 구현예에서, 담체는 예를 들어 땅콩유, 대두유, 광유, 참기름 등과 같은 석유, 동물, 식물 또는 합성 유래의 오일을 포함하는, 예를 들어, 물 및 오일과 같은 멸균 액체를 포함할 수 있다. 일부 구현예에서, 담체는 하나 이상의 고형분 성분이거나 이를 포함한다. 일부 구현예에서, 담체는, 예를 들어 물, 에탄올, 폴리올(예를 들어 글리세롤, 프로필렌 글리콜, 및 액체 폴리에틸렌 글리콜 등), 및 이들의 적절한 혼합물을 함유하는 용매 또는 분산매질일 수 있다. 적절한 유통성은, 예를 들어 레시틴과 같은 코팅의 사용에 의해, 분산액의 경우 요구되는 입자 크기를 유지함으로써, 그리고 계면활성제를 사용함으로써 유지될 수 있다. 미생물의 작용을 방지하는 것은 다양한 항균제 및 항진균제, 예를 들어 파라벤, 클로로부탄올, 페놀, 아스코르브산, 티메로살 등에 의해 달성될 수 있다. 일부 경우에, 등장화제, 예를 들어 당류, 만니톨과 같은 다가알코올, 소르비톨, 염화나트륨을 조성물에 포함하는 것이 바람직할 수 있다. 주사식 조성물의 흡수를 연장하는 것은 흡수를 지연시키는 제제, 예를 들어 모노스테아르산 알루미늄 및 젤라틴을 조성물에 포함시킴으로써 이뤄질 수 있다.

[0130] 본원에서 사용되는 바와 같이, 용어 "**키트**"는 물질을 전달하기 위한 임의의 전달 시스템을 지칭한다. 이러한 전달 시스템은, 다양한 진단 시약 또는 치료 시약(예를 들어 적절한 용기에 담긴 올리고뉴클레오타이드, 효소 등) 및/또는 지지 물질(예를 들어 완충액, 검정을 수행하기 위한 서면 지침 등)을 한 위치에서 다른 위치로 저장, 수송, 또는 전달할 수 있게 하는 시스템을 포함할 수 있다. 예를 들어, 키트는 관련 반응 시약 및/또는 지지 물질을 함유하는 하나 이상의 인클로저(예를 들어 박스, 카트리지, 병, 앰플 등)를 포함한다. 본원에서 사용되는 바와 같이, 용어 "**단편화된 키트(fragmented kit)**"는 총 키트 구성 요소의 하위 부분을 각각 함유하는 둘 이상의 개별 용기를 포함하는 전달 시스템을 지칭한다. 용기는 의도된 수용자에게 함께 또는 개별적으로 전달될 수 있다. 예를 들어, 제1 용기는 검정에 사용하기 위한 효소를 함유할 수 있는 반면, 제2 용기는 올리고뉴클레오타이드를 함유한다. 용어 "**단편화된 키트**"는 미연방 식품, 의약품, 및 화장품법의 520(e)절에 의거하여 규제되는 분석물 특이적 시약(ASR)을 함유하는 키트를 포함하도록 의도되지만 이에 한정되지는 않는다. 실제로, 총 키트 구성 요소의 하위 부분을 각각 함유하는 둘 이상의 개별 용기를 포함하는 임의의 전달 시스템이 용어 "**단편화된 키트**"에 포함된다. 대조적으로, "**합쳐진 키트(combined kit)**"는 단일 용기 내에 (예를 들어 원하는 구성 요소 각각을 수용하는 단일 박스 내에) 모든 구성 요소를 포함하는 전달 시스템을 지칭한다. 용어 "**키트**"는 단편화된 키트 및 합쳐진 키트를 모두를 포함한다.

[0131] 본원에서 사용되는 바와 같이, 용어 "**투여**"는 일반적으로 조성물인 제제 또는 조성물에 포함된 제제를 전달하기 위해 대상체 또는 시스템에 조성물을 투여하는 것을 지칭한다. 당업자는 적절한 상황에서 대상체, 예를 들어 인간에게 투여하기 위해 사용될 수 있는 다양한 경로를 알 것이다. 투여 경로의 예는 비경구 투여, 예를 들어 정맥 내, 피부내, 피하 투여, 경구(예를 들어 흡입) 투여, 경피(즉, 국소) 투여, 점막관통 투여, 및 직장 투여를 포함한다. 예를 들어, 일부 구현예에서, 투여는 안구, 경구, 비경구, 국소 투여 등일 수 있다. 구현예에서, 투여는 비경구 투여(예를 들어 정맥내 투여)이다. 구현예에서, 정맥내 투여는 정맥내 주입이다. 일부 특정 구현예에서, 투여는 (예를 들어 기관지 점적주입에 의한) 기관지 투여, 구강 투여, 피부 투여(예를 들어 피부에 대한

국소 투여, 피내, 피간, 경피 투여 중 하나 이상이거나 이를 포함할 수 있음), 장내 투여, 동맥내 투여, 피내 투여, 위내 투여, 골수내 투여, 근육내 투여, 비강내 투여, 복강내 투여, 경막내 투여, 정맥내 투여, 심실내 투여, 특정 기관내(예: 간내) 투여, 점막 투여, 비강 투여, 경구 투여, 직장 투여, 피하 투여, 설하 투여, 국소 투여, (예를 들어 기관내 점적주입에 의한) 기관 투여, 질 투여, 유리체 투여 등일 수 있다.

[0132] 본원에서 사용되는 바와 같이, 용어 "**친핵성**"은 전자가 풍부하고, 반응 부위로서 작용하는 비공유 전자 쌍을 가지며, 양으로 하전된 또는 전자가 결핍된 부위와 반응하는 반응성 기를 지칭한다. 본 발명에 사용하기에 적합한 친핵성 기의 예는 아미노 기(예를 들어 일차 아민, 이차 아민, 하이드록시아민, 및/또는 하이드라진), 티올, 페놀, 및 알코올을 포함하지만 이들로 한정되지는 않는다. 구현예에서, 친핵성 작용기는 아미노, 하이드라지노, 하이드록시아미노, 하이드록시, 또는 티올을 포함한다. 구현예에서, 친핵성 작용기는 카르복사미드, N-하이드록시카르복사미드, 카르복실 하이드라지드, 또는 구아니디노이다. 구현예에서, 친핵성기는 티올기이거나 티올기를 포함한다. 소정의 친핵성 기는 친전자성 기와 반응할 수 있기 위해서는 반드시 염기로 활성화되어야 한다. 예를 들어, 다작용성 화합물에 친핵성 티올 및 하이드록실기가 있는 경우, 양성자를 제거하고 티올레이트 또는 하이드록실레이트 음이온이 친전자성 기와 반응할 수 있게 하기 위해서는 화합물을 반드시 수성 염기와 혼합해야 한다. 염기가 반응에 참여하는 것이 바람직하지 않은 한, 비친핵성 염기가 바람직하다. 일부 구현예에서, 염기는 완충액의 성분으로서 존재할 수 있다.

[0133] 본원에서 사용되는 바와 같이, 용어 "**친전자성**"은 친핵성 공격에 취약한 반응성 기; 즉, 유입되는 친핵성 기와의 반응에 취약한 반응성 기를 지칭한다. 친전자성 기의 선택은 쌍을 형성한 반응물의 친핵성 기와의 반응이 가능하도록 이루어질 수 있다. 예를 들어, 친핵성 반응성 기가 아미노기인 경우, 친전자성 기(들)는 아미노기와 반응하도록 선택될 수 있다. 유사하게, 친핵성 반응성 기가 티올 모이어티인 경우, 상응하는 친전자성 기는 티올-반응성 기 등일 수 있다. 본 발명에서 사용하기에 적합한 친전자성 기의 예는 카르복시산 에스테르, 산성 염화물 기, 무수물, 이소시아나토, 티오이소시아나토, 에폭시드, 활성화된 하이드록실 기, 숙신이미드 에스테르, 설포숙신이미드 에스테르, 말레이미드, 및 에텐설포닐을 포함하되 이들로 한정되지는 않는다. 구현예에서, 친전자성 기는 알데히드, α-할로 케톤, 말레이미드, 숙신이미드, 하이드록시숙신이미드, 이소티오시아네이트, 이소시아네이트, 아실 아지드, 염화설포닐, 토실레이트 에스테르, 글리옥살, 에폭시드, 옥시란, 탄산염, 이미도에스테르, 무수물, 플루오로페닐 에스테르, 하이드록시메틸 포스핀 유도체, 탄산염, 할로아세틸, 클로로트리아진, 할로아세틸, 할로겐화알킬, 아지리딘, 아크릴로일 유도체, 케톤, 카르복시산, 에스테르, 염화아세틸, 또는 아세트산 무수물이다. 구현예에서, 친전자성 기는 말레이미드 또는 숙신이미드 기이거나 이를 포함한다. 카르복시산 기는, 디시클로헥실카르보디이미드(DCC) 또는 디시클로헥실우레아(DHU)와 같은 탈수제의 존재 하에 적절한 하이드록실 함유 화합물과의 반응을 포함하여, 친핵체와 반응하도록 활성화될 수 있다. 예를 들어, 카르복시산은 DCC의 존재 하에 알콕시-치환된 N-하이드록시숙신이미드 또는 N-하이드록시설포석신이미드와 반응하여 반응성 친전자성 기인, N-하이드록시숙신이미드 에스테르 및 N-하이드록시설포숙신이미드 에스테르를 각각 형성할 수 있다. 카르복시산은 염화아실(예를 들어 염화아세틸)과 같은 할로겐화아실과의 반응에 의해서도 활성화되어 반응성 무수물 기를 제공할 수 있다. 추가의 예에서, 카르복시산은, 예를 들어 교환 반응이 가능한 염화티오닐 또는 염화아실을 사용해 산성 염화물 기로 전환될 수 있다.

[0134] 달리 명시되지 않는 한, 용어 "**알킬**"은 그 자체로서 또는 또 다른 용어의 일부로서, 표시된 수의 탄소 원자를 치환되거나 치환되지 않은 직쇄 또는 분지형, 포화 또는 불포화 탄화수소를 지칭한다(예를 들어, "-C₁-C₈ 알킬" 또는 "-C₁-C₁₀" 알킬은 각각 1 내지 8개 또는 1 내지 10개의 탄소 원자를 갖는 알킬기를 지칭한다). 탄소 원자의 수가 표시되지 않은 경우, 알킬기는 1 내지 8개의 탄소 원자를 갖는다. 대표적인 직쇄 "-C₁-C₈ 알킬" 기는 -메틸, -에틸, -n-프로필, -n-부틸, -n-펜틸, -n-헥실, -n-헵틸, 및 -n-옥틸을 포함하되 이에 한정되지는 않으며; 분지형 -C₃-C₈ 알킬은 -이소프로필, -세크-부틸, -이소부틸, -터트-부틸, -이소펜틸, 및 -2-메틸부틸을 포함하되 이에 한정되지 않으며; 불포화 -C₂-C₈ 알킬은 -비닐, -알릴, -1-부테닐, -2-부테닐, -이소부틸레닐, -1 펜테닐, -2 펜테닐, -3-메틸-1-부테닐, -2 메틸-2-부테닐, -2,3 디메틸-2-부테닐, -1-헥실, 2-헥실, -3-헥실, -아세틸레닐, -프로피닐, -1 부티닐, -2 부티닐, -1 펜티닐, -2 펜티닐, 및 -3 메틸 1 부티닐을 포함하되 이에 한정되지 않는다. 가끔씩 알킬기는 치환되지 않는다. 알킬기는 하나 이상의 기로 치환될 수 있다. 다른 양태에서, 알킬기는 포화되게 된다.

[0135] 달리 명시되지 않는 한, "**알킬렌**"은 그 자체로서 또는 다른 용어의 일부로서, 명시된 수의 탄소 원자(일반적으로 1 내지 10개의 탄소 원자)로 이루어지고, 부모 알칸의 동일하거나 2개의 상이한 탄소 원자로부터 2개의 수소를 제거함으로써 유도된 2개의 1가 라디칼 중심을 갖는, 치환되거나 치환되지 않은 포화, 분지형 또는 직쇄

또는 환형 탄화수소 라디칼을 지칭한다. 전형적인 알킬렌 라디칼은 메틸렌(-CH₂-), 1,2-에틸렌(-CH₂CH₂-), 1,3-프로필렌(-CH₂CH₂CH₂-), 1,4-부틸렌(-CH₂CH₂CH₂CH₂-) 등을 포함하지만, 이들로 한정되지는 않는다. 바람직한 양태에서, 알킬렌은 분지쇄 또는 직쇄 탄화수소이다(즉, 환형 탄화수소가 아님).

[0136] 달리 명시되지 않는 한, "아릴"은 그 자체로서 또는 또 다른 용어의 일부로서, 명시된 수의 탄소 원자(일반적으로 6 내지 20개의 탄소 원자)로 이루어지고, 부모 방향족 고리 시스템의 단일 탄소 원자로부터 하나의 수소 원자를 제거함으로써 유도된, 치환되거나 치환되지 않은 1가 탄소환 방향족 탄화수소 라디칼을 의미한다. 일부 아릴기는 예시적인 구조에서 "Ar"로서 표시된다. 전형적인 아릴기는 벤젠, 치환된 벤젠, 나프탈렌, 안트라센, 바이페닐 등으로부터 유래된 라디칼을 포함하지만, 이에 한정되지는 않는다. 예시적인 아릴기는 페닐기이다.

[0137] 달리 명시되지 않는 한, "아릴렌"은 그 자체로서 또는 또 다른 용어의 일부로서, 2개의 공유 결합(즉, 2가 결합)을 갖는 위에서 정의된 것과 같은 아릴기이고, 오르토, 메타, 또는 파라 배향으로 존재할 수 있다.

[0138] 달리 명시되지 않는 한, "C₃-C₈ 헤테로환"은 그 자체로서 또는 또 다른 용어의 일부로서, 3 내지 8개의 탄소 원자(고리 구성원으로도 지칭됨) 및 N, O, P, 또는 S로부터 독립적으로 선택된 1 내지 4개의 헤테로원자 고리 구성원을 갖고, 부모 고리 시스템의 고리 원자로부터 하나의 수소 원자의 제거함으로써 유래된 1가의 치환된 또는 치환되지 않은 방향족 또는 비방향족 단환 또는 이환 고리 시스템을 지칭한다. 헤테로환 내의 하나 이상의 N, C, 또는 S 원자는 산화될 수 있다. 헤테로원자를 포함하는 고리는 방향족 또는 비방향족일 수 있다. 모든 고리 원자가 방향성(aromaticity)에 관여하는 헤테로환은 헤테로아릴로서 지칭되고, 달리 헤테로탄소환으로서 지칭된다. 달리 언급되지 않는 한, 헤테로환은 임의의 헤테로원자 또는 탄소 원자에서 펜던트기에 부착되며, 이는 구조를 안정화시킨다. 이와 같이, 헤테로아릴은 C-연결 헤테로아릴로서 지칭되는 이의 방향족 고리 시스템의 방향족 탄소를 통해 결합되거나, 이의 방향족 고리 시스템의 비-이중결합형 N 원자(즉 =N-이 아님)를 통해 결합될 수 있으며, 이 경우 N-연결 헤테로아릴로서 지칭된다. 따라서, 질소-함유 헤테로환은 C-연결되거나 N-연결될 수 있고, 피롤-1-일(N-연결) 및 피롤-3-일(C-연결)과 같은 피롤 모이어티; 및 이미다졸-1-일 및 이미다졸-3-일(모두 N-연결)과 같은 이미다졸 모이어티; 및 이미다졸-2-일, 이미다졸-4-일, 및 이미다졸-5-일 모이어티(모두 C-연결)를 포함할 수 있다.

[0139] 달리 명시되지 않는 한, "C₃-C₈ 헤테로아릴"은 방향족 C₃-C₈ 헤테로고리이며, 식 중 아래 첨자는 헤테로환의 환형 고리 시스템의 총 탄소 수 또는 헤테로아릴의 방향족 고리 시스템의 방향족 탄소의 총 수를 나타내고, 고리 시스템의 크기 또는 고리 융합의 존재 또는 부재를 암시하지는 않는다. C₃-C₈ 헤테로환의 대표적인 예는 피롤리딘, 아제티딘, 피페리딘, 모르폴리딘, 테트라하이드로푸라닐, 테트라하이드로피라닐, 벤조푸라닐, 벤조티오펜, 인돌릴, 벤조피라졸릴, 피롤릴, 티오펜(티오펜), 푸라닐, 티아졸릴, 이미다졸릴, 피라졸릴, 피리미디닐, 피리디닐, 피라지닐, 피리다지닐, 이소티아졸릴, 및 이속사졸릴을 포함하지만, 이에 한정되지는 않는다. 명시적으로 주어질 때, 헤테로환 또는 헤테로아릴의 고리 시스템의 크기는 고리 내 원자의 총 수로 표시된다. 예를 들어, 5-원 또는 6-원 헤테로아릴로의 명칭은 헤테로아릴의 헤테로방향족 고리 시스템 내 방향족 원자의 총 수(즉 5 또는 6개)를 나타내지만, 해당 고리 시스템 내 방향족 헤테로원자 또는 방향족 탄소의 수를 의미하지는 않는다. 융합된 헤테로아릴은 이와 같이 문맥에 의해 명시적으로 언급되거나 암시되며, 이는 일반적으로, 융합된 헤테로방향족 고리 시스템을 구성하도록 함께 융합되는 각각의 방향족 고리 내 방향족 원자의 수로 표시된다. 예를 들어, 5,6-원 헤테로아릴은 방향족 6-원 고리에 융합된 방향족 5-원 고리이며, 여기서 고리 중 하나 또는 둘 다는 방향족 헤테로원자(들)를 갖거나 헤테로원자가 2개의 고리 사이에서 공유된다.

[0140] 헤테로환이 비-방향족으로 유지되고, 융합된 고리 시스템의 비-방향족 부분과의 부착을 통해 더 큰 구조의 일부가 되도록, 아릴 또는 헤테로아릴에 융합된 헤테로환은, 헤테로환이 아릴 또는 헤테로아릴과의 고리 융합에 의해 치환되는 선택적으로 치환된 헤테로환의 일례이다. 마찬가지로, 융합된 고리 시스템의 방향족 부분과의 부착을 통해 더 큰 구조의 일부가 된 헤테로환 또는 탄소환에 융합된 아릴 또는 헤테로아릴은, 아릴 또는 헤테로환이 헤테로환 또는 탄소환과의 고리 융합에 의해 치환되는 선택적으로 치환된 아릴 또는 헤테로환의 일례이다.

[0141] 달리 명시되지 않는 한, "C₃-C₈ 헤테로시클로"는 그 자체로서 또는 또 다른 용어의 일부로서, 위에 정의된 C₃-C₈ 헤테로환을 지칭하며, 여기서 헤테로환의 수소 원자 중 하나는 결합으로 치환된다(즉, 2가임). 달리 명시되지 않는 한, "C₃-C₈ 헤테로아릴렌"은 그 자체로서 또는 또 다른 용어의 일부로서, 위에 정의된 C₃-C₈ 헤테로아릴기를 지칭하며, 여기서 헤테로아릴기의 수소 원자 중 하나는 결합으로 치환된다(즉, 2가임).

[0142] 달리 명시되지 않는 한, "C₃-C₈ 탄소환"은 그 자체로서 또는 또 다른 용어의 일부로서, 부모 고리 시스템의 고리

원자로부터 하나의 수소 원자가 제거됨으로써 유래된 3-, 4-, 5-, 6-, 7-, 또는 8-원 1가, 치환되거나 치환되지 않은, 포화 또는 불포화 비-방향족 단환 또는 이환 탄소환 고리이다. 대표적인 $-C_3-C_8$ 탄소환은 시클로프로필, 시클로부틸, 시클로펜틸, 시클로헥사디에닐, 시클로헥실, 시클로헥세닐, 1,3-시클로헥사디에닐, 1,4-시클로-헥사디에닐, 시클로헵틸, 1,3-시클로헵타디에닐, 1,3,5-시클로-헵타트리에닐, 시클로옥틸, 및 시클로옥타디에닐을 포함하지만 이에 한정되지는 않는다.

[0143] 달리 명시되지 않는 한, " C_3-C_8 카보시클로"는 그 자체로서 또는 또 다른 용어의 일부로서, 위에 정의된 C_3-C_8 탄소환 기를 지칭하며, 여기서 탄소환 기의 수소 원자 중 다른 하나는 결합으로 치환된다(즉, 2가임).

[0144] 달리 명시되지 않는 한, 용어 "헤테로알킬"은 그 자체로서 또는 다른 용어와 조합하여, 달리 명시되지 않는 한, 완전히 포화되었거나 1 내지 3도의 포화도를 함유하고, 명시된 수의 탄소 원자 및 1 내지 10개, 바람직하게는 0, N, Si, 및 S로 이루어진 군으로부터 선택된 1 내지 3개의 헤테로원자로 이루어진 안정한 직쇄 또는 분지형 탄화수소 또는 이들의 조합을 의미하며, 여기서 질소 원자와 황 원자는 선택적으로 산화될 수 있고, 질소 헤테로원자는 선택적으로 사분화될 수 있다. 헤테로원자(들)인 O, N, 및 S는 헤테로알킬기의 임의의 내부 위치에 배치되거나, 알킬기가 분자의 나머지에 부착되는 위치에 배치될 수 있다. 헤테로원자 Si는 알킬기가 분자의 나머지에 부착되는 위치를 포함하여, 헤테로알킬기의 임의의 위치에 배치될 수 있다. 예로는 $-CH_2-CH_2-O-CH_3$, $-CH_2-CH_2-NH-CH_3$, $-CH_2-CH_2-N(CH_3)-CH_3$, $-CH_2-S-CH_2-CH_3$, $-CH_2-CH_2-S(O)-CH_3$, $-NH-CH_2-CH_2-NH-C(O)-CH_2-CH_3$, $-CH_2-CH_2-S(O)_2-CH_3$, $-CH=CH-O-CH_3$, $-Si(CH_3)_3$, $-CH_2-CH=N-O-CH_3$, 및 $-CH=CH-N(CH_3)-CH_3$ 이 포함된다. 예를 들어 $-CH_2-NH-OCH_3$ 및 $-CH_2-O-Si(CH_3)_3$ 과 같이 최대 2개의 헤테로원자가 연속될 수 있다. 전형적으로, C_1 내지 C_4 헤테로알킬 또는 헤테로알킬렌은 1 내지 4개의 탄소 원자 및 1 또는 2개의 헤테로원자를 가지며, C_1 내지 C_3 헤테로알킬 또는 헤테로알킬렌은 1 내지 3개의 탄소 원자 및 1 또는 2개의 헤테로원자를 갖는다. 일부 양태에서, 헤테로알킬 또는 헤테로알킬렌은 포화된다.

[0145] 달리 명시되지 않는 한, 용어 "헤테로알킬렌"은 그 자체로서 또는 또 다른 용어와 조합하여, $-CH_2-CH_2-S-CH_2-CH_2-$ 및 $-CH_2-S-CH_2-CH_2-NH-CH_2-$ 에 의해 예시된 것과 같이, (전술한 것과 같은) 헤테로알킬로부터 유래된 2가 기를 의미한다. 헤테로알킬렌기의 경우, 헤테로원자는 사슬 말단 중 하나 또는 둘 다를 점유할 수 있다. 또한, 알킬렌 및 헤테로알킬렌 연결기의 경우, 연결기의 배향이 표시되지 않는다.

[0146] 달리 명시되지 않는 한, "아미노알킬"은 그 자체로서 또는 또 다른 용어와 조합하여, 본원에서 정의된 것과 같은 알킬 모이어티가 아미노, 알킬아미노, 디알킬아미노, 또는 시클로알킬아미노기로 치환된 헤테로알킬을 의미한다. 예시적인 비제한적인 아미노알킬은 $-CH_2NH_2$, $-CH_2CH_2NH_2$, $-CH_2CH_2NHCH_3$, 및 $-CH_2CH_2N(CH_3)_2$ 이며, 추가로 $-CH(CH_3)NH_2$ 및 $-C(CH_3)_2NH_2$ 와 같은 분지형 중을 (R)- 또는 (S)-구성으로 포함한다. 대안적으로, 아미노알킬은 본원에서 정의된 것과 같은 알킬 모이어티, 기, 또는 치환기이며, 여기서 라디칼 탄소 이외의 sp^3 탄소는 아미노 또는 알킬아미노 모이어티로 치환된 것이고, 여기서 적어도 하나의 sp^3 탄소가 남는 경우, 이의 sp^3 질소가 알킬의 sp^3 탄소를 대체한다. 아미노알킬 모이어티를 더 큰 구조 또는 다른 모이어티에 대한 치환기로서 지칭하는 경우, 아미노알킬은 아미노알킬의 알킬 모이어티의 탄소 라디칼을 통해 구조 또는 모이어티에 공유 부착된다.

[0147] 달리 명시되지 않는 한, "알킬아미노" 및 "시클로알킬아미노"는 그 자체로서 또는 또 다른 용어와 조합하여, 본원에 기술된 것과 같은 알킬 또는 시클로알킬 라디칼을 의미하며, 여기서 적어도 하나의 sp^3 탄소가 남는 경우, 알킬 또는 시클로알킬 라디칼의 라디칼 탄소가 질소 라디칼로 대체된 것이다. 알킬아미노가 이의 질소에서 또 다른 알킬 모이어티로 치환되는 경우에, 생성된 치환된 라디칼은 때때로 디알킬아미노 모이어티, 기, 또는 치환기로서 지칭되며, 여기서 질소를 치환하는 알킬 모이어티는 독립적으로 선택된다. 예시적이고 비제한적인 아미노, 알킬아미노, 및 디알킬아미노 치환기는 $-N(R')_2$ 의 구조를 갖는 것들을 포함하며, 이들 실시예에서 R'는 수소 또는 C_{1-6} 알킬, 전형적으로 수소 또는 메틸로부터 독립적으로 선택되는 반면, 헤테로시클로알킬에 포함되는 시클로알킬 아민의 경우, R' 모두는 이들이 부착되는 질소와 함께 헤테로환 고리를 정의한다. R' 모두가 수소 또는 알킬인 경우, 모이어티는 때때로 일차 아미노기 및 삼차 아민기로서 각각 기술된다. 하나의 R'이 수소이고 다른 하나가 알킬인 경우, 모이어티는 때때로 이차 아미노기로서 기술된다. 일차 및 이차 알킬아미노 모이어티

는 친핵체로서 카르보닐-함유 친전자성 중심에 대해 더 반응성인 반면, 삼차 아민은 더 염기성이다.

[0148] "치환된 알킬" 및 "치환된 아릴"은 하나 이상의 수소 원자, 일반적으로는 1개의 수소 원자가 치환기로 각각 독립적으로 치환되는 알킬 및 아릴을 각각 의미한다. 일반적인 치환기는 $-X$, $-R'$, $-OH$, $-OR'$, $-SR'$, $-N(R')_2$, $-N(R')_3$, $=NR'$, $-CX_3$, $-CN$, $-NO_2$, $-NR'C(=O)R'$, $-C(=O)R'$, $-C(=O)N(R')_2$, $-S(=O)_2R'$, $-S(=O)_2NR$, $-S(=O)R'$, $-OP(=O)(OR')_2$, $-P(=O)(OR')_2$, $-PO_3$, PO_3H_2 , $-C(=O)R'$, $-C(=S)R'$, $-CO_2R'$, $-CO_2^-$, $-C(=S)OR'$, $-C(=O)SR'$, $-C(=S)SR'$, $-C(=O)N(R')_2$, $-C(=S)N(R')_2$, 및 $-C(=NR)N(R')_2$ 를 포함하지만 이에 한정되지는 않으며, 식 중 각각의 X는 할로젠: $-F$, $-Cl$, $-Br$, 및 $-I$ 로 이루어진 군으로부터 독립적으로 선택되고; 각각의 R'은 $-H$, $-C_1-C_{20}$ 알킬, $-C_6-C_{20}$ 아릴, $-C_3-C_{14}$ 헤테로환, 보호기, 및 전구약물 모이어티로 이루어진 군으로부터 독립적으로 선택된다.

[0149] 보다 일반적으로, 치환기는 $-X$, $-R'$, $-OH$, $-OR'$, $-SR'$, $-N(R')_2$, $-N(R')_3$, $=NR'$, $-NR'C(=O)R$, $-C(=O)R'$, $-C(=O)N(R')_2$, $-S(=O)_2R'$, $-S(=O)_2NR'$, $-S(=O)R'$, $-C(=O)R'$, $-C(=S)R$, $-C(=O)N(R')_2$, $-C(=S)N(R')_2$, 및 $-C(=NR)N(R')_2$ 로 이루어진 군으로부터 선택되거나(식 중 각각의 X는 $-F$ 및 $-Cl$ 로 이루어진 군으로부터 독립적으로 선택됨), $-X$, $-R$, $-OH$, $-OR'$, $-N(R')_2$, $-N(R')_3$, $-NR'C(=O)R'$, $-C(=O)N(R')_2$, $-S(=O)_2R'$, $-S(=O)_2NR'$, $-S(=O)R'$, $-C(=O)R'$, $-C(=O)N(R')_2$, $-C(=NR)N(R')_2$, 보호기, 및 전구약물 모이어티로 이루어진 군으로부터 선택된다(식 중 각각의 X는 $-F$ 이고; 각각의 R'은 수소, $-C_1-C_{20}$ 알킬, $-C_6-C_{20}$ 아릴, $-C_3-C_{14}$ 헤테로환, 보호기, 및 전구약물 모이어티로 이루어진 군으로부터 독립적으로 선택됨). 일부 양태에서, 알킬 치환기는 $-N(R')_2$, $-N(R')_3$, 및 $-C(=NR)N(R')_2$ 로 이루어진 군으로부터 선택되며, 식 중 R은 수소 및 $-C_1-C_{20}$ 알킬로 이루어진 군으로부터 선택된다. 다른 양태에서, 알킬은 일련의 에틸렌옥시 모이어티로 치환되어 PEG 단위를 정의한다. 전술한 바와 같은 알킬렌, 탄소환, 카보시클로, 아릴렌, 헤테로알킬, 헤테로알킬렌, 헤테로환, 헤테로시클로, 헤테로아릴렌, 및 헤테로아릴렌 기도 유사하게 치환될 수 있다.

[0150] 본원에서 사용되는 "보호기"는 모이어티가 연결된 원자 또는 작용기가 원치 않는 반응에 참여하는 능력을 방지하거나 감소시키는 상기 모이어티를 의미한다. 원자 또는 작용기에 대한 일반적인 보호기는 Greene의 문헌 [1999], "Protective Groups In Organic Synthesis, 3RD Ed.", Wiley Interscience]에 제시되어 있다. 산소, 황, 및 질소와 같은 헤테로원자에 대한 보호기는, 일부 경우에 친전자성 화합물과 헤테로원자의 원치 않는 반응을 최소화하거나 회피하는 데 사용된다. 다른 경우에, 보호기는 보호되지 않은 헤테로원자의 친핵성 및/또는 염기성을 감소시키거나 제거하는 데 사용된다. 보호된 산소의 비제한적인 예는 $-OR^{PR}$ 에 의해 주어지며, 식 중 R^{PR} 은 하이드록실에 대한 보호기이고, 하이드록실은 일반적으로 에스테르(예를 들어, 아세테이트, 프로피오네이트, 또는 벤조에이트)로서 보호된다. 하이드록실에 대한 다른 보호기는 유기금속 시약 또는 다른 고도로 염기성인 시약의 친핵성을 방해하지 않게 하며, 여기서 하이드록실은 일반적으로 알킬 또는 헤테로시클로알킬 에테르(예를 들어 메틸 또는 테트라하이드로피라닐 에테르), 알콕시메틸 에테르(예를 들어, 메톡시메틸 또는 에톡시메틸 에테르), 선택적으로 치환된 아릴 에테르, 및 실릴 에테르(예를 들어 트리메틸실릴(TMS), 트리에틸실릴(TES), 터트-부틸디페닐실릴(TBDPS), 터트-부틸디메틸실릴(TBS/TBDMS), 트라이소프로필실릴(TIPS), 및 [2-(트리메틸실릴)에톡시]-메틸실릴(SEM))를 포함하여, 에테르로서 보호된다. 질소 보호기는 $-NHR^{PR}$ 또는 $-N(R^{PR})_2$ 에서와 같이 일차 또는 이차 아민에 대한 것들을 포함하며, 여기에서 R^{PR} 중 적어도 하나는 질소 원자 보호기이거나, R^{PR} 둘 모두는 함께 보호기를 포함한다.

[0151] 보호기는, 분자 내의 다른 곳에서 원하는 화학적 형질전환을 수행하는 데 필요한 반응 조건 하에서, 그리고 새로 형성된 분자의 정제 중에 필요할 때 원치 않는 부반응(side-reaction) 또는 보호기의 조기 상실을 방지하거나 회피할 수 있는 경우에 적합하며, 새로 형성된 해당 분자의 구조 또는 입체 화학적 완전성에 악영향을 미치지 않는 조건 하에서 제거될 수 있다. 제한이 아닌 예시로서, 적절한 보호기는 보호 작용기에 대해 이전에 기술된 것들을 포함할 수 있다. 적절한 보호기는 때때로 펩티드 결합 반응에 사용되는 보호기이다.

[0152] "방향족 알코올"은 그 자체로서 또는 더 큰 구조의 일부로서 하이드록실 작용기 $-OH$ 로 치환된 방향족 고리 시스템을 지칭한다. 따라서, 방향족 알코올은 방향족 고리 시스템의 방향족 탄소에 결합된 하이드록실 작용기를 갖는, 본원에 기술된 것과 같은 임의의 아릴, 헤테로아릴, 아릴렌, 및 헤테로아릴렌 모이어티를 지칭한다. 방향

족 알코올은, 이의 방향족 고리 시스템이 이러한 잔기의 치환기인 경우에 더 큰 모이어티의 일부일 수 있거나, 고리 융합에 의해 더 큰 모이어티에 포매될 수 있고, 하나 이상의 다른 하이드록실 치환기를 포함하여 본원에 기술된 것과 같은 모이어티로 선택적으로 치환될 수 있다. 페놀 알코올은 방향족 고리로서 페놀기를 갖는 방향족 알코올이다.

[0153] "지방족 알코올"은 그 자체로서 또는 더 큰 구조의 일부로서, 하이드록실 작용기 -OH에 결합된 비방향족 탄소를 갖는 모이어티를 지칭한다. 하이드록시-함유 탄소는 치환되지 않거나(즉, 메틸 알코올), 선형 또는 환형 구조 내에서 일차 알코올, 또는 이차 또는 삼차 지방족 알코올을 정의하기 위한 1개, 2개, 또는 3개의 선택적으로 치환된 분지형 또는 비분지형 알킬 치환기를 가질 수 있다. 더 큰 구조의 일부일 때, 알코올은 하이드록시 함유 탄소를 통해, 이 하이드록실 함유 탄소에 대한 본원에 기술된 것과 같은 알킬 또는 다른 모이어티의 탄소를 통해, 또는 이러한 알킬 또는 다른 모이어티의 치환기를 통해 결합함으로써 이 구조의 치환기가 될 수 있다. 지방족 알코올은 하이드록시 작용기가 이의 환형 고리 시스템의 비방향족 탄소에 결합되는 비방향족 환형 구조(즉, 선택적으로 치환된 탄소환 및 헤테로-탄소환)를 고려한다.

[0154] 본원에서 사용되는 바와 같이, "아릴알킬" 또는 "헤테로아릴알킬"은 아릴 모이어티가 알킬 모이어티에 결합되는 치환기, 모이어티, 또는 기, 즉 아릴-알킬-를 의미하며, 여기서 알킬 및 아릴기는 전술한 것, 예를 들어 C_6H_5- CH_2- 또는 $C_6H_5-CH_3$) CH_2- 이다. 아릴알킬 또는 헤테로아릴알킬은 이의 알킬 모이어티의 sp^3 탄소를 통해 더 큰 구조 또는 모이어티와 연관된다.

[0155] 본원에서 사용되는 바와 같이, "숙신이미드 모이어티"는 숙신이미드 고리 시스템으로 구성된 유기 모이어티를 지칭하며, 이는 일반적으로 해당 고리 시스템의 이미드 질소에 결합된 알킬렌 함유 모이어티로 추가로 구성되는 식 (PL-A)의 화합물 중에 일 유형의 Y'으로 존재한다. 숙신이미드 모이어티는 일반적으로 캄프토테신 페이로드 화합물(식 II)의 말레이미드 고리 시스템에 세포 결합체의 티올기의 마이클 첨가에 의해 생성된다. 따라서, 숙신이미드 모이어티는 티오-치환된 숙신이미드 고리 시스템으로 구성되고, 캄프토테신 접합체에 존재할 때, 캄프토테신 접합체의 나머지 세포 결합체로 치환된 이미드 질소를 가지며, 식 II의 화합물의 말레이미드 고리 시스템 상에 존재하는 치환기(들)로 선택적으로 치환된다.

[0156] 본원에서 사용되는 바와 같이, "산-아미드 모이어티"는 숙신이미드 모이어티의 티오-치환된 숙신이미드 고리 시스템이 가수분해에 의해 이의 카르보닐-질소 결합 중 하나가 파괴되어 생성된 아미드 치환기를 갖는 숙신산을 지칭한다. 숙신산-아미드 모이어티를 생성하는 가수분해는 항체-티오 치환기를 제거함으로써 이 모이어티가 결합되는 링커가 조기 상실될 가능성을 낮춘다. 티오-치환된 숙신이미드 모이어티의 숙신이미드 고리 시스템의 가수분해는, 식 II의 화합물의 말레이미드 고리 시스템에 존재하는 임의의 치환기 및 표적화 리간드에 의해 도입된 티오 치환기에 적어도 부분적으로 기인하는 숙신이미드 고리 시스템의 2개의 카르보닐 탄소 간의 반응성 차이로 인해 산-아미드 모이어티의 위치화학적 이성질체를 제공할 것으로 예상된다.

[0157] 본원에서 사용되는 바와 같이, 용어 "전구약물"은 화학적 또는 생물학적 가공(즉, 화학적 반응 또는 효소적 생체 내 변화)을 통해 신체 내에서 보다 생물학적으로 활성인 화합물로 형질전환되는 생물학적으로 덜 활성이거나 비활성인 화합물을 지칭한다. 전형적으로, 생물학적 활성 화합물은 전구약물 모이어티로 화합물을 화학적으로 변형시킴으로써 생물학적으로 덜 활성이 된다(즉, 전구약물로 변환된다). 일부 양태에서, 전구약물은 세포 외부에서, 예를 들어 소화액에서, 또는 신체의 순환계에서, 예를 들어 혈액에서 생물활성화되는 II형 전구약물이다. 예시적인 전구약물은 에스테르 및 (β -D-글루코피라노시드)이다.

[0158] 많은 경우에, 본원에 기술된 접합체, 링커, 및 성분의 조립체는 반응성 기를 지칭하게 된다. "반응성 기" 또는 RG는, 캄프토테신 페이로드 또는 캄프토테신 접합체의 링커의 성분 또는 캄프토테신과 결합을 형성할 수 있는 반응성 부위(RS)를 함유하는 기이다. RS는 반응성 기(RG) 내의 반응성 부위이다. 반응성 기는 이황화 결합 또는 티오에테르 결합을 형성하기 위한 티올기, 하이드라진 결합을 형성하기 위한 알데히드, 케톤, 또는 히드라진기, 펩티드 결합을 형성하기 위한 카르복시기 또는 아미노기, 에스테르 결합을 형성하기 위한 카르복시기 또는 하이드록시기, 설포아미드 결합을 형성하기 위한 설포산, 카르바메이트 결합을 형성하기 위한 알코올, 및 설포아미드 결합 또는 카르바메이트 결합을 형성하기 위한 아민을 포함한다. 다음 표는 반응성 기, 반응성 부위, 및 반응성 부위의 반응 후에 형성될 수 있는 예시적인 작용기를 예시한 것이다. 표는 한정하기 위한 것은 아니다. 당업자는 표에서 언급된 R' 및 R" 부분이 RG를 예시적인 작용기 중 하나로 변환하는 데 제공된 결합 형성과 양립 가능한 효과적인 임의의 유기 모이어티(예를 들어 알킬기, 아릴기, 헤테로아릴기, 또는 치환된 알킬기, 아릴기, 또는 헤테로아릴기)인 것을 이해할 것이다. 또한, 본 발명의 구현예에 적용되는 바와 같이, R'은 자가 안정

화 링커 또는 임의의 이차 링커의 하나 이상의 성분을 나타낼 수 있고, 경우에 따라, R'은 임의의 이차 링커, 캄프토테신, 안정화 유닛, 또는 검출 유닛의 하나 이상의 성분을 나타낼 수 있음을 이해할 것이다.

RG	RS	예시적인 작용기
1) R'—SH	—S—	R'—S—R" R'—S—S—R"
2) R'—C(=O)OH	—C(=O)—	R'—C(=O)NH—R"
3) R'—C(=O)ONHS	—C(=O)—	R'—C(=O)NH—R"
4) R'S(=O) ₂ —OH	—S(=O) ₂ —	R'S(=O) ₂ NH—R"
5) R'—CH ₂ —X (X is Br, I, Cl)	—CH ₂ —	R'—CH ₂ —S—R"
6) R'—NH ₂	—N—	R'—NHC(=O)R"

[0159]

[0160]

본 발명에 의해 고려되는 치환기 및 변수의 조합은 안정한 화합물의 형성을 유도하는 것들 뿐이다. 본원에서 사용되는 바와 같이, 용어 "**안정화**"은 제조를 허용하기에 충분한 안정성을 가지며, 본원에서 상세히 기술된 목적 (예를 들어, 대상체에게 치료적 또는 예방적 투여)에 유용할 수 있는 충분한 기간 동안 화합물의 무결성을 유지하는 화합물을 지칭한다.

[0161]

본 발명의 화합물은, 제조된 후에, 바람직하게는 단리되고 정제되어, 중량 기준으로 95% 이상의 양을 함유하는 ("실질적으로 순수한") 조성물로서 수득된 다음, 본원에 기술된 것과 같이 사용되거나 제형화된다.

[0162]

본원에서 사용되는 용어 "**접합체**"는 세포 결합체에 연결된 본원에 기술된 화합물 또는 이의 유도체를 지칭한다.

[0163]

본원에서 사용되는 바와 같이, 용어 "**세포 결합체에 연결 가능한**"은 화합물 또는 이의 유도체를 세포 결합체에 결합시키기에 적합한 적어도 하나의 연결기 또는 이의 전구체를 포함하는 본원에 기술된 화합물 또는 이의 유도체를 지칭한다.

[0164]

주어진 기의 "**전구체**"라는 용어는 임의의 탈보호, 화학적 변형, 또는 결합 반응에 의해 해당 기를 생성할 수 있는 임의의 기를 지칭한다.

[0165]

본원에서 사용되는 바와 같이, 용어 "**세포 결합체에 연결된**"은 적합한 연결기 또는 이의 전구체를 통해 세포 결합체에 연결된 본원에 기술된 화합물 또는 이의 유도체 중 적어도 하나를 포함하는 접합체 분자를 지칭한다.

[0166]

용어 "**비정상적인 세포 성장**" 및 "**증식성 장애**"는 본 출원에서 상호 교환적으로 사용된다. 본원에서 사용되는 바와 같이, "**비정상적인 세포 성장**"은, 달리 명시되지 않는 한, 정상적인 조절 메커니즘과 독립적인 (예를 들어 접촉 억제의 상실) 세포 성장을 지칭한다. 이는, 예를 들어 다음을 포함한다: (1) 돌연변이된 티로신 키나아제의 발현 또는 수용체 티로신 키나아제의 과발현에 의해 증식하는 종양 세포(종양)의 비정상적인 성장; (2) 비정상적인 티로신 키나아제 활성화가 발생하는 다른 증식성 질환의 양성 및 악성 세포의 비정상적인 성장; (3) 수용체 티로신 키나아제에 의해 증식하는 임의의 종양의 비정상적인 성장; (4) 비정상적인 세린/트레오닌 키나아제 활성화에 의해 증식하는 임의의 종양의 비정상적인 성장; 및 (5) 비정상적인 세린/트레오닌 키나아제 활성화가 발생하는 다른 증식성 질환의 양성 및 악성 세포의 비정상적인 성장.

[0167]

용어 "**암(cancer 및 cancerous)**"은 조절되지 않는 세포 성장을 전형적인 특징으로 하는 포유동물에서의 생리학 적 병태를 지칭하거나 이를 기술한다. "종양"은 하나 이상의 암세포 및/또는 양성 또는 전암성 세포를 포함한다.

[0168]

"**치료제**"는 항체, 펩티드, 단백질, 효소와 같은 생물학적 제제 또는 화학요법제 둘 다를 포함한다.

[0169]

"**화학요법제**"는 암의 치료에 유용한 화학적 화합물이다.

[0170]

"**대사산물**"은 특정 화합물, 이의 유도체, 또는 이의 접합체, 또는 이의 임의의 신체 내 대사를 통해 생산된 생성물이다. 화합물, 이의 유도체, 또는 이의 접합체의 대사산물은 당업계에 공지된 일상적인 기술을 사용해 식별할 수 있고, 본원에 기술된 것과 같은 시험을 사용하여 결정된 이들의 활성을 사용해 식별할 수 있다. 이러한 생성물은, 예를 들어 투여된 화합물의 산화, 하이드록실화, 환원, 가수분해, 아미드화, 탈아미드화, 에스테르화, 탈 에스테르화, 효소 절단 등에 의해 생성될 수 있다. 따라서, 본 발명은 본 발명의 화합물, 이의 유도체, 또는 이의 접합체를 포함하며, 여기에는 다음을 포함하는 방법에 의해 생성된 화합물, 이의 유도체, 또는 이의 접합체

를 포함한다: 본 발명의 화합물, 이의 유도체, 또는 이의 접합체를 이의 대사 산물을 수득하기에 충분한 기간 동안 포유동물과 접촉시키는 단계.

[0171] 본원에서 정의된 바와 같은 "링커", "링커 모이어티", 또는 "연결기"는 2개의 기, 예컨대 세포 결합제와 세포독성 화합물을 함께 연결하는 모이어티를 지칭한다. 일반적으로, 링커는 링커가 연결하는 2개의 기가 연결되는 조건 하에서 실질적으로 불활성이다. 이작용성 가교제는, 하나의 반응성 기가 세포독성 화합물과 먼저 반응하여 링커 모이어티를 함유하는 화합물을 제공한 다음, 두 번째 반응성기 세포 결합제와 반응할 수 있도록, 링커 모이어티의 각 단부에 하나씩, 2개의 반응성 기를 포함할 수 있다. 대안적으로, 이작용성 가교제의 일 단부가 세포 결합제와 먼저 반응하여 링커 모이어티를 함유하는 세포 결합제를 제공한 다음, 두 번째 반응성 기가 세포독성 화합물과 반응할 수 있다. 연결 모이어티는 특정 부위에서 세포독성 모이어티의 방출을 가능하게 하는 화학적 결합을 함유할 수 있다. 적절한 화학적 결합은 당업계에 잘 알려져 있고, 이황화 결합, 티오에테르 결합, 산 불안정성 결합, 광 불안정성 결합, 펩티다아제 불안정성 결합, 및 에스테라제 불안정성 결합을 포함한다(예를 들어, 미국 특허 제5,208,020호; 제5,475,092호; 제6,441,163호; 제6,716,821호; 제6,913,748호; 제7,276,497호; 제7,276,499호; 제7,368,565호; 제7,388,026호; 및 제7,414,073호 참조). 이황화 결합, 티오에테르 및 펩티다아제 불안정 결합이 바람직하다. 본 발명에서 사용될 수 있는 다른 링커는 미국 특허 공개 제20050169933호에 상세히 기술된 것과 같은 비절단성 링커, 또는 US 2009/0274713, US 2010/01293140, 및 WO 2009/134976에 기술된 하전된 링커 또는 친수성 링커를 포함하며, 이들 문헌 각각은 참조로서 본원에 명시적으로 통합된다.

[0172] 용어 "아미노산"은 자연 발생 아미노산 및 합성 아미노산뿐만 아니라, 자연 발생 아미노산과 유사한 방식으로 작용하는 아미노산 유사체 및 아미노산 모방체를 지칭한다. 자연 발생 아미노산은 유전자 코드에 의해 암호화된 것들뿐만 아니라, 나중에 변형되는 아미노산, 예를 들어 하이드록시프롤린, γ -카르복시글루타메이트, 셀리노스티엔, 및 O-포스포세린이다. 아미노산 유사체는 자연 발생 아미노산과 동일한 염기성 화학 구조를 갖는 화합물, 즉 탄소가 수소, 카르복실기, 아미노기, 및 R 기, 예를 들어, 호모세린, 노르류신, 메티오닌 설폭시드, 메티오닌 메틸 설포늄에 결합되는 구조를 갖는 화합물을 지칭한다. 이러한 유사체는 변형된 R 기(예를 들어, 노르류신) 또는 변형된 펩티드 백본을 갖지만, 자연 발생 아미노산과 동일한 염기성 화학 구조를 유지한다. 특히 사용될 수 있는 하나의 아미노산은 시트룰린으로서, 이는 아르기닌의 유도체이고, 간에서 우레아의 형성에 관여한다. 아미노산 모방체는 아미노산의 일반적인 화학 구조와는 상이하지만, 자연 발생 아미노산과 유사한 방식으로 작용하는 구조를 갖는 화학적 화합물을 지칭한다. 용어 "비천연 아미노산"은 전술한 20개의 자연 발생 아미노산의 "D" 입체화학 형태를 나타내도록 의도된다. 비천연 아미노산이란 용어는 천연 아미노산 또는 이의 D 이성질체의 상동체, 및 천연 아미노산의 합성 변형된 형태를 포함한다는 것이 추가로 이해된다. 합성 변형된 형태는, 최대 2개의 탄소 원자만큼 짧아지거나 길어진 측쇄를 갖는 아미노산, 선택적으로 치환된 아릴기를 포함하는 아미노산, 및 할로겐화된 기, 바람직하게는 할로겐화된 알킬 및 아릴 기로 이루어진 아미노산, 및 N-메틸-알라닌과 같은 N-치환된 아미노산도 포함하지만, 이에 한정되지는 않는다. 아미노산 또는 펩티드는 아미노산 또는 펩티드의 말단 아민 또는 말단 카르복시산을 통해 링커/스페이서 또는 세포 결합제에 부착될 수 있다. 아미노산은 또한, 시스테인의 티올기, 리신의 엽실론 아민, 또는 세린 또는 트레오닌의 측쇄 하이드록실과 같은 (이에 한정되지는 않음) 측쇄 반응성 기를 통해 링커/스페이서 또는 세포 결합제에 부착될 수 있다.

[0173] 구현예에서, 아미노산은 $\text{NH}_2\text{-C}(\text{R}^{\text{aa}}\text{R}^{\text{aaa}})\text{-C(=O)OH}$ 로 표시되며, 식 중 R^{aa} 및 R^{aaa} 은 각각 독립적으로 H, 선택적으로 치환된 선형, 분지형, 또는 환형 알킬, 1 내지 10개의 탄소 원자를 갖는 알케닐 또는 알키닐, 아릴, 헤테로아릴, 또는 헤테로시클릴이거나, R과 N-말단 질소 원자는 (예를 들어, 프롤린에서와 같이) 함께 헤테로환 고리를 형성할 수 있다. 용어 "아미노산 잔기"는 하나의 수소 원자가 아민으로부터 제거되고/되거나 하이드록실기가 아미노산의 카르복시 말단으로부터 제거될 때의 상응하는 잔기, 예컨대 $\text{-NH-C}(\text{R}^{\text{aa}}\text{R}^{\text{aaa}})\text{-C(=O)O-}$ 를 지칭한다.

[0174] 본원에서 사용되는 바와 같이, 아미노산은 L 또는 D 이성질체일 수 있다. 달리 명시되지 않는 한, 아미노산을 참조할 경우, 아미노산은 L 또는 D 이성질체 또는 이의 혼합물일 수 있다. 구현예에서, 펩티드가 이의 아미노산 서열에 의해 참조될 때, 아미노산의 각각은 달리 명시되지 않는 한 L 또는 D 이성질체일 수 있다. 펩티드 내 아미노산 중 하나가 D 이성질체로서 특정되는 경우, 달리 명시되지 않는 한, 다른 아미노산(들)은 L 이성질체이다. 예를 들어, 펩티드 D-Ala-Ala는 D-Ala-L-Ala를 의미한다.

[0175] 아미노산 및 펩티드는 차단기에 의해 보호될 수 있다. 차단기는 원하지 않는 반응으로부터 아미노산 또는 펩티드의 N-말단을 보호하는 원자 또는 화학적 모이어티이며, 이는 약물-리간드 접합체를 합성하는 동안 사용될 수 있다. 이는 합성 전 과정에 걸쳐 N-말단에 부착된 상태로 유지되어야 하며, 약물 접합체의 합성이 완료된 후에,

화학물질에 의해서 또는 차단기를 선택적으로 제거할 수 있는 다른 조건에 의해 제거될 수 있다. N-말단 보호에 적합한 차단기는 펩티드 화학 분야에 잘 알려져 있다. 예시적인 차단기는 메틸 에스테르, 터트-부틸 에스테르, 9-플루오레닐메틸 카르바메이트(Fmoc), 및 카보벤조옥시(Cbz)를 포함하지만, 이에 한정되지는 않는다.

[0176] 용어 "**프로테아제에 의해 절단 가능한 펩티드**"는 프로테아제의 절단 인식 서열을 함유하는 펩티드를 지칭한다. 본원에서 사용되는 바와 같이, 프로테아제는 펩티드 결합을 절단할 수 있는 효소이다. 프로테아제에 대한 절단 인식 서열은 단백질분해에 의한 절단 동안 프로테아제에 의해 인식되는 특정 아미노산 서열이다. 많은 프로테아제 절단 부위가 당업계에 공지되어 있고, 이들 및 다른 절단 부위는 링커 모이어티에 포함될 수 있다. 예를 들어, Matayoshi 등의 문헌[*Science* **247**: 954 (1990)]; Dunn 등의 문헌[*Meth. Enzymol.* **241**: 254 (1994)]; Seidah 등의 문헌[*Meth. Enzymol.* **244**: 175 (1994)]; Thornberry의 문헌[*Meth. Enzymol.* **244**: 615 (1994)]; Weber 등의 문헌[*Meth. Enzymol.* **244**: 595 (1994)]; Smith 등의 문헌[*Meth. Enzymol.* **244**: 412 (1994)]; Bouvier 등의 문헌[*Meth. Enzymol.* **248**: 614 (1995)]; 및 Masters 등이 편집한 Hardy 등의 문헌[*AMYLOID PROTEIN PRECURSOR IN DEVELOPMENT, AGING, AND ALZHEIMER'S DISEASE*, pp. 190-198 (1994)] 참조.

[0177] 펩티드 서열은 프로테아제에 의해 절단되는 능력에 기초하여 선택되며, 이의 비제한적인 예는 카텡신 B, C, D, H, L, 및 S, 및 푸린을 포함한다. 바람직하게는, 펩티드 서열은 적절한 단리된 프로테아제에 의해 시험관 내에서 절단될 수 있으며, 이는 당업계에 공지된 시험관 내 프로테아제 절단 검정을 사용하여 시험될 수 있다.

[0178] 또 다른 구현예에서, 펩티드 서열은 리소솜 프로테아제에 의해 절단되는 능력에 기초하여 선택된다. 리소솜 프로테아제는 주로 리소솜에 위치하는 프로테아제이지만, 엔도솜에 위치할 수도 있다. 리소솜 프로테아제의 예는 카텡신 B, C, D, H, L, 및 S, 및 푸린을 포함하지만, 이에 한정되지 않는다.

[0179] 또 다른 구현예에서, 펩티드 서열은 종양-연관 프로테아제, 예컨대 암세포 표면 또는 종양 세포 근처의 세포외에서 발견되는 프로테아제에 의해 절단되는 능력에 기초하여 선택되며, 이러한 프로테아제의 비제한적인 예는 티메트 올리고펩티다아제(Thimet oligopeptidase, TOP), CD10(네프틸리신), 기질 메탈로프로테아제(예컨대 MMP2 또는 MMP9), II형 막관통 세린 프로테아제(예: 헬신, 테스트신, TMPRSS4, 또는 매트립타아제/MT-SP1), 레구마인, 및 하기 참조 문헌에 기술된 효소를 포함한다(Current Topics in Developmental Biology: Cell Surface Proteases, vol. 54 Zucker S. 2003, Boston, MA). 종양-연관 프로테아제에 의해 절단되는 펩티드의 능력은 당업계에 공지된 시험관내 프로테아제 절단 검정을 사용하여 시험할 수 있다.

[0180] 용어 "**양이온**"은 양전하를 갖는 이온을 지칭한다. 양이온은 1가(예를 들어, Na⁺, K⁺ 등), 2가(예를 들어, Ca²⁺, Mg²⁺ 등), 또는 다가(예를 들어, Al³⁺ 등)일 수 있다. 구현예에서, 양이온은 1가이다.

[0181] **HER2**

[0182] HER2는 인간 표피 세포 성장 인자 수용체 2-관련 종양유전자로서 식별된 전형적인 성장 인자 수용체 종양유전자의 종양유전자 산물 중 하나이며, 185 kDa의 분자량을 가지며 티로신 키나아제 도메인을 갖는 막관통 수용체 단백질이다. HER2는 HER1(EGFR, ErbB-1), HER2(neu, ErbB-2), HER3(ErbB-3), 및 HER4(ErbB-4)로 이루어진 EGFR 패밀리의 구성원이며, 이의 동종이량체 형성 또는 또 다른 EGFR 수용체 HER1, HER3 또는 HER4과의 이종이량체 형성에 의해 세포내 티로신 잔기에서 자가포스포릴화되는 것으로 알려져 있고, 이러한 방식으로 그 자체가 활성화됨으로써, 세포 성장, 분화, 및 정상 세포 및 종양 세포에서의 생존에 중요한 역할을 담당한다.

[0183] 본 발명에서 사용될 HER2 단백질의 경우, HER2 단백질은 인간 또는 비인간 포유동물(예를 들어, 랫트 또는 마우스)의 HER2-발현 세포로부터 직접 정제될 수 있고, 사용되거나, 전술한 세포의 세포막 분획이 제조되고 사용될 수 있다. 또한, HER2는 유전자 조작을 통해 숙주 세포에서 이의 시험관 내 합성 또는 이의 생산에 의해 획득될 수 있다. 유전자 조작에서, 구체적으로, HER2 cDNA가 HER2 cDNA를 발현할 수 있는 벡터에 통합된 후, HER2 단백질은 효소, 기질 및 전사 및 번역에 필요한 에너지 물질을 함유하는 용액에서 이를 합성함으로써, 또는 또 다른 원핵세포 또는 진핵세포 형질전환 숙주 세포에서 HER2를 발현시킴으로써 획득될 수 있다. 대안적으로, 전술한 유전적으로 조작된 HER2-발현 세포, 또는 HER2를 발현하는 세포주가 HER2 단백질을 사용하여 사용될 수 있다.

[0184] HER2의 DNA 서열 및 아미노산 서열은 공개 데이터베이스에 개시되고, 예를 들어, 수탁 번호 M11730(GenBank), NP_004439.2(NCBI) 등을 참조할 수 있다.

[0185] 또한, 아미노산 서열로 이루어진 단백질로서, 하나 또는 여러 개의 아미노산이 전술한 HER2의 전술한 아미노산 서열 중 어느 하나로 치환되고, 결실되고/되거나 추가되고, 단백질과 동등한 생물학적 활성을 갖는 아미노산 서열로 이루어진 단백질 또한 HER2에 포함된다.

- [0186] 인간 HER2 단백질은 N-말단 22개의 아미노산 잔기, 630개의 아미노산 잔기로 이루어진 세포외 도메인, 23개의 아미노산 잔기로 이루어진 막관통 도메인, 및 580개의 아미노산 잔기로 이루어진 세포내 도메인으로 이루어진 신호 서열로 구성된다.
- [0187] HER2는 유방암, 위암, 폐암(예를 들어, 비소세포 폐암), 및 난소암과 같은 다양한 암 유형에서 과발현되며, 유방암에 대한 음성 예후 인자인 것으로 보고되었다.
- [0188] **항-HER2 항체**
- [0189] 항-HER2 항체는 종양 세포를 표적화할 수 있는 항체로서, 종양 세포, 종양 세포에 대한 결합 특성, 종양 세포 내재화 특성, 종양 세포에 대한 세포 활성화, 종양 세포에 대한 세포살상 활성화 등을 가지며, 항종양 활성을 갖는 약물과 링커를 통해 접합되어 항체-약물 접합체를 형성할 수 있다. 본원에 기술된 화합물, 조성물 및 방법에 사용하기에 적합한 비제한적인 항-HER2 항체는 아래의 예시적인 특성 중 어느 하나, 또는 이들의 임의의 조합을 갖는 것들을 포함한다:
- [0190] (1) 항-HER2 항체로서:
- [0191] (a) HER2에 특이적으로 결합하고,
- [0192] (b) HER2에 결합함으로써, HER2-발현 세포에서 내재화 활성을 갖는, 항-HER2 항체.
- [0193] (2) 전술한 (1)에 따른 항체로서, 항체는 HER2의 세포외 도메인에 결합하는, 항체.
- [0194] (3) 전술한 (1) 또는 (2)에 따른 항체로서, 항체는 단클론 항체인, 항체.
- [0195] (4) 전술한 (1) 내지 (3) 중 어느 하나에 따른 항체로서, 항체는 항체 의존성 세포독성(ADCC) 활성화 및/또는 보체 의존성 세포독성(CDC) 활성을 갖는, 항체.
- [0196] (5) 전술한 (1) 내지 (4) 중 어느 하나에 따른 항체로서, 항체는 마우스 단클론 항체, 키메라 단클론 항체, 또는 인간화 단클론 항체인, 항체.
- [0197] (6) 전술한 (1) 내지 (5)에 따른 항체로서, 항체는 인간화 단클론 항체인, 항체.
- [0198] 트라스투주맵(Herceptin[®])은 재조합 인간화 항-HER2 단클론 항체(huMAb4D5-8, rhuMAb HER2)로 명명된 마우스 항-HER2 항체 4D5의 인간화 단클론 항체이다. 트라스투주맵은 HER2의 세포외 영역 IV에 특이적으로 결합하여 항체 의존성 세포 세포독성(ADCC)을 유도하거나 HER2로부터의 신호 전달 억제를 통해 항암 효과를 발휘한다. 트라스투주맵은 HER2를 과발현하는 종양에 매우 효과적이며, 따라서 HER2를 과발현하는 전이성 유방암 환자를 위한 치료제로서 미국에서는 1999년에, 일본에서는 2001년에 출시되었다.
- [0199] 트라스투주맵은 유방암 치료에 치료적 효과가 있지만, HER2를 과발현하는 유방암을 가진 일부 환자는 트라스투주맵 치료에 대해 반응이 없거나 단지 약한 반응을 갖는다. 본 발명의 항-HER2 항체-약물 접합체에 사용된 항-HER2 항체는 임의의 종으로부터 유래될 수 있고, 이러한 종의 바람직한 예는 인간, 랫트, 마우스 및 토끼를 포함할 수 있다. 항체가 인간 종 이외의 종으로부터 유래되는 경우, 이는 바람직하게는 공지된 기술을 사용하여 키메라화되거나 인간화된다. 본 발명의 항체는 다클론 항체 또는 단클론 항체일 수 있으며, 바람직하게는 단클론 항체이다.
- [0200] 트라스투주맵은 서열번호 1로 표시되는 아미노산 서열로 이루어진 중쇄 및 서열번호 2로 표시되는 아미노산 서열로 이루어진 경쇄를 포함한다.
- [0201] 트라스투주맵의 중쇄 아미노산 서열:
- [0202] EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFNIDKTYIHWRQAPGKLEWVARIYPTNGYTRYADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCSRWGGDGFYAMDYWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPTVSWNSGALTSVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHNKSNTKVDKVKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELGGPSVFLFPPKPKDITLMSRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTIKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (서열번호 1)
- [0203] 트라스투주맵의 경쇄 아미노산 서열:
- [0204] DIQMTQSPSSLSASVGRVTITCRASQDVNTAVAWYQQKPGKAPKLLIYSASFLYSGVPSRFSGSRSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQHYTTPPTFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVCLLNNFYPRKAVQWVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSYLSSTLTLSKADYEEKHKVYACEVTHQGLSSP

VTKSFNRGEC (서열번호 2)

[0205] Kabat에 따른 트라스투주맙의 CDR 서열은 다음과 같다:

HCDR1:	GFNIKDTYIH (서열번호 3)
HCDR2:	RIYPTNGYTRYADSVKG (서열번호 4)
HCDR3:	WGGDGFYAMDY (서열번호 5)
LCDR1:	RASQDVNTAVA (서열번호 6)
LCDR2:	SASFLYS (서열번호 7)
LCDR3:	QQHYTTPPT (서열번호 8)

[0206]

[0207] 일부 구현예에서, 항-HER2 항체는: (a) 서열번호 3의 아미노산 서열, (b) 서열번호 4의 아미노산 서열, 및 (c) 서열번호 5의 아미노산 서열로부터 선택되는 1, 2, 또는 3개의 서열을 포함한다. 구현예에서.

[0208] 일부 구현예에서, 항-HER2 항체는 서열번호 1에 대해 적어도 80%의 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하는 중쇄를 포함한다. 일부 구현예에서, 항-HER2 항체는 서열번호 2에 대해 적어도 80%의 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하는 경쇄를 포함한다.

[0209] 일부 구현예에서, 항-HER2 항체는 서열번호 1에 대해 적어도 80%, 85%, 90%, 95% 또는 100%의 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하는 중쇄, 및 서열번호 2에 대해 적어도 80%, 85%, 90%, 95% 또는 100%의 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하는 경쇄를 포함한다.

[0210] 구현예에서, 항체는 서열번호 1의 서열에 의해 달리 정의되는 중쇄의 카르복실 말단에서의 리신 잔기가 결여되어 있다. 구현예에서, 항체는 서열번호 1의 아미노산 잔기 1 내지 449까지로 이루어진 아미노산 서열로 이루어진 중쇄, 및 서열번호 2의 아미노산 잔기 1 내지 214로 이루어진 아미노산 서열로 이루어진 경쇄를 포함한다.

[0211] 일부 구현예에서, 항-HER2 항체는 트라스투주맙이다.

[0212] 일부 구현예에서, 항-HER2 항체는 트라스투주맙의 바이오시밀러(biosimilar)이다. 본 발명의 ADC는 또한 상업적으로 이용 가능한 항체 작제물, 또는 "이노베이터(innovator)"와 매우 유사한, 또는 바이오시밀러인, 항체 작제물에 효과적이다. 바이오시밀러 ADC는 이노베이터 제품(예를 들어, 트라스투주맙)의 면역접합체와 유사하게 수행될 것으로 예상된다. 본원에서 사용되는 바와 같이, 생물학적 제제와 관련하여, 용어 "바이오시밀러"는 해당 생물학적 제제가 임상적으로 비활성인 성분에서의 미미한 차이에도 불구하고 기준 제품과 매우 유사하며, 제품의 안전성, 순도 및 효능 측면에서 해당 생물학적 제제와 기준 제품 간에 임상적으로 의미 있는 차이가 없음을 의미한다.

[0213] 일부 구현예에서, 항-HER2 항체는 트라스투주맙 바이오시밀러이다. 일부 구현예에서, 항-HER2 트라스투주맙 바이오시밀러는, 트라스투주맙-dkst(Ogivri), 트라스투주맙-pkrb(Herzuma), 트라스투주맙-dttb(Ontruzant), 트라스투주맙-qyyp(Trazimera), 및 트라스투주맙-anns(Kanjinti)로 이루어진 군으로부터 선택된다.

[0214] 다른 구현예에서, 항-HER2 항체는 트라스투주맙과 상호교차가 가능하다. 구현예에서, 전술한 상호교차 가능한 항-HER2 항체는 트라스투주맙에 대한 바이오시밀러이며, 임의의 주어진 환자에서 트라스투주맙과 동일한 임상 결과를 생성할 것으로 예상된다.

[0215] 다른 구현예에서, 항-HER2 항체는 트라스투주맙의 바이오베터(biobetter)이다. 구현예에서, "바이오베터" 생물학적 제품은 FDA-승인된 생물학적 제품과 동일한 부류에 포함되고, 기준 생물학적 제제와 동일한 표적 단백질을 목표로 하지만, 동일하지 않으며, 기준 제품에 비해 안전성, 효능, 안정성, 투여 경로 등의 측면에서 개선점을 갖는다.

[0216] **항체의 결합 및 항종양 활성**

[0217] 종양 세포에 대한 항체의 결합 활성은 유세포 분석을 사용하여 확인할 수 있다. 종양 세포 내로의 항체의 내재화는, (1) 치료적 항체에 결합하는 이차 항체(형광 표지됨)를 사용하여 세포 중 혼입된 항체를 형광 현미경으로 시각화하는 검정(Cell Death and Differentiation (2008) 15, 751-761), (2) 치료적 항체에 결합하는 이차 항체(형광 표지됨)를 이용하여 세포 중 혼입된 형광 강도를 측정하는 검정(Molecular Biology of the Cell, Vol.

15, 5268-5282, 2004년 12월), 또는 (3) 치료적 항체에 결합하는 면역독소를 사용하는 Mab-ZAP 검정(독소는 세포 내로 혼입 시 방출되어 세포 성장을 억제함)(Bio Techniques 28: 162-165, 2000년 1월)을 사용하여 확인될 수 있다. 면역독소로서, 디프테리아 독소 촉매 도메인과 단백질 G의 제조함 복합 단백질을 사용할 수 있다.

[0218] 항체의 항종양 활성은 세포 성장에 대한 억제 활성을 측정함으로써 시험관 내에서 확인될 수 있다. 예를 들어, 항체에 대한 표적 단백질을 과발현하는 암 세포주를 배양하고, 항체를 다양한 농도로 배양 시스템에 첨가하여 초점 형성, 콜로니 형성, 및 구상체 성장에 대한 억제 활성을 결정한다. 항종양 활성은, 예를 들어, 표적 단백질을 고도로 발현하는 이식된 종양 세포주를 사용하여 누드 마우스에 항체를 투여하고 암 세포의 변화를 결정함으로써 생체 내에서 확인될 수 있다.

[0219] 항체-약물 접합체에 접합된 화합물은 항종양 효과를 발휘하기 때문에, 항체 자체가 항종양 효과를 가져야 하는 것이 바람직하지만 필수는 아니다. 종양 세포에 대한 항종양 화합물의 세포독성 활성을 특이적으로 및 선택적으로 행사하기 위한 목적으로, 항체가 종양 세포 내로 이동하기 위한 내재화 특성을 가져야 하는 것이 중요하고 또한 바람직하다.

[0220] **항-HER2 항체의 생산**

[0221] 본 발명의 HER2에 대한 항체는, 예를 들어 당업계에서 일반적으로 수행되는 방법에 따라 수득될 수 있으며, 방법은 HER2 또는 HER2의 아미노산 서열로부터 선택된 임의의 폴리펩티드를 사용하여 동물을 면역화하는 단계 및 생체 내에서 생산된 항체를 수집하고 정제하는 단계를 포함한다. 항원으로서 사용될 HER2의 생물학적 종은 인간만으로 한정되지 않으며, 동물은 마우스 또는 랫트와 같은 인간 이외의 동물 또는 랫트 p185neu로부터 유래된 HER2로 면역화될 수 있다. 이 경우, 수득된 이종 HER2 및 인간 HER2에 대한 항체 결합 간의 교차 반응성을 검사함으로써, 인간 질환에 적용할 수 있는 항체가 선택될 수 있다.

[0222] 또한, 단클론 항체는 공지된 방법(예를 들어, Kohler 및 Milstein의 문헌[Nature, (1975) 256, pp. 495-497]; Kennet, R의 문헌(편집)[Monoclonal Antibodies, pp. 365-367, Plenum Press, N.Y. (1980)])에 따라 골수종 세포와 함께 HER2에 대한 항체를 생산하는 항체를 융합함으로써 확립된 하이브리도마로부터 수득될 수 있다.

[0223] 항원으로서 사용될 HER2는 유전자 조작을 사용하여 숙주 세포에서 HER2 유전자를 발현함으로써 수득될 수 있다. 구체적으로, HER2 유전자를 발현할 수 있는 벡터가 생산되고, 생성된 벡터가 숙주 세포 내로 형질감염되어 유전자를 발현한 다음, 발현된 HER2가 정제된다.

[0224] 대안적으로, 전술한 유전적으로 조작된 HER2-발현 세포, 또는 HER2를 발현하는 세포주가 HER2 단백질로서 사용될 수 있다. 항-HER2 항체는 당업계에 공지된 절차에 의해 수득될 수 있다. 이하, HER2에 대한 항체를 수득하는 방법이 구체적으로 기술된다.

[0225] **항원의 제조**

[0226] 항-HER2 항체를 생산하는 데 사용될 항원의 예는 HER2, 또는 HER2의 적어도 6개의 연속적인 아미노산을 포함하는 부분 아미노산 서열로 이루어진 폴리펩티드, 또는 주어진 아미노산 서열 또는 담체를 이에 첨가함으로써 수득된 유도체를 포함한다.

[0227] HER2는 인간 종양 조직 또는 종양 세포로부터 직접 정제되어 사용될 수 있다. 또한, HER2는 시험관 내에서 이를 합성하거나 유전자 조작에 의해 숙주 세포에서 생산함으로써 수득될 수 있다.

[0228] 유전자 조작에 대하여, 구체적으로, HER2 cDNA가 HER2 cDNA를 발현할 수 있는 벡터에 통합된 후, HER2는 효소, 기질 및 전사 및 번역에 필요한 에너지 물질을 함유하는 용액에서 이를 합성함으로써, 또는 또 다른 원핵세포 또는 진핵세포 형질전환 숙주 세포에서 HER2를 발현시킴으로써 수득될 수 있다.

[0229] 또한, 항원은 또한, 적절한 숙주-벡터 시스템에서 항체의 불변 영역에, 막 단백질인 HER2의 세포외 도메인을 결합시킴으로써 수득된 융합 단백질을 발현시킴으로써, 분비 단백질로서 수득될 수 있다.

[0230] HER2 cDNA는, 예를 들어, 템플릿으로서 HER2 cDNA를 발현하는 cDNA 라이브러리 및 HER2 cDNA를 특이적으로 증폭시키는 프라이머를 사용하여 중합효소 연쇄 반응이 수행되는 소위 PCR 방법에 의해 수득될 수 있다(PCR; Saiki, R. K. 등의 문헌[Science, (1988) 239, pp. 487-489]).

[0231] 폴리펩티드의 시험관 내 합성으로서, 예를 들어, Roche Diagnostics, Inc.에서 제조된 Rapid Translation System(RTS)이 예시될 수 있지만, 이에 한정되지는 않는다.

- [0232] 원핵 숙주 세포의 예는 대장균 및 바실루스 서브틸리스(Bacillus subtilis)를 포함한다. 표적 유전자로 숙주 세포를 형질전환시키기 위해, 숙주 세포는 레플리콘, 즉 숙주와 양립 가능한 종으로부터 유래된 복제 기원, 및 조절 서열을 포함하는 플라스미드 벡터에 의해 형질전환된다. 또한, 벡터는 바람직하게는 형질전환된 세포에 표현형 선택성을 부과할 수 있는 서열을 갖는다.
- [0233] 진핵 숙주 세포의 예는 척추동물 세포, 곤충 세포, 및 효모 세포를 포함한다. 척추동물 세포로서, 예를 들어, 시미안 COS 세포(Gluzman, Y., Cell, (1981) 23, pp. 175-182, ATCC CRL-1650; ATCC: American Type Culture Collection), 쥐와 섬유아세포 NIH3T3(ATCC No. CRL-1658), 및 차이나이즈 햄스터 난소 세포(CHO 세포; ATCC: CCL-61)의 디하이드로엽산 환원효소 결핍 계통(Urlaub, G. 및 Chasin, L. A., Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1980) 77, pp. 4126-4220); 등이 종종 사용되지만, 세포는 이에 한정되지 않는다.
- [0234] 이렇게 수득된 형질전환체는 당업계에서 일반적으로 수행되는 방법에 따라 배양될 수 있고, 형질전환체의 배양에 의해 표적 폴리펩티드가 세포 내 또는 세포 외에서 생산된다.
- [0235] 배양에 사용될 적절한 배지는 사용된 숙주 세포에 따라 통상적으로 사용되는 다양한 배양 배지로부터 선택될 수 있다. 대장균이 사용되는 경우, 예를 들어, 필요에 따라 압피실린 또는 IPMG와 같은 항생제가 보충된 LB 배지가 사용될 수 있다.
- [0236] 이러한 배양을 통해 형질전환체에 의해 세포내 또는 세포외에서 생산된 재조합 단백질은 단백질의 물리적 또는 화학적 특성을 이용하는 임의의 공지된 분리 방법에 의해 분리되고 정제될 수 있다.
- [0237] 방법의 특정 예는 공통 단백질 침전제, 한외여과, 다양한 유형의 액체 크로마토그래피, 예컨대 분자 체 크로마토그래피(겔여과), 흡착 크로마토그래피, 이온 교환 크로마토그래피, 및 친화도 크로마토그래피, 투석, 및 이들의 조합을 이용한 처리를 포함한다.
- [0238] 또한, 발현될 재조합 단백질에 6개의 히스티딘 잔기의 태그(서열번호 9)를 부착함으로써, 단백질은 니켈 친화성 컬럼으로 효율적으로 정제될 수 있다. 대안적으로, 발현될 재조합 단백질에 IgG Fc 영역을 부착함으로써, 단백질은 단백질 A 컬럼으로 효율적으로 정제될 수 있다.
- [0239] 전술한 방법을 조합함으로써, 다량의 표적 폴리펩티드가 고 수율 및 고 순도로 용이하게 생산될 수 있다.
- [0240] 전술한 형질전환체 자체가 항원으로서 사용될 수 있다. HER2를 발현하는 세포주가 또한 항원으로서 사용될 수 있다. 이러한 세포주의 예는 인간 유방암 세포주 SK-BR-3, BT-474, KPL-4, 및 JIMT-1, 인간 위암 세포주 NCI-N87, 및 인간 난소암 세포주 SK-OV-3을 포함할 수 있다. 본 발명의 세포주는 HER2를 발현하는 한 이들 세포주에 한정되지 않는다.
- [0241] **항-HER2 단클론 항체의 생산**
- [0242] HER2에 특이적으로 결합하는 항체의 예는 HER2에 특이적으로 결합하는 단클론 항체를 포함하며, 이러한 항체를 수득하는 방법은 아래에 기술된 바와 같다.
- [0243] 단클론 항체의 생산은 대체적으로 다음의 작동 단계를 필요로 한다:
- [0244] (a) 항원으로서 사용될 바이오중합체를 정제하거나, 항원-발현 세포를 제조하는 단계;
- [0245] (b) 항원을 주사하여 동물을 면역화시킴으로써 항체 생산 세포를 제조하고, 혈액을 채취하고, 비장이 절제되는 때를 결정하기 위해 항체 역가를 검정하는 단계;
- [0246] (c) 골수종 세포(이하 "골수종"으로 지칭함)를 제조하는 단계;
- [0247] (d) 항체 생산 세포를 골수종과 융합시키는 단계; (e) 원하는 항체를 생산하는 하이브리도마 군을 스크리닝하는 단계;
- [0248] (f) 하이브리도마를 단일 세포 클론으로 분할하는 단계(복제);
- [0249] (g) 선택적으로, 다량의 단클론 항체를 생산하기 위해 하이브리도마를 배양하거나 하이브리도마를 이식한 동물을 사육하는 단계;
- [0250] (h) 생성된 단클론 항체를 생물학적 활성 및 결합 특이성에 대해 검사하거나, 표지된 시약과 같은 특성에 대해 이를 검정하는 단계; 등.
- [0251] 이하에서, 단클론 항체를 생산하는 방법은 전술한 단계에 따라 상세히 기술될 것이지만, 방법은 이에 제한되지

않으며, 예를 들어, 비장 세포 및 골수종 이외의 항체 생산 세포가 사용될 수 있다.

[0252] **항원의 정제**

[0253] 항원으로서, 전술한 바와 같은 방법에 의해 제조된 HER2 또는 이의 부분적인 펩티드가 사용될 수 있다.

[0254] 또한, HER2를 발현하는 재조합 세포 또는 HER2 자체를 발현하는 재조합 세포로부터 제조된 막 분획, 및 당업자에게 공지된 방법에 의해 화학적으로 합성된 본 발명의 단백질의 부분 펩티드 또한 항원으로서 사용될 수 있다.

[0255] 또한, HER2-발현 세포주가 항원으로서 사용될 수 있다.

[0256] **항체-생성 세포의 제조**

[0257] 단계 (a)에서 수득된 항원을 Freund의 완전 또는 불완전 보강제 또는 알루미늄 황산칼륨과 같은 보조제와 같은 보강제와 혼합하고, 생성된 혼합물을 면역원으로서 사용하여 실험 동물을 면역화시킨다. 다른 방법은 면역원으로서의 항원-발현 세포로 실험 동물을 면역화시키는 단계를 포함한다. 실험 동물로서, 공지된 하이브리도마 생산 방법에 사용된 임의의 동물을 지장 없이 사용할 수 있다. 구체적으로, 예를 들어, 마우스, 랫트, 염소, 양, 소, 말 등이 사용될 수 있다. 그러나, 추출된 항체 생성 세포와 융합될 골수종 세포의 가용성의 용이성 관점에서, 바람직하게는 마우스 또는 랫트가 면역화될 동물로서 사용된다.

[0258] 또한, 사용될 마우스 또는 랫트의 계통은 특별히 제한되지 않으며, 예를 들어, 마우스의 경우, A, AKR, BALB/c, BDP, BA, CE, C3H, 57BL, C57BL, C57L, DBA, FL, HTH, HT1, LP, NZB, NZW, RF, R III, SJL, SWR, WB, 및 129 등과 같은 다양한 계통이 사용될 수 있으며, 랫트의 경우, 예를 들어, 위스타(Wistar), 로우(Low), 루이스(Lewis), 스프라우(Sprague), 다우리(Dawley), ACI, BN, 피셔(Fischer) 등이 사용될 수 있다.

[0259] 이들 마우스 및 랫트는 실험 동물 사육자/판매자, 예를 들어, CLEA Japan, Inc. 및 Charles River Laboratories Japan, Inc.으로부터 상업적으로 입수 가능하다.

[0260] 면역화될 동물로서, 후술하는 골수종 세포와의 융합의 호환성을 고려하여, 마우스의 경우, BALB/c 계통, 및 랫트의 경우, 위스타 및 로우 계통이 특히 바람직하다.

[0261] 또한, 인간과 마우스 간의 항원 상동성을 고려하여, 자가면역 질환을 가진 마우스와 같은, 자가 항체를 제거하기 위해 생물학적 기능이 감소된 마우스를 사용하는 것이 바람직하다.

[0262] 면역화 시점에서의 이러한 마우스 또는 랫트의 연령은 바람직하게는 5 내지 12주령, 보다 바람직하게는 6 내지 8주령이다.

[0263] HER2 또는 이의 재조합체로 동물을 면역화하기 위해, 예를 들어, Weir, D. M.의 문헌[Handbook of Experimental Immunology Vol. I. II. III., Blackwell Scientific Publications, Oxford (1987)]; Kabat, E. A. 및 Mayer, M. M.의 문헌[Experimental Immunochimistry, Charles C Thomas Publisher Springfield, Ill. (1964)]등에 상세히 기술된 공지된 방법이 사용될 수 있다.

[0264] 이들 면역화 방법 중, 본 발명에서 바람직한 특정 방법은, 예를 들어 다음과 같다.

[0265] 즉, 우선적으로, 항원 또는 항원을 발현하도록 유도된 세포로서 작용하는 막 단백질 분획은/들은 동물에게 피내 투여되거나 복강내 투여된다. 그러나, 면역화 효율을 증가시키기 위해 두 투여 경로의 조합이 바람직하며, 피내 투여가 전반부에서 수행되고 복강내 투여가 후반부에서 또는 마지막 투여에서만 수행될 경우, 면역화 효율이 특히 증가될 수 있다.

[0266] 항원의 투여 일정은 면역화될 동물의 유형, 개별적인 차이 등에 따라 달라진다. 그러나, 일반적으로, 항원의 투여 빈도가 3 내지 6회이고 투여 간격이 2 내지 6주인 투여 일정이 바람직하고, 항원의 투여 빈도가 3 내지 4회이고 투여 간격이 2 내지 4주인 투여 일정이 보다 바람직하다.

[0267] 또한, 항원의 투여량은 동물의 유형, 개별적인 차이 등에 따라 달라지지만, 투여량은 일반적으로 0.05 내지 5 mg, 바람직하게는 약 0.1 내지 0.5 mg으로 설정된다.

[0268] 추가 면역화는 전술한 바와 같은 항원의 투여 후 1 내지 6주, 바람직하게는 1 내지 4주, 보다 바람직하게는 1 내지 3주 후에 수행된다. 면역원이 세포인 경우, 1×10^6 내지 1×10^7 개 세포가 사용된다.

[0269] 추가접종을 수행하는 시점에서의 항원의 투여량은 동물의 유형 또는 크기 등에 따라 달라지지만, 예를 들어, 마우스의 경우, 투여량은 일반적으로 0.05 내지 5 mg, 바람직하게는 0.1 내지 0.5 mg, 보다 바람직하게는 약 0.1

내지 0.2 mg으로 설정된다. 면역원이 세포인 경우, 1×10^6 내지 1×10^7 개 세포가 사용된다.

- [0270] 항체-생성 세포를 포함하는 비장 세포 또는 림프구는 추가 접종으로부터 1 내지 10일, 바람직하게는 2 내지 5일, 보다 바람직하게는 2 내지 3일 후에 면역화된 동물로부터 무균적으로 제거된다. 이때, 항체 역가를 측정하고, 항체 역가가 충분히 증가된 동물이 항체-생산 세포의 공급원으로서 사용되는 경우, 후속 절차를 보다 효율적으로 수행할 수 있다.
- [0271] 본원에서 사용되는 항체 역가를 측정하는 방법의 예는 RIA 방법 및 ELISA 방법을 포함하지만, 방법은 이에 한정되지 않는다. 예를 들어, ELISA 방법이 사용되는 경우, 본 발명의 항체 역가의 측정은 아래에 기술된 절차에 따라 수행될 수 있다.
- [0272] 먼저, 정제된 또는 부분적으로 정제된 항원을 ELISA용 96-웰 플레이트와 같은 고상 표면에 흡착시키고, 이에 흡착되지 않은 항원을 갖는 고상 표면을 소 혈청 알부민(BSA)과 같은 항원과 무관한 단백질로 덮는다. 표면을 세척한 후, 일차 항체로서 연속 희석된 샘플(예를 들어, 마우스 혈청)과 표면을 접촉시켜 샘플 내의 항체가 항원에 결합할 수 있게 한다.
- [0273] 또한, 이차 항체로서, 마우스 항체에 대해 효소로 표지된 항체를 첨가하고 마우스 항체에 이에 결합할 수 있게 한다. 세척 후, 효소용 기질을 첨가하고, 기질의 분해 등에 의해 유도된 색 발달로 인해 발생하는 흡광도의 변화를 측정하고, 해당 측정에 기초하여 항체 역가를 계산한다.
- [0274] 면역화된 동물의 비장 세포 또는 림프구로부터의 항체-생성 세포의 분리는 공지된 방법(예를 들어, Kohler 등의 문헌[Nature (1975), 256, p. 495]; Kohler 등의 문헌[Eur. J. Immunol. (1977), 6, p. 511]; Milstein 등의 문헌[Nature (1977), 266, p. 550]; Walsh의 문헌[Nature (1977), 266, p. 495])에 따라 수행될 수 있다. 예를 들어, 비장 세포의 경우, 비장을 균질화하여 스테인리스 스틸 메시로 여과하고 Eagle의 최소 필수 배지(Eagle's Minimum Essential Medium(MEM))에 세포를 현탁시킴으로써 항체 생성 세포를 분리하는 일반적인 방법이 사용될 수 있다.
- [0275] **골수종 세포(이하 "골수종"으로 지칭됨)의 제조**
- [0276] 세포 융합에 사용될 골수종 세포는 특히 제한되지 않으며, 공지된 세포주로부터 적합한 세포가 선택될 수 있다. 그러나, 하이브리도마가 융합된 세포로부터 선택될 경우의 편의를 고려하여, 선택 절차가 확립된 HGPRT(하이포크산틴-구아닌 포스포리보실 트랜스퍼라아제) 결핍 계통을 사용하는 것이 바람직하다.
- [0277] 보다 구체적으로, HGPRT-결핍 계통의 예는, 마우스 유래의, X63-Ag8(X63), NS1-ANS/1(NS1), P3X63-Ag8.U1(P3U1), X63-Ag8.653(X63.653), SP2/0-Ag14(SP2/0), MPC11-45.6TG1.7(45.6TG), FO, S149/5XXO, 및 BU.1; 랫트 유래의, 210.RSY3.Ag.1.2.3(Y3); 및 인간 유래의 U266AR(SKO-007), GM1500.GTG-A12(GM1500), UC729-6, LICR-LOW-HMy2(HMy2) 및 8226AR/NIP4-1(NP41)을 포함한다. 이들 HGPRT 결핍 계통은, 예를 들어 ATCC 등으로부터 입수 가능하다.
- [0278] 이들 세포 계통을 8-아자구아닌 배지[글루타민, 2-메르캅토에탄올, 겐타마이신, 및 태아 송아지 혈청(이하 "FCS"로 지칭함)이 보충된 RPMI 1640 배지에 8-아자구아닌을 첨가하여 얻은 배지], Iscove의 변형된 돌베코 배지(Iscove's Modified Dulbecco's Medium, 이하 "IMDM"로 지칭됨), 또는 돌베코의 변형된 이글(Eagle) 배지와 같은 적절한 배지에서 계대배양한다. 이 경우, 세포 융합을 수행하기 3 내지 4일 전에, 세포를 정상 배지(예를 들어, 10% FCS를 함유하는 ASF104 배지(Ajinomoto Co., Ltd. 제조))에서 계대배양하여 세포 융합 당일에 2×10^7 세포 이상을 보장한다.
- [0279] **세포 융합**
- [0280] 항체 생산 세포와 골수종 세포 사이의 융합은, 세포의 생존율이 과도하게 감소하지 않는 조건 하에서, 공지된 방법(Weir, D. M.의 문헌[Handbook of Experimental Immunology Vol. I. II. III., Blackwell Scientific Publications, Oxford (1987)]; Kabat, E. A. 및 Mayer, M. M.의 문헌[Experimental Immunology, Charles C Thomas Publisher, Springfield, Ill. (1964)], 등)에 따라 수행되었다.
- [0281] 이러한 방법에 있어서, 예를 들어, 항체 생산 세포 및 골수종 세포가 고농도의 폴리에틸렌 글리콜과 같은 중합체를 함유하는 용액, 전기 자극을 사용하는 물리적 방법 등에 혼합되는 화학적 방법이 사용될 수 있다. 이들 방법 중, 화학적 방법의 특정 예는 후술하는 바와 같다.
- [0282] 즉, 폴리에틸렌 글리콜이 고농도의 중합체를 함유하는 용액에 사용되는 경우, 항체 생산 세포 및 골수종 세포는

분자량이 1500 내지 6000, 보다 바람직하게는 2000 내지 4000인 폴리에틸렌 글리콜의 용액에 30 내지 40°C, 바람직하게는 35 내지 38°C의 온도에서 1 내지 10분, 바람직하게는 5 내지 8분 동안 혼합된다.

[0283] **하이브리도마 균의 선택**

[0284] 전술한 세포 융합에 의해 수득된 하이브리도마를 선택하는 방법은 특히 제한되지 않는다. 일반적으로, HAT(하이포크산틴, 아미노프테린, 티미딘) 선택 방법(Kohler 등의 문헌[Nature (1975), 256, p. 495]; Milstein 등의 문헌[Nature (1977), 266, p. 550])이 사용된다.

[0285] 이러한 방법은 아미노프테린의 존재 하에 생존할 수 없는 HGPRT-결핍 계통의 골수종 세포를 사용하여 하이브리도마를 수득할 경우 효과적이다. 즉, 융합되지 않은 세포 및 하이브리도마를 HAT 배지에서 배양함으로써, 아미노프테린에 내성인 하이브리도마만이 선택적으로 생존하고 증식할 수 있게 된다.

[0286] **단일 세포 클론으로 분할(복제)**

[0287] 하이브리도마에 대한 클로닝 방법으로서, 메틸셀룰로오스 방법, 연질 아گار로스 방법, 또는 제한 희석 방법과 같은 공지된 방법이 사용될 수 있다(예를 들어, Barbara, B. M. 및 Stanley, M. S.의 문헌[Selected Methods in Cellular Immunology, W. H. Freeman and Company, San Francisco (1980)] 참조). 이들 방법 중, 특히 메틸셀룰로오스 방법과 같은 3차원 배양 방법이 바람직하다. 예를 들어, 세포 융합에 의해 생산된 하이브리도마 균을 ClonaCell-HY 선택 배지 D(StemCell Technologies, Inc. 제조, #03804)와 같은 메틸셀룰로오스 배지에 현탁시키고 배양한다. 그런 다음, 형성된 하이브리도마 콜로니를 수집하고, 이에 의해 단클론 하이브리도마를 수득할 수 있다. 수집된 각각의 하이브리도마 콜로니를 배양하고, 수득된 하이브리도마 배양 상청액에서 안정한 항체 역가를 갖는 것으로 확인된 하이브리도마를 HER2 단클론 항체 생산 하이브리도마 균주로서 선택한다.

[0288] **하이브리도마 배양 단계에 의한 단클론 항체의 제조**

[0289] 이렇게 선택된 하이브리도마를 배양함으로써, 단클론 항체가 효율적으로 수득될 수 있다. 그러나, 배양 전, 표적 단클론 항체를 생산하는 하이브리도마의 스크리닝을 수행하는 것이 바람직하다.

[0290] 이러한 스크리닝에서, 공지된 방법이 사용될 수 있다. 본 발명에서 항체 역가의 측정은, 예를 들어, 전술한 항목 (b)에 기술된 ELISA 방법에 의해 수행될 수 있다. 전술한 방법에 의해 수득된 하이브리도마는 액체 질소 중의 냉동 상태 또는 -80°C 이하의 냉동고에 저장될 수 있다. 클로닝 완료 후, 배지를 HT 배지에서 정상 배지로 변경하고, 하이브리도마를 배양한다.

[0291] 대규모의 배양은 큰 배양 병을 사용하는 회전 배양에 의해 또는 스피너 배양에 의해 수행된다. 대규모 배양에 의해 수득된 상청액으로부터, 본 발명의 단백질에 특이적으로 결합하는 단클론 항체는 겔 여과와 같은 당업자에게 공지된 방법을 사용하여 정제함으로써 수득될 수 있다.

[0292] 또한, 하이브리도마는 하이브리도마와 동일한 계통의 마우스(예를 들어, 전술한 BALB/c) 또는 Nu/Nu 마우스의 복강 내에 주입되어 하이브리도마를 증식시키고, 이에 의해 본 발명의 단클론 항체를 함유하는 복수가 수득될 수 있다.

[0293] 하이브리도마가 복강 내에 투여되는 경우, 2,6,10,14-테트라메틸 펜타데칸(프리스탄)과 같은 미네랄 오일이 3 내지 7일 전에 투여되는 경우, 더 많은 양의 복수가 수득될 수 있다.

[0294] 예를 들어, T 세포를 불활성화시키기 위해 하이브리도마와 동일한 계통의 마우스의 복강 내에 면역억제제를 미리 주입한다. 그 후 20일차에, 10⁶ 내지 10⁷개의 하이브리도마 클론 세포를 무혈청 배지(0.5 ml)에 현탁시키고, 현탁액을 마우스의 복강 내에 투여한다. 일반적으로, 복부가 확장되고 복수로 채워질 때, 마우스로부터 복수가 수집된다. 이러한 방법에 의해, 단클론 항체는 배양 용액에서의 농도보다 약 100배 이상 더 높은 농도로 수득될 수 있다.

[0295] 전술한 방법에 의해 수득된 단클론 항체는, 예를 들어, Weir, D. M.의 문헌[Handbook of Experimental Immunology Vol. I, II, III, Blackwell Scientific Publications, Oxford (1978)]에 기술된 방법에 의해 정제될 수 있다.

[0296] 이에 따라 수득된 단클론 항체는 HER2에 대한 높은 항원 특이성을 갖는다. 본 발명의 단클론 항체의 예는 마우스 단클론 항체 4D5(ATCC CRL 10463)를 포함할 수 있지만, 이에 특별히 한정되지는 않는다.

[0297] **단클론 항체 검정**

- [0298] 이렇게 수득된 단클론 항체의 이소형 및 하위부류는 다음과 같이 결정될 수 있다.
- [0299] 먼저, 식별 방법의 예는 오크털로니(Ouchterlony) 방법, ELISA 방법, 및 RIA 방법을 포함한다.
- [0300] 오크털로니 방법은 간단하지만, 단클론 항체의 농도가 낮은 경우, 응결 작업이 필요하다.
- [0301] 한편, ELISA 방법 또는 RIA 방법을 사용할 경우, 배양 상청액을 항원-흡착된 고상과 직접 반응시키고, 다양한 유형의 면역글로불린 이소형 및 하위부류에 상응하는 항체를 이차 항체로서 사용함으로써, 단클론 항체의 이소형 및 하위부류를 식별할 수 있다.
- [0302] 또한, 보다 간단한 방법으로서, 상업적으로 이용 가능한 식별 키트(예를 들어, Bio-Rad Laboratories, Inc.에서 제조한 마우스 타이퍼 키트(Mouse Typer Kit)) 등이 사용될 수도 있다.
- [0303] 또한, 단백질의 정량적 결정은 Folin Lowry 방법 및 280 nm에서의 흡광도(1.4 (OD 280) = 면역글로불린 1 mg/ml)에 기초한 계산 방법에 의해 수행될 수 있다.
- [0304] 또한, 단클론 항체가 (2)에서의 (a) 내지 (h)의 단계를 다시 수행함으로써 개별적 및 독립적으로 수득되는 경우에도, 단계 (g)에서 수득된 HER2 항체와 동등한 세포독성 활성을 갖는 항체를 수득하는 것이 가능하다. 이러한 항체의 일례로서, 단계 (g)에서 수득된 HER2 항체와 동일한 에피토프에 결합하는 항체를 예시할 수 있다. 새롭게 생산된 단클론 항체가 항-HER2 항체가 결합하는 부분 펩티드 또는 부분 3차 구조에 결합하는 경우, 단클론 항체가 항-HER2 항체와 동일한 에피토프에 결합하는 것으로 결정될 수 있다. 또한, 단클론 항체가 HER2에 대한 결합을 위해 항-HER2 항체와 경쟁한다는 것을 확인함으로써(즉, 단클론 항체가 항-HER2 항체와 HER2 간의 결합을 억제함), 특정 에피토프 서열 또는 구조가 결정되지 않았더라도 단클론 항체가 항-HER2 항체와 동일한 에피토프에 결합하는 것으로 결정될 수 있다. 단클론 항체가 항-HER2 항체와 동일한 에피토프에 결합하는 것으로 확인될 경우, 해당 단클론 항체는 항-HER2 항체와 동등한 항원 결합 친화도 또는 생물학적 활성을 가질 것으로 강력하게 기대된다.
- [0305] **다른 항체**
- [0306] 본 발명의 항체는 HER2에 대한 전술한 단클론 항체뿐만 아니라 키메라 항체, 인간화 항체 및 인간 항체와 같은 인간에 대한 이중 항원성을 감소시키기 위한 목적으로 인공적인 변형에 의해 수득된 재조합 항체를 포함한다. 이들 항체는 공지된 방법을 사용하여 생산될 수 있다.
- [0307] 키메라 항체로서, 항체 가변 및 불변 영역이 상이한 종으로부터 유래된 항체, 예를 들어, 마우스- 또는 랫트-유래 항체 가변 영역이 인간-유래 항체 불변 영역에 연결되는 키메라 항체가 예시될 수 있다(Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 81, 6851-6855, (1984) 참조). 본 발명의 키메라 항체의 예는 인간 IgG1 또는 IgG2의 중쇄 불변 영역을 포함하는 키메라 항체 4D5를 포함할 수 있지만, 이에 특별히 한정되지는 않는다.
- [0308] 인간화 항체로서, 인간 유래 항체에 상보성 결정 영역(CDR)만을 통합한 항체(Nature (1986) 321, pp. 522-525 참조), 인간 항체에 프레임워크의 아미노산 잔기 일부와 CDR 서열을 CDR 접목법으로 접목시켜 얻은 항체(WO 90/07861), 및 유전자 전환 돌연변이 유발 전략(U.S. 제5,821,337호)을 사용하여 인간화된 항체가 예시될 수 있다.
- [0309] 본원에서 사용되는 바와 같이, 용어 "몇"은 1 내지 10, 1 내지 9, 1 내지 8, 1 내지 7, 1 내지 6, 1 내지 5, 1 내지 4, 1 내지 3, 또는 1 또는 2를 지칭한다.
- [0310] 본 명세서의 아미노산 치환으로서, 보존적 아미노산 치환이 바람직하다. 보존적 아미노산 치환은 아미노산 측쇄와 관련된 아미노산의 군 내에서 발생하는 치환을 지칭한다. 바람직한 아미노산 기는 다음과 같다: 산성 기(아스파르트산 및 글루탐산); 염기성 기(리신, 아르기닌, 및 히스티딘); 비-극성 기(알라닌, 발린, 류신, 이소류신, 프롤린, 페닐알라닌, 메티오닌, 및 트립토판); 및 하전되지 않은 극성 계열(글리신, 아스파라긴, 글루타민, 세린, 시스테인). 보다 바람직한 아미노산 기는 다음과 같다: 지방족 하이드록시 기(세린 및 트레오닌); 아미드-함유 기(아스파라긴 및 글루타민); 지방족 기(알라닌, 발린, 류신 및 이소류신); 및 방향족 기(페닐알라닌, 트립토판 및 티로신). 이러한 아미노산 치환은 바람직하게는 원래의 아미노산 서열을 갖는 물질의 특성을 손상시키지 않는 범위 내에서 수행된다.
- [0311] 전술한 중쇄 아미노산 서열과의 높은 상동성을 갖는 서열을 전술한 경쇄 아미노산 서열과의 높은 상동성을 갖는 서열과 조합함으로써, 전술한 항체 각각의 생물학적 활성에 동등한 생물학적 활성을 갖는 항체를 선택하는 것이 가능하다. 이러한 상동성은 대체적으로 80% 이상의 상동성, 바람직하게는 90% 이상의 상동성, 보다 바람직하게

는 95% 이상의 상동성, 가장 바람직하게는 99% 이상의 상동성이다. 또한, 1개 내지 수개의 아미노산 잔기가 중쇄 또는 경쇄 아미노산 서열에 치환, 결실 또는 첨가되는 아미노산 서열을 조합함으로써, 전술한 항체 각각의 생물학적 활성과 동등한 생물학적 활성을 갖는 항체를 선택하는 것이 또한 가능하다. 본원에서 사용되는 용어 "상동성"은 "동일성"과 동일한 의미로 사용된다.

- [0312] 2개의 아미노산 서열 간의 상동성은 Blast 알고리즘 버전 2.2.2(Altschul, Stephen F., Thomas L. Madden, Alejandro A. Schaeffer, Jinghui Zhang, Zheng Zhang, Webb Miller, 및 David J. Lipman (1997)의 문헌 ["Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs", *Nucleic Acids Res.* 25: 3389-3402])의 디폴트 파라미터를 사용하여 결정될 수 있다. Blast 알고리즘은 또한 웹사이트 www.ncbi.nlm.nih.gov/blast에 접속하여 인터넷을 통해 사용할 수 있다.
- [0313] 또한, 본 발명의 항체는 HER2에 결합하는 인간 항체를 포함한다. 항-HER2 인간 항체는 인간 염색체로부터 유래된 항체의 서열만을 갖는 인간 항체를 지칭한다. 항-HER2 인간 항체는 인간 항체의 중쇄 및 경쇄 유전자를 포함하는 인간 염색체 단편을 갖는 인간 항체 생산 마우스를 사용하는 방법에 의해 획득될 수 있다(Tomizuka, K. 등의 문헌[Nature Genetics (1997) 16, pp. 133-143]; Kuroiwa, Y. 등의 문헌[Nucl. Acids Res. (1998) 26, pp. 3447-3448]; Yoshida, H. 등의 문헌[Animal Cell Technology: Basic and Applied Aspects vol. 10, pp. 69-73 (Kitagawa, Y., Matuda, T. 및 Iijima, S. 편집), Kluwer Academic Publishers, 1999]; Tomizuka, K. 등의 문헌[Proc. Natl. Acad. Sci. USA (2000) 97, pp. 722-727] 등 참조).
- [0314] 이러한 인간 항체-생산 마우스는 다음과 같이 특이적으로 생성될 수 있다. 내인성 면역글로블린 중쇄 및 경쇄 유전자 유전자좌가 파괴되었고, 그 대신에, 인간 면역글로블린 중쇄 및 경쇄 유전자 유전자좌가 효모 인공 염색체(YAC) 벡터 등을 통해 도입된, 유전적으로 변형된 동물이 녹아웃 동물 및 유전자이식 동물을 생산하여 이들 동물과 교배시킴으로써 생성된다.
- [0315] 또한, 재조합 DNA 기술에 따르면, 이러한 인간 항체의 중쇄 및 경쇄 각각을 암호화하는 cDNA, 바람직하게는 이러한 cDNA를 포함하는 벡터를 사용함으로써, 진핵 세포가 형질전환되고, 재조합 인간 단클론 항체를 생산하는 형질전환 세포가 배양되어, 항체가 배양 상청액으로부터 획득될 수도 있다.
- [0316] 여기에서, 숙주로서, 예를 들어 진핵 세포, 바람직하게는 CHO 세포, 림프구, 또는 골수종 세포와 같은 포유류 세포가 사용될 수 있다.
- [0317] 또한, 인간 항체 라이브러리로부터 선택되는 파지 디스플레이 유래의 인간 항체를 획득하는 방법이 공지되어 있다(Wormstone, I. M. 등의 문헌[Investigative Ophthalmology & Visual Science. (2002) 43 (7), pp. 2301-2308]; Carmen, S. 등의 문헌[Briefings in Functional Genomics and Proteomics (2002), 1 (2), pp. 189-203]; Siriwardena, D. 등의 문헌[Ophthalmology (2002) 109 (3), pp. 427-431] 등 참조).
- [0318] 예를 들어, 인간 항체의 가변 영역이 단쇄 항체(scFv)로서 파지의 표면 상에서 발현되고, 항원에 결합하는 파지가 선택될 수 있는 파지 디스플레이 방법(Nature Biotechnology (2005), 23, (9), pp. 1105-1116)이 사용될 수 있다.
- [0319] 항원에 대한 결합에 기초하여 선택된 파지의 유전자를 분석함으로써, 항원에 결합하는 인간 항체의 가변 영역을 암호화하는 DNA 서열이 결정될 수 있다.
- [0320] 항원에 결합하는 scFv의 DNA 서열이 결정되면, 인간 항체는 해당 서열을 포함하는 발현 벡터를 제조하고 이를 발현시키기 위한 적절한 숙주에 해당 벡터를 도입함으로써 획득될 수 있다(WO 92/01047, WO 92/20791, WO 93/06213, WO 93/11236, WO 93/19172, WO 95/01438, WO 95/15388; Annu. Rev. Immunol. (1994) 12, pp. 433-455, Nature Biotechnology (2005) 23 (9), pp. 1105-1116).
- [0321] 항체의 특성 비교에 사용하기 위한 또 다른 인덱스의 일례로서, 항체의 안정성이 예시될 수 있다. 시차주사 열량측정(DSC)은 단백질의 상대적인 구조적 안정성에 유리한 인덱스로서 사용되는 열 변성 중간점 온도(Tm)를 신속하고 정확하게 측정할 수 있는 장치이다. DSC를 사용하여 Tm 값을 측정하고 해당 값을 비교함으로써, 열 안정성의 차이를 비교할 수 있다. 항체의 저장 안정성은 항체의 열 안정성과 다소의 상관성을 나타내며(Lori Burton, 등의 문헌[Pharmaceutical Development and Technology (2007) 12, pp. 265-273]), 열 안정성을 인덱스로서 사용함으로써 바람직한 항체를 선택할 수 있는 것으로 알려져 있다. 항체를 선택하기 위한 다른 인덱스의 예는 다음의 특징을 포함한다: 적절한 숙주 세포에서의 높은 수율; 및 수용액에서의 낮은 응집성. 예를 들어, 가장 높은 수율을 나타내는 항체가 항상 가장 높은 열 안정성을 나타내는 것은 아니므로, 전술한 인덱스

에 기초하여 포괄적인 평가를 함으로써 인간에게 투여하기에 가장 적합한 항체를 선택하는 것이 필요하다.

- [0322] 본 발명에서, 항체의 변형된 변이체가 또한 포함된다. 변형된 변이체는 본 발명의 항체에 화학적 또는 생물학적 변형을 가함으로써 획득된 변이체를 지칭한다. 화학적으로 변형된 변이체의 예는 화학적 모이어티를 아미노산 골격에 연결함으로써 화학적으로 변형된 변이체, N-연결된 또는 O-연결된 탄수화물 사슬로 화학적으로 변형된 변이체 등을 포함한다. 생물학적으로 변형된 변이체의 예는 번역 후 변형에 의해 획득된 변이체(예컨대, N-연결 또는 O-연결 당질화, N-말단 또는 C-말단 처리, 탈아미드화, 아스파르트산의 이성질체화, 또는 메티오닌의 산화), 및 메티오닌 잔기가 원핵 숙주 세포에서 발견됨으로써 N 말단에 첨가된 변이체를 포함한다. 또한, 본 발명의 항체 또는 항원의 검출 또는 단리를 가능하게 하도록 표지된 항체, 예를 들어 효소-표지된 항체, 형광-표지된 항체, 및 친화도-표지된 항체 또한 변형된 변이체의 의미에 포함된다. 본 발명의 항체의 이러한 변형된 변이체는 항체의 안정성 및 혈액 보유를 개선하고, 이의 항원성을 감소시키며, 항체 또는 항원을 검출하거나 단리하는 것 등에 유용하다.
- [0323] 또한, 본 발명의 항체에 연결된 글리칸의 변형(글리코실화, 탈푸코실화 등)을 조절함으로써, 항체 의존성 세포 세포독성 활성을 향상시키는 것이 가능하다. 항체의 글리칸의 변형을 조절하는 기술로서, WO 99/54342, WO 00/61739, WO 02/31140 등이 공지되어 있다. 그러나, 이러한 기술은 이에 한정되지 않는다. 본 발명의 항체에서, 글리칸 변형이 조절된 항체 또한 포함된다.
- [0324] 먼저 항체 유전자를 단리한 다음 유전자를 적절한 숙주에 도입함으로써 항체가 생산되는 경우, 적절한 숙주와 적절한 발현 벡터의 조합을 사용할 수 있다. 항체 유전자의 특정 예는 본 명세서에 기술된 항체의 중쇄 서열을 암호화하는 유전자 및 이의 경쇄 서열을 암호화하는 유전자의 조합을 포함한다. 숙주 세포가 형질전환될 때, 중쇄 서열 유전자 및 경쇄 서열 유전자를 동일한 발현 벡터에 삽입하는 것, 및 상이한 발현 벡터에 또한 별도로 삽입하는 것이 가능하다.
- [0325] 진핵 세포가 숙주로서 사용되는 경우, 동물 세포, 식물 세포, 및 진핵 미생물이 사용될 수 있다. 동물 세포로서, 포유동물 세포, 예를 들어, 시미안 COS 세포(Gluzman, Y., Cell, (1981) 23, pp. 175-182, ATCC CRL-1650), 쥐와 섬유아세포 NIH3T3(ATCC No. CRL-1658), 및 차이니스 햄스터 난소 세포(CHO 세포; ATCC: CCL-61)의 디하이드로엽산 환원효소 결핍 계통(Urlaub, G. 및 Chasin, L. A., Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1980) 77, pp. 4126-4220)이 예시될 수 있다. 원핵 세포가 사용되는 경우, 예를 들어, 대장균 및 바실루스 서브틸리스가 예시될 수 있다.
- [0326] 형질전환을 통해 원하는 항체 유전자를 이들 세포 내로 도입하고, 이에 따라 형질전환된 세포를 시험관 내에서 배양함으로써, 항체를 획득할 수 있다. 전술한 배양 방법에서, 수율은 때때로 항체의 서열에 따라 달라질 수 있으므로, 동등한 결합 활성을 갖는 항체 중의 수율을 인덱스로서 사용하여 약학적으로 용이하게 생산되는 항체를 선택하는 것이 가능하다. 따라서, 본 발명의 항체에서, 형질전환된 숙주 세포를 배양하는 단계 및 배양 단계에서 획득된 배양된 생물로부터 원하는 항체를 수집하는 단계를 포함하는 것을 특징으로 하는, 항체를 생산하는 방법에 의해 획득된 항체가 또한 포함된다.
- [0327] 배양된 포유동물 세포에서 생산된 항체의 중쇄 카르복실 말단에는 리신 잔기가 결실되어 있는 것으로 알려져 있으며(Journal of Chromatography A, 705: 129-134 (1995)), 또한, 배양된 포유동물 세포에서 생산된 항체의 중쇄 카르복실 말단에 있는 2개의 아미노산 잔기(글리신 및 리신)가 결실되고, 카르복실 말단에 새로 위치하는 프롤린 잔기가 아미드화되는 것으로 알려져 있다(Analytical Biochemistry, 360: 75-83 (2007)). 그러나, 이러한 중쇄 서열의 결실 및 변형은 항체의 항원 결합 친화도 및 효과기 기능(보체 활성화, 항체 의존성 세포 세포독성 등)에 영향을 미치지 않는다. 따라서, 본 발명에 따른 항체에서는, 이러한 변형을 거치는 항체 및 항체의 기능적 단편이 또한 포함되고, 중쇄의 카르복실 말단에서 1개 또는 2개의 아미노산이 결실된 결실 변이체, 결실 변이체의 아미드화에 의해 획득된 변이체(예를 들어, 카르복실 말단 프롤린 잔기가 아미드화된 중쇄) 등이 또한 포함된다. 본 발명에 따른 항체의 중쇄의 카르복실 말단에서 결실을 갖는 결실 변이체의 유형은, 항원 결합 친화도 및 효과기 기능이 보존되는 한, 전술한 변이체에 한정되지 않는다. 본 발명에 따른 항체를 구성하는 2개의 중쇄는 전장 중쇄 및 전술한 결실 변이체로 이루어진 균으로부터 선택되는 하나의 유형일 수 있거나, 이로부터 선택된 조합의 2개의 유형일 수 있다. 각각의 결실 변이체의 양의 비율은 본 발명에 따른 항체를 생산하는 배양된 포유류 세포의 유형 및 배양 조건에 의해 영향을 받을 수 있지만, 본 발명에 따른 항체의 주요 성분으로서 함유된 2개의 중쇄 둘 모두에서의 카르복실 말단에서 하나의 아미노산 잔기가 결실된 경우가 예시될 수 있다.
- [0328] 본 발명의 항체의 이소형으로서, 예를 들어, IgG(IgG1, IgG2, IgG3, IgG4)가 예시될 수 있으며, 바람직하게는 IgG1 또는 IgG2가 예시될 수 있다.

[0329] 항체의 생물학적 활성으로서는, 대체적으로 항원 결합 활성, 항원에 결합함으로써 항원을 발현하는 세포에 내재화하는 활성, 항원의 활성을 중화시키는 활성, 항원의 활성을 향상시키는 활성, 항체 의존성 세포독성(ADCC) 활성, 보체 의존성 세포독성(CDC) 활성, 및 항체 의존성 세포 매개 식균작용(ADCP)이 예시될 수 있다. 본 발명의 항체의 생물학적 활성은 HER2에 대한 결합 활성이며, 바람직하게는 HER2에 대한 결합에 의한 HER2-발현 세포에서의 내재화 활성이다. 또한, 본 발명의 항체는 세포 내 내재화 활성에 더하여 ADCC 활성, CDC 활성, 및/또는 ADCP 활성을 가질 수 있다.

[0330] 수득된 항체는 정제되어 균질화될 수 있다. 항체의 분리 및 정제는 종래의 단백질 분리 및 정제 방법을 사용하여 수행될 수 있다. 예를 들어, 항체는 컬럼 크로마토그래피, 필터 여과, 한외여과, 염 침전, 투석, 분취 폴리 아크릴아미드 겔 전기영동, 등전점 전기영동 등(Strategies for Protein Purification and Characterization: A Laboratory Course Manual, Daniel R. Marshak 등 eds., Cold Spring Harbor Laboratory Press (1996); Antibodies: A Laboratory Manual. Ed Harlow 및 David Lane, Cold Spring Harbor Laboratory (1988))을 적절히 선택하고 조합하여 분리되고 정제될 수 있으나, 방법은 이에 한정되지 않는다.

[0331] 이러한 크로마토그래피의 예는 친화도 크로마토그래피, 이온 교환 크로마토그래피, 소수성 크로마토그래피, 겔 여과 크로마토그래피, 역상 크로마토그래피, 및 흡착 크로마토그래피를 포함한다. 이러한 크로마토그래피는 HPLC 또는 FPLC와 같은 액상 크로마토그래피를 사용하여 수행될 수 있다.

[0332] 친화도 크로마토그래피에 사용될 컬럼으로서, 단백질 A 컬럼 및 단백질 G 컬럼을 예시할 수 있다. 예를 들어, 단백질 A 컬럼을 사용하는 컬럼으로서, Hyper D, POROS, Sepharose FF(Pharmacia Corporation) 등이 예시될 수 있다.

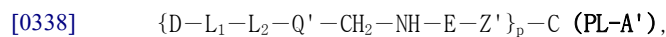
[0333] 또한, 항원이 그 위에 고정된 담체를 사용함으로써, 항체는 또한 해당 항원에 대한 항체의 결합 특성을 사용하여 정제될 수 있다.

[0334] **항-HER2 항체를 포함하는 항체-약물 접합체**

[0335] 일부 양태에서, 본 발명은 세포 결합체(예를 들어, 본원에서 기술된 바와 같은 항-HER2) 및 캄프토테신 유도체를 포함하는 접합체를 포함한다.

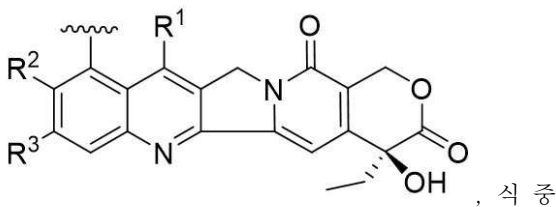
[0336] 구현예에서, 항-HER2 항체(예를 들어, 트라스투주맵)에 대한 접합에 적합한 화합물은, 그 전체가 본원에 참조로서 통합되는, 2020년 2월 25일에 출원된 미국 가출원 제62/981,197호에 기술된 화합물을 포함한다. 예를 들어, 적합한 화합물은 USSN 제62/981,197호에 기술된 바와 같은 식 (I), (II) 및 (III)의 화합물을 포함한다.

[0337] 또 다른 양태에서, 본 발명은 식 (PL-A')의 화합물,



[0339] 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염을 포함하며, 식 중:

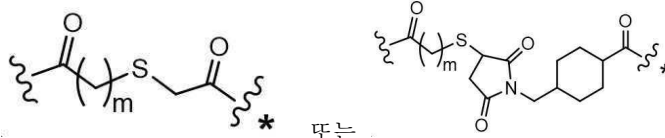
[0340] D는 다음의 구조식으로 표시되고:

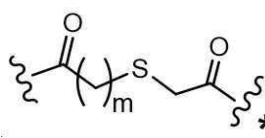
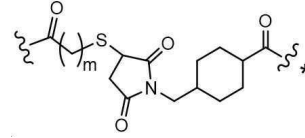


[0342] R¹은 독립적으로 -H, C₁-C₆ 알킬, C₂-C₆ 알케닐, C₂-C₆ 알키닐, 실릴, C₃-C₆ 시클로알킬, C₁-C₆ 할로젠화 알킬, C₂-C₆ 할로젠화 알케닐, 또는 C₂-C₆ 할로젠화 알키닐이고;

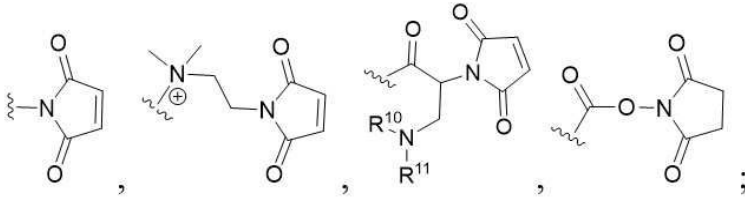
[0343] R²는 독립적으로 -H, -F, -N(R⁴)₂, -N(R⁴)(R⁵), -OR⁴, -SR⁴, -S(=O)R⁵, -SO₂R⁵, C₁-C₆ 알킬, 또는 C₁-C₆ 플루오로알킬이고; R³은 -H, -F, -CN, -OCH₃, -CH₃, 또는 -CF₃이거나; R² 및 R³은 일군의 화학식 -O(CH₂)_nO- 또는 -(CF₂)_nO-을 형성하고(식 중 n은 1 또는 2임);

- [0344] R^4 는 독립적으로 -H 또는 C_1-C_4 알킬이고;
- [0345] R^5 는 독립적으로 C_1-C_4 알킬이고;
- [0346] L_1 은 독립적으로 없거나 $-(C_1-C_{10}$ 알킬렌)-이고;
- [0347] L_2 는 독립적으로 없거나 $-OCH_2-L_3-*$, $-SCH_2-L_3-*$, $-S(=O)-L_3-*$, $-SO_2-L_3-*$, $-C(=O)-L_3-*$, $-N(R^6)CH_2-L_3-*$, $-N(R^6)C(=O)-L_3-*$, $-N(R^6)C(=O)N(R^7)-L_3-*$, $-C(=O)N(R^6)CH_2-L_3-*$, $-OC(=O)N(R^6)CH_2-L_3-*$, 또는 $-N(R^6)C(=O)OCH_2-L_3-*$ 이고; 식 중 *는 Q' 에 공유 연결된 부위를 나타내며;
- [0348] L_3 은 독립적으로 $-(C_1-C_{10}$ 알킬렌)-, $-CH_2OCH_2CH_2-$, 또는 $-CH_2CH_2OCH_2CH_2-$ 이고;
- [0349] 각각의 R^6 및 R^7 은 독립적으로 -H, C_1-C_6 알킬, C_1-C_6 플루오로알킬, C_3-C_6 시클로알킬, 아릴, 헤테로아릴, 또는 벤질이고;
- [0350] Q' 은 -O- 또는 -S-이고;
- [0351] E 는 2 내지 10개의 아미노산을 포함하는 펩티드이고, 여기서, E 는 하나 이상의 폴리올로 선택적으로 치환되고, 펩티드의 N 말단은 Z' 에 공유 부착되며;



- [0352] Z' 은 $-C(=O)-L_4-Y'$, , 또는  이고; 식 중 m은 1 내지 10의 정수를 나타내고, *는 전술한 C에 공유 연결된 부위를 나타내며;
- [0353] L_4 는 $-(C_1-C_{10}$ 알킬렌)-, $-CH_2CH_2(OCH_2CH_2)_nN(R^8)C(=O)-L_5-*$, 또는 $-CH_2(OCH_2CH_2)_nN(R^8)C(=O)-L_5-*$ 이고, 식 중 n은 1 내지 10의 정수를 나타내고, *는 Y' 에 공유 연결된 부위를 나타내며;
- [0354] L_5 는 $-(C_1-C_{10}$ 알킬렌)-이고;
- [0355] R^8 은 -H 또는 $-CH_3$ 이고;
- [0356] C는 세포 결합제를 나타내고;
- [0357] Y' 은 상기 세포 결합제 상에 존재하는 반응성 친핵성 기와 친전자성 기의 반응에 의해 형성된 기이고;
- [0358] R^2 와 R^3 은 합쳐져 $-OCH_2O-$ 를 형성하고, R^1 은 $-CH_2CH_2CH_2CH_3$ 이 아니며;
- [0359] p는 1 내지 18의 값을 갖는다.
- [0360] 식 (PL-A')의 예시적인 화합물은 본원에 기술된 바와 같은 MB-2a 및 MB-3a(트라스투주맙 메디테칸)와 같은 식 (PL-A)의 화합물을 포함한다.
- [0361] 구현예에서, L_4 는 $-(C_1-C_{10}$ 알킬렌)-이다.
- [0362] 구현예에서, L_4 는 $-CH_2CH_2(OCH_2CH_2)_nN(R^8)C(=O)-L_5-*$ 또는 $-CH_2(OCH_2CH_2)_nN(R^8)C(=O)-L_5-*$ 이고, 식 중 n은 1 내지 10의 정수를 나타내고, *는 Y' 에 공유 연결된 부위를 나타낸다.
- [0363] 구현예에서, L_4 는 $-CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2-$, $-CH_2CH_2-$, $-CH_2-$, $-CH_2CH_2OCH_2CH_2OCH_2CH_2NHC(=O)CH_2CH_2-*$ 또는
- [0364] $-CH_2OCH_2CH_2OCH_2CH_2NHC(=O)CH_2CH_2-*$ 이고, 식 중 *는 Y' 에 공유 연결된 부위를 나타낸다.
- [0365] 구현예에서, Y' 은 마이클 수용체 기, 숙신이미드, 에폭시드, 또는 할로젠으로부터 형성된다.

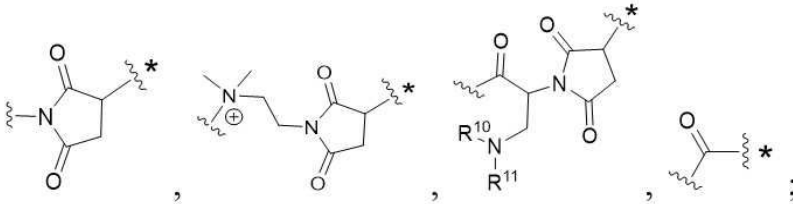
[0366] 구현예에서, Y'은 다음으로부터 형성되고



[0367]

[0368] 식 중 R¹⁰ 및 R¹¹은 각각 독립적으로 -H 또는 C₁-C₃ 알킬이다.

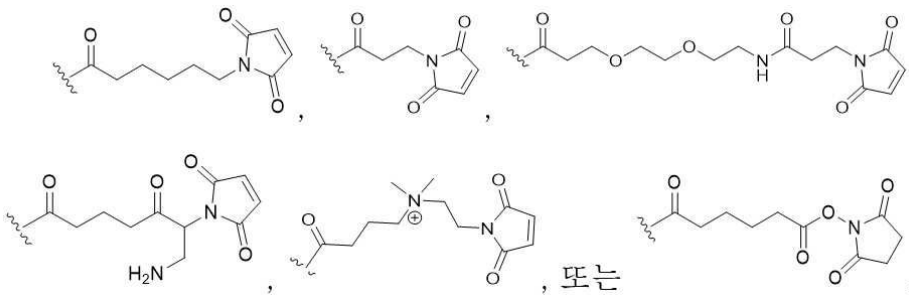
[0369] 구현예에서, Y'은 다음과 같고:



[0370]

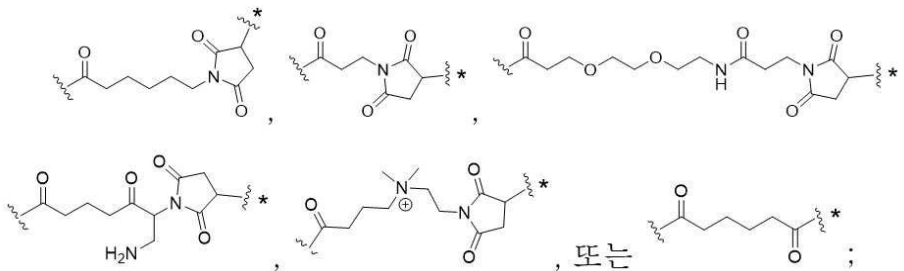
[0371] 식 중, R¹⁰ 및 R¹¹은 각각 독립적으로 -H 또는 C₁-C₃ 알킬이고, *는 상기 C에 공유 연결된 부위를 나타낸다.

[0372] 구현예에서, Z'은 다음으로부터 형성된다:



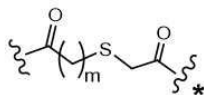
[0373]

[0374] 구현예에서, Z'은 다음과 같고:

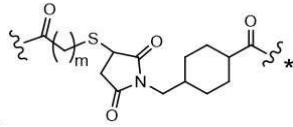


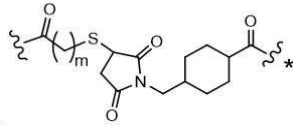
[0375]

[0376] 식 중 *는 C에 공유 결합되는 부위를 나타낸다.



[0377] 구현예에서, Z'은 이고, *는 전술한 C에 공유 연결된 부위를 나타낸다. 구현예에서, m은 1이다. 구현예에서 m은 2이다. 구현예에서 m은 3이다. 구현예에서 m은 4이다. 구현예에서 m은 5이다. 구현예에서 m은 6이다. 구현예에서 m은 7이다. 구현예에서 m은 8이다. 구현예에서 m은 9이다. 구현예에서 m은 10이다.



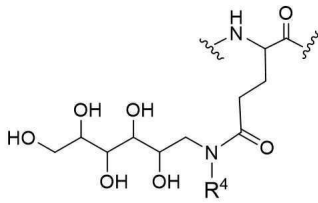
[0378] 구현예에서, **Z'**은  이고, *는 전술한 **C**에 공유 연결된 부위를 나타낸다. 구현예에서, **m**은 1이다. 구현예에서 **m**은 2이다. 구현예에서 **m**은 3이다. 구현예에서 **m**은 4이다. 구현예에서 **m**은 5이다. 구현예에서 **m**은 6이다. 구현예에서 **m**은 7이다. 구현예에서 **m**은 8이다. 구현예에서 **m**은 9이다. 구현예에서 **m**은 10이다.

[0379] 구현예에서, **E**는 2, 3, 또는 4개의 아미노산으로 이루어진 펩티드이다. 상기 펩티드 내의 각각의 아미노산은 L 아미노산이거나, 상기 펩티드 내의 적어도 하나의 아미노산은 D 아미노산이다.

[0380] 구현예에서, **E**는 글리신, 알라닌, 발린, 글루타민, 글루탐산, 페닐알라닌, 및 류신으로부터 선택된 하나 이상의 아미노산을 포함하되, 상기 글루타민 또는 글루탐산은 폴리올로 선택적으로 치환된다.

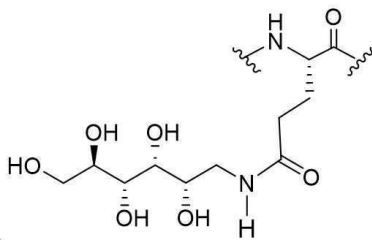
[0381] 구현예에서, **E**는 글리신, 알라닌, 발린, 글루타민, 글루탐산, 페닐알라닌, 및 류신으로부터 선택된 아미노산을 포함하되, 상기 글루타민 또는 글루탐산은 폴리올로 선택적으로 치환된다.

[0382] 구현예에서, **E**는 다음의 구조를 갖는 아미노산을 포함하고,



[0383] ,
 [0384] 식 중 **R⁹**는 -H 또는 C₁-C₆ 알킬이다.

[0385] 구현예에서, **E**는 다음의 구조를 갖는 아미노산을 포함한다:



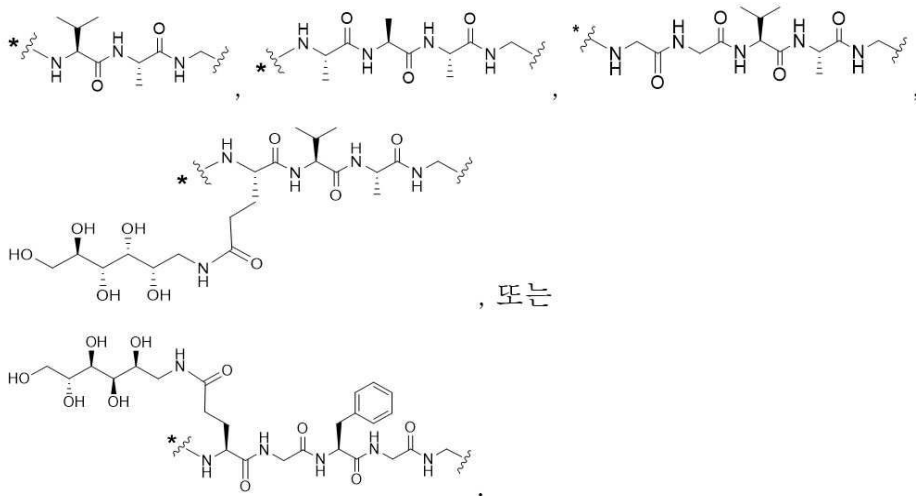
[0386] ,
 [0387] 구현예에서, **E**는, -Ala-Val-*, -Val-Ala-*, -Gly-Gly-*, -Val-Cit-*, -Cit-Val-*, -Leu-Ala-*, -Ala-Leu-*, -Leu-Cit-*, -Cit-Leu-*, -Leu-Ala-*, -Ala-Leu-*, -Lys-Lys-*, -Ala-Lys-*, -Lys-Ala-*, -Val-Lys-*, -Lys-Val-*, -Tyr-Arg-*, -Arg-Tyr-*, -Arg-Arg-*, -Ala-Ala-*, -Phe-Lys-*, -Lys-Phe-*, -Thr-Thr-*, -Thr-Met-*, -Met-Thr-*, -Met-Tyr-*, -Tyr-Met-*, -Phe-Gln-*, -Gln-Phe-*, -Gly-Ser-*, -Leu-Gln-*, -Gln-Leu-*, -Ser-Ala-*, -Ser-Gly-*, -Val-Thr-*, -Thr-Val-*, -Val-Gln-*, -Ser-Val-*, -Val-Ser-*, -Ala-Met-*, -Met-Ala-*, -Val-Arg-*, -Arg-Val-*, -Phe-Ala-*, -Ala-Phe-*, -Cit-Val-*, -Gln-Val-*, -Phe-Arg-*, -Arg-Phe-*, -Ala-Ala-Ala-*, -Gly-Gly-Gly-*, -Ala-Val-Ala-*, -Gly-Val-Gly-*, -Ala-Val-Gly-*, -Gly-Phe-Lys-*, -Lys-Phe-Gly-*, -Leu-Ala-Leu-*, -Val-Ala-Leu-*, -Leu-Ala-Val-*, -Val-Ala-Val-*, -Ala-Val-Ala-Gly-* (서열번호 10), -Gly-Phe-Gly-Gly-* (서열번호 11), -Gly-Gly-Phe-Gly-* (서열번호 12), -Ala-Val-Gly-Gly-* (서열번호 13), -Ala-Ala-Ala-Ala-* (서열번호 14), -Ala-Val-Ala-Ala-* (서열번호 15), -Ala-Leu-Ala-Leu-* (서열번호 16), -Leu-Ala-Leu-Ala-* (서열번호 17), -Gly-Phe-Leu-Gly-* (서열번호 18) 및 -Gly-Leu-Phe-Gly-* (서열번호 19)로 이루어진 군으로부터 선택되며, 식 중 *는 **Z'**에 공유 부착된 펩티드의 N-말단을 나타낸다.

[0388] 구현예에서, **E**는 다음으로 이루어진 군으로부터 선택되며: -L-Ala-D-Val-*, -L-Val-D-Ala-*, -L-Val-D-Lys-*, -L-Val-D-Arg-*, -L-Val-D-Cit-*,

[0389] -L-Val-D-Arg-*, -L-Val-D-Cit-*, -L-Val-D-Lys-*, -L-Val-D-Arg-*, -L-Arg-D-Arg-*, -L-Ala-D-Ala-*, -L-Ala-D-Lys-*, -L-Ala-D-Arg-*, -L-Ala-D-Ala-L-Ala-*, -L-Ala-D-Val-L-Ala-*, -L-Ala-D-Ala-Gly-*, 및 -L-Ala-

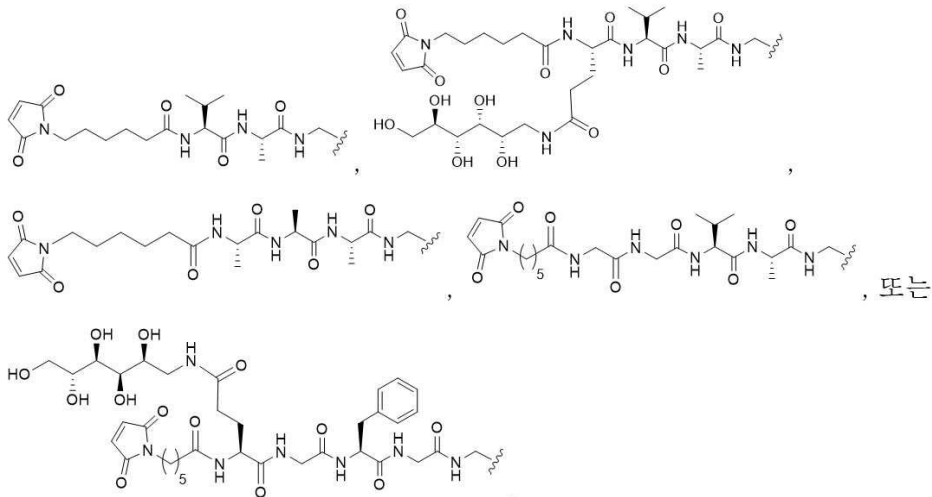
D-Val-Gly-*, 식 중 *는 Z'에 공유 부착된 펩티드의 N-말단을 나타낸다.

[0390] 구현예에서, -E-NH-CH₂-는 다음 구조 중 하나를 가지며, 식 중 *는 Z'에 공유 부착된 펩티드의 N-말단을 나타낸다:



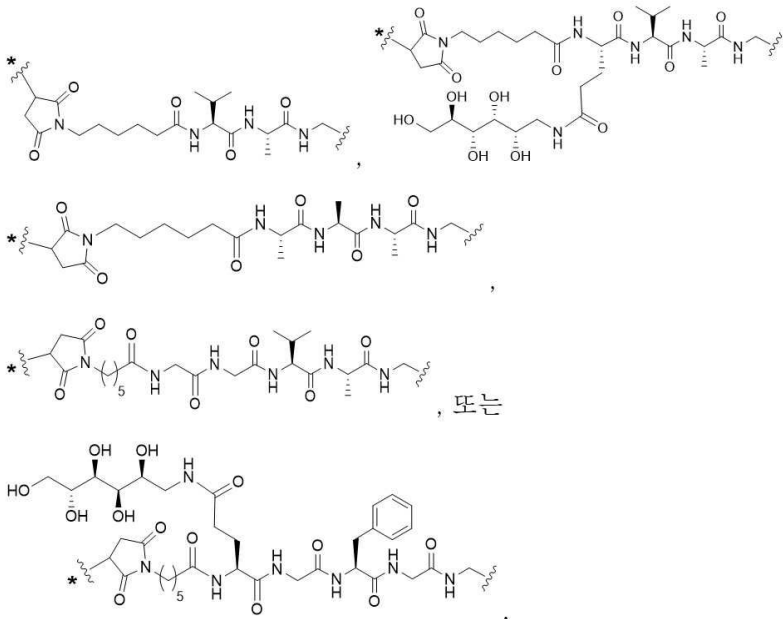
[0391]

[0392] 구현예에서, Z'-E-NH-CH₂-는 다음 구조 중 하나로부터 형성된다:



[0393]

[0394] 구현예에서, $Z'-E-NH-CH_2$ 는 다음 구조 중 하나이고, 식 중 *는 C에 대한 부착점을 나타낸다:



[0395]

[0396] 구현예에서, R^1 이 -H 또는 $-CH_2CH_3$ 이고, R^2 가 -OH 또는 알콕시이고, R^3 이 -H인 경우, $-L_1-L_2-Q'$ 는 $-CH(R')CH_2O-$ 또는 $-CH(R')(CH_2)_2O-$ 가 아니고, R' 은 -H 또는 C_1-C_6 알킬, 알콕시, 치환된 알킬, 페닐, 또는 $PhCH_2-$ 이다. 구현예에서, R^1 이 -H 또는 $-CH_2CH_3$ 이고, R^2 가 -OH 또는 알콕시이고, R^3 이 -H인 경우, $-L_1-L_2-Q'$ 는 $-CH(R')CH_2O-$ 또는 $-CH(R')(CH_2)_2O-$ 가 아니고, R' 은 -H 또는 C_1-C_6 알킬, 알콕시, 치환된 알킬, 페닐, 또는 $PhCH_2-$ 이다.

[0397] 구현예에서, L_1 및 L_2 중 적어도 하나가 존재한다.

[0398] 구현예에서, R^1 , R^2 , 및 R^3 중 적어도 하나는 -H가 아니다.

[0399] 구현예에서, R^1 은 독립적으로 C_1-C_6 알킬, C_2-C_6 알케닐, C_2-C_6 알키닐, 실릴, C_3-C_6 시클로알킬, C_1-C_6 할로젠화 알킬, 알켄, 또는 알킨이다.

[0400] 구현예에서, R^1 은 독립적으로 -H 또는 C_1-C_6 알킬이다.

[0401] 구현예에서, R^2 는 독립적으로 -H, -F, $-N(R^4)_2$, $-N(R^4)(R^5)$, $-OR^4$, $-SR^4$, $-S(=O)R^5$, $-SO_2R^5$, C_1-C_6 알킬, 또는 C_1-C_6 플루오로알킬이고; R^3 은 독립적으로 -H, -F, -CN, $-OCH_3$, $-CH_3$, 또는 $-CF_3$ 이다.

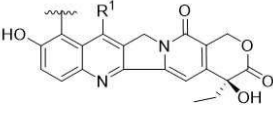
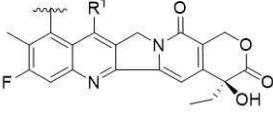
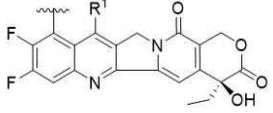
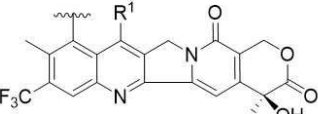
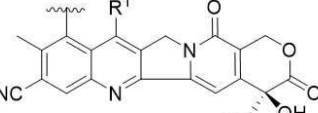
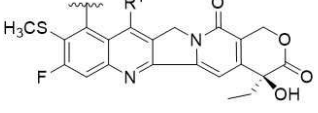
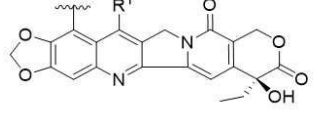
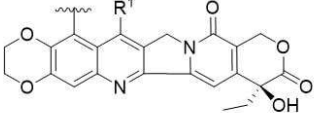
[0402] 구현예에서, R^2 는 독립적으로 C_1-C_6 알킬, C_1-C_6 플루오로알킬, 또는 -F이다.

[0403] 구현예에서, R^3 은 독립적으로 -H, -F, -CN, 또는 $-CF_3$ 이다.

[0404] 구현예에서, R^3 은 독립적으로 -F, -CN, $-OCH_3$, $-CH_3$, 또는 $-CF_3$ 이다.

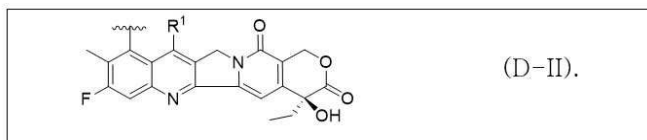
[0405] 구현예에서, R^2 및 R^3 은 결합하여 $-O(CH_2)_nO-$ 또는 $-O(CF_2)_nO-$ 를 형성하고, 식 중 n 은 1 또는 2이다.

[0406] 구현예에서, **D**는 다음 구조 중 하나로 표시된다:

	(D-I);
	(D-II);
	(D-III);
	(D-IV);
	(D-V);
	(D-VI);
	(D-VII); 또는
	(D-VIII).

[0407]

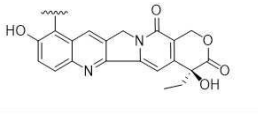
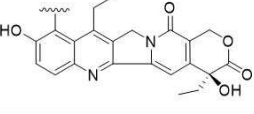
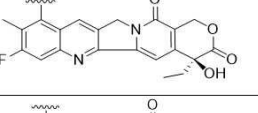
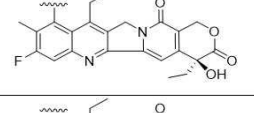
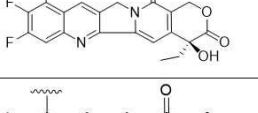
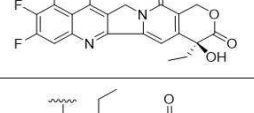
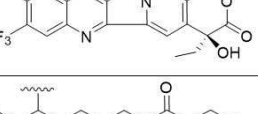
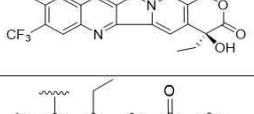
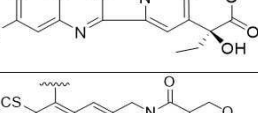
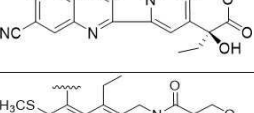
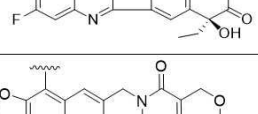
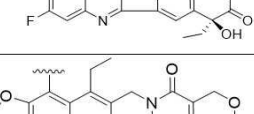
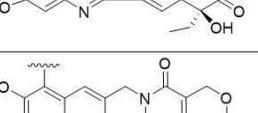
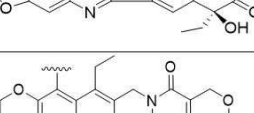
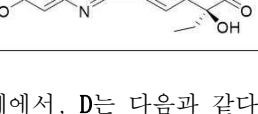
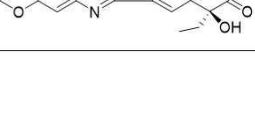
[0408] 구현예에서, **D**는 다음과 같다:



[0409]

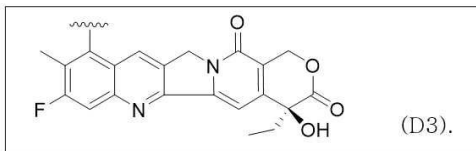
[0410] 구현예에서, **R**¹은 -H 또는 C₁-C₆ 알킬이다.

[0411] 구현예에서, D는 다음 구조 중 하나로 표시된다:

	(D1);		(D2);
	(D3);		(D4);
	(D5);		(D6);
	(D7);		(D8);
	(D9);		(D10);
	(D11);		(D12);
	(D13);		(D14);
	(D15); 또는		(D16).

[0412]

[0413] 구현예에서, D는 다음과 같다:



[0414]

[0415] 구현예에서, L₁은 -(C₁-C₁₀ 알킬렌)-이고, L₂는 없다.

[0416] 구현예에서, L₁은 -(C₁-C₁₀ 알킬렌)-이고, L₂는 -N(R⁶)CH₂-L₃-* 또는 -N(R⁶)C(=O)-L₃-*이며, *는 Q'에 공유 결합된 부위를 나타낸다.

[0417] 구현예에서, L₁은 없고 L₂는 -N(R⁶)CH₂-L₃-* 또는 -N(R⁶)C(=O)-L₃-*이며, 식 중 *는 Q'에 공유 연결된 부위를 나타낸다.

[0418] 구현예에서, L₃은 -(C₁-C₁₀ 알킬렌)-이다.

[0419] 구현예에서, R⁶은 -H 또는 -CH₃이다.

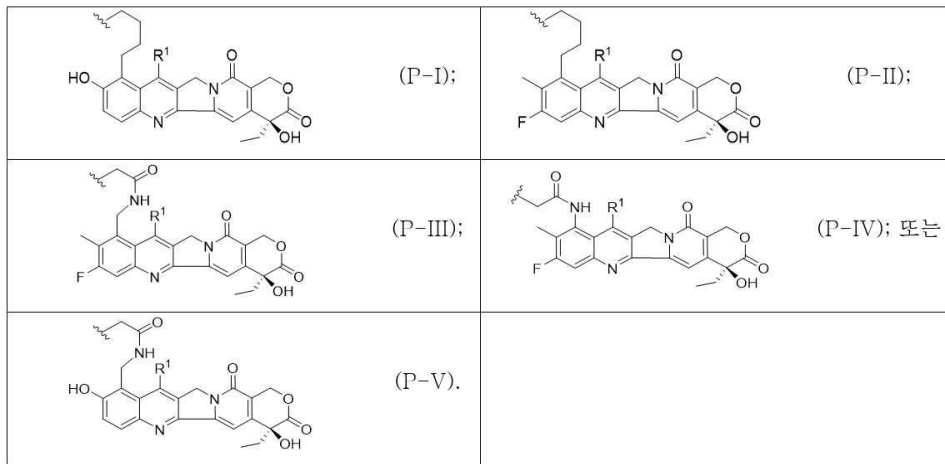
[0420] 구현예에서, L₁-L₂는 -CH₂-, -CH₂CH₂-, -CH₂CH₂CH₂-, 또는 -CH₂CH₂CH₂CH₂-이다.

[0421] 구현예에서, L₁-L₂는 -OCH₂CH₂-, -OCH₂CH₂OCH₂CH₂-, -SCH₂CH₂-, -SCH₂CH₂OCH₂CH₂-, -S(=O)CH₂-, -SO₂CH₂-, -C(=O)CH₂-, -NHCH₂CH₂-, -N(CH₃)CH₂CH₂-, -N(CF₃)CH₂CH₂-, -NHC(=O)CH₂-, -CH₂NHC(=O)CH₂-, -CH₂CH₂NHC(=O)CH₂-, -CH₂N(CH₃)C(=O)CH₂-,

[0422] $-N(CH_3)C(=O)CH_2-^*$, $-N(CH_3)C(=O)CH_2CH_2-^*$, $-C(=O)NHCH_2CH_2-^*$, $-NHC(=O)NHCH_2CH_2-^*$, $-NHC(=O)OCH_2CH_2-^*$, $-CH_2OC(=O)NHCH_2CH_2-^*$, 또는 $-C(=O)N(CH_3)CH_2CH_2-^*$ 이며, 식 중 *는 Q'에 공유 연결된 부위를 나타낸다.

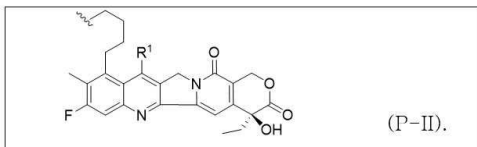
[0423] 구현예에서, L_1-L_2-Q' 은 $-CH_2CH_2CH_2CH_2O-$, $-CH_2CH_2CH_2O-$, $-CH_2CH_2O-$, $-CH_2CH_2OCH_2CH_2O-$, $-CH_2SCH_2CH_2O-$, $-CH_2NHC(=O)CH_2O-$, $-CH_2CH_2NHC(=O)CH_2O-$, $-CH_2N(CH_3)C(=O)CH_2O-$, $-OCH_2CH_2O-$, $-OCH_2CH_2CH_2O-$, $-SCH_2CH_2CH_2O-$, $-SCH_2CH_2O-$, $-NHCH_2CH_2O-$, $-NHCH_2CH_2CH_2O-$, $-N(CH_3)CH_2CH_2O-$, $-C(=O)NHCH_2CH_2O-$, $-NHC(=O)CH_2O-$, $-CH_2S(=O)CH_2O-$, $-CH_2SO_2CH_2O-$, $-CH_2CH_2CH_2CH_2S-$, $-CH_2CH_2CH_2S-$, $-CH_2CH_2S-$, $-CH_2CH_2OCH_2CH_2S-$, $-CH_2SCH_2CH_2S-$, $-CH_2NHC(=O)CH_2S-$, $-OCH_2CH_2CH_2S-$, $-SCH_2CH_2CH_2S-$, $-SCH_2CH_2S-$, $-NHCH_2CH_2CH_2S-$, $-N(CH_3)CH_2CH_2S-$, $-C(=O)NHCH_2CH_2S-$, $-NHC(=O)CH_2S-$, $-CH_2S(=O)CH_2S-$, 또는 $-CH_2SO_2CH_2S-$ 이다.

[0424] 구현예에서, D-L₁-L₂는 다음 구조에 의해 표시된다:



[0425]

[0426] 구현예에서, D-L₁-L₂는 다음 구조로 표시된다:



[0427]

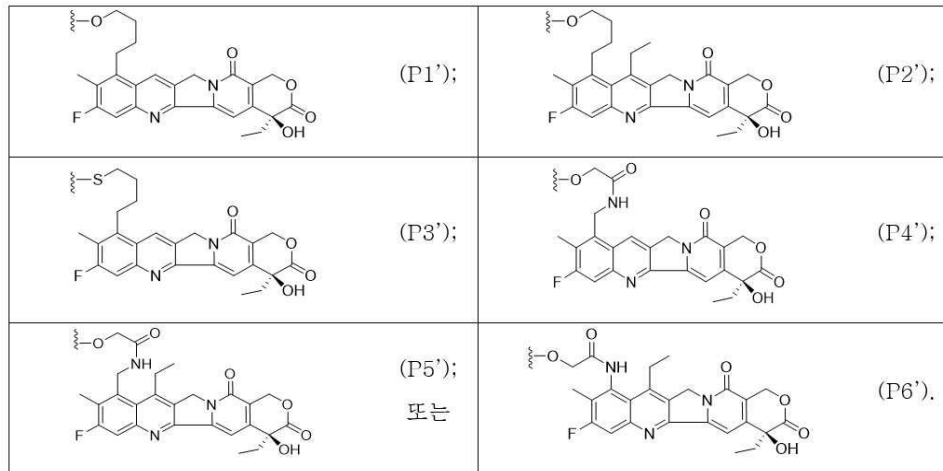
[0428] 구현예에서, R¹은 -H 또는 C₁-C₆ 알킬이다.

[0429] 구현예에서, R¹은 -H 또는 -CH₂CH₃이다.

[0430] 구현예에서, Q'은 -O-이다.

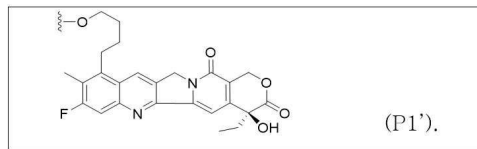
[0431] 구현예에서, Q'은 -S-이다.

[0432] 구현예에서, D-L₁-L₂-Q'-는 다음 구조 중 하나를 갖는다:



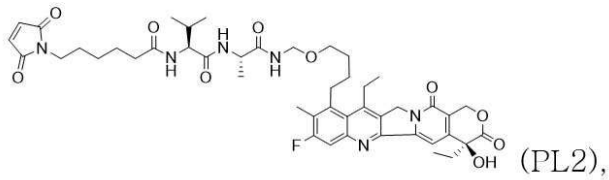
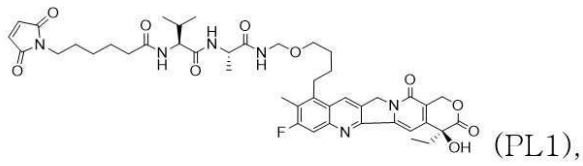
[0433]

[0434] 구현예에서, D-L₁-L₂-Q'-는 다음과 같다:

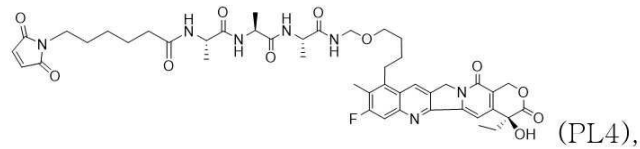
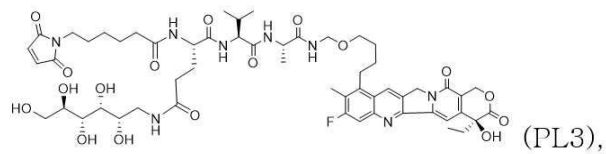


[0435]

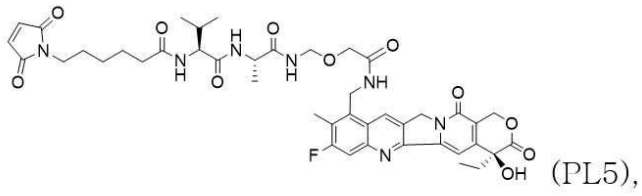
[0436] 구현예에서, D-L₁-L₂-Q'-CH₂-NH-E-Z'-는 다음 구조 중 하나로부터 형성된다:



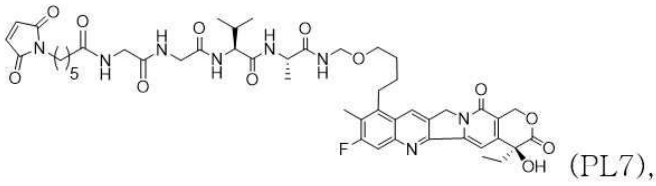
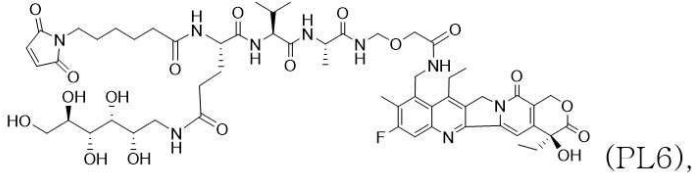
[0437]



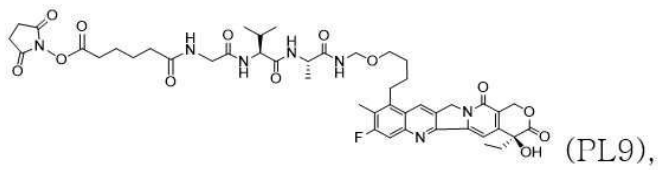
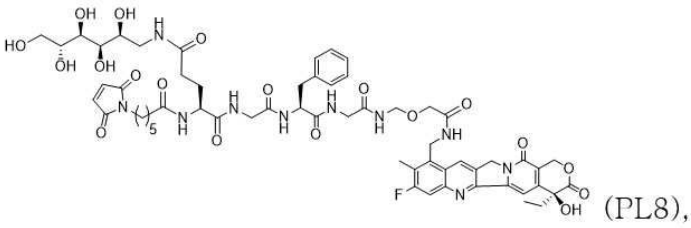
[0438]



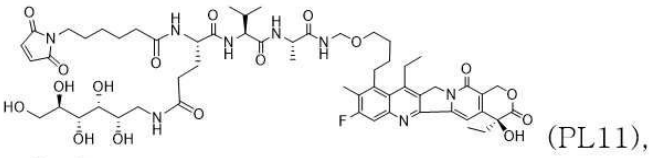
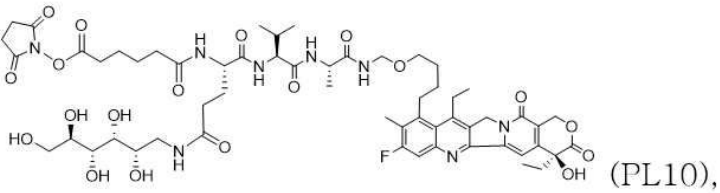
[0439]



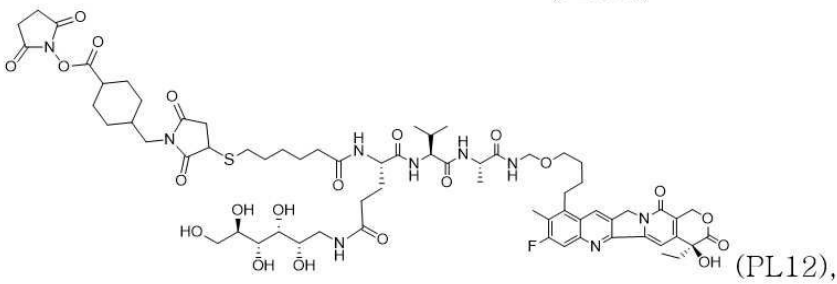
[0440]

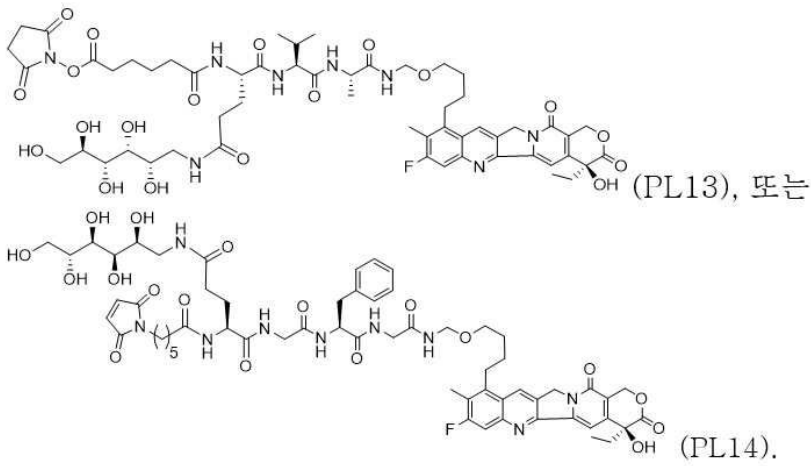


[0441]



[0442]

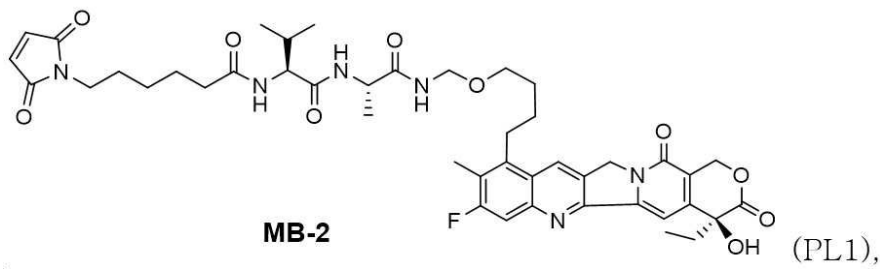




[0443]

[0444]

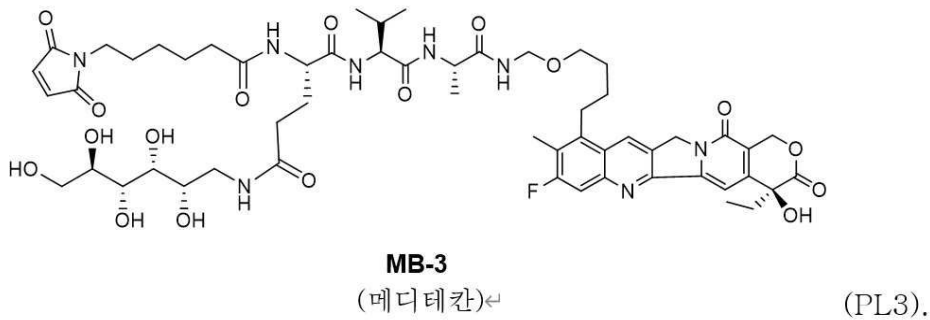
구현예에서, $D-L_1-L_2-Q'-CH_2-NH-E-Z'$ -은 **MB-2**로부터 형성된다:



[0445]

[0446]

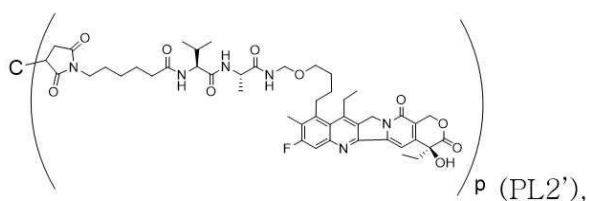
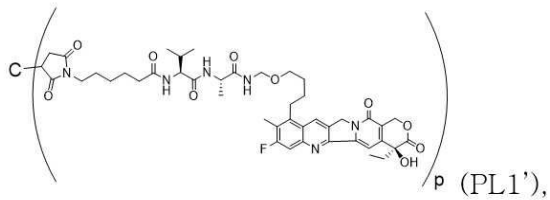
구현예에서, $D-L_1-L_2-Q'-CH_2-NH-E-Z'$ -은 **MB-3**(메디테칸)으로부터 형성된다:



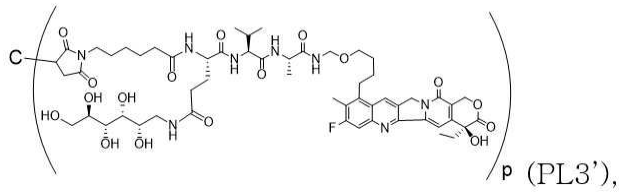
[0447]

[0448]

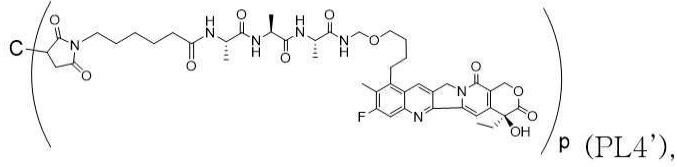
구현예에서, $\{D-L_1-L_2-Q'-CH_2-NH-E-Z'\}_p-C$ 는 다음 구조 중 하나이고, 식 중 **C**는 단클론 항체이고, **p**는 약물 대 항체 비율(DAR)이고, **p**는 약 2 내지 10, 4 내지 8, 또는 7 내지 8 범위(예를 들어, 3.2 내지 8.0)의 평균 수이다:



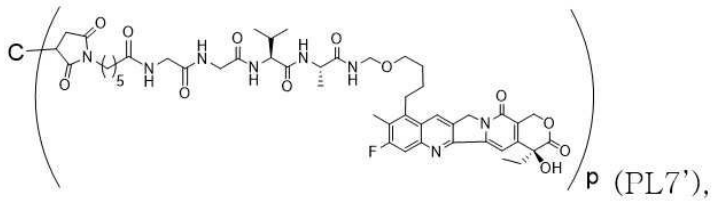
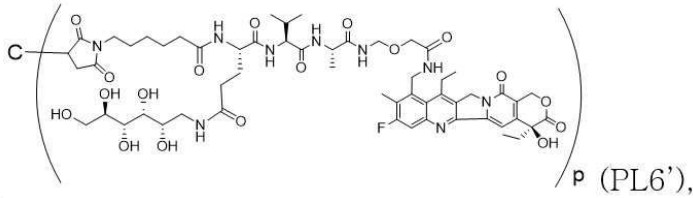
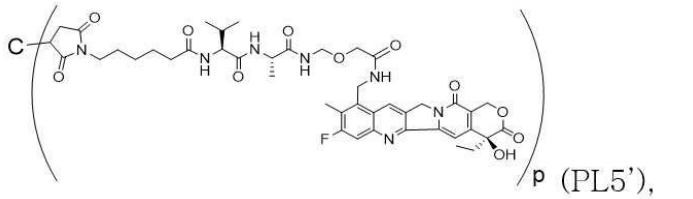
[0449]



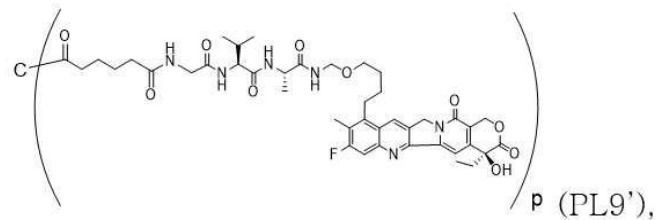
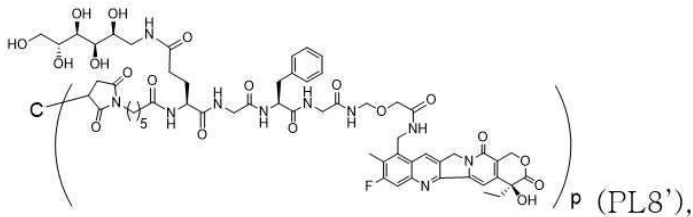
[0450]



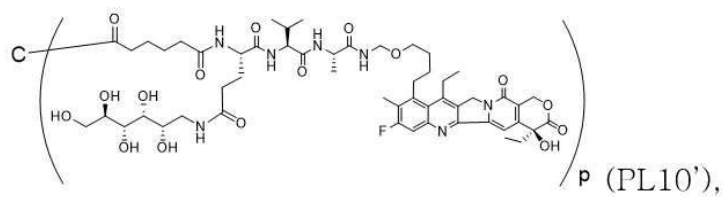
[0451]

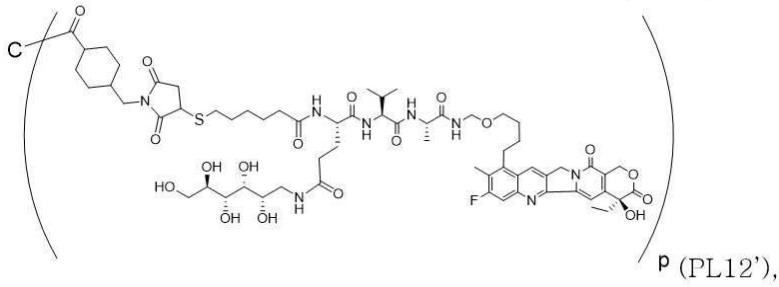
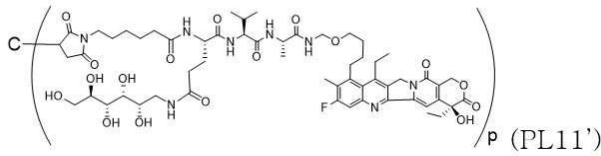


[0452]

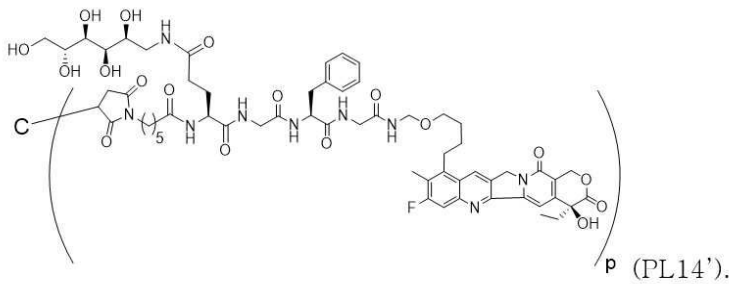
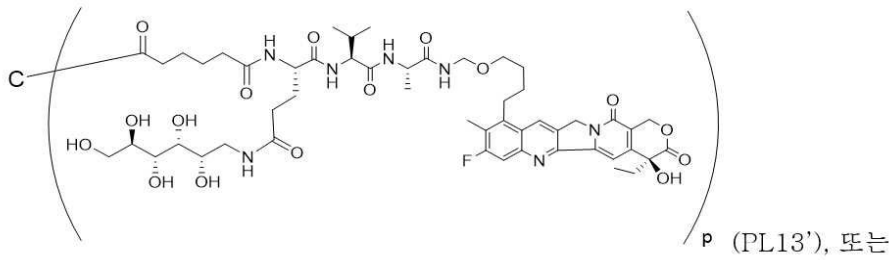


[0453]



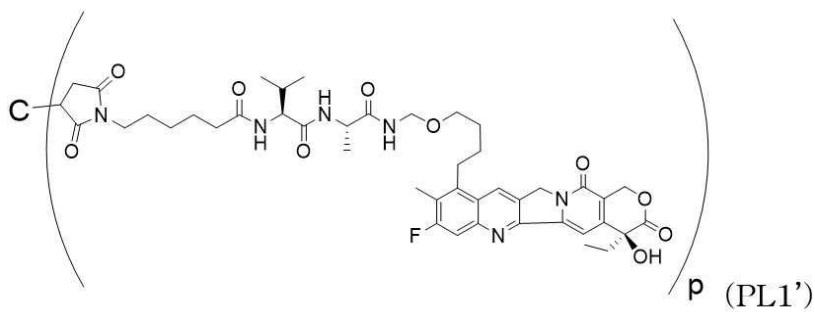


[0454]



[0455]

[0456] 구현예에서, $\{D-L_1-L_2-Q'-CH_2-NH-E-Z'\}_p-C$ 는,

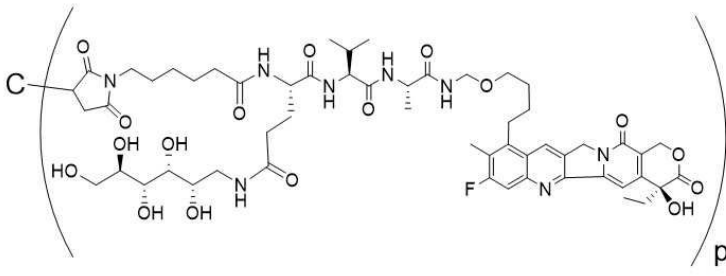


[0457]

이름, 식 중 C 는 단클론 항체이고, p 는 약물 대 항체 비율(DAR)이다. 구현예에서, p 는 약 2 내지 10, 4 내지 8, 또는 7 내지 8(예를 들어, 3.2 내지 8.0) 범위의 평균 수이다.

[0458]

구현예에서, $\{D-L_1-L_2-Q'-CH_2-NH-E-Z'\}_p-C$ 는,



[0459] $p(PL3')$ 이며, 식 중 **C**는 단클론 항체이고, **p**는 약물 대 항체 비율(DAR)이다. 구현예에서, **p**는 약 2 내지 10, 4 내지 8, 또는 7 내지 8(예를 들어, 3.2 내지 8.0) 범위의 평균 수이다.

[0460] 구현예에서, **C**는 항-HER2 항체이다.

[0461] 구현예에서, **C**는 트라스투주맙(Herceptin)이다.

[0462] 구현예에서, **C**는 트라스투주맙-dkst(Ogivri)이다.

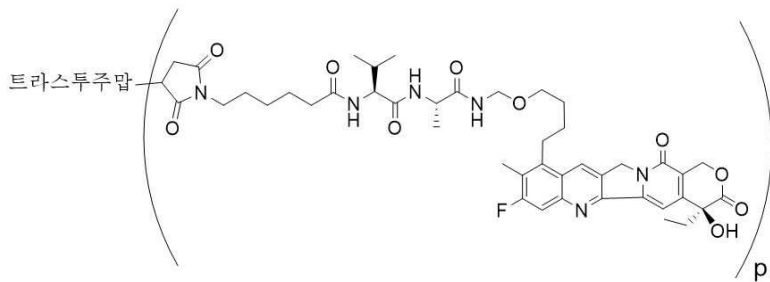
[0463] 구현예에서, **C**는 트라스투주맙-pkrb(Herzuma)이다.

[0464] 구현예에서, **C**는 트라스투주맙-dttb (Ontruzant)이다.

[0465] 구현예에서, **C**는 트라스투주맙-qyyp (Trazimera)이다.

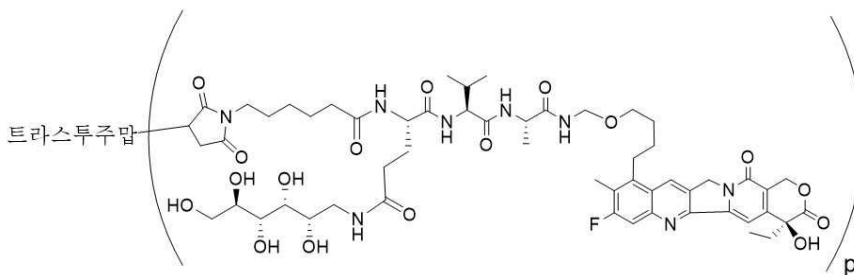
[0466] 구현예에서, **C**는 트라스투주맙-anns (Kanjinti)이다.

[0467] 구현예에서, $\{D-L_1-L_2-Q'-CH_2-NH-E-Z'\}_p-C$ 는 **MB-2a**이고,



[0468] **MB-2a**, 식 중 **p**는 약물 대 항체 비율(DAR)이다. 구현예에서, **p**는 약 4 내지 8, 또는 7 내지 8 범위의 평균 수(예를 들어, 7.9)이다.

[0469] 구현예에서, $\{D-L_1-L_2-Q'-CH_2-NH-E-Z'\}_p-C$ 는 **MB-3a**(트라스투주맙 메디테칸)이고,



[0470] **MB-3a**, 식 중 **p**는 약물 대 항체 비율(DAR)이다. 구현예에서, **p**는 약 4 내지 8, 또는 7 내지 8 범위의 평균 수이거나, **p**는 8이다.

[0471] 본원에 기술된 접합체(예를 들어, 식 **PL-A'** 또는 식 **PL-A**에 따른 임의의 화합물, 예컨대 **MB-2a** 및 **MB-3a**)는 적어도 캄프토테신 유도체의 공유 부착물을 포함할 수 있다.

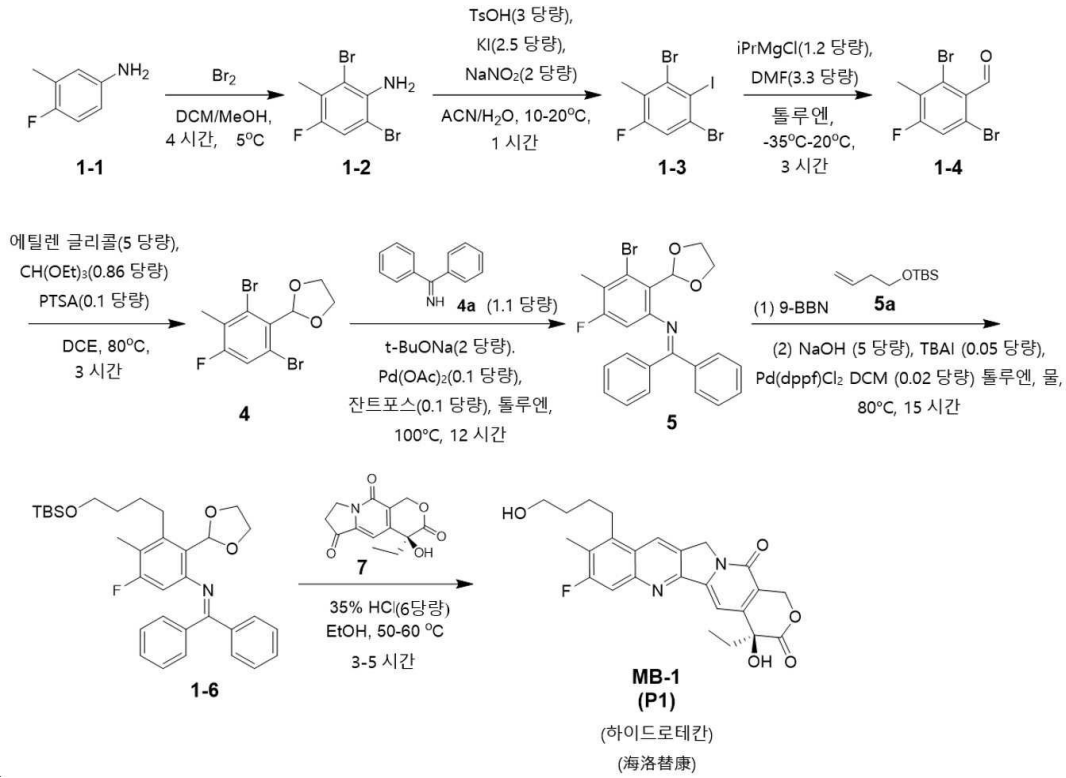
[0472] 구현예에서, 아래 첨자 **p**는 세포 결합제 상의 세포 결합제 상의 캄프토테신 페이로드 모이어티의 수를 나타내며, 1 내지 18, 1 내지 12, 또는 1 내지 8의 값을 갖는다. 개별 캄프토테신 접합체는 또한 캄프토테신 접합체 화합물로 지칭될 수 있다. 본원의 구현예에서, 개별 캄프토테신 접합체의 세포 결합제에 접합된 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 또는 18개의 캄프토테신 페이로드 모이어티가 있을 수 있

다.

- [0473] 구현예에서, 각각의 세포 결합체에 결합된 캄프토테신 페이로드 모이어티의 수를 제외하면, 개별 캄프토테신 접합체의 집합(즉, 캄프토테신 접합체 조성물)은 실질적으로 동일하므로, **p**는 캄프토테신 접합체 조성물의 세포 결합체에 결합된 캄프토테신 페이로드 모이어티의 평균 수를 나타낸다. 구현예의 해당 군에서, **p**는 1 내지 약 18, 1 내지 약 10, 또는 1 내지 약 8, 2 내지 약 6, 3 내지 약 5, 또는 6 내지 약 8 범위의 평균 수이다. 구현예에서, **p**는 약 2 내지 10, 4 내지 8, 또는 7 내지 8(예를 들어, 3.2 내지 8.0) 범위의 평균 수이다. 구현예에서, **p**는 약 2이다. 구현예에서, **p**는 약 4이다. 구현예에서, **p**는 약 6이다. 구현예에서, **p**는 약 8이다. 구현예에서, **p**는 약 10이다. 구현예에서, **p**는 약 12이다. 구현예에서, **p**는 2이다. 구현예에서, **p**는 4이다. 구현예에서, **p**는 8이다. 구현예에서, **p**는 3 내지 4의 값을 갖는다. 구현예에서, **p**는 4 내지 5의 값을 갖는다. 구현예에서, **p**는 5 내지 6의 값을 갖는다. 구현예에서, **p**는 6 내지 7의 값을 갖는다. 구현예에서, **p**는 7 내지 8의 값을 갖는다. 구현예에서, **p**는 7.4 내지 8의 값을 갖는다. 구현예에서, **p** 값은 평균 약물 로딩뿐만 아니라 조성물에서 우세한 ADC의 약물 로딩을 또한 지칭한다.
- [0474] 구현예에서, (예를 들어, 본원에 기술된 **MB-2a** 또는 **MB-3a**와 같은, 식 **PL-A'** 또는 식**PL-A**에 따른 임의의 화합물에서 발견되는) 접합은, 감소된 사슬 간 이황화물을 통해 이루어지게 되며, 이는 세포 결합체에 접합된 약 1 내지 약 8, 또는 3 내지 5, 또는 6 내지 8개의 캄프토테신 페이로드 화합물일 수 있다.
- [0475] 구현예에서, (예를 들어, 본원에 기술된 **MB-2a** 또는 **MB-3a**와 같은, 식 **PL-A'** 또는 식**PL-A**에 따른 임의의 화합물에서 발견되는) 접합은, 도입된 시스테인 잔기 및 감소된 사슬 간 이황화물을 통해 이루어지게 되며, 여기에는 세포 결합체에 접합된 1 내지 8, 또는 1 내지 10, 또는 1 내지 12, 또는 1 내지 18개의 캄프토테신 페이로드 화합물이 있을 수 있다.
- [0476] 구현예에서, (예를 들어, 본원에 기술된 **MB-2a** 또는 **MB-3a**와 같은, 식 **PL-A'** 또는 식**PL-A**에 따른 임의의 화합물에서 발견되는) 접합은, 도입된 시스테인 잔기를 통해 이루어지게 되며, 여기에는 세포 결합체에 접합된 2, 또는 3, 또는 4, 또는 5, 또는 6, 또는 7, 또는 8개의 캄프토테신 페이로드 화합물이 있게 된다.
- [0477] 구현예에서, (예를 들어, 본원에 기술된 **MB-2a** 또는 **MB-3a**와 같은, 식 **PL-A'** 또는 식**PL-A**에 따른 임의의 화합물에서 발견되는) 접합은, 리신 잔기를 통해 이루어지게 되며, 여기에는 세포 결합체에 접합된 1 내지 10, 또는 1 내지 12, 또는 1 내지 14, 또는 1 내지 18개의 캄프토테신 페이로드 화합물이 있을 수 있다.
- [0478] **공유 부착을 위한 세포 결합체 상의 반응성 기**
- [0479] 구현예에서, 세포 결합체는 펩티드 방출 가능 링커에 결합되어 식 **PL-A'** 또는 식 **PL-A**에 따른 것과 같은 접합체(예를 들어, **MB-2a** 또는 **MB-3a**)를 형성한다. 전술한 바와 같이, 또 다른 연결 성분은 본원에 기술된 접합체에 존재하여 캄프토테신 화합물과 세포 결합체 사이에 추가 공간을 제공하는 역할을 할 수 있다. 구현예에서, 세포 결합체는 세포 결합체의 헤테로원자를 통해 링커 유닛에 결합된다.
- [0480] 이러한 결합을 위해 세포 결합체 상에 존재할 수 있는 헤테로원자는 황(일 구현예에서, 표적화 리간드의 티올기 유래의 황), 산소(일 구현예에서, 표적화 리간드의 카르복실기 또는 하이드록실기 유래의 산소), 및 질소를 포함하고, 선택적으로 치환될 수 있다(일 구현예에서, 표적화 리간드의 일차 또는 이차 아민 작용기로부터, 또는 다른 구현예에서는 선택적으로 치환된 아미드 질소로부터). 이들 헤테로원자는 세포 결합체의 자연 상태에서, 예를 들어 자연 발생 항체에서 표적화 리간드 상에 존재할 수 있거나, 화학적 변형 또는 생물학적 조작을 통해 표적화 리간드 내로 도입될 수 있다.
- [0481] 일 구현예에서, 세포 결합체는 티올 작용기를 가지므로, 세포 결합체는 티올 작용기의 황 원자를 통해 캄프토테신 페이로드 화합물에 결합된다.
- [0482] 또 다른 구현예에서, 세포 결합체는 캄프토테신 페이로드 화합물의 활성화된 에스테르(이러한 에스테르는 N-하이드록시수신이미드, 펜타플루오로페닐, p-니트로페닐 에스테르를 포함하지만 이들로 한정되지는 않음)와 작용할 수 있는 하나 이상의 리신 잔기를 가지므로, 세포 결합체의 질소 원자 및 화합물의 C=O 기로 이루어진 아미드 결합을 제공한다.
- [0483] 또 다른 양태에서, 세포 결합체는 하나 이상의 티올기를 도입하기 위해 화학적 변형이 가능한 하나 이상의 리신 잔기를 갖는다. 이들 구현예에서, 세포 결합체는 티올 작용기의 황 원자를 통해 캄프토테신 페이로드 화합물에 공유 부착된다. 이러한 방식으로 리신을 변형시키는 데 사용될 수 있는 시약은 N-숙신이미딜 S-아세틸티오아세테이트(SATA) 및 2-이미노티올란 하이드로클로라이드(타라우트 시약)를 포함하지만 이에 한정되지는 않는다.

- [0484] 또 다른 구현예에서, 세포 결합제는 하나 이상의 티올 작용기를 제공하도록 변형될 수 있는 하나 이상의 탄수화물 기를 갖는다. 캄프토테신 접합체에서 화학적으로 변형된 세포 결합제는 티올 작용기의 황 원자를 통해 캄프토테신 페이로드 화합물에 결합된다.
- [0485] 또 다른 구현예에서, 세포 결합제는 산화되어 알데히드(-CHO) 작용기를 제공할 수 있는 하나 이상의 탄수화물기를 갖는다(예를 들어, Laguzza 등의 문헌[1989, *J. Med. Chem.* 32(3):548-55] 참조). 이들 구현예에서, 상응하는 알데히드는 캄프토테신 페이로드 화합물 상의 반응성 부위와 상호작용하여, 캄프토테신 페이로드 화합물과 세포 결합제 사이에 결합을 형성한다. 표적화 리간드 상의 반응성 카르보닐-함유 작용기와 상호작용할 수 있는 캄프토테신 페이로드 화합물 상의 반응 부위는 하이드라진 및 하이드록실아민을 포함하지만 이에 한정되지는 않는다.
- [0486] 일부 양태에서, 세포 결합제는 반응성 작용기 Y와 상호작용하여 식 PL-A'의 Y'과 표적화 리간드에 상응하는 세포 결합제 사이에서 공유 결합을 형성함으로써 결합을 형성할 수 있다. 표적화 리간드와 상호작용하는 능력을 갖는 작용기 Y는 세포 결합제의 성질에 따라 달라질 것이다. 구현예에서, 반응성 기는 부착되어 세포 결합제를 형성하기 전에 캄프토테신 페이로드 화합물 상에 존재하는 말레이미드이다. 캄프토테신 페이로드 화합물에 대한 세포 결합제의 공유 부착은 페이로드 화합물의 말레이미드 작용기 Y와 상호작용하여 티오-치환된 숙신이미드를 형성하는 세포 결합제의 티올 작용기를 통해 달성된다. 티올 작용기는 세포 결합제의 자연 상태에서 세포 결합제 상에, 예를 들어 자연 발생 잔기로 존재할 수 있거나, 화학적 변형을 통해 또는 생물학적 조작에 의해 세포 결합제 내로 도입될 수 있다.
- [0487] 또 다른 구현예에서, 세포 결합제는 항체이고, 티올기는 항체의 사슬간 이황화물의 환원에 의해 생성된다. 따라서, 구현예에서, 캄프토테신 페이로드 화합물은 환원된 사슬간 이황화물(들) 유래의 시스테인 잔기에 접합된다.
- [0488] 또 다른 구현예에서, 세포 결합제는 항체이고, 티올 작용기는 예를 들어 시스테인 잔기의 도입에 의해 항체 내로 화학적으로 도입된다. 따라서, 구현예에서, 캄프토테신 페이로드 화합물은 세포 결합제의 도입된 시스테인 잔기를 통해 세포 결합체에 접합된다.
- [0489] 바이오접합체의 경우, 약물 접합 부위가 접합 용이성, 약물-링커 안정성, 생성된 바이오접합체의 생물물리학적 특성에 미치는 영향, 및 시험관 내 세포독성을 포함하는 다수의 파라미터에 영향을 미칠 수 있다는 것이 관찰되었다. 약물-링커 안정성과 관련하여, 세포 결합체에 대한 약물-링커 모이어티의 접합 부위는 제거 반응을 겪는, 접합된 약물-링커 모이어티의 능력에 영향을 미쳐, 일부 경우에 유리 약물의 조기 방출을 유발할 수 있다. 표적화 리간드 상의 접합을 위한 부위는, 예를 들어 조작된 부위에서의 선택된 시스테인 잔기뿐만 아니라 환원된 사슬간 이황화물도 포함한다. 구현예에서, 본원에 기술된 것과 같은 캄프토테신 접합체를 형성하기 위한 접합 방법은, 환원된 이황화 결합 유래의 티올 잔기를 사용하는 접합 방법과 비교하여 제거 반응에 덜 민감한, 유전적으로 조작된 부위에서 티올 잔기(예: Kabat에 제시된 것과 같은 EU 인덱스에 따른 위치 239)를 사용한다. 다른 구현예에서, 본원에 기술된 것과 같은 캄프토테신 접합체를 형성하기 위한 접합 방법은 (예를 들어 사슬간 이황화 환원으로 인한) 제거 반응에 더 민감한 부위에서 티올 잔기를 사용한다.
- [0490] **합성 방법**
- [0491] 예시적인 합성 방법이 본원에 기술된다. 또 다른 예시적인 합성 방법은, 그 전문뿐만 아니라 당업계에 공지된 방법 또한 본원에 참조로서 통합되는, 미국 특허 가출원 제62/981,197호에 기술된 것을 포함한다.
- [0492] 구현예에서, **반응식 1**은 기술된 화합물 **MB-1**(하이드로테칸, 海洛替康)(P1)에 대한 예시적인 합성 방법을 제공한다:

반응식 1

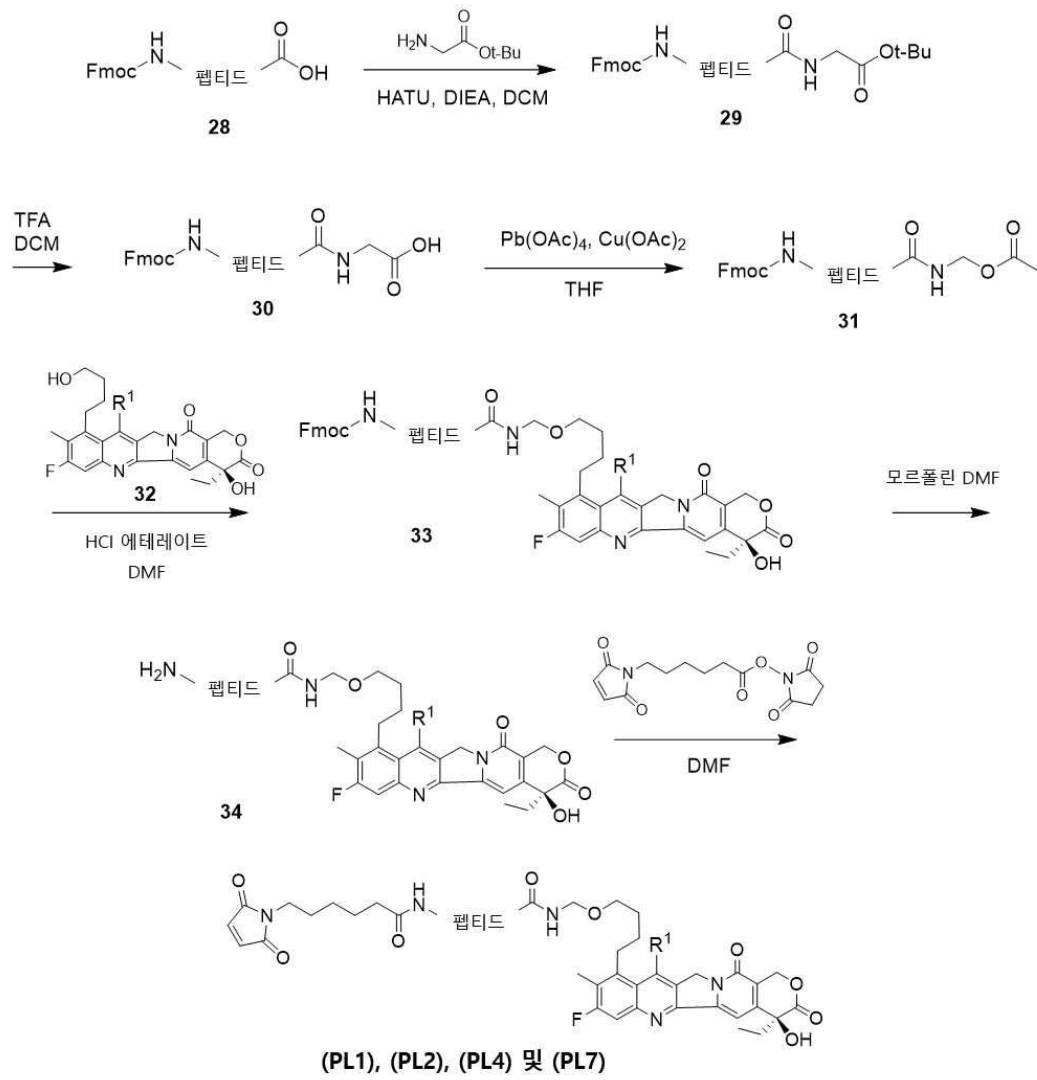


[0493]

[0494]

구현예에서, **반응식 2**는 기술된 연결형 페이로드 (PL1), (PL2), (PL4) 및 (PL7)을 제조하기 위한 예시적인 합성 방법을 제공한다:

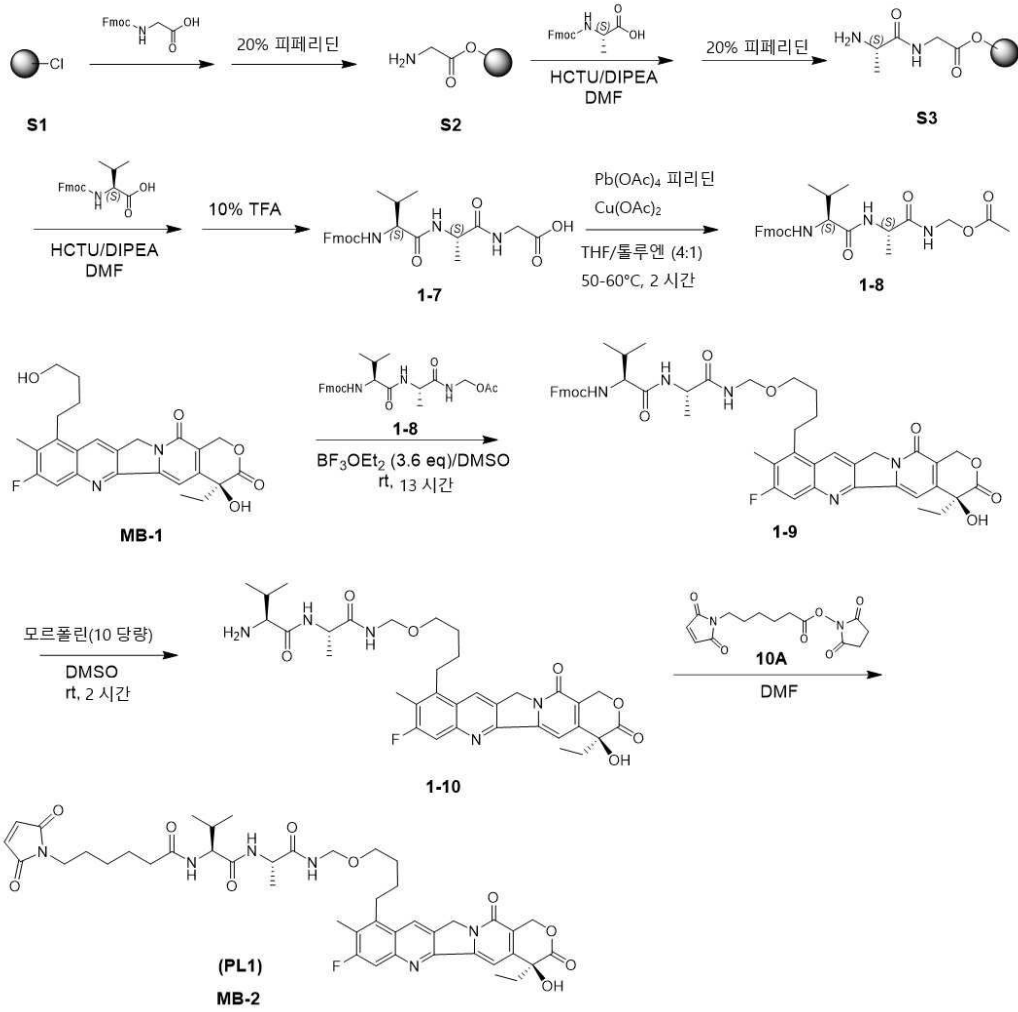
반응식 2



[0495]

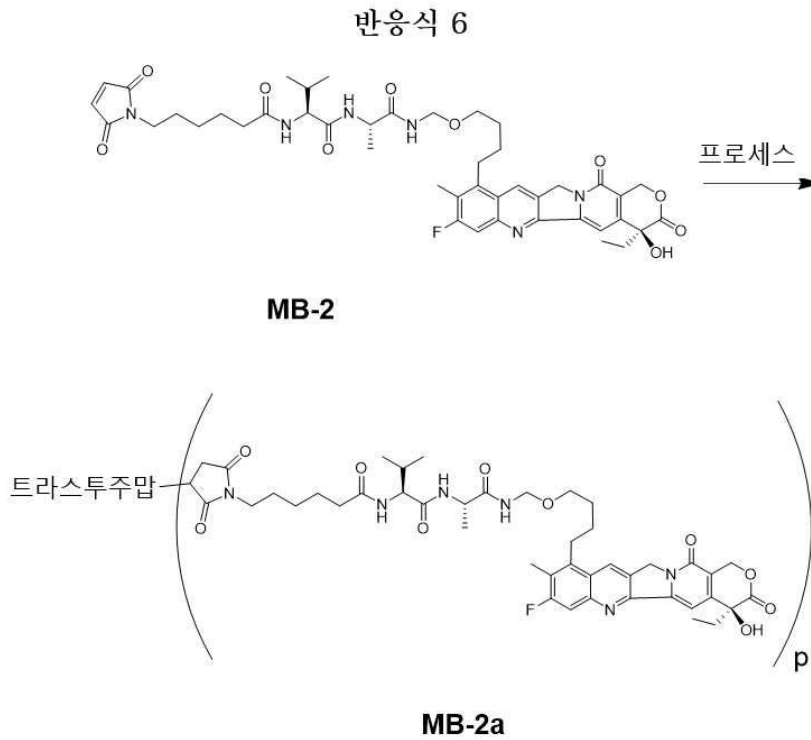
[0496] 구현예에서, 반응식 3은 기술된 화합물 MB-2 (PL1)에 대한 예시적인 합성 방법을 제공한다:

반응식 3



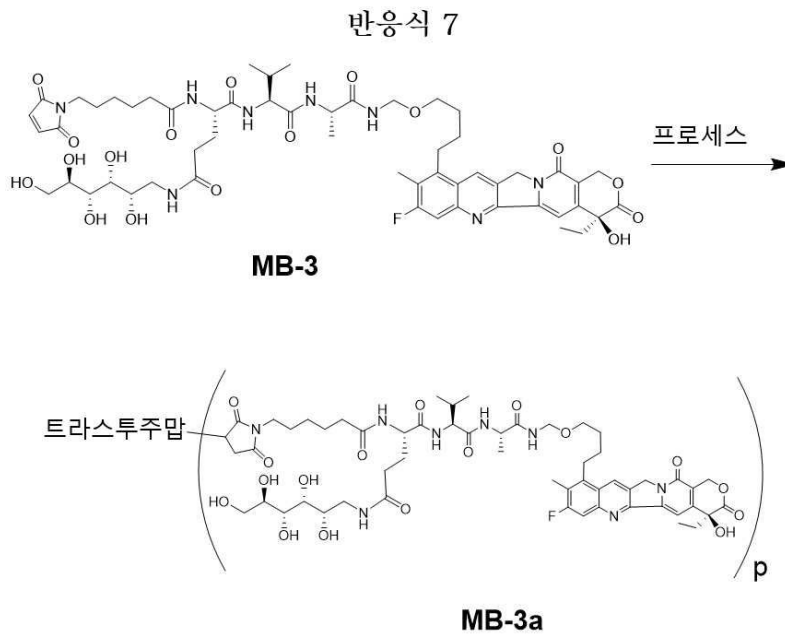
[0497]

[0504] 구현예에서, 항체-약물 접합체는 **MB-2a**이다. 구현예에서, **반응식 6**은 기술된 항체-약물 접합체 **MB-2a**에 대한 예시적인 합성 방법을 제공한다:



[0505]

[0506] 구현예에서, 항체-약물 접합체는 **MB-3a**(트라스투주맙 메디테칸)이다. 구현예에서, **반응식 7**은 기술된 항체-약물 접합체 **MB-3a**(트라스투주맙 메디테칸)에 대한 예시적인 합성 방법을 제공한다:



[0507]

[0508] **치료 방법**

[0509] 또 다른 양태에서, 본 발명은 세포 증식성 질환 또는 장애를 치료하거나 비정상적인 세포 성장을 억제하는 방법을 특징으로 하며, 전술한 방법은 **MB-2a** 또는 **MB-3a**(트라스투주맙 메디테칸)와 같은 식(**PL-A**)의 화합물 중 하나, 또는 전술한 바와 같은, 이의 약학적으로 허용 가능한 염, 또는 식(**PL-A**)의 화합물 중 어느 하나(예를 들어, **MB-2a** 또는 **MB-3a**(트라스투주맙 메디테칸)), 또는 전술한 바와 같은 이의 약학적으로 허용 가능한 염을 투여하는 단계를 포함한다.

- [0510] 구현예에서, 방법은 암을 치료하기 위한 것이다. 구현예에서, 암은 HER2 과발현을 특징으로 하고/하거나 전이성 이고/이거나 트라스투주맙 내성이다.
- [0511] 구현예에서, 암은 선암종, 뇌암, 방광암, 유방암, 자궁경부암, 용모막암종, CNS 종양, 대장암 또는 결장암, 미만성 내인성 뇌교 신경교종(DIPG), 자궁내막암, 식도암, 유잉 육종, 난관암, 담낭암, 위암, 교아세포종, 두경부암, 혈액암, 호지킨 림프종, 신장암, 후두암, 백혈병, 간암, 폐암, 림프종, 흑색종, 메르켈 세포 암종, 중피종, 다발성 골수종, 골수이형성 증후군(MDS), 신경아세포종, 비호지킨 림프종, 골육종, 췌장암, 복막암, 전립선암, 난소암, 신장암, 타액선 횡문근육종 암, 육종, 피부암, 소장암, 편평 세포 암종, 고환암, 갑상선암, 자궁암, 또는 빌름스 종양이다.
- [0512] 구현예에서, 암은 폐암, 요로상피암, 결장암, 전립선암, 난소암, 췌장암, 유방암, 방광암, 위암, 위장 기질 종양, 자궁 경부암, 식도암, 편평 세포 암종, 복막암, 간암, 간세포암, 대장암, 직장암, 결장암, 자궁내막암, 자궁암, 침샘암, 신장암, 외음부암, 갑상선암, 음경암, 백혈병, 악성 림프종, 형질세포종, 골수종, 또는 육종이다.
- [0513] 구현예에서, 암은 유방암, 위암, 폐암(예를 들어, 비소세포 폐암), 및 난소암이고, 유방암에 대한 음성 예후 인자인 것으로 보고되었다.
- [0514] 구현예에서, 암은 낮은 HER2-발현을 특징으로 한다.
- [0515] 구현예에서, 암은 중등도의 HER2-발현을 특징으로 한다.
- [0516] 구현예에서, 암은 높은 HER2-발현을 특징으로 한다.
- [0517] 구현예에서, 암은 HER2 과발현을 특징으로 한다.
- [0518] 구현예에서, 암은 트라스투주맙 내성이다.
- [0519] 구현예에서, 암은 유방암이다. 구현예에서, 유방암은 전이성이다. 구현예에서, 유방암은 낮은 HER2-발현을 특징으로 한다. 구현예에서, 유방암은 중등도의 HER2-발현을 특징으로 한다. 구현예에서, 유방암은 높은 HER2-발현을 특징으로 한다. 구현예에서, 유방암은 트라스투주맙 내성이다.
- [0520] 구현예에서, 암은 위암이다. 구현예에서, 위암은 전이성이다. 구현예에서, 위암은 낮은 HER2-발현을 특징으로 한다. 구현예에서, 위암은 중등도의 HER2-발현을 특징으로 한다. 구현예에서, 위암은 높은 HER2-발현을 특징으로 한다. 구현예에서, 위암은 트라스투주맙 내성이다.
- [0521] 일부 구현예에서, 암은 폐암(예를 들어, 비소세포 폐암)이다. 일부 구현예에서, 폐암(예를 들어, 비소세포 폐암)은 전이성이다. 구현예에서, 폐암(예를 들어, 비소세포 폐암)은 낮은 Her2-발현을 특징으로 한다. 구현예에서, 폐암(예를 들어, 비소세포 폐암)은 중등도의 Her2-발현을 특징으로 한다. 구현예에서, 폐암(예를 들어, 비소세포 폐암)은 높은 Her2-발현을 특징으로 한다. 구현예에서, 폐암(예를 들어, 비소세포 폐암)은 트라스투주맙 내성이다.
- [0522] 구현예에서, 암은 난소암이다. 구현예에서, 난소암은 전이성이다. 구현예에서, 난소암은 낮은 HER2-발현을 특징으로 한다. 구현예에서, 난소암은 중등도의 HER2-발현을 특징으로 한다. 구현예에서, 난소암은 높은 HER2-발현을 특징으로 한다. 구현예에서, 난소암은 트라스투주맙 내성이다.
- [0523] 종양, 전이, 또는 세포 성장 미조절을 특징으로 하는 다른 질환 또는 장애를 포함하지만 이에 한정되지 않는 암은, 캄프토테신 접합체의 투여에 의해 치료되거나 억제될 수 있다.
- [0524] 다른 구현예에서, 암의 치료 방법이 제공되며, 상기 방법은 캄프토테신 접합체 및 화학요법제의 유효량을 이를 필요로 하는 환자에게 투여하는 단계를 포함한다. 일 구현예에서, 화학요법제는 암의 치료에 불응성인 것으로 확인되지 않은 제제이다. 또 다른 구현예에서, 화학요법제는 암의 치료에 불응성인 것으로 확인된 제제이다. 캄프토테신 접합체는 암에 대한 치료로서 수술까지 받은 환자에게 투여될 수 있다.
- [0525] 구현예에서, 환자는 방사선 요법과 같은 추가 치료도 받는다. 특정 구현예에서, 캄프토테신 접합체는 화학요법제 또는 방사선 요법과 동시에 투여된다. 또 다른 특정 구현예에서, 화학요법제 또는 방사선 요법은 캄프토테신 접합체(예를 들어, **MB-2a** 또는 **MB-3a**(트라스투주맙 메디테칸))의 투여 전 또는 후에 투여된다.
- [0526] 화학요법제는 일련의 기간에 걸쳐 투여될 수 있다. 화학요법제, 예컨대 표준 치료 화학요법제(들) 중 임의의 하나 또는 이들의 조합이 투여될 수 있다.

- [0527] 또한, 화학요법 또는 방사선 요법이 너무 유독한 것으로 입증되었거나 입증될 수 있는 경우, 예를 들어 이로 인해 치료 중인 대상체에게 허용할 수 없거나 참을 수 없는 부작용이 발생하는 경우, 화학요법 또는 방사선 요법에 대한 대안으로서 캄프토테신 접합체로 암을 치료하는 방법이 제공된다. 치료 중인 환자는, 어떤 치료가 허용 가능한지 또는 참을 수 있는 것으로 확인되었는지에 따라, 선택적으로 수술, 방사선 요법, 또는 화학요법과 같은 다른 암 치료제로 치료받을 수 있다.
- [0528] 구현예에서, 본원에 기술된 치료 방법은 **MB-2a** 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염을 투여하는 단계를 포함한다.
- [0529] 구현예에서, 본원에 기술된 치료 방법은 **MB-3a**(트라스투주맙 메디테칸)를 투여하는 단계를 포함한다.
- [0530] 조성물 및 투여 방법
- [0531] 또 다른 양태에서, 본 발명은 본원에 기술된 화합물(식(PL-A)의 화합물 중 어느 하나, 예컨대 **MB-2a** 및 **MB-3a**(트라스투주맙 메디테칸)), 또는 본원에 기술된 바와 같은, 이의 약학적으로 허용 가능한 염을 포함하는 약학적 조성물을 특징으로 한다. 구현예에서, 약학적 조성물은 약학적으로 허용 가능한 담체를 포함한다.
- [0532] 구현예에서, 약학적 조성물은 **MB-2a** 또는 **MB-3a**(트라스투주맙 메디테칸)와 같은 식(PL-A)에 따른 접합체, 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염을 포함한다.
- [0533] 구현예에서, 약학적 조성물은 **MB-2a**, 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염을 포함한다.
- [0534] 구현예에서, 약학적 조성물은 **MB-3a**(트라스투주맙 메디테칸), 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염을 포함한다.
- [0535] 구현예에서, 본 발명은, 본원에 기술된 캄프토테신 접합체(예를 들어, **MB-2a** 또는 **MB-3a**(트라스투주맙 메디테칸)와 같은 식(PL-A)의 화합물 중 어느 하나) 및 약학적으로 허용 가능한 담체를 포함하는 약학적 조성물을 제공한다. 캄프토테신 접합체는, 세포 결합체가 결합하는 항원의 발현과 연관된 장애의 치료를 위해 화합물을 환자에게 투여할 수 있게 하는 임의의 형태일 수 있다. 예를 들어, 접합체는 액체 또는 고형분의 형태일 수 있다. 바람직한 투여 경로는 비경구이다. 비경구 투여는 피하 주사, 정맥내, 근육내, 흉골내 주사, 또는 주입 기술을 포함한다. 일 양태에서, 조성물은 비경구 투여된다. 일 양태에서, 접합체는 정맥내 투여된다. 투여는 임의의 편리한 경로에 의해, 예를 들어 주입 또는 볼루스 주사에 의해 이루어질 수 있다.
- [0536] 약학적 조성물은 조성물이 환자에게 투여될 때 화합물이 생체 이용할 수 있도록 제형화될 수 있다. 조성물은 하나 이상의 투여 단위의 형태를 취할 수 있다.
- [0537] 약학적 조성물을 제조하는 데 사용되는 물질은 사용된 양에 있어서 비독성일 수 있다. 약학적 조성물 중 활성 성분(들)의 최적 투여량은 다양한 인자에 따라 달라지게 된다는 것이 당업자에게 명백할 것이다. 관련 인자는 동물 유형(예를 들어 인간), 화합물의 특정 형태, 투여 방식, 및 사용된 조성물을 포함하지만 이에 한정되지는 않는다.
- [0538] 조성물은, 예를 들어 액체의 형태일 수 있다. 액체는 주사에 의한 전달에 유용할 수 있다. 주사에 의한 투여용 조성물에는 계면활성제, 보존제, 습윤제, 분산제, 현탁제, 완충제, 안정화제, 및 등장제 중 하나 이상이 또한 포함될 수 있다.
- [0539] 용액, 현탁액, 또는 다른 유사한 형태의 여부와 상관없이, 액체 조성물은 다음 중 하나 이상을 포함할 수도 있다: 멸균 희석제, 예컨대 주사용수, 식염수 바람직하게는 생리식염수, 링거 용액, 등장성 염화나트륨, 용매 또는 현탁 매질의 역할을 할 수 있는 합성 모노 또는 디글리세리드와 같은 고정유, 폴리에틸렌 글리콜, 글리세린, 시클로텍스트린, 프로필렌 글리콜 또는 다른 용매; 벤질 알코올 또는 메틸 파라벤과 같은 향균제; 아스코르브산 또는 중아황산나트륨과 같은 항산화제; 에틸렌디아민테트라아세트산과 같은 킬레이트제; 아미노산, 아세트산염, 구연산염, 또는 인산염과 같은 완충제; 비이온성 계면활성제, 폴리에틸렌 글리콜과 같은 세제; 및 염화 나트륨 또는 텍스트로스과 같은 등장성 조절제. 비경구 조성물은 앰플, 일회용 주사기, 또는 유리, 플라스틱, 또는 다른 재료로 만들어진 다회투여 바이알에 담길 수 있다. 생리학적 식염수는 예시적인 보조제이다. 주사식 조성물은 바람직하게는 멸균 상태이다.
- [0540] 특정 장애 또는 병태의 치료에 효과적인 접합체의 양은 장애 또는 병태의 성질에 따라 달라질 것이며, 표준 임상 기술에 의해 결정될 수 있다. 또한, 최적 투여량 범위를 식별하는 데 도움이 되는 시험관내 또는 생체내 검정을 선택적으로 사용할 수 있다. 조성물에 사용될 정확한 투여량 또한, 투여 경로 및 질환 또는 장애의 심각성

에 따라 달라질 것이며, 의료인의 판단 및 각 환자의 상황에 따라 결정되어야 한다.

- [0541] 조성물은 적절한 투여량이 수득되도록 유효량의 화합물을 포함한다. 통상적으로, 이러한 양은 조성물의 중량 기준으로 화합물의 적어도 약 0.01%이다.
- [0542] 정맥내 투여의 경우, 조성물은 동물의 체중 1kg당 약 0.01 내지 약 100 mg의 캄프토테신 접합체를 포함할 수 있다. 일 양태에서, 조성물은 동물 체중 1kg당 약 1 내지 약 100 mg의 캄프토테신 접합체를 포함할 수 있다. 또 다른 양태에서, 투여되는 양은 체중 1kg당 약 0.1 내지 약 25 mg의 범위의 화합물일 것이다. 사용된 약물에 따라, 투여량은 훨씬 더 낮을 수 있는데, 예를 들어, 1.0 µg/kg(대상체의 체중) 내지 5.0 mg/kg, 4.0 mg/kg, 3.0 mg/kg, 2.0 mg/kg, 또는 1.0 µg/kg, 또는 1.0 µg/kg 내지 500.0 µg/kg일 수 있다.
- [0543] 일반적으로, 환자에게 투여되는 접합체의 투여량은 일반적으로 약 0.01 mg/kg(대상체의 체중) 내지 약 100 mg/kg 또는 1.0 µg/kg(대상체의 체중) 내지 5.0 mg/kg이다. 구현예에서, 환자에게 투여되는 투여량은 약 0.01 mg/kg(대상체의 체중) 내지 약 15 mg/kg이다. 구현예에서, 환자에게 투여되는 투여량은 약 0.1 mg/kg(대상체의 체중) 내지 약 15 mg/kg이다. 구현예에서, 환자에게 투여되는 투여량은 약 0.1 mg/kg(대상체의 체중) 내지 약 20 mg/kg이다. 구현예에서, 투여되는 투여량은 약 0.1 mg/kg(대상체의 체중) 내지 약 5 mg/kg 또는 약 0.1 mg/kg 내지 약 10 mg/kg이다. 구현예에서, 투여되는 투여량은 약 1 mg/kg(대상체의 체중) 내지 약 15 mg/kg이다. 구현예에서, 투여되는 투여량은 약 1 mg/kg(대상체의 체중) 내지 약 10 mg/kg이다. 구현예에서, 투여되는 투여량은 치료 사이클에 걸쳐 약 0.1 내지 4 mg/kg(대상체의 체중), 더 바람직하게는 0.1 내지 3.2 mg/kg, 또는 더욱 더 바람직하게는 0.1 내지 2.7 mg/kg이다.
- [0544] 용어 "**담체(carrier)**"는 조성물과 함께 투여되는 희석제, 보조제, 또는 부형제를 지칭한다. 이러한 약학적 담체는 석유, 동물, 식물, 또는 합성 기원의 오일, 예컨대 땅콩유, 대두유, 팜유, 참기름을 포함하는 액체, 예컨대 물 및 오일일 수 있다. 담체는 식염수, 검 아카시아, 젤라틴, 전분 페이스트, 탈크, 케라틴, 콜로이드 실리카, 우레아일 수 있다. 또한, 보조제, 안정화제, 증점제, 유허제, 및 착색제가 사용될 수 있다. 일 구현예에서, 환자에게 투여될 때의 화합물 또는 조성물 및 약학적으로 허용 가능한 담체는 멸균 상태이다.
- [0545] 화합물이 정맥 내 투여될 때, 물은 예시적인 담체이다. 식염수 용액 및 수성 텍스트로스 및 글리세롤 용액 또한, 특히 주사식 용액을 위한 액체 담체로서 사용될 수 있다. 적절한 약학적 담체는 부형제, 예컨대 전분, 글루코스, 락토오스, 수크로오스, 젤라틴, 맥아, 쌀, 밀가루, 백악, 실리카 겔, 스테아르산 나트륨, 글리세롤 모노스테아레이트, 운모, 염화나트륨, 건조 탈지유, 글리세롤, 프로필렌, 글리콜, 물, 에탄올 등을 포함할 수도 있다. 필요에 따라, 본 발명의 조성물은 소량의 습윤제나 유화제 또는 pH 완충제를 함유할 수도 있다.
- [0546] 일 구현예에서, 접합체는 동물, 특히 인간에게 정맥 내 투여에 적합한 약학적 조성물로서 일상적인 절차에 따라 제형화된다. 일반적으로, 정맥 내 투여용 담체 또는 비히클은 멸균 등장성 수성 완충액이다. 필요한 경우, 조성물은 가용화제를 포함할 수도 있다. 정맥 내 투여용 조성물은 주사 부위에서 통증을 완화하기 위해 리도카인과 같은 국소 마취제를 선택적으로 포함할 수 있다. 일반적으로, 성분은 별도로 공급되거나, 활성제의 양이 표시된 앰플이나 봉지(sachette)와 같은 완전 밀폐 용기에 담긴 동결 건조 분말 또는 무수 농축물과 같은 단위 투여량 형태로 함께 혼합되어 공급된다. 접합체가 주입에 의해 투여되는 경우, 이는 멸균된 약학용 등급의 물 또는 식염수가 담긴 주입 병에 분배될 수 있다. 접합체가 주사에 의해 투여되는 경우, 성분들이 투여 전에 혼합될 수 있도록 주사용 멸균수 또는 식염수 앰플이 제공될 수 있다.
- [0547] 약학적 조성물은 일반적으로 멸균된 상태로, 실질적으로 등장성으로 제형화되며, 미국 식품의약국의 모든 제조 및 품질관리 기준(GMP) 규정을 철저히 준수하여 제형화된다.
- [0548] 치료적 사용을 위한 키트
- [0549] 일부 양태에서, 암 치료 및 자가면역 질환의 치료에 사용하기 위한 키트가 제공된다. 이러한 키트는 본원에 기술된 캄프토테신 접합체를 포함하는 약학적 조성물을 포함할 수 있다.
- [0550] 구현예에서, 키트는 본원에 기술된 임의의 치료 방법에 사용하기 위한 지침을 포함할 수 있다. 포함된 지침은 대상체에게 약학적 조성물을 투여하여 대상체에서 의도된 활성, 예를 들어 암과 같은 질환 또는 병태의 치료를 달성하는 것에 대해 설명할 수 있다. 구현예에서, 본원에 기술된 약학적 조성물의 사용과 관련된 지침은 의도된 치료를 위한 투여량, 투여 일정, 및 투여 경로에 관한 정보를 포함할 수 있다. 용기는 단위 투여량, 벌크 패키지(예: 여러 번 투여용 패키지) 또는 하위 단위 투여량일 수 있다. 본 개시의 키트에 제공된 지침은 일반적으로 라벨 또는 패키지 삽입물 상의 서면 지침이다. 라벨 또는 패키지 삽입물은 약학적 조성물이 대상체에서 질환 또

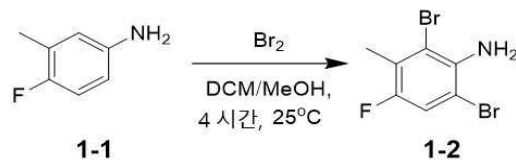
는 장애를 치료하고, 발병을 지연시키고/시키거나 완화시키는 데 사용된다는 것을 나타낸다.

- [0551] 구현예에서, 본원에 제공된 키트는 적절히 포장에 담긴다. 적절한 포장은 바이알, 병, 단지, 가요성 포장 등을 포함하지만, 이들로 한정되지는 않는다. 특정 장치, 예컨대 흡입기, 비강 투여 장치, 주입 장치와 함께 사용하기 위한 패키지도 고려된다. 구현예에서, 키트는 멸균 접근 포트를 가질 수 있다(예를 들어, 용기는 정맥주사액 주머니이거나 피하 주사 바늘로 뚫을 수 있는 마개를 가진 바이알일 수 있다).
- [0552] 구현예에서, 본원에 제공된 키트는 본원에 기술된 것과 같은 암 또는 자가면역 질환을 치료하는 데 유용한 추가 치료제를 포함한다.
- [0553] 암에 대한 다중 방식 요법
- [0554] 종양, 전이, 또는 세포 성장 미조절을 특징으로 하는 다른 질환 또는 장애를 포함하지만 이에 한정되지 않는 암은, 캄프토테신 접합체의 투여에 의해 치료되거나 억제될 수 있다.
- [0555] 다른 구현예에서, 암의 치료 방법이 제공되며, 상기 방법은 캄프토테신 접합체 및 화학요법제의 유효량을 이를 필요로 하는 환자에게 투여하는 단계를 포함한다. 일 구현예에서, 화학요법제는 암의 치료에 불응성인 것으로 확인되지 않은 제제이다. 또 다른 구현예에서, 화학요법제는 암의 치료에 불응성인 것으로 확인된 제제이다. 캄프토테신 접합체는 암에 대한 치료로서 수술까지 받은 환자에게 투여될 수 있다.
- [0556] 구현예에서, 환자는 방사선 요법과 같은 추가 치료도 받는다. 특정 구현예에서, 캄프토테신 접합체는 화학요법제 또는 방사선 요법과 동시에 투여된다. 또 다른 특정 구현예에서, 화학요법제 또는 방사선 요법은 캄프토테신 접합체의 투여 전 또는 후에 투여된다.
- [0557] 화학요법제는 일련의 기간에 걸쳐 투여될 수 있다. 화학요법제, 예컨대 표준 치료 화학요법제(들) 중 임의의 하나 또는 이들의 조합이 투여될 수 있다.
- [0558] 또한, 화학요법 또는 방사선 요법이 너무 유독한 것으로 입증되었거나 입증될 수 있는 경우, 예를 들어 이로 인해 치료 중인 대상체에게 허용할 수 없거나 참을 수 없는 부작용이 발생하는 경우, 화학요법 또는 방사선 요법에 대한 대안으로서 캄프토테신 접합체로 암을 치료하는 방법이 제공된다. 치료 중인 환자는, 어떤 치료가 허용 가능한지 또는 참을 수 있는 것으로 확인되었는지에 따라, 선택적으로 수술, 방사선 요법, 또는 화학요법과 같은 다른 암 치료제로 치료받을 수 있다.
- [0559] 본 개시는 다음의 실시예로 추가로 예시되며, 이는 본원에서 기술되는 특정 절차에 대한 범위 또는 사상에서 제한하는 것으로 해석되지 않아야 한다. 실시예들은 특정 구현예를 예시하기 위해 제공되고, 본 발명의 범주에 대한 어떠한 제한도 의도되지 않음을 이해해야 한다. 본 발명의 사상 및/또는 첨부된 청구 범위로부터 벗어나지 않고 당업자에게 제안할 수 있는 다양한 다른 실시예, 변형, 및 그 균등물이 제공될 수 있음을 또한 이해해야 한다.
- [0560] **실시예**
- [0561] 본 발명은 아래에 나타낸 실시예의 관점에서 구체적으로 설명된다. 그러나, 본 발명은 이들로 한정되지 않는다. 또한, 이는 결코 제한된 방식으로 해석되지 않는다. 또한, 달리 구체적으로 기술되지 않는 한, 본 명세서에 기술된 시약, 용매, 및 출발 물질은 상업적 공급업체로부터 용이하게 취득될 수 있다.
- [0562] 다음 약어는 다음 용어에 사용된다:
- [0563] ADC 항체-약물 접합체
- [0564] ACN 아세토니트릴
- [0565] DAR 약물 대 항체 비율
- [0566] DCC N,N'-디시클로헥실카르보디이미드
- [0567] DCM 디클로로메탄
- [0568] DIPA 디이소프로필아민
- [0569] DIPEA 디이소프로필에틸아민
- [0570] DMF 디메틸포름아미드

- [0571] DMSO 디메틸설폭시드
- [0572] DMTMM 4-(4,6-디메톡시-1,3,5-트리아진-2-일)-4-메틸모르폴리늄 클로라이드
- [0573] DMTMMT 4-(4,6-디메톡시-1,3,5-트리아진-2-일)-4-메틸모르폴리늄 테트라플루오로보레이트
- [0574] DTPA 디에틸렌트리아민펜타아세트산
- [0575] EDCI 1-에틸-3-(3-디메틸아미노프로필)카르보디이미드
- [0576] HOPO 2-하이드록시피리딘-1-옥사이드
- [0577] i.v. 정맥내
- [0578] M 물
- [0579] nM 나노몰
- [0580] NMM N-메틸모르폴린
- [0581] PPTS 피리디늄 *p*-톨루엔설포네이트
- [0582] PTSA 4-메틸벤젠설포산
- [0583] SEC 크기 배제 크로마토그래피
- [0584] TBS 터트-부틸디메틸실릴
- [0585] TCEP 3,3',3''-포스핀트리일트리프로파노산 하이드로클로라이드
- [0586] TEA 트리에틸아민
- [0587] TFA 트리플루오로아세트산
- [0588] THF 테트라하이드로푸란
- [0589] TLC 박층 크로마토그래피
- [0590] *p*-TsOH *p*-톨루엔설포산

[0591] **실시예 1. 화합물 MB-1(P1)의 예시적인 합성**

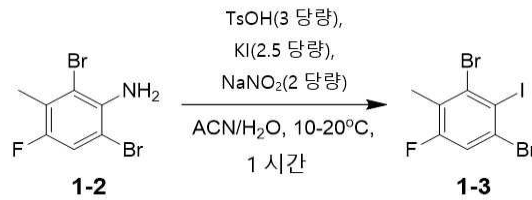
[0592] 2,6-디브로모-4-플루오로-3-메틸-아닐린(1-2)의 제조를 위한 일반 절차



[0593] .

[0594] CH₂Cl₂/메탄올(1:1, 1.2 L) 중 화합물 1-1(70 g, 559.36 mmol, 1당량)의 교반 용액에 CH₂Cl₂/메탄올(1:1, 200 mL) 중 Br₂(223.48 g, 1.40 mol, 72.09 mL, 2.5당량)의 용액을 추가 깔때기를 사용해 15°C에서 1.5시간 동안 적 가하였다. 반응 혼합물을 25°C에서 4시간 동안 교반하였고, TLC(석유 에테르/아세트산 에틸=6/1, R_f=0.6)는 출발 물질이 소모되었음을 보여주었다. 3개의 추가 반응 바이알을 전술한 바와 같이 설정하고, 모두 4개의 반응물을 합치고 농축시켰다. 생성된 잔류물에 1 N Na₂S₂O₃(1.5 L) 및 아세트산 에틸(1.5 L)을 첨가하였다. 용액을 10 분 동안 교반한 다음, 1 N Na₂CO₃(150 mL)으로 조심스럽게 염기화시켰다. 이를 분별 깔때기 내로 옮기고 유기층을 분리하였다. 수성층을 아세트산 에틸(2 x 1 L)로 추출하였다. 합쳐진 유기층을 1 N Na₂S₂O₃(1 L)으로 세척하고, 이어서 염수(1 L)로 세척한 다음, Na₂SO₄ 상에서 건조시켰다. 이를 여과하고 감압 하에 농축시켜 잔류물을 수득하였다. 잔류물을 석유 에테르(1 L)와 함께 분쇄하고 여과하여 생성물 1-2를 연보라색 고형분으로서 수득하였다(574 g, 1.93 mol, 수율 86%, 순도 95%). ¹H NMR (400MHz, 클로로포름-d) δ 7.18 (d, J=8.6 Hz, 1H), 4.52 - 4.30 (m, 2H), 2.29 (d, J=2.4 Hz, 3H).

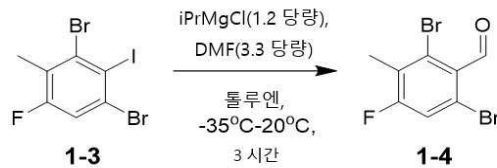
[0595] 1,3-디브로모-5-플루오로-2-요오드-4-메틸-벤젠(1-3)의 제조를 위한 일반 절차



[0596]

[0597] 아세트니트릴(700 mL) 중 p-TsOH(90 g, 522.2 mmol, 3당량)의 용액에 화합물 1-2(49.25 g, 174.07 mmol, 1당량)를 첨가하였다. 생성된 백색 현탁액을 10 내지 15°C로 냉각시킨 다음, 물(105 mL) 중 NaNO₂(24.02 g, 348.14 mmol, 2당량) 및 KI(73.22 g, 435.13 mmol, 2.5당량)의 용액을 점진적으로 첨가하였다. 현탁액은 짙은 갈색이 되었고, 가스가 방출되었다. 백백한 혼합물을 10분 동안 10°C에서 교반한 다음, 20°C에서 1시간 동안 추가로 교반하였다. TLC(석유 에테르/아세트산 에틸 = 6/1, R_f = 0.6)는 출발 물질이 소모되었음을 보여주었다. 반응 혼합물에 물(400 mL)에 부었다. 1 N 탄산수소나트륨 용액(200 mL)을 첨가하여 pH를 9 내지 10으로 조절한 다음, 2 N 티오황산나트륨 용액(200 mL)을 첨가하였다. 수득된 혼합물을 아세트산 에틸(3 x 500 mL)로 추출하였다. 11개의 추가 바이알을 전술한 바와 같이 설정하였다. 12개 반응물 유래의 합쳐진 유기층을 합치고, Na₂SO₄ 상에서 건조시키고, 감압 하에 농축시켰다. 수득된 잔류물을 실리카 겔 크로마토그래피로 정제하고 석유 에테르로 용리시켜 생성물 1-3을 황색 고형분으로서 수득하였다(504 g, 1.09 mol, 수율 56%, 순도 85%). ¹H NMR (400MHz, 클로로포름-d) δ 7.41 (d, J=8.8 Hz, 1H), 2.43 (d, J=2.4 Hz, 3H).

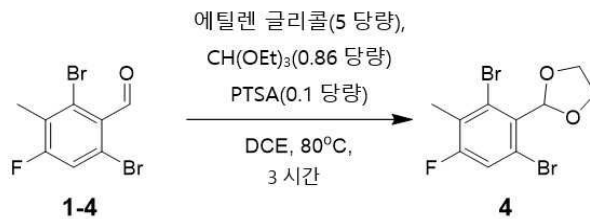
[0598] 2,6-디브로모-4-플루오로-3-메틸-벤즈알데히드(1-4)의 제조를 위한 일반 절차



[0599]

[0600] 무수 톨루엔(300 mL) 중 화합물 1-3(50.4 g, 127.98 mmol, 1당량)의 용액에, 내부 온도를 -25°C 미만으로 유지하면서 10분에 걸쳐 클로로(이소프로필)마그네슘(테트라하이드로푸란 중 2 M, 76.80 mL, 1.2당량)의 용액을 첨가하였다. 투명한 갈색 용액을 수득하고, 혼합물을 1.5시간 동안 교반한 다음, N,N-디메틸포름아미드(30.86 g, 422.33 mmol, 3.3당량)를 10분 동안 첨가하였다. 반응 혼합물의 온도는 첨가 후 -19°C까지 증가하였다. 반응 혼합물을 0.5시간에 걸쳐 20°C로 가온시키고 1.5시간 동안 교반하였다. TLC(석유 에테르/아세트산 에틸=10/1, R_f=0.45)는 반응이 완료되었음을 보여주었다. 반응 혼합물을 포화 수성 NH₄Cl(50 mL)로 퀀칭시켰다. 10개의 추가 바이알을 전술한 바와 같이 설정하고, 모두 11개의 반응 혼합물을 합쳤다. 합쳐진 혼합물을 여과하고, 여액을 감압 하에 증발시켜 잔류물을 수득하였다. 잔류물을 실리카-겔 컬럼 크로마토그래피로 정제하고 석유 에테르로 용리시켜 생성물 1-4를 황색 고형분으로서 수득하였다(253 g, 812.18 mmol, 60% 수율, 순도 95%). ¹H NMR (400MHz, 클로로포름-d) δ 10.22 (s, 1H), 7.40 (d, J=8.6 Hz, 1H), 2.37 (d, J=2.4 Hz, 3H).

[0601] 2-(2,6-디브로모-4-플루오로-3-메틸-페닐)-1,3-디옥솔란(4)의 제조를 위한 일반 절차.



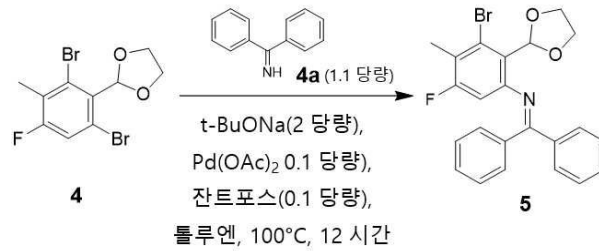
[0602]

[0603] 1,2-디클로로에탄(430 mL) 중 화합물 1-4(50.6 g, 170.99 mmol, 1당량)의 용액에 에틸렌 글리콜(53.06 g, 878.58 mmol, 47.80 mL, 5당량), 트리에틸 오르토포르메이트(25.34 g, 170.99 mmol, 28.44 mL, 1당량), 및 p-톨루엔 설펡산(1.47 g, 8.55 mmol, 0.05당량)을 첨가하였다. 반응 혼합물을 80°C에서 3시간 동안 교반하였으며, TLC(석유 에테르/아세트산 에틸 = 10/1, R_f = 0.59)는 반응이 완료되었음을 보여주었다. 4개의 추가 바이알을

전술한 바와 같이 설정하고, 5개의 반응의 반응 혼합물을 합쳤다.

[0604] 합쳐진 반응 혼합물을 포화 수성 Na₂CO₃(1 L), 포화 수성 NH₄Cl(1 L), 및 물(1 L)로 연속 세척하였다. 유기층을 Na₂SO₄ 상에서 건조시키고, 여과하고, 감압 하에 증발시켜 미정제 생성물을 수득하였다. 미정제 생성물을 20℃에서 15분 동안 석유 에테르와 함께 분쇄하고 여과하여 생성물 **4**를 연황색 고형분으로서 수득하였다(280 g, 741.21 mmol, 수율 84%, 순도 90%). ¹H NMR (400MHz, 클로로포름-d) δ 7.34 (d, J=8.6 Hz, 1H), 6.44 (s, 1H), 4.37 - 4.31 (m, 2H), 4.11 - 4.06 (m, 2H), 2.34 (d, J=2.4 Hz, 3H).

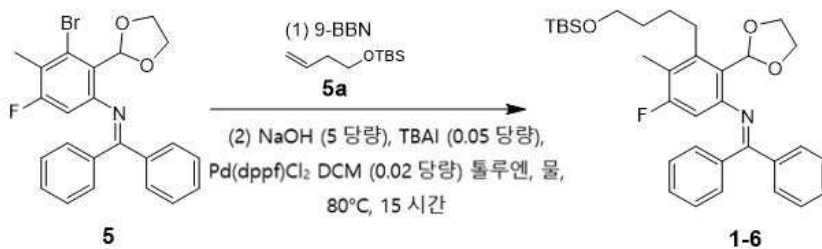
[0605] N-[3-브로모-2-(1,3-디옥솔란-2-일)-5-플루오로-4-메틸-페닐]-1,1-디페닐-메타니민(**5**)의 제조를 위한 일반 절차



[0606]

[0607] 톨루엔(100 mL) 중 화합물 **4**(53 g, 155.89 mmol, 1당량)의 용액에 화합물 **4a**(29.67 g, 163.69 mmol, 27.46 mL, 1.05당량), 터트-부톡시드 나트륨(29.97 g, 311.78 mmol, 2당량), 아세트이트 팔라듐(II)(3.5 g, 15.59 mmol, 0.1당량), 및 4,5-비스(디페닐포스포노)-9,9-디메틸크산틴(9.02 g, 15.59 mmol, 0.1당량)을 N₂ 보호 하에 첨가하였다. 반응 혼합물을 N₂ 보호 하에 100℃에서 12시간 동안 교반하였고, TLC(석유 에테르/아세트산 에틸 = 10/1, R_f = 0.32)는 반응이 완료되었음을 보여주었다. 2개의 추가 바이알을 전술한 바와 같이 설정하고, 모두 3개의 반응 혼합물을 합치고, 셀라이트 패드를 통해 여과하였다. 필터 케이크를 아세트산 에틸(500 mL)로 세척하였다. 합쳐진 여액을 감압 하에 농축시켜 잔류물을 수득하였다. 잔류물을 컬럼 크로마토그래피로 정제하고 석유 에테르/아세트산 에틸=10/1로 용리시켜 생성물 **5**를 황색 고형분으로서 수득하였다(105 g, 214.62 mmol, 수율 45.61%, 순도 80%). 생성물은 추가 정제 없이 다음 단계에서 사용하였다. ¹H NMR (400MHz, 클로로포름-d) δ 7.77 (br d, J=7.3 Hz, 2H), 7.54 - 7.37 (m, 4H), 7.31 (br d, J=4.5 Hz, 3H), 7.26 - 7.22 (m, 1H), 6.48 (s, 1H), 5.93 (d, J=10.3 Hz, 1H), 4.11 - 4.05 (m, 2H), 3.96 - 3.91 (m, 2H), 2.23 (d, J=2.3 Hz, 3H).

[0608] N-[3-[4-[터트-부틸(디메틸)실릴]옥시부틸]-2-(1,3-디옥솔란-2-일)-5-플루오로-4-메틸-페닐]-1,1-디페닐-메타니민(**1-6**)의 제조를 위한 일반 절차

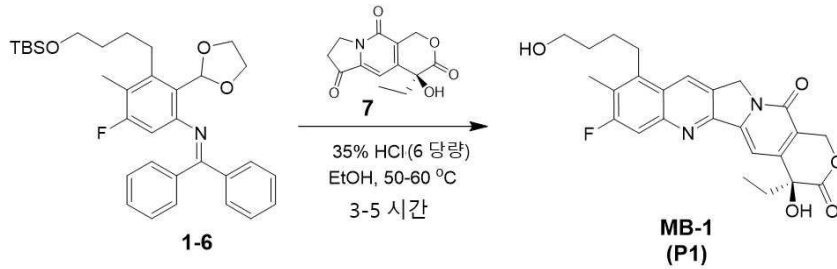


[0609]

[0610] 톨루엔(80 mL) 중 화합물 **5a**(5.3 g, 28.44 mmol, 1당량)의 교반 혼합물에 9-BBN(테트라하이드로푸란 중 0.5 M, 68.13 mL, 1.2당량)을 질소 분위기 하에 10℃에서 첨가하였다. 생성된 혼합물을 질소 보호 하에 80℃에서 20분 동안 교반하였으며, TLC(석유 에테르/아세트산 에틸=1/1, 생성물 R_f = 0.2, I₂)는 반응이 완료되었음을 보여주었다. 물(20 mL) 중 NaOH(2.27 g, 56.78 mmol, 2당량)의 용액을 질소 분위기 하에 10℃에서 위의 혼합물에 첨가하였다. 생성된 혼합물을 10℃에서 10분 동안 교반한 다음, 화합물 **5**(10.00 g, 22.71 mmol, 0.8당량), 테트라부틸암모늄 요오드화물(524.31 mg, 1.42 mmol, 0.05당량) 및 [1,1-비스(디페닐-포스포노)페로센]팔라듐(II) 디클로라이드 디클로로메탄 부가물(463.7 mg, 568.8 μmol, 0.02당량)을 질소 분위기 하 10℃에서 첨가하였다. 생성된 혼합물을 질소 분위기 하에 80℃에서 15시간 동안 교반하였으며, LCMS(유지 시간 = 3.620)는 반응이 완료되었음을 나타냈다. 7개의 추가 바이알을 전술한 바와 같이 설정하고, 모두 8개의 반응 혼합물을 합쳤다. 합쳐진 반응 혼합물을 물(500 mL x 3)로 세척하고, Na₂SO₄로 건조시키고, 여과하고, 감압하에 농축시켰다. 수득된 잔

류물을 컬럼 크로마토그래피(SiO₂, 석유 에테르/아세트산 에틸 = 10/1 내지 5/1)로 정제하여 미정제 생성물을
수득하고, 이를 역상 HPLC로 추가로 정제하여 생성물 **1-6**을 황색 검으로서 수득하였다(45 g, 82.15 mmol, 50%
수율, 순도 80%). ¹H NMR (400MHz, DMSO-d₆) δ 7.72 - 7.61 (m, 2H), 7.59 - 7.51 (m, 1H), 7.50 - 7.42 (m,
2H), 7.37 - 7.22 (m, 4H), 7.19 (br d, J=3.5 Hz, 1H), 6.03 (s, 1H), 5.89 (s, 1H), 4.07 - 3.99 (m, 2H),
3.93 - 3.78 (m, 2H), 3.65 - 3.56 (m, 2H), 2.75 - 2.64 (m, 2H), 2.01 (s, 2H), 1.64 (s, 1H), 1.59 - 1.44
(m, 4H), 0.87 (s, 9H), 0.03 (s, 6H).

[0611] (19S)-19-에틸-6-플루오로-19-하이드록시-8-(4-하이드록시부틸)-7-메틸-17-옥사-3,13-디아자펜타시클로[11.8.0.
0^{2,11}.0^{4,9}.0^{15,20}]헥시코사-1(21),2,4,6,8,10,15(20)-헵타엔-14,18-디온(**MB-1**, **하이드로데칸**, 海洛替康)의 제조를
위한 일반 절차

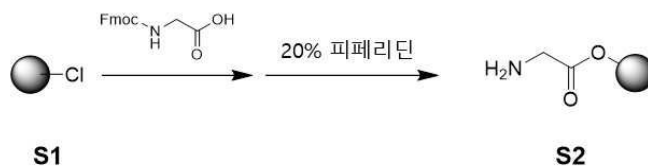


[0612]

[0613] 에탄올(100 mL) 중 화합물 **7**(2.4 g, 1당량)의 용액에 35% HCl(5.7 g, 6당량)을 첨가하고, 용액을 50 내지 60℃
로 가열한 다음, 에탄올(100 mL) 중 화합물 **1-6**(10 g, 2당량)을 2시간 동안 적가하였다. 이를 50 내지 60℃에서
1.5시간 동안 계속 교반하였다. 가열조를 제거하고, 반응 혼합물을 실온으로 냉각시켰다. 메틸-tert-부틸 에테
르(2000 mL)를 첨가하여 생성물을 침전시켰다. 이를 여과하고 메틸-삼차-부틸 에테르로 고형분을 세척하여 생성
물 **MB-1**(하이드로데칸, 海洛替康)을 황색 고형분으로서 수득하였다(2.45g, 59% 수율 및 98% 순도). ¹H NMR
(400MHz, DMSO-d₆) δ 8.89 (s, 1H), 7.77 (d, J=11.0 Hz, 1H), 7.31 (s, 1H), 6.54 (br s, 1H), 5.53 - 5.33
(m, 2H), 5.26 (s, 2H), 4.80 - 4.06 (m, 1H), 3.49 (br t, J=5.9 Hz, 2H), 3.19 - 3.11 (m, 2H), 2.43 (d,
J=1.8 Hz, 3H), 1.86 (tt, J=7.2, 14.5 Hz, 2H), 1.62 (br s, 4H), 0.88 (t, J=7.3 Hz, 3H).

[0614] 실시예 2. 화합물 **MB-2(PL1)**의 예시적인 합성

[0615] C₁₇H₁₄NO₄(**S2**)의 제조를 위한 일반 절차.



[0616]

[0617] 디클로로메탄(1500 mL) 중 2-(9H-플루오렌-9-일메톡시카르보닐아미노)아세트산(74.92 g, 252.10 mmol, 2당량),
Trt-수지 **S1**(120.00 g, 126.05 mmol, 1당량), 및 N,N-디이소프로필에틸아민(162.85 g, 1.26 mol, 219.47 mL,
10당량)으로 충전된 컬럼을 20℃에서 질소로 12시간 동안 버블링하였다. 여과 후, 잔류물을 디클로로메탄(3 x
300 mL), 디메틸 포름아미드 디클로로메탄/메탄올 = 1/1(3 x 300 mL), 및 디메틸 포름아미드(3 x 300 mL)로 연
속 세척하였다. 잔류물을 고진공에서 추가로 건조시켜 미정제 수지-C₁₇H₁₄NO₄를 황색 고형분으로서 수득하였다
(150 g, 123.66 mmol, 98.10% 수율, 미정제 순도). 생성물은 정제 없이 다음 단계에서 직접 사용하였다.
DMF(1200 mL) 중 수지-C₁₇H₁₄NO₄(150 g, 123.66 mmol, 1당량)로 충전된 컬럼에 피페리딘(105.30 g, 1.24 mol,
122.13 mL, 10당량)을 첨가하였다. 혼합물을 20℃에서 N₂로 1시간 동안 버블링하였다. 생성된 수지를 여과하고,
이어서 디메틸 포름아미드(2 x 500 mL) 및 디클로로메탄(2 x 500 mL)으로 세척하였다. 수지를 건조시켜 수지-
C₂H₄NO₂(**S2**)를 황색 고형분으로서 수득하고(120 g, 121.21 mmol, 98.02% 수율), 다음 단계에서 직접 사용하였다.

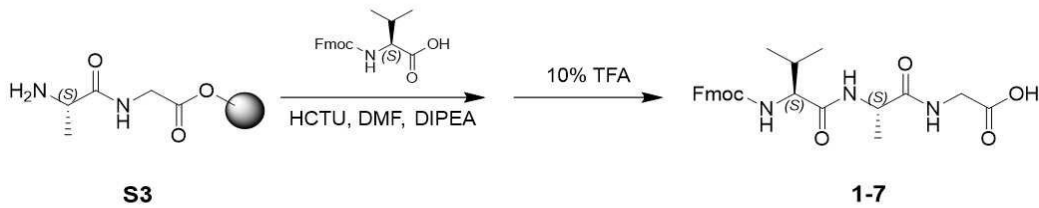
[0618] 수지-C₅H₉N₂O₃(S3)의 제조를 위한 일반 절차



[0619]

[0620] 디메틸 포름아미드(1200 mL) 중 (2S)-2-(9H-플루오렌-9-일메톡시카르보닐아미노)프로판산(75.47 g, 242.42 mmol, 2당량) 및 수지-C₂H₄NO₂(S2)(120 g, 121.21 mmol, 1당량)으로 충전된 컬럼에 HCTU (O-(6-클로로-1-하이드로시벤조트리아졸-1-일)-1,1,3,3-테트라메틸우로늄헥사플루오로포스페이트)(100.29 g, 242.42 mmol, 2당량) 및 N,N-디이소프로필에틸아민(78.33 g, 606.06 mmol, 105.56 mL, 5당량)을 첨가하였다. 혼합물을 20℃에서 N₂로 1시간 동안 버블링하였다. 생성된 수지를 여과하고, 디메틸 포름아미드(2 x 500 mL) 및 디클로로메탄(2 x 500 mL)으로 연속 세척하였다. 이를 건조시켜 수지-C₂₀H₁₉N₂O₅를 황색 고형분으로서 수득하고(150 g, 미정제), 이를 다음 단계에서 직접 사용하였다. 디메틸포름아미드(1200 mL) 중 수지-C₂₀H₁₉N₂O₅(150 g, 116.91 mmol, 1당량)로 충전된 컬럼에 피페리딘(99.55 g, 1.17 mol, 115.46 mL, 10당량)을 첨가하였다. 혼합물을 20℃에서 N₂로 1시간 동안 버블링하였다. 생성된 수지를 여과하고, 디메틸 포름아미드(2 x 500 mL) 및 디클로로메탄(2 x 500 mL)으로 연속 세척하였다. 이를 건조시켜 수지 C₅H₉N₂O₃(S3)을 황색 고형분으로서 수득하고(120 g, 미정제), 이를 다음 단계에서 직접 사용하였다.

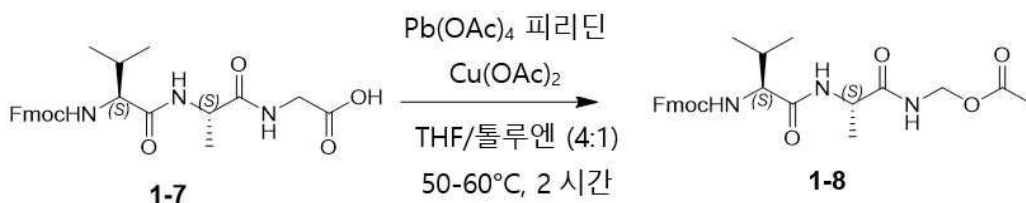
[0621] 2-[[[(2S)-2-[[[(2S)-2-(9H-플루오렌-9-일메톡시-카르보닐아미노)-3-메틸-부타노일]아미노]프로판오일]아미노]아세트산(1-7)의 제조를 위한 일반 절차



[0622]

[0623] 디메틸 포름아미드(200 mL) 중 수지 C₅H₉N₂O₃(S3)(120 g, 112.99 mmol, 1당량) 및 (2S)-2-(9H-플루오렌-9-일메톡시카르보닐아미노)-3-메틸-부탄산(76.70 g, 225.99 mmol, 2당량)으로 충전된 컬럼에 O-(6-클로로-1-하이드로시벤조트리아졸-1-일)-1,1,3,3-테트라메틸우로늄헥사플루오로포스페이트(93.49 g, 225.99 mmol, 2당량) 및 N,N-디이소프로필-에틸아민(73.02 g, 564.97 mmol, 98.41 mL, 5당량)을 첨가하였다. 혼합물을 20℃에서 N₂로 12시간 동안 버블링하였다. 생성된 수지를 여과하고, 디메틸 포름아미드(2 x 500 mL) 및 디클로로메탄(2 x 500 mL)으로 연속 세척하였다. 트리플루오로아세트산/디클로로메탄(10%, 3 x 500 mL)으로 수지를 킁칭시켰다. 유기층을 합치고, 감압 하에 농축시켜 잔류물을 수득하였다. 잔류물을 20℃에서 n-헥산과 함께 12시간 동안 분쇄하였다. 이를 여과하여 생성물 1-7을 백색 고형분으로서 수득하였다(60 g, 39.05 mmol, 수율 34.56%, 순도 90%). ¹H NMR (400MHz, DMSO-d₆) δ 8.17 (br t, J=5.7 Hz, 1H), 7.99 (d, J=7.5 Hz, 1H), 7.89 (d, J=7.3 Hz, 2H), 7.74 (t, J=6.6 Hz, 2H), 7.45 - 7.38 (m, 3H), 7.37 - 7.29 (m, 2H), 4.39 - 4.19 (m, 4H), 3.93 - 3.66 (m, 3H), 2.03 - 1.92 (m, 1H), 1.22 (d, J=7.1 Hz, 3H), 0.85 (dd, J=6.9, 9.8 Hz, 6H).

[0624] [[[(2S)-2-[[[(2S)-2-(9H-플루오렌-9-일메톡시카르보닐 아미노)-3-메틸-부탄오일]아미노]프로판오일]아미노]메틸아세테이트(1-8)의 제조를 위한 일반 절차.

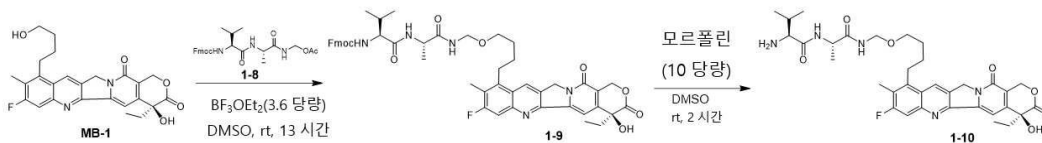


[0625]

[0626] THF(1000 mL) 및 톨루엔(250 mL) 중 화합물 **1-7**(90.0 g), 피리딘(30.6 g, 2당량), 아세테이트 납(IV)(189 g, 2당량), 및 Cu(OAc)₂(3.6 g, 0.1당량)의 용액을 50 내지 60°C에서 2시간 동안 교반하였다. 반응 혼합물을 실온으로 냉각시키고 여과하여 불용성 염을 제거하였다. 여과물을 THF/MTBE(1:4)로 희석하여 원하는 생성물을 침전시켰다. 이를 여과하고, 고형분을 THF/MTBE(1:4)로 세척하여 생성물 **1-8**을 연황색 고형분(84.2 g, 수율 = 90.8%, 순도 91.9%)으로 수득하였다. ¹H NMR (400MHz, DMSO-d₆) δ 8.03 - 7.93 (m, 1H), 7.89 (d, J=7.5 Hz, 2H), 7.74 (br t, J=6.3 Hz, 2H), 7.47 - 7.36 (m, 3H), 7.36 - 7.28 (m, 2H), 5.16 - 5.02 (m, 1H), 4.39 - 4.26 (m, 2H), 4.22 (br d, J=3.9 Hz, 2H), 3.93 - 3.82 (m, 1H), 1.98 (s, 2H), 1.78 (s, 1H), 1.27 - 1.13 (m, 3H), 0.92 - 0.75 (m, 6H).

[0627] (2S)-2-아미노-N-[(1S)-2-[4-[(19S)-19-에틸-6-플루오로-19-하이드록시-7-메틸-14,18-디옥소-17-옥사-3,13-디아자헨타시클로[11.8.0.0^{2,11}.0^{4,9}.0^{15,20}]헨니코사-1(21),2,4,6,8,10,15(20)-헵타엔-8-일]부톡시메틸아미노]-1-메틸-2-옥소-에틸]-3-메틸-부탄아미드(**1-10**)의 제조를 위한 일반 절차

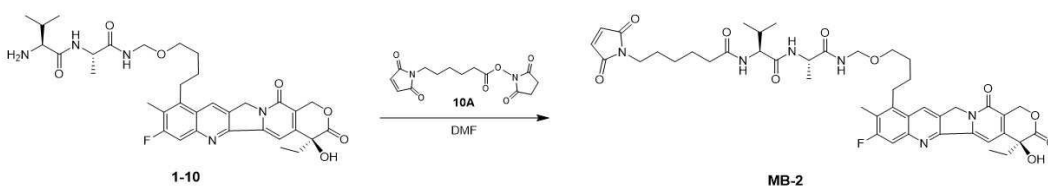
[0628]



[0629] 무수 DMSO(90 mL) 중 **MB-1**(하이드로테칸)(10.7 g, 0.0236 mol) 및 화합물 **1-8**(14.7 g, 0.0306 mol, 1.3당량)의 교반 용액에 BF₃ 에테르(12.1 g, 0.0852 mol, 3.6당량)를 실온에서 첨가하였다. 반응 용액을 실온에서 13시간 동안 계속 교반하였다. 반응 샘플의 LCMS는 약 75%의 생성물 **1-9**가 형성되었고 출발 물질 **MB-1**의 6%가 남아있음을 보여주었다. 모르폴린(20.5 g, 0.236 mol)을 반응 용액에 첨가하고, 반응 용액을 실온에서 2시간 동안 계속 교반하였다. 이를 분취 HPLC(C18 컬럼, 이동상 CH₃CN/H₂O)로 직접 정제하여 동결건조 후 생성물 **1-10**을 희백색 고형분으로서 수득하였다(9.1 g, 수율 = 59%, 순도 96.1%). ¹H NMR (400MHz, DMSO-d₆) δ 8.87 (s, 1H), 8.68 (br s, 1H), 8.09 (br s, 1H), 7.77 (br d, J=10.6 Hz, 1H), 7.32 (s, 1H), 6.51 (s, 1H), 5.43 (s, 2H), 5.29 (br s, 2H), 4.55 (br s, 2H), 4.28 (br s, 1H), 3.46 (br s, 1H), 3.45 - 3.42 (m, 1H), 3.14 (br s, 2H), 3.02 (br s, 1H), 2.43 (br s, 3H), 1.88 (br dd, J=7.9, 14.8 Hz, 3H), 1.70 (br s, 2H), 1.58 (br s, 2H), 1.19 (br d, J=6.8 Hz, 3H), 0.88 (br t, J=7.2 Hz, 3H), 0.82 (br d, J=6.6 Hz, 3H), 0.73 (br d, J=6.6 Hz, 3H).

[0630] 6-(2,5-디옥소피롤-1-일)-N-[(1S)-1-[(1S)-2-[4-[(19S)-19-에틸-6-플루오로-19-하이드록시-7-메틸-14,18-디옥소-17-옥사-3,13-디아자헨타시클로[11.8.0.0^{2,11}.0^{4,9}.0^{15,20}]헨니코사-1(21),2,4,6,8,10,15(20)-헵타엔-8-일]부톡시메틸아미노]-1-메틸-2-옥소-에틸]카바모일]-2-메틸-프로필]핵산아미드(**MB-2**)의 제조를 위한 일반 절차

[0631]



[0632] N,N-디메틸포름아미드(10 mL) 중 화합물 **1-10**(400 mg, 613.8 μmol, 1당량)의 용액에 화합물 **10A**(283.8 mg, 920.6 μmol, 1.5당량)를 첨가하였다. 반응 혼합물을 15°C에서 12시간 동안 교반하였다. LCMS(생성물의 유지 시간 = 2.080)는 화합물 **1-10**이 모두 소모되었고 원하는 MS를 갖는 새로운 피크가 검출되었음을 보여주었다. 반응 혼합물을 여과하고, 아세트니트릴과 탈이온수를 이동상으로 사용하여 분취-HPLC에 의해 여액을 정제하여 생성물 **MB-2**를 백색 고형분으로서 수득하였다(173 mg, 203.9 μmol, 수율 33.36%, 순도 95.74%). ¹H NMR (400MHz, DMSO-d₆) δ 8.87 (s, 1H), 8.57 (t, J=6.4 Hz, 1H), 7.97 (d, J=7.2 Hz, 1H), 7.81 - 7.71 (m, 2H), 7.32 (s, 1H), 6.99 (s, 2H), 6.52 (s, 1H), 5.43 (s, 1H), 5.49 - 5.37 (m, 1H), 5.30 (s, 2H), 4.54 (dq, J=6.6, 10.1 Hz, 2H), 4.21 (quin, J=7.1 Hz, 1H), 4.10 (dd, J=6.8, 8.4 Hz, 1H), 3.48 - 3.41 (m, 2H), 3.37 - 3.34 (m, 2H), 3.20 - 3.08 (m, 2H), 2.43 (d, J=2.0 Hz, 3H), 2.18 - 2.01 (m, 2H), 1.95 - 1.79 (m, 3H), 1.68 (br d, J=7.0 Hz, 2H), 1.58 (br s, 2H), 1.51 - 1.38 (m, 4H), 1.20 - 1.10 (m, 5H), 0.88 (t, J=7.3

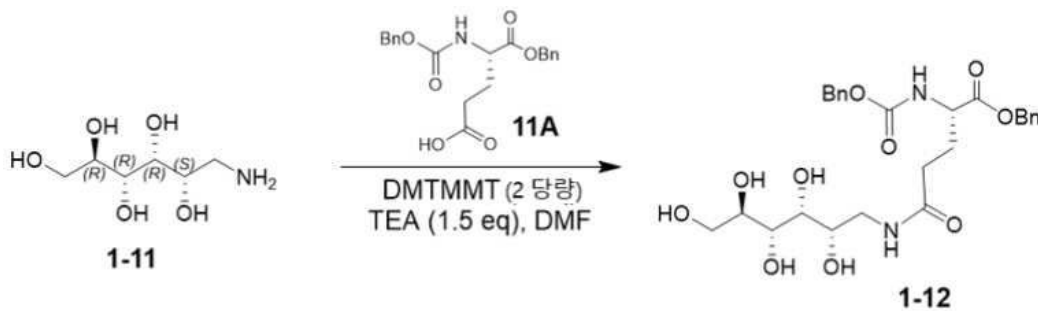
Hz, 3H), 0.76 (dd, J=6.8, 9.3 Hz, 6H). ¹³C NMR (101MHz, DMSO-d₆) δ 173.09, 172.54, 172.26, 171.09, 170.85, 160.54, 156.86, 152.36, 150.00, 147.85, 145.38, 140.13, 134.46, 129.33, 128.33, 125.02, 124.04, 119.05, 110.14, 96.73, 72.40, 69.18, 66.72, 65.27 (br s, 1C), 57.44, 50.49 (br s, 1C), 48.29, 37.02, 34.88, 30.31 (br s, 1C), 29.00, 27.78, 27.62 (br s, 1C), 26.73 (br s, 1C), 25.78, 24.89, 19.18, 18.03 (br d, J=5.8 Hz, 1C), 11.46, 7.80. HRMS (ESI-TOF) m/z: [M + H]⁺ 계산된 값 845.39; 확인된 값 845.3859.

[0633] 분취-HPLC 방법:

[0634] Gilson 281 반-분취 HPLC 시스템 및 Phenomenex Gemini C18 컬럼(75 x 40 mm x 3 um); 이동상: 아세토니트릴 및 물; 유속: 25 mL/분; 모니터 파장: 220&254 nm. 구배: 8분 동안 30%에서 50%로 아세토니트릴 증가, 0.2분 동안 50%에서 100%로 아세토니트릴 증가, 2분 동안 100% 아세토니트릴 유지, 0.1분 동안 100%에서 30%로 아세토니트릴 감소, 1.2분 동안 30% 아세토니트릴 유지.

[0635] 실시예 3. MB-3(메디테칸, 美迪替康)(PL3)의 예시적인 합성

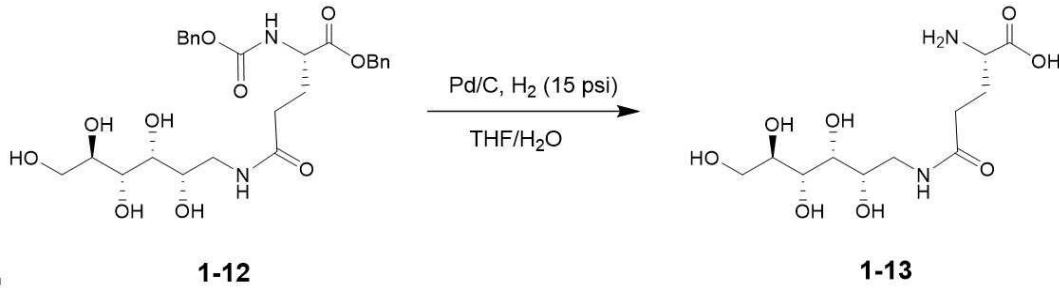
[0636] 벤질(2S)-2-(벤질옥시카르보닐아미노)-5-옥소-5-[[[(2S,3R,4R,5R)-2,3,4,5,6-펜타하이드록시헥실]아미노]펜타노에이트(1-12)의 제조를 위한 일반 절차.



[0637]

[0638] N,N-디메틸포름아미드(27 mL) 중 화합물 11A(6.03 g, 16.27 mmol, 1.1당량)의 용액에 4-(4,6-디메톡시-1,3,5-트리아진-2-일)-4-메틸모르폴리늄 테트라플루오로보레이트(DMTMMT)(9.7 g, 29.59 mmol, 2당량) 및 트리 에틸아민(2.24 g, 22.19 mmol, 1.5당량)을 연속 첨가하였다. 25℃에서 0.5시간 동안 교반한 후, 화합물 1-11(2.68 g, 14.79 mmol, 1당량)을 첨가하고, 반응 혼합물을 25℃에서 12시간 동안 교반하였다. LCMS(생성물의 유지 시간 = 0.253)는 출발 물질이 소모되었고 원하는 MS를 갖는 새로운 피크가 검출되었음을 보여주었다. 반응 혼합물을 물(50 mL)로 희석시키고, 디클로로메탄(6 x 50 mL)으로 추출하였다. 합쳐진 유기층을 염수(3 x 130 mL)로 세척하고, Na₂SO₄로 건조시키고, 여과하였다. 여액을 감압 하에 농축시키고, 잔류물을 고진공으로 처리하여 오일을 수득하였다. 오일을 역상 HPLC(3 kg Agela C18 컬럼, CH₃CN/H₂O, 300 mL/분, 구배: 10분 동안 30% CH₃CN, 30분 동안 30%에서 45%로 CH₃CN 증가, 35분 동안 45% CH₃CN 유지; 약 15 그램의 미정제 생성물을 70 mL의 DMF에 용해시켜 컬럼에 로딩함)로 정제하여 생성물 1-12를 백색 고형분으로서 수득하였다(4 g, 6.74 mmol, 수율 46.1%, 순도 99%). ¹H NMR (400 MHz, DMSO-d₆) δ 1.72 - 1.85 (m, 1 H) 1.91 - 2.03 (m, 1 H) 2.18 (br t, J=7.44 Hz, 2 H) 2.96 - 3.03 (m, 1 H) 3.24 (dt, J=13.16, 5.17 Hz, 2 H) 3.37 - 3.40 (m, 2 H) 3.44 (br s, 2 H) 4.04 - 4.11 (m, 1 H) 4.29 (d, J=6.38 Hz, 1 H) 4.39 - 4.45 (m, 2 H) 4.51 (d, J=5.63 Hz, 1 H) 4.75 (d, J=4.63 Hz, 1 H) 4.96 - 5.14 (m, 4 H) 7.19 - 7.46 (m, 10 H) 7.68 - 7.85 (m, 2 H).

[0639] (2S)-2-아미노-5-옥소-5-[[[(2S,3R,4R,5R)-2,3,4,5,6-펜타하이드록시헥실]아미노]펜탄산(1-13)의 제조를 위한 일반 절차.



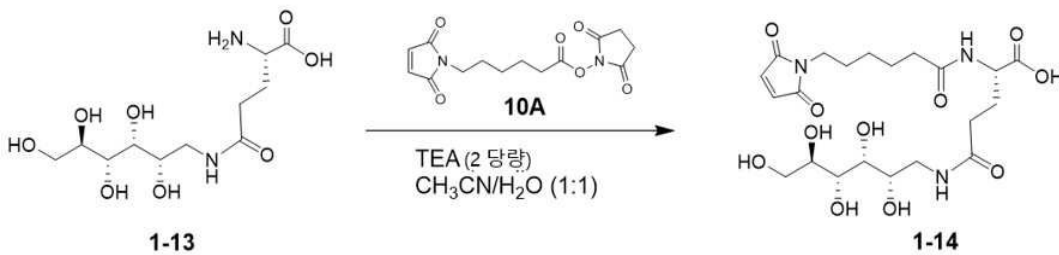
[0640]

[0641]

물(192 mL) 및 테트라하이드로푸란(48 mL) 중 화합물 **1-12**(4 g, 7.48 mmol, 1당량)의 용액에 Pd/C(15.86 g, 14.96 mmol, 10 wt%, 2당량)를 첨가하였다. 혼합물을 H₂ (15 psi) 하에 25℃에서 12시간 동안 교반하였다. LCMS(생성물의 유지 시간 = 0.137)는 출발 물질이 소모되었고 원하는 생성물이 검출되었음을 보여주었다. 혼합물을 셀라이트 패드를 통해 여과하고, 여액을 농축시켜 생성물 **1-13**을 백색 고형분으로서 수득하였다(2 g, 6.26 mmol, 수율 83.6%, 순도 97.1%). ¹H NMR (400MHz, 중수) δ 3.84 (dt, J=7.76, 4.74 Hz, 1 H) 3.70 - 3.80 (m, 4 H) 3.58 - 3.64 (m, 2 H) 3.41 (dd, J=14.06, 4.03 Hz, 1 H) 3.25 (dd, J=14.06, 7.83 Hz, 1 H) 2.41 (br s, 2 H) 2.10 (br s, 2 H).

[0642]

(2S)-2-[6-(2,5-디옥소피롤-1-일)헥산오일아미노]-5-옥소-5-[[[(2S,3R,4R,5R)-2,3,4,5,6-펜타하이드록시헥실]아미노]펜탄산(**1-13**)]의 제조를 위한 일반 절차.



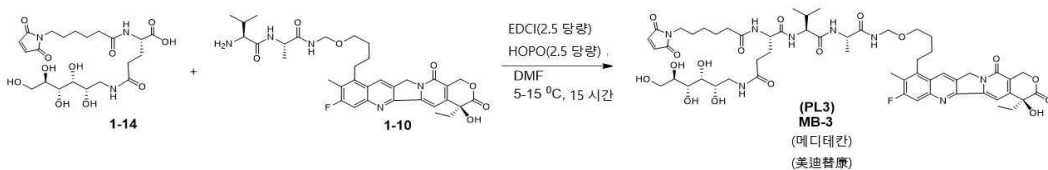
[0643]

[0644]

아세트니트릴(100 mL) 및 물(100 mL) 중 화합물 **1-13**(함유수 및 0.0361 mol 또는 11.2 g의 **1-13**) 및 **10A**(11.13 g, 0.0361 mol)의 교반 용액에 TEA(7.3 g, 0.0722 mol)를 10 내지 20℃에서 첨가하였다. 반응 용액을 10 내지 20℃에서 18시간 동안 계속 교반하였다. 이를 분취 HPLC(C18 컬럼, 이동상: CH₃CN 및 물)로 정제하여 동결건조 후 생성물 **1-14**를 연적색 고형분으로서 수득하였다(9.7 g, 수율 = 53%, 순도 95.7%). ¹H NMR (400MHz, 중수) δ 6.78 (s, 1 H) 4.30 (dd, J=9.11, 5.07 Hz, 1 H) 3.83 (dt, J=7.89, 4.74 Hz, 1 H) 3.79 - 3.74 (m, 1 H) 3.74 - 3.68 (m, 2 H) 3.65 - 3.57 (m, 2 H) 3.46 (t, J=6.91 Hz, 2 H) 3.40 (dd, J=14.06, 4.16 Hz, 1 H) 3.23 (dd, J=14.00, 7.89 Hz, 1 H) 2.39 - 2.30 (m, 2 H) 2.24 (t, J=7.27 Hz, 2 H) 2.20 - 2.08 (m, 1 H) 2.04 - 1.89 (m, 1 H) 1.55 (dquin, J=14.04, 7.19, 7.19, 7.19, 7.19 Hz, 4 H) 1.28 - 1.17 (m, 2 H).

[0645]

(2S)-2-[6-(2,5-디옥소피롤-1-일)헥산오일아미노]-N-[(1S)-1-[[[(1S)-2-[4-[(19S)-19-에틸-6-플루오로-19-하이 드록시-7-메틸-14,18-디옥소-17-옥사-3,13-디아자펜타시클로[11.8.0.0^{2,11}.0^{4,9}.0^{15,20}]]헨니코사-1(21),2,4,6,8,10,15(20)-헵타엔-8-일]부톡시메틸아미노]-1-메틸-2-옥소-에틸]카바모일]-2-메틸-프로필]-N'-[[[(2S,3R,4R,5R)-2,3,4,5,6-펜타하이드록시헥실]펜탄디아미드(**MB-3**, 메디테칸, 美迪替康)]의 제조를 위한 일반 절차



[0646]

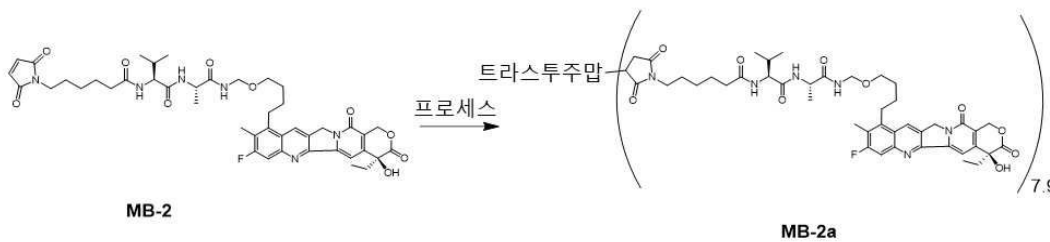
[0647]

무수 DMF(400 mL) 중 화합물 **1-10**(15 g, 순도: 90.1%, 0.0207 mol) 및 화합물 **1-14**(8.7 g, 0.0173 mol)의 교반 용액에, EDCI(8.04 g, 0.0518 mol) 및 HOPO(5.75 g, 0.0518 mol)의 혼합물을 5 내지 15℃에서 첨가하였다. 이를 5 내지 15℃에서 13.5시간 동안 계속 교반하고, 분취 HPLC(C18 컬럼, 이동상: CH₃CN/H₂O)로 정제하여 생성물

MB-3(메디테칸, 美迪替康)을 회백색 고형분으로서 수득하였다(7.1 g, 수율 = 30.2%, 순도 98.8%). ¹H NMR (400MHz, DMSO-d₆) δ 8.87 (s, 1H), 8.60 (br s, 1H), 8.08 (br d, J=6.2 Hz, 1H), 8.00 (br d, J=7.7 Hz, 1H), 7.77 (br d, J=11.5 Hz, 1H), 7.72 (br s, 1H), 7.63 (br d, J=9.3 Hz, 1H), 7.32 (s, 1H), 6.99 (s, 2H), 6.53 (s, 1H), 5.43 (br s, 2H), 5.29 (br s, 2H), 4.74 (br s, 1H), 4.57 (br s, 1H), 4.52 (br d, J=6.6 Hz, 1H), 4.47 (br d, J=5.5 Hz, 1H), 4.38 (br d, J=5.1 Hz, 1H), 4.33 (br s, 1H), 4.26 (br d, J=6.4 Hz, 1H), 4.23 (br d, J=6.6 Hz, 2H), 4.13 (br s, 1H), 3.55 (br d, J=4.4 Hz, 3H), 3.45 (br s, 7H), 3.14 (br s, 3H), 3.00 (br s, 1H), 2.42 (br s, 3H), 2.08 (br d, J=5.7 Hz, 4H), 1.96 - 1.78 (m, 1H), 1.96 - 1.78 (m, 4H), 1.69 (br s, 3H), 1.58 (br s, 2H), 1.45 (br s, 4H), 1.18 (br d, J=6.4 Hz, 5H), 0.88 (br t, J=7.1 Hz, 3H), 0.76 - 0.76 (m, 1H), 0.76 (br dd, J=6.9, 11.4 Hz, 5H). ¹³C NMR (101MHz, DMSO-d₆) δ 173.14, 172.49 (d, J=10.3 Hz, 1C), 172.08, 171.53, 171.14, 170.58, 163.06, 160.59, 156.93, 152.35, 150.07, 147.96 (d, J=13.9 Hz, 1C), 145.41, 140.24, 134.48, 129.34, 128.39, 125.08, 124.09, 119.08, 110.24 (br d, J=22.7 Hz, 1C), 96.83, 72.44, 72.10, 71.78, 71.55, 69.67, 69.25, 66.80, 65.33, 63.38, 57.25, 52.34, 50.52, 48.41, 42.09, 37.02, 34.99, 31.98, 30.69, 30.36, 29.01, 27.81, 27.65 (br s, 1C), 26.75, 25.82, 24.80, 19.12, 17.88 (d, J=11.7 Hz, 1C), 11.44 (d, J=5.9 Hz, 1C), 7.81. HRMS (ESI-TOF) m/z: [M + H]⁺ 계산된 값 1137.52; 확인된 값 1137.5140.

[0648] **실시예 4. 항체-약물 접합체 MB-2a 및 MB-3a(트라스투주맙 메디테칸)의 예시적인 합성**

[0649] 트라스투주맙-약물 접합체 **MB-2a**의 제조를 위한 일반 절차



[0650]

[0651] 50 mM 접합 완충액(pH 7.4): 1 리터에는 6.86 g의 Na₂HPO₄ · 2H₂O 및 1.58 g의 NaH₂PO₄ · H₂O가 포함된다.

[0652] 10 mM DTPA (펜테트산) 용액: 1 리터에는 3.90 g의 DTPA 및 1.20 g의 NaOH가 포함된다.

[0653] 25 mM His/His-HCl 제형 완충액(pH 5.5): 1리터에는 0.90g의 L-히스티딘과 4.04g의 L-히스티딘 염산염 일수화물이 포함된다.

[0654] 항체 제조: 452 mg의 동결건조된 트라스투주맙 분말을 22 mL의 정제수에 용해시켰다. 수득된 항체 용액을 초미세여과 튜브(30KD)를 사용하여 50 mM 접합 완충액으로 4 사이클 투석하여 8.63 mg/ml의 항체 농도를 수득하였다 (트라스투주맙의 흡광 계수 ε₂₈₀ = 213380 M⁻¹cm⁻¹을 사용함).

[0655] 항체의 환원: 위에서 제조한 12.2 mL(105 mg, 0.000724 mmol의 트라스투주맙)의 트라스투주맙 용액이 담긴 튜브에 6.2 mL의 50 mM 접합 완충액을 첨가한 다음, 579.2 μl의 TCEP(10 mM) 및 2.1 mL의 10 mM DTPA를 첨가하였다. 튜브를 Thermomixer에 넣고, 25°C에서 2시간 동안 환원 반응을 수행하였다.

[0656] 항체와 페이로드 간의 접합: 위의 트라스투주맙 환원 용액에 DMSO(1.76 mL) 중 **MB-2**(7.45 mg, 0.00882 mmol)의 용액을 첨가하였다. 튜브를 Thermomixer에 넣고, 25°C에서 1시간 동안 접합 반응을 수행하였다.

[0657] 정제: 위의 접합 반응 용액을 25 mM His/His-HCl 제형화 완충액과 함께 한외여과 튜브(30 KD)를 사용하여 6 사이클 동안 정제하여, 제형화 완충액 중 5.5 mL의 **MB-2a**를 수득하였다(15.1 mg/mL, 항체 생산량 = 83 mg, 수율 = 79%).

[0658] **MB-2a**의 물리화학적 특성 분석(페이로드의 흡광 계수 ε₂₈₀ = 4546 M⁻¹cm⁻¹ 및 ε₃₆₀ = 17513 M⁻¹cm⁻¹을 사용함) (표 1).

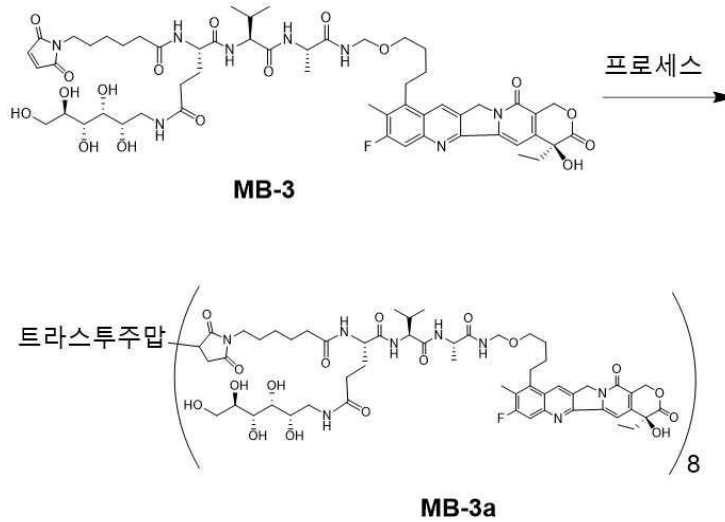
[표 1]

분석 항목	방법	결과	
단량체 수준	SEC-HPLC	99.4%	
DAR	HIC-HPLC	DAR = 7.9 D6 = 5.9% D8 = 94.1%	
농도	UV-Vis	질량 농도	15.1 mg/ml
		항체	98.9 $\mu\text{mol/L}$
		페이로드	797.3 $\mu\text{mol/L}$

[0659]

[0660]

트라스투주맵-약물 접합체 **MB-3a**의 제조를 위한 일반 절차



[0661]

[0662]

50 mM 접합 완충액(pH 7.4): 1 리터에는 6.86 g의 $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 및 1.58 g의 $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 가 포함된다.

[0663]

10 mM DTPA (펜테트산) 용액: 1 리터에는 3.90 g의 DTPA 및 1.20 g의 NaOH가 포함된다.

[0664]

25 mM His/His-HCl 제형 완충액(pH 5.5): 1리터에는 0.90g의 L-히스티딘과 4.04g의 L-히스티딘 염산염 일수화물이 포함된다.

[0665]

항체 제조: 452 mg의 동결건조된 트라스투주맵 분말을 22 mL의 정제수에 용해시켰다. 수득된 항체 용액을 초미세여과 튜브(30KD)를 사용하여 50 mM 접합 완충액으로 4 사이클 투석하여 8.63 mg/ml의 항체 농도를 수득하였다(트라스투주맵의 흡광 계수 $\epsilon_{280} = 213380 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ 을 사용함).

[0666]

항체의 환원: 위에서 제조한 12.2 mL(105 mg, 0.000724 mmol의 트라스투주맵)의 트라스투주맵 용액이 담긴 튜브에 6.2 mL의 50 mM 접합 완충액을 첨가한 다음, 579.2 μl 의 TCEP(10 mM) 및 2.1 mL의 10 mM DTPA를 첨가하였다. 튜브를 Thermomixer에 넣고, 25°C에서 2시간 동안 환원 반응을 수행하였다.

[0667]

항체와 페이로드 간의 접합: 위의 트라스투주맵 환원 용액에 DMSO(1.77 mL) 중 **MB-3**(10.02 mg, 0.00886 mmol)의 용액을 첨가하였다. 튜브를 Thermomixer에 넣고, 25°C에서 1시간 동안 접합 반응을 수행하였다.

[0668]

정제: 위의 접합 반응 용액을 25 mM His/His-HCl 제형화 완충액과 함께 한외여과 튜브(30 KD)를 사용하여 6 사이클 동안 정제하여, 제형화 완충액 중 6.2 mL의 **MB-3a**를 수득하였다(14.6 mg/mL, 항체 생산량 = 90.5 mg, %수율 = 86%).

[0669]

MB-3a의 물리화학적 특성 분석(페이로드의 흡광 계수 $\epsilon_{280} = 4546 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ 및 $\epsilon_{360} = 17513 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ 을 사용함)(표 2):

[표 2]

분석 항목	방법	결과	
단량체 수준	SEC-HPLC	98.4%	
DAR	HIC-HPLC	DAR = 8 D8 = 100%	
농도	UV-Vis	질량 농도	14.6 mg/ml
		몰농도	94.8 μmol/L
		페이로드	772.5 μmol/L

[0670]

[0671]

[0672]

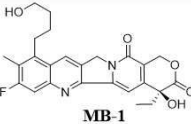
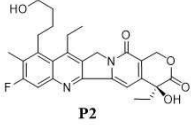
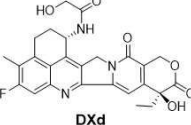
실시예 5. 독소 및 ADC의 시험관 내 검정

175 μL의 세포 현탁액을 웰 당 1500개의 세포로 96-웰 플레이트에 분배하고, 가슴된 인큐베이터(37°C, 5% CO₂)에서 24시간 동안 인큐베이션하였다. 항체 차단을 위해, 세포(15000 세포/mL)를 2 x 10⁻⁶ M의 트라스투주맙(최종 농도 1 μM)과 함께 인큐베이션한다. 25 μL의 다양한 농도의 화합물을 5x 용액으로서 플레이트 내의 세포 배양 배지(소 태아 혈청, Invitrogen)에 첨가하고, 인큐베이터에서 120시간 동안 인큐베이션하였다. CCK-8을 벤치 상단에서 또는 37°C 수조에서 해동하고, 인큐베이션한 플레이트의 각 웰에 10 μL의 CCK-8을 첨가한 다음(기포가 O. D. 판독을 방해할 수 있으므로 웰 내에 기포가 들어가지 않도록 주의할 것), 인큐베이터에서 1 내지 4 시간 동안 추가로 인큐베이션하였다. SpectraMax i3x 마이크로플레이트 판독기를 사용하여 450 nm에서 흡광도를 측정하고 세포 억제율을 계산하였다. GraphPad Prism 소프트웨어를 사용하여 IC₅₀ 값과 함께 IC₅₀ 곡선을 생성하였다.

[0673]

독소(ADC의 예상 대사산물)의 시험관 내 세포독성 검정 결과는 다음 표 3 및 도 1a 내지 1f에 요약되어 있다. 대사산물 MB-1의 세포독성은, Her-2 발현이 중간 정도이고 트라스투주맙-내성 세포주인 JIMT-1을 제외하고는, 다수의 세포주에서 DS-8201a(Enhertu)의 대사산물인 DXd와 유사하며, 여기에서 MB-1은 DXd보다 10배 더 강력하다.

[표 3]

화합물	세포주 (IC ₅₀ , nM)						
	SK-BR-3	MCF-7	NCI-N87	SK-OV-3	MDA-MB-468	JIMT-1	OVCAR-3
 MB-1	0.77	0.37	1.3	1.0	0.42	0.78	0.10
 P2	> 30		> 30		> 30	> 30	
 DXd	1.9	0.57	3.6	4.7	0.57	8.7	0.20

[0674]

[0675]

페이로드 MB-3(메디테칸)은 링커 내의 폴리올 모이어티의 존재로 인해 MB-2 및 다이이치(Daiichi)의 페이로드 데록스테칸보다 더 친수성이다. 따라서, MB-3은 이황화 환원된 트라스투주맙과 더 반응하여, DAR 값이 8인 균질한 ADC인 MB-3a(트라스투주맙 메디테칸)를 제공한다. 대조적으로, MB-2a 및 DS-8201a(트라스투주맙 데록스테칸) 둘 모두는 감소된 항체에 대한 페이로드의 반응성이 더 낮기 때문에 적은 백분율의 DAR6 종을 함유한다. 도 2a 내지 2c는 ADC의 HIC-HPLC 스펙트럼을 도시한다. 친수성 페이로드 MB-3은 접합 반응에서 더 반응하여 균질한 ADC로서 MB-3a를 제공한다. ADC MB-2a 및 MB-3a에 각각 통합된 페이로드 MB-2 및 MB-3은, 해당 ADC가 DS-8201a(Enhertu)보다 더 나은 방관자 활성을 가질 수 있도록 설계된다.

[0676]

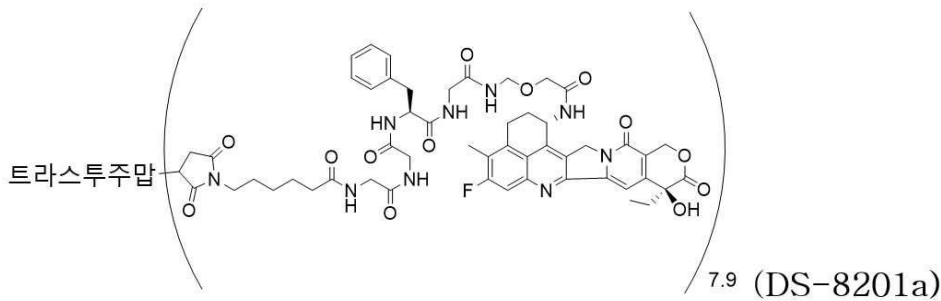
ADC의 시험관 내 세포독성 분석 결과는 다음의 표 4 및 도 3a 내지 3d에 요약되어 있다. 비교를 위해, MB-2a 및 MB-3a와 같은 식 III의 예시적인 화합물 이외에, 트라스투주맙 및 ADC 트라스투주맙 데록스테칸(DS-8201a)의 활

성 또한 평가하였다. 표 4 및 도 3a 내지 3d에 나타난 바와 같이, 트라스투주맙 ADC MB-2a 및 MB-3a는 Her2 고 발현 세포주인 NCI-N87에서 DS-8201a와 동일한 효능을 나타냈다(도 3a). 그러나, Her2 항원이 트라스투주맙으로 차단되었을 때, ADC의 세포 성장 억제 능력은 감소하였다(도 3b). 또한, ADC는 Her2 음성 세포주인 MDA-MB-468에서 강력하지 않은데(도 3d), 이는 Her2-발현 세포에 대한 ADC의 특이성을 입증한다. 시험관 내 검증에서, ADC는 Her2 발현이 중등도 수준인 JIMT-1 세포에서 민감하지 않지만, MB-2a 및 MB-3a는 해당 세포주에서 DS-8201a보다 여전히 상대적으로 더 강력하다(도 3c).

[표 4]

화합물	세포주 (IC ₅₀ , nM)				
	NCI-N87	NCI-N87 + 트라스투주맙 차단	JIMT-1	MDA-MB-468	SK-Br-3
트라스투주맙	495				0.56
MB-2a	11.5	37.8	3773	> 1000	
MB-3a	11.1	36.4	1815	> 1000	0.12
DS-8201a	11.3	29	6496	> 1000	0.09

[0677]



[0678]

[0679]

제형화 완충액 중 ADC의 안정성 연구에서, MB-2a, MB-3a 및 DS-8201a는 모두 실온에서 안정적이다. DAR 값은 25 °C 또는 37 °C에서 변하지 않았으며, 이는 항체로부터 떨어진 페이로드가 없음을 나타낸다. MB-2a 및 DS-8201a 제형은 37 °C에서 시간이 지남에 따라 고분자량(HMW) 및 저분자량(LMW) 중의 증가를 나타냈다. 37 °C에서 6일 후에 MB-3a에 대해 LMW 종만이 약간 증가하였다. MB-3a는 보다 친수성인 페이로드를 포함하였기 때문에, 고온에서 MB-2a 및 DS-8201a보다 더 안정적이다. 표 5는 안정성 데이터를 나타낸다.

[표 5]

ADC	온도	시간 (일)	SEC(%)			HIC DAR
			HMW	단량체	LMW	
MB-2a	25 °C	0	0.6	99.4	/	7.55
		1	0.7	99.3	/	7.52
		3	1.0	98.4	0.6	7.53
	37 °C	3	0.7	91.3	8	7.56
		6	3.9	86.0	9.1	7.51
MB-3a	25 °C	0	0.7	99.3	/	8
		1	0.7	99.1	0.2	8
		3	0.7	99.1	0.2	8
	37 °C	3	0.8	95.0	4.2	8
		6	0.9	94.2	4.9	8
DS-8201a	25 °C	0	0.9	99.1	/	7.55
		1	1.0	99.0	/	7.55
		3	0.8	99.2	/	7.57
	37 °C	3	0.8	94.9	4.3	7.58
		6	3.7	86.6	9.7	7.58

[0680]

[0681]

실시예 6. NCI-N87 CDX 모델에서 ADC의 생체내 효능

[0682]

종양 생성을 위해, 각 마우스(Vital Rivers로부터의 암컷 Balb/c-누드)의 우측 옆구리에 0.2 mL의 PBS 중 매트릭셀(Matrigel)과 혼합된 NCI-N87 종양 세포(5×10^6)(50:50)를 피하 접종하였다. 종양 접종 후 6일차에 평균 종양 부피가 약 160 mm³에 도달했을 때, 동물을 여러 군에 무작위 배정한 다음, 효능 연구를 위한 치료를 시작하였다. 각 군에는 8마리의 마우스를 포함시켰다. 종양을 가진 마우스에게 시험 물품과 및 대조군 물품을 꼬리 정맥을 통해 5 mL/kg의 부피로 투여하였다.

[0683]

종양 크기는 캘리퍼를 사용하여 2가지 치수로 주 2회 측정하였고, 부피는 다음 식을 사용하여 mm³으로 표현하였다: $V = 0.5 a \times b^2$ (식 중 a 및 b는 각각 종양의 긴 치수 및 짧은 치수임). 결과는 평균 및 표준 오차(평균 ± SEM)로 표시하였다.

[0684]

통계 분석: 2개의 군 간의 종양 부피를 비교하기 위해 이원 ANOVA를 수행하였다. 모든 데이터는 Graphpad Prism 6.0을 사용하여 분석하였고, P < 0.05는 통계적으로 유의한 것으로 간주하였다. 통계 분석과 생물학적 관찰 모두를 고려하였다.

[0685]

종양 성장 억제: 종양 크기는 T/C 값의 계산에 사용하였다. 상대적 종양 증식 속도인 T/C(%)는 다음 식을 사용하여 계산하였다: $T/C(\%) = (T_i/T_0) / (V_i/V_0) \times 100\%$. 상대 종양 성장 억제는 다음 식에 의해 계산하였다: $TGI(\%) = [1 - (T_i/T_0) / (V_i/V_0)] \times 100\%$. T_i는 치료 후 각각의 표시된 시점에 측정된 치료군의 평균 종양 부피를 지칭하고; T₀은 군으로 나눌 때 치료군의 종양 부피를 지칭하고; V_i는 치료 후 각각의 표시된 시점에 측정된 비히클 대조군의 평균 종양 부피를 지칭하며; V₀은 군으로 나눌 때 비히클 대조군의 종양 부피를 지칭한다. T/C > 40%인 경우, 효능이 없는 것이고; T/C ≤ 40%이고, p 값 < 0.05인 경우, 종양이 억제되는 것이다.

[0686]

NCI-N87 CDX 모델에서 ADC의 항종양 효과는 도 4 및 표 6에 나타나 있다. 도 4에 도시된 바와 같이, MB-2a(1 mg/kg 및 4 mg/kg 투여량) 및 MB-3a(1 mg/kg 및 4 mg/kg 투여량) 둘 모두는 강력한 항종양 효과를 나타냈고,

DS-8201a(Enhertu)보다 더 효과적이었다.

[표 6]

모델	ADC	투여량 (mg/Kg, 단일 i.v.)	퇴행		TGI (%) (23 일차)	코멘트
			부분	완전		
NCI-N87	비히클	N/A	---	---	---	---
	트라스투주맙	4	0/8	0/8	16.8	비활성
	MB-2a	0.25	0/8	0/8	12.0	비활성
	MB-3a	0.25	0/8	0/8	28.1	비활성
	DS-8201a	0.25	0/8	0/8	24.7	비활성
	MB-2a	1	2/8	0/8	75.5	활성
	MB-3a	1	3/8	0/8	82.4	고도로 활성
	DS-8201a	1	0/8	0/8	52.2	활성
	MB-2a	4	5/8	3/8	97.1	고도로 활성
	MB-3a	4	5/8	3/8	97.6	고도로 활성
DS-8201a	4	8/8	0/8	97.3	고도로 활성	

[0687]

[0688]

실시예 7. JIMT-1 CDX 모델에서 ADC의 생체 내 효능

[0689]

종양 생성을 위해, 각 마우스(Scid-Beige from Shanghai Lingchang Biotech)의 오른쪽 옆구리에 0.2 mL의 PBS 중 매트릭셀과 혼합된 JIMT-1 종양 세포(1×10^7)(50:50)를 피하 접종하였다. 종양 접종 후 6일차에 평균 종양 부피가 약 175 mm³에 도달했을 때, 동물을 여러 군에 무작위 배정한 다음, 효능 연구를 위한 치료를 시작하였다. 각 군에는 8마리의 마우스를 포함시켰다. 종양을 가진 마우스에게 시험 물품과 및 대조군 물품을 꼬리 정맥을 통해 5 mL/kg의 부피로 투여하였다.

[0690]

종양 크기는 캘리퍼를 사용하여 2가지 치수로 주 2회 측정하였고, 부피는 다음 식을 사용하여 mm³으로 표현하였다: $V = 0.5 a \times b^2$ (식 중 a 및 b는 각각 종양의 긴 치수 및 짧은 치수임). 결과는 평균 및 표준 오차(평균 ± SEM)로 표시하였다.

[0691]

통계 분석: 2개의 군 간의 종양 부피를 비교하기 위해 이원 ANOVA를 수행하였다. 모든 데이터는 Graphpad Prism 6.0을 사용하여 분석하였고, P < 0.05는 통계적으로 유의한 것으로 간주하였다. 통계 분석과 생물학적 관찰 모두를 고려하였다.

[0692]

종양 성장 억제: 종양 크기는 T/C 값의 계산에 사용하였다. 상대적 종양 증식 속도인 T/C(%)는 다음 식을 사용하여 계산하였다: $T/C(\%) = (Ti/T0) / (Vi/V0) \times 100\%$. 상대 종양 성장 억제는 다음 식에 의해 계산하였다: $TGI(\%) = [1 - (Ti/T0) / (Vi/V0)] \times 100\%$. Ti는 치료 후 각각의 표시된 시점에 측정된 치료군의 평균 종양 부피를 지칭하고; T0은 군으로 나눌 때 치료군의 종양 부피를 지칭하고; Vi는 치료 후 각각의 표시된 시점에 측정된 비히클 대조군의 평균 종양 부피를 지칭하며; V0은 군으로 나눌 때 비히클 대조군의 종양 부피를 지칭한다. T/C > 40%인 경우, 효능이 없는 것이고; T/C ≤ 40%이고, p 값 < 0.05인 경우, 종양이 억제되는 것이다.

[0693]

JIMT-1 CDX 모델에서 ADC의 항종양 효과는 도 5 내지 8 및 표 7에 나타나 있다. 도 5는 JIMT-1 CDX 모델에서 3가지 상이한 투여량의 항체 약물 접합체(ADC)의 효과를 도시한 것이다. 이 연구에서, 연구된 MB-2a 및 MB-3a의 3가지 투여량 모두가 유의한 항종양 효과를 나타냈다. 이들 실험에서 연구된 상이한 투여량은 도 6(2.5 mg/kg IV 단일 투여량), 도 7(5 mg/kg IV 단일 투여량), 및 도 8(10 mg/kg IV 단일 투여량)에도 별도로 도시되어 있다.

[표 7]

모델	ADC	투여량 (mg/Kg, 단일 i.v.)	퇴행		TGI (%) (27 일차)	코멘트
			부분	완전		
JIMT-1	비히클	N/A	---	---	---	---
	트라스투주맙	10	0/8	0/8	22.5	비활성
	MB-2a	2.5	5/8	0/8	83.9	고도로 활성
	MB-3a	2.5	3/8	0/8	76.2	활성
	DS-8201a	2.5	1/8	0/8	66.3	활성
	MB-2a	5	6/8	0/8	85.1	고도로 활성
	MB-3a	5	7/8	0/8	88.4	고도로 활성
	DS-8201a	5	4/8	0/8	78.4	활성
	MB-2a	10	8/8	0/8	90.9	고도로 활성
	MB-3a	10	6/8	1/8	90.9	고도로 활성
DS-8201a	10	7/8	0/8	87.5	고도로 활성	

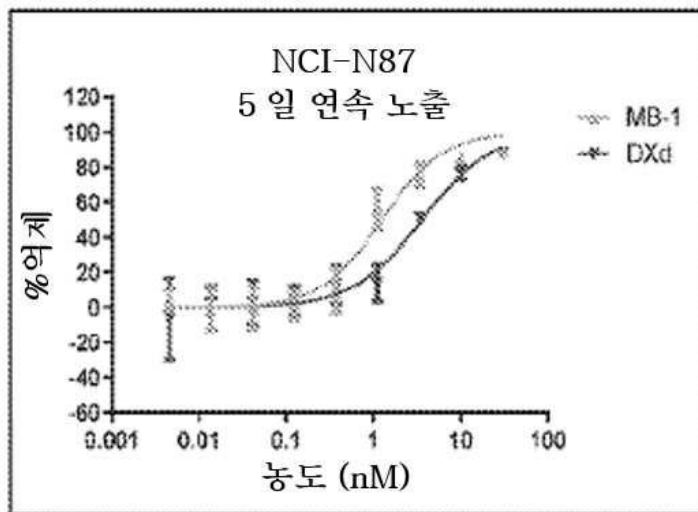
[0694]

[0695]

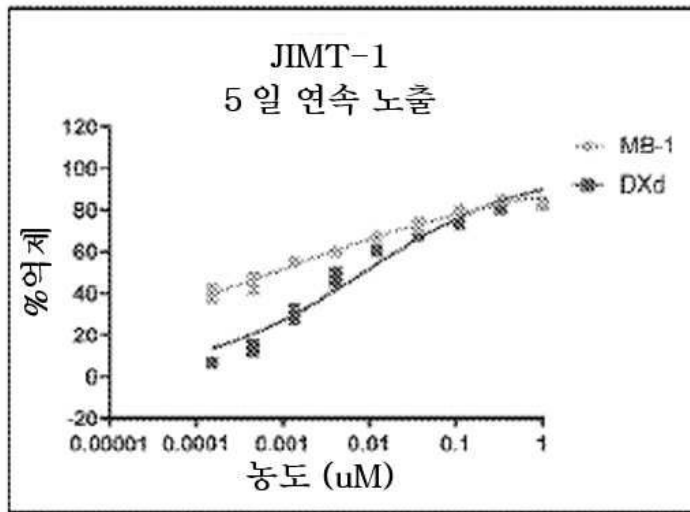
본 명세서에 인용된 모든 간행물 및 특허 출원은, 각각의 개별 간행물 또는 특허 출원이 구체적으로 그리고 개별적으로 참조로서 포함되는 것으로 표시되고 각각의 참조가 그 전체가 완전히 기술된 것처럼 모든 목적을 위해 본원에 참조로서 통합된다. 비록 전술한 발명이 이해의 명확성을 위해 예시 및 예로서 일부 상세하게 설명되었지만, 본 발명의 교시를 고려하여 첨부된 청구범위의 사상 또는 범위를 벗어나지 않고서 특정 변경 및 변형이 이루어질 수 있다는 것은 당업자에게 쉽게 명백해질 것이다.

도면

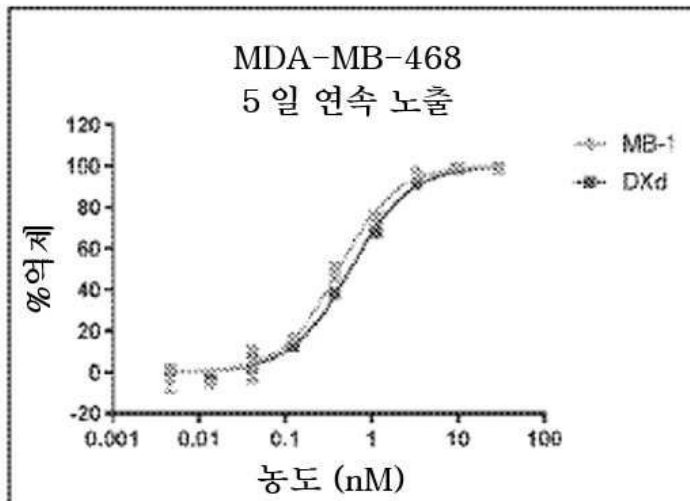
도면1a



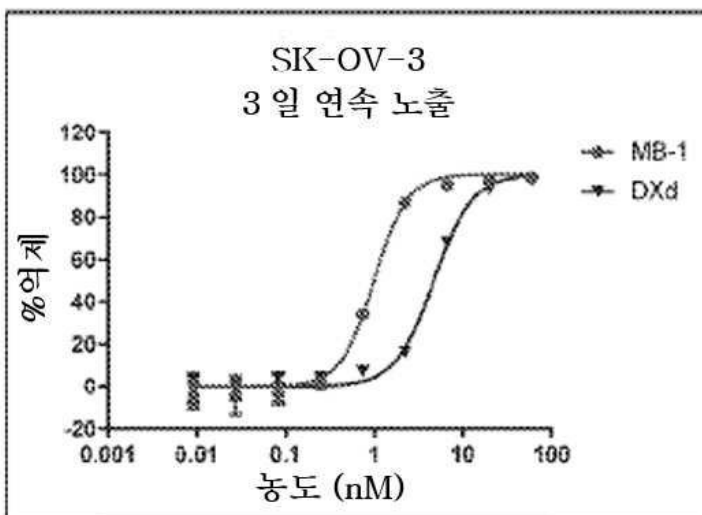
도면1b



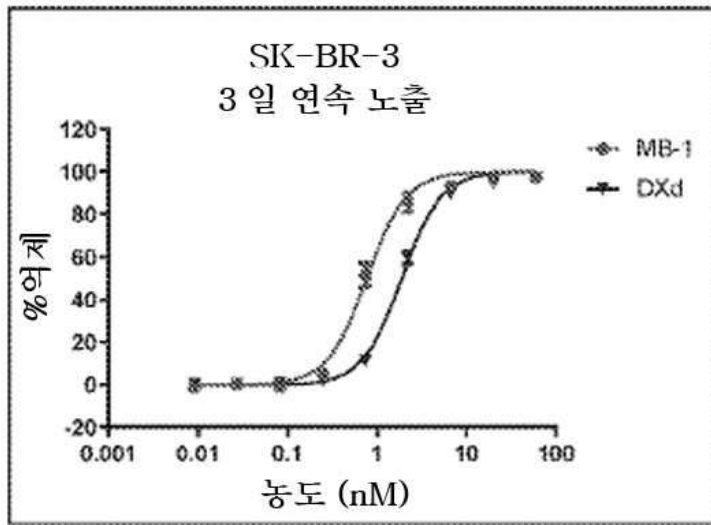
도면1c



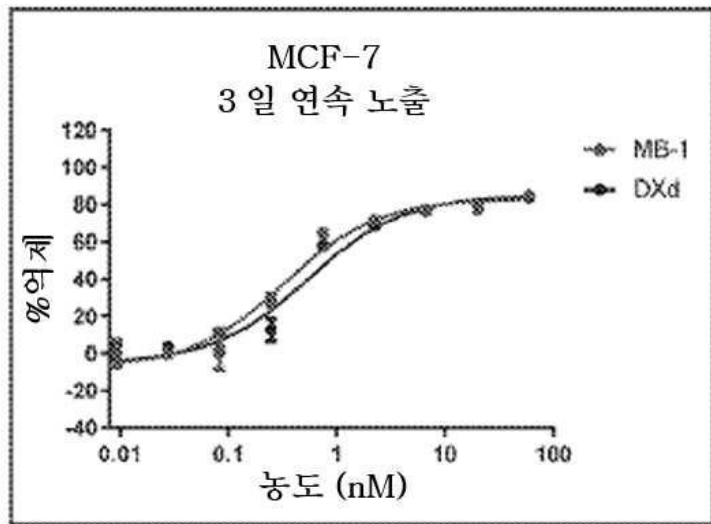
도면1d



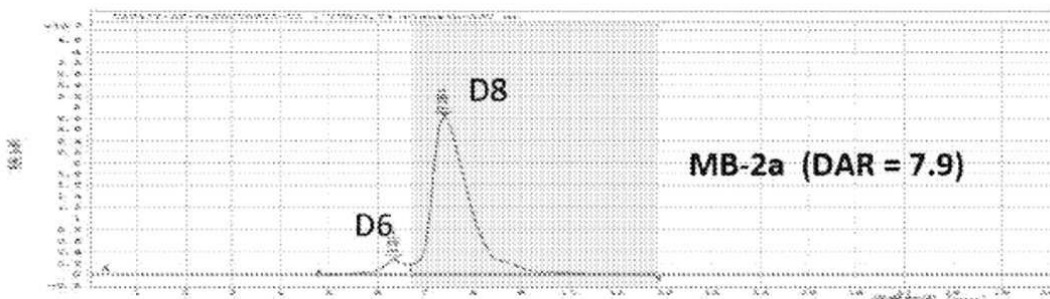
도면1e



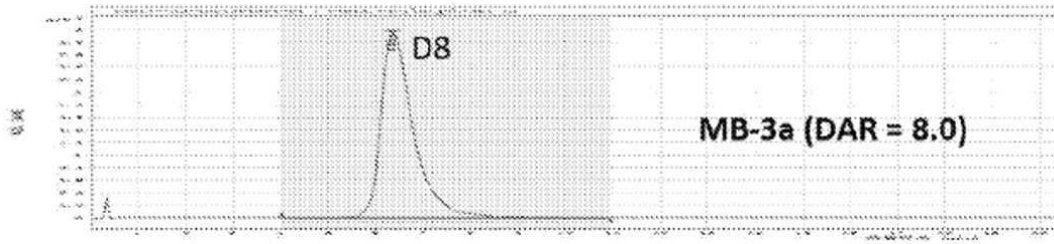
도면1f



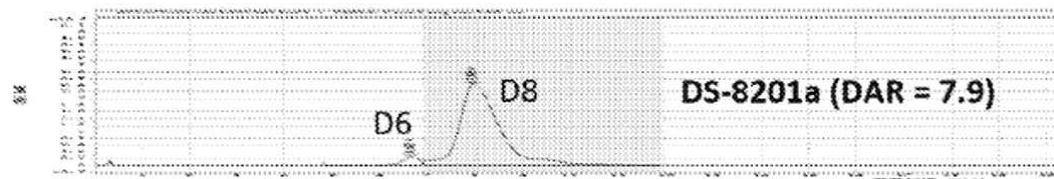
도면2a



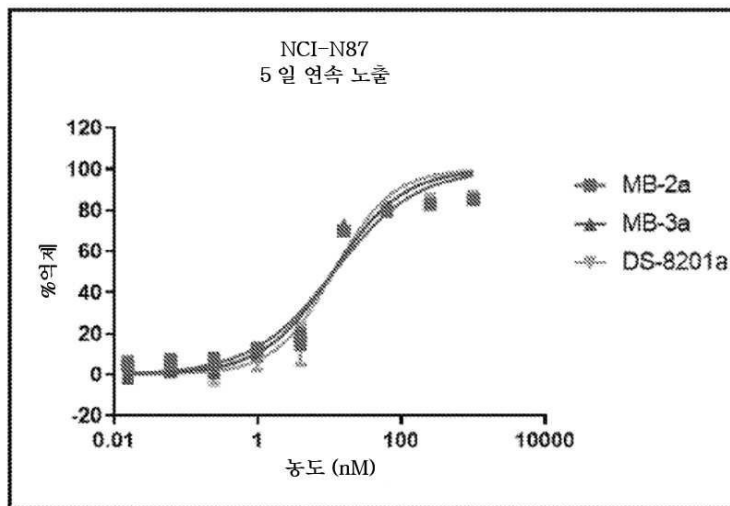
도면2b



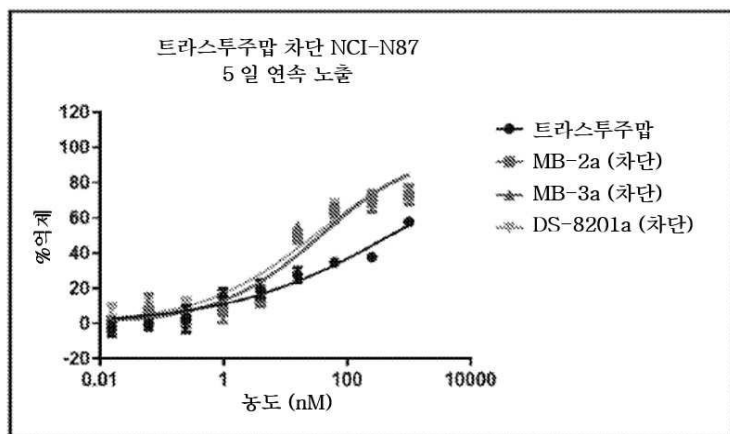
도면2c



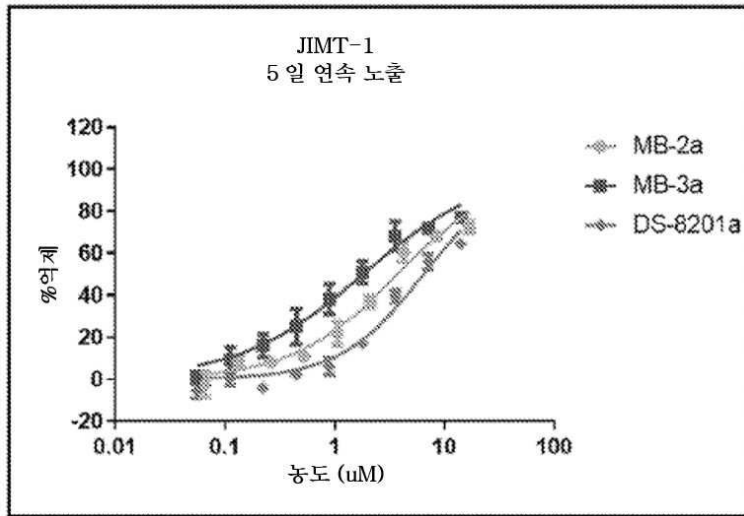
도면3a



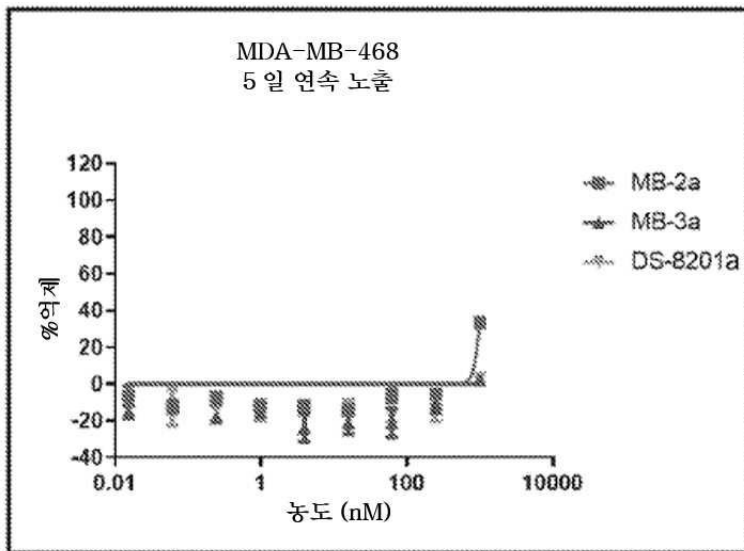
도면3b



도면3c

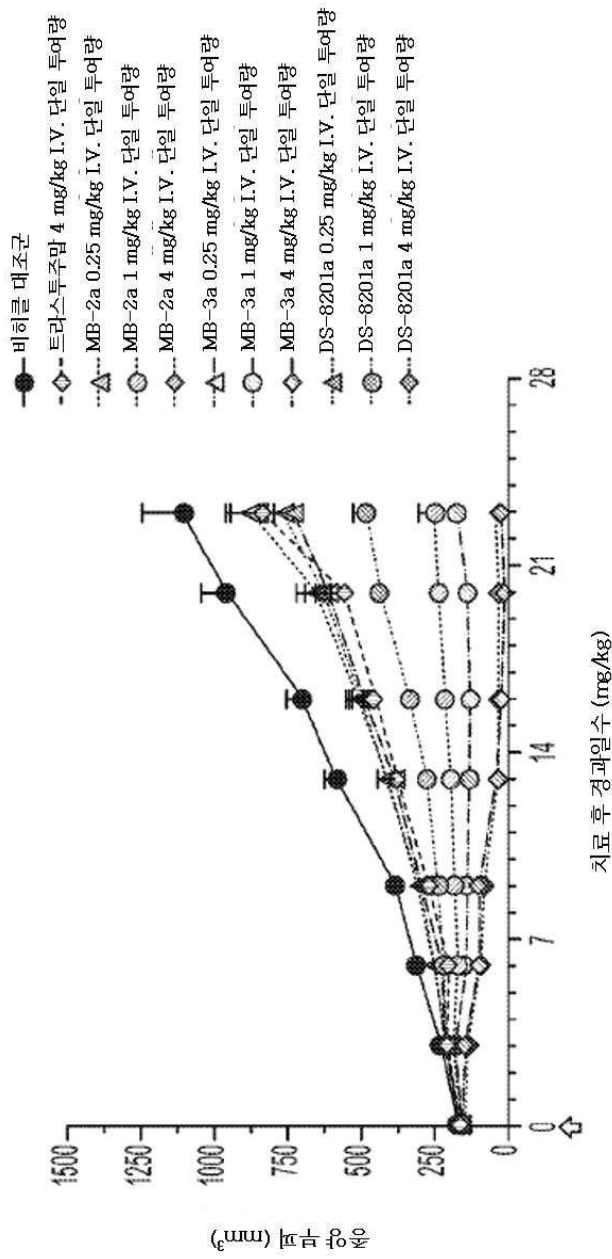


도면3d



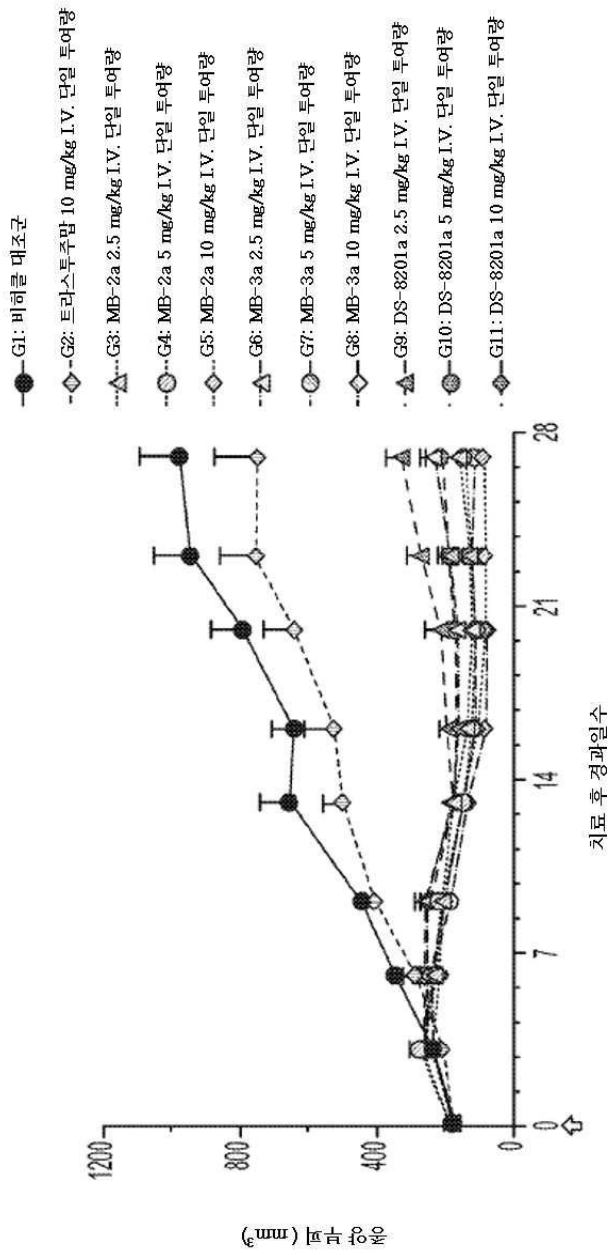
도면4

NCI-N87 CDX 모델에서 ADC의 항종양 효과

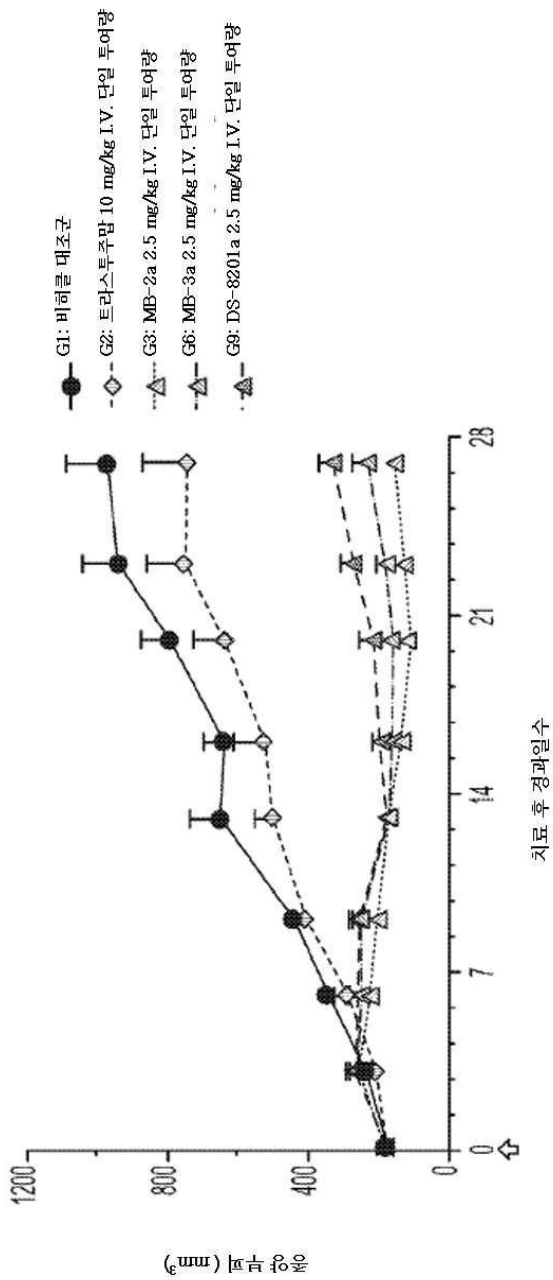


도면5

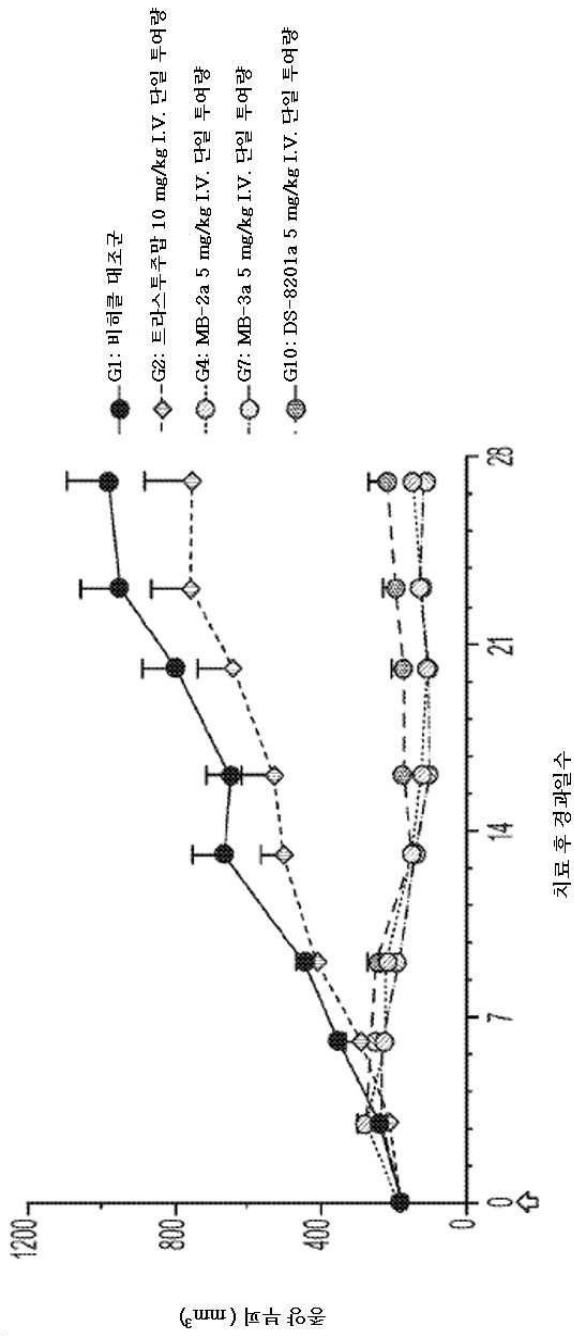
JMT-1 CDX 모델에서 ADC의 항종양 효과



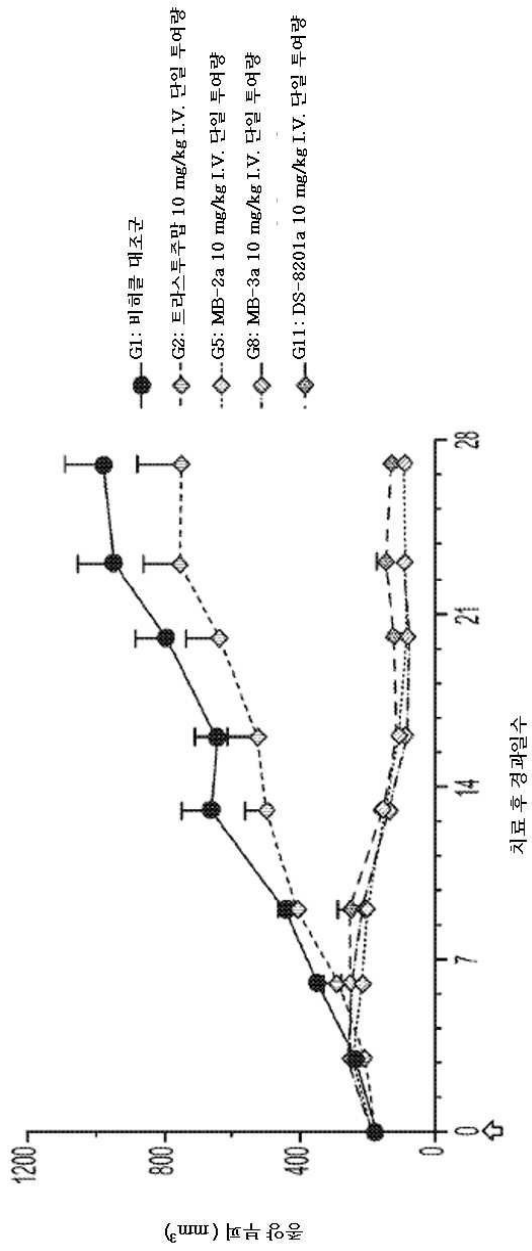
도면6



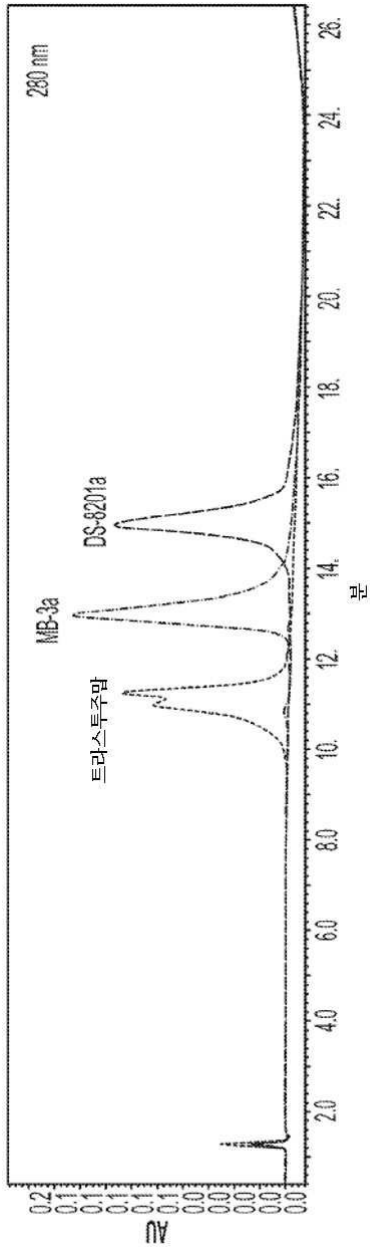
도면7



도면8

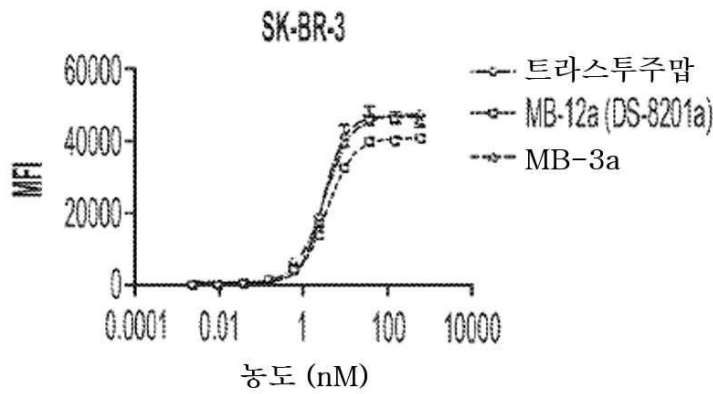


도면9



MB-3a, DS-8201a 및 트라스투주맙의 친수성 비교

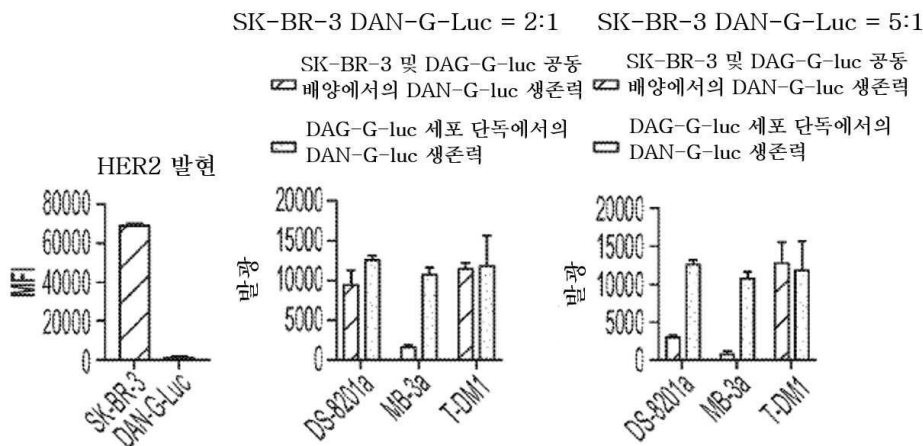
도면10



샘플명	트라스투주맙	MB-12a (DS-8201a)	MB-3a (트라스투주맙 메디테칸)
EC50 (nM)	3.096	3.632	3.065

MB-3a, DS-8201a 및 트라스투주맙의 항원 결합 친화도

도면11



MB-3a, DS-8201a 및 T-DM1의 방관자 효과 비교

서열목록

SEQUENCE LISTING

<110> MEDIBOSTON LIMITED

<120> ANTI-HER2 ANTIBODY-DRUG CONJUGATES AND USES THEREOF

<130> MDB-002WO

<140><141><150> 63/153,530

<151> 2021-02-25

<160> 19

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 450

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

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

<400> 1

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

1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Asn Ile Lys Asp Thr

20 25 30

Tyr Ile His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val

35 40 45

Ala Arg Ile Tyr Pro Thr Asn Gly Tyr Thr Arg Tyr Ala Asp Ser Val

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

Ser Arg Trp Gly Gly Asp Gly Phe Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln

100 105 110

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val

115 120 125

Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala

130 135 140

Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser

145 150 155 160

Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val

165 170 175

Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro

180 185 190
 Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys
 195 200 205

Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp
 210 215 220

Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly
 225 230 235 240

Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile
 245 250 255

Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu
 260 265 270

Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His
 275 280 285

Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg
 290 295 300

Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys
 305 310 315 320

Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu
 325 330 335

Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr
 340 345 350

Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu
 355 360 365

Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp
 370 375 380

Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val
 385 390 395 400

Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp
 405 410 415

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

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

Gly Lys
 450

<210> 2

<211> 214

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

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

<400> 2

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 Asp Val Asn Thr Ala
 20 25 30

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

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

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

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln His Tyr Thr Thr Pro Pro
 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> 3

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

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

<400> 3

Gly Phe Asn Ile Lys Asp Thr Tyr Ile His

1 5 10

<210> 4

<211> 17

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

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

<400> 4

Arg Ile Tyr Pro Thr Asn Gly Tyr Thr Arg Tyr Ala Asp Ser Val Lys

1 5 10 15

Gly

<210> 5

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial Sequence
<220><221> source
<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
peptide"
<400> 5
Trp Gly Gly Asp Gly Phe Tyr Ala Met Asp Tyr
1 5 10
<210> 6
<211> 11

<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220><221> source
<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
peptide"
<400> 6
Arg Ala Ser Gln Asp Val Asn Thr Ala Val Ala
1 5 10
<210> 7
<211> 7

<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220><221> source
<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
peptide"
<400> 7
Ser Ala Ser Phe Leu Tyr Ser
1 5
<210> 8
<211> 9

<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220><221> source
<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic

peptide"
<400> 8
Gln Gln His Tyr Thr Thr Pro Pro Thr
1 5
<210> 9
<211> 6
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220><221> source
<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
6xHis tag"
<400> 9
His His His His His His
1 5
<210> 10
<211> 4
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220><221> source
<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic

peptide"
<400> 10
Ala Val Ala Gly
1
<210> 11
<211> 4
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220><221> source
<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic

peptide"
<400> 11
Gly Phe Gly Gly
1

<210> 12
<211> 4
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220><221> source
<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
peptide"
<400> 12
Gly Gly Phe Gly
1
<210> 13
<211> 4
<212> PRT
<
213> Artificial Sequence
<220><221> source
<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
peptide"
<400> 13
Ala Val Gly Gly
1
<210> 14
<211> 4
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220><221> source
<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
peptide"
<400> 14
Ala Ala Ala Ala
1
<210> 15
<211> 4
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220><221> source
<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
peptide"
<400> 15
Ala Val Ala Ala
1
<210> 16
<211> 4
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220><221> source
<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
peptide"
<400> 16
Ala Leu Ala Leu
1
<210> 17
<211> 4
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220><221> source
<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
peptide"
<400> 17
Leu Ala Leu Ala
1
<210> 18
<211> 4
<212> PRT
<
<213> Artificial Sequence
<220><221> source
<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
peptide"

<400> 18

Gly Phe Leu Gly

1

<210> 19

<211> 4

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

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

<400> 19

Gly Leu Phe Gly

1