



(19) 대한민국특허청(KR)  
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2024-0037267  
(43) 공개일자 2024년03월21일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)  
A61K 47/68 (2017.01) A61K 31/357 (2006.01)  
A61P 35/00 (2006.01) C07K 16/32 (2006.01)

(52) CPC특허분류  
A61K 47/6889 (2017.08)  
A61K 31/357 (2013.01)

(21) 출원번호 10-2024-7004483  
(22) 출원일자(국제) 2022년07월22일  
심사청구일자 없음

(85) 번역문제출일자 2024년02월06일  
(86) 국제출원번호 PCT/CN2022/107479  
(87) 국제공개번호 WO 2023/001300  
국제공개일자 2023년01월26일

(30) 우선권주장  
202110830783.6 2021년07월22일 중국(CN)

(71) 출원인  
상하이 쉐후이 메디슨 컴퍼니 리미티드  
중국, 201203 상하이 푸둥 뉴 에리어, 프리 트레  
이드 파일럿 존, 진케 로드 넘버 3728, 빌딩 넘버  
14, 플로어 4  
상하이 헨그루이 파마수티컬 컴퍼니 리미티드  
중국, 상하이 200245, 민항 디스트릭트, 웬징 로  
드, 279  
(뒷면에 계속)

(72) 발명자  
선, 징  
중국, 201210 상하이 푸둥 뉴 에어리어, 장지양  
타운, 하이커 로드 넘버 1288  
양, 창용  
중국, 지양수 222047, 리안원강, 이코노믹 앤드  
테크놀로지컬 디벨롭먼트 존, 7 곤룬산 로드  
(뒷면에 계속)

(74) 대리인  
안소영

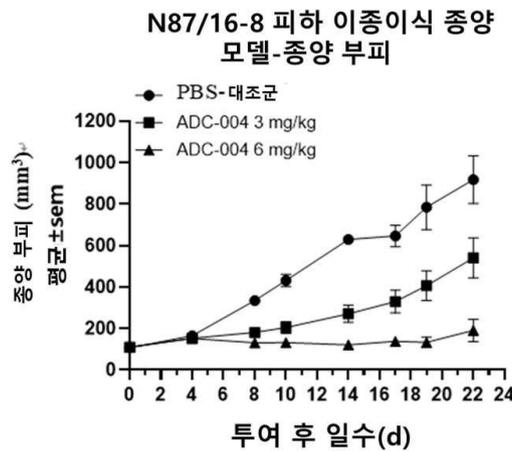
전체 청구항 수 : 총 24 항

(54) 발명의 명칭 **에리블린 유도체의 약물 접합체**

(57) 요약

에리블린 유도체의 약물 접합체. 구체적으로, 에리블린 유도체를 HER2의 구조적 도메인 II에 결합시킴으로써 형성된 HER2 항체 접합체, 이에 대한 제조 방법, 및 이의 약제학적 적용이 제공된다. 본 발명은 추가로 항체-약물 접합체의 투여에 의해 암을 치료하는 방법, 및 조성물에 관한 것이다.

대표도 - 도1



(52) CPC특허분류

*A61K 47/6803* (2023.08)

*A61K 47/6855* (2017.08)

*A61P 35/00* (2018.01)

*C07K 16/32* (2013.01)

*C07K 2317/73* (2013.01)

(71) 출원인

**지양수 헨그루이 파마슈티컬스 컴퍼니 리미티드**

중국, 지양수 222047, 리안원강, 이코노믹 앤드 테  
크놀로지컬 디벨롭먼트 존, 7 곤륜산 로드

**상하이 쉹디 파마슈티컬 컴퍼니 리미티드**

중국, 201210 상하이 푸둥 뉴 디스트릭트, 장지양  
타운, 하이커 로드 넘버 1288

(72) 발명자

**리양, 진동**

중국, 상하이 200245, 민항 디스트릭트, 웬징  
로드, 279

**리아오, 청**

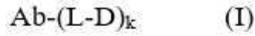
중국, 201210 상하이 푸둥 뉴 에어리어, 장지양 타  
운, 하이커 로드 넘버 1288

**명세서**

**청구범위**

**청구항 1**

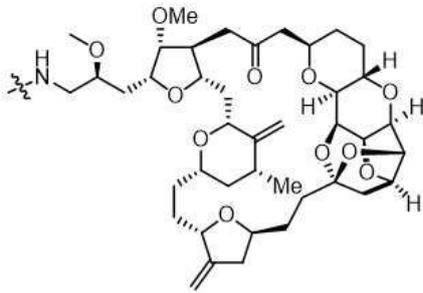
화학식 (I)의 구조를 갖는 항체-약물 접합체 또는 이의 약제학적으로 허용되는 염 또는 용매화물:



여기서 Ab는 HER2의 도메인 II에 결합하는 HER2 항체 또는 이의 항원 결합 단편이고;

L은 Ab를 D에 공유적으로 연결하는 링커이고, k는 1 내지 20이고;

-D는 아래 화학식으로 제시된다:



**청구항 2**

제1항에 있어서, k가 1 내지 10으로 이루어진 군으로부터 선택되고 정수 또는 소수일 수 있는, 항체-약물 접합체.

**청구항 3**

제1항 또는 제2항에 있어서, 링커가 절단 가능한 펩티드 모이어티를 포함하는, 항체-약물 접합체.

**청구항 4**

제3항에 있어서, 절단 가능한 펩티드 모이어티가 효소에 의해 절단될 수 있고, 바람직하게는 카텝신에 의해 절단될 수 있고, 추가로 카텝신이 바람직하게는 카텝신 B인, 항체-약물 접합체.

**청구항 5**

제3항 또는 제4항에 있어서, 링커가 아미노산 단위를 포함하고, 아미노산 단위가 바람직하게는 페닐알라닌, 글리신, 발린, 리신, 시트룰린, 세린, 글루탐산, 및 아스파르트산으로 이루어진 군으로부터 선택된 2 내지 7개의 아미노산, 보다 바람직하게는 발린-시트룰린(Val-Cit), 알라닌-알라닌-아스파라긴(Ala-Ala-Asn), 글리신-글리신-리신(Gly-Gly-Lys), 발린-리신(Val-Lys), 발린-알라닌(Val-Ala), 발린-페닐알라닌(Val-Phe), 및 글리신-글리신-페닐알라닌-글리신(Gly-Gly-Phe-Gly)(서열번호: 7)으로 이루어진 펩티드 잔기를 포함하는, 항체-약물 접합체.

**청구항 6**

제1항 또는 제2항에 있어서, 링커가 절단 가능한 술폰아미드 모이어티를 포함하는, 항체-약물 접합체.

**청구항 7**

제1항 내지 제3항 중 어느 한 항에 있어서, 링커가 절단 가능한 디설파이드 모이어티를 포함하는, 항체-약물 접합체.

**청구항 8**

제6항 또는 제7항에 있어서, 링커가 환원 조건 하에 절단될 수 있는, 항체-약물 접합체.

**청구항 9**

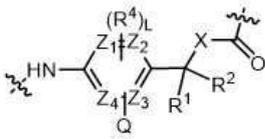
제1항 내지 제8항 중 어느 한 항에 있어서, 링커가 D에 연결되는 스페이서 단위를 포함하는, 항체-약물 접합체.

**청구항 10**

제9항에 있어서, 스페이서 단위가 *p*-아미노벤질옥시카르보닐(pAB)을 포함하는, 항체-약물 접합체.

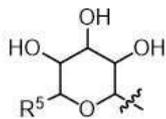
**청구항 11**

제9항에 있어서, 스페이서 단위가 다음을 포함하는, 항체-약물 접합체:



여기서 Z<sub>1</sub>-Z<sub>4</sub>는 탄소 원자 및 질소 원자로 이루어진 군으로부터 임의적으로 선택되고; R<sup>4</sup>는 알킬, 사이클로알킬, 아릴, 및 헤테로아릴로 이루어진 군으로부터 선택되고, 알킬, 사이클로알킬, 아릴, 및 헤테로아릴은 각각 독립적으로 알킬, 알콕시, 할로젠, 아미노, 시아노, 니트로, 하이드록시, 하이드록시알킬, 사이클로알킬, 헤테로사이클로알킬, 아릴, 및 헤테로아릴로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상의 치환기로 임의적으로 치환되고; R<sup>1</sup> 및 R<sup>2</sup>는 각각 독립적으로 수소, C<sub>1-6</sub> 알킬, 할로알킬, 및 C<sub>3-6</sub> 사이클로알킬, 바람직하게는 수소로 이루어진 군으로부터 선택되거나; R<sup>1</sup> 및 R<sup>2</sup>는 이들이 부착된 탄소 원자와 함께 C<sub>3-6</sub> 사이클로알킬을 형성하고; X는 -O- 및 -NH-로 이루어진 군으로부터 선택되고; L은 1 내지 4의 정수로 이루어진 군으로부터 선택되고;

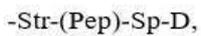
Q는 V-E이고, V-E는 세포내 위치한 글리코시다제에 의해 절단 가능한 글리코시드 결합을 제공하고, E는 -O-, -S- 및 -NR<sup>3</sup>-으로 이루어진 군으로부터 선택되며, 여기서 R<sup>3</sup>은 수소 및 메틸로 이루어진 군으로부터 선택되고;



추가로, V는 R<sup>5</sup>로부터 선택되며, 여기서 R<sup>5</sup>는 -COOH 및 CH<sub>2</sub>OH로 이루어진 군으로부터 선택된다.

**청구항 12**

제1항 내지 제11항 중 어느 한 항에 있어서, L-D가 다음 화학식으로 표시되는 화학 모이어티인, 항체-약물 접합체:



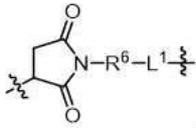
여기서 Str은 Ab에 공유적으로 연결되는 스트레처 단위(stretcher unit)이고,

Sp는 스페이서 단위이고,

Pep는 아미노산 단위로 이루어진 군으로부터 선택된다.

**청구항 13**

제12항에 있어서, Str이 다음 화학식으로 표시되는 화학 모이어티로부터 선택되는, 항체-약물 접합체:



여기서 R<sup>6</sup>은 -W-C(O)-, -C(O)-W-C(O)-, -(CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O)<sub>p1</sub>C(O)-, -(CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O)<sub>p1</sub>CH<sub>2</sub>C(O)-, 및 -(CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O)<sub>p1</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>C(O)-로 이루어진 군으로부터 선택되며, 여기서 W는 C<sub>1-8</sub> 알킬렌, C<sub>1-8</sub> 알킬렌-사이클로알킬, 및 1 내지 8개의 원자를 갖는 선형 헤테로알킬렌으로 이루어진 군으로부터 선택되고, 헤테로알킬렌은 N, O, 및 S로 이루어진 군으로부터 선택된 1 내지 3개의 헤테로원자를 포함하며, 여기서 C<sub>1-8</sub> 알킬렌, C<sub>1-8</sub> 알킬렌-사이클로알킬, 및 선형 헤테로알킬렌은 각각 독립적으로 할로겐, 하이드록시, 시아노, 아미노, 알킬, 클로로알킬, 알콕시, 및 사이클로알킬로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상의 치환기로 임의적으로 추가로 치환되고;

L<sup>1</sup>은 -NR<sup>7</sup>(CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O)<sub>p1</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>C(O)-, -NR<sup>7</sup>(CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O)<sub>p1</sub>CH<sub>2</sub>C(O)-, -S(CH<sub>2</sub>)<sub>p1</sub>C(O)-, -(CH<sub>2</sub>)<sub>p1</sub>C(O)-, 및 화학 결합으로 이루어진 군으로부터 선택되며, 여기서 p1은 1 내지 20의 정수이고, L<sup>1</sup>은 바람직하게는 화학 결합이고; p1은 1 내지 20의 정수이고, R<sup>7</sup>은 수소, 알킬, 할로알킬, 및 하이드록시알킬로 이루어진 군으로부터 선택된다.

**청구항 14**

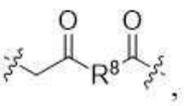
제13항에 있어서, R<sup>6</sup>이 C<sub>1-6</sub> 알킬렌 C(O)-, -(CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>O)<sub>2</sub>C(O)-, -(CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>O)<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>C(O)-, -(CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>O)<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>C(O)-, -(CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>O)<sub>3</sub>C(O)-, 및 -(CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>O)<sub>4</sub>C(O)-로 이루어진 군으로부터 선택되는, 항체-약물 접합체.

**청구항 15**

제13항 또는 제14항에 있어서, 링커 L이 말레이미드-(PEG)<sub>2</sub>-Val-Cit, 말레이미드-(PEG)<sub>6</sub>-Val-Cit, 말레이미드-(PEG)<sub>8</sub>-Val-Cit, 말레이미드-(PEG)<sub>4</sub>-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>C(O)-Val-Iys, 말레이미드-(CH<sub>2</sub>)<sub>5</sub>-Val-Cit, 말레이미드-(CH<sub>2</sub>)<sub>5</sub>-Val-Iys, 말레이미드-(CH<sub>2</sub>)<sub>5</sub>-Gly-Gly-Phe-Gly, 말레이미드-(PEG)<sub>2</sub>-Ala-Ala-Asn, 말레이미드-(PEG)<sub>6</sub>-Ala-Ala-Asn, 말레이미드-(PEG)<sub>8</sub>-Ala-Ala-Asn, 말레이미드-(PEG)<sub>4</sub>-트리아졸-(PEG)<sub>3</sub>-술폰아미드, 말레이미드-(PEG)<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>C(O)-Val-Iys, 말레이미드-(PEG)<sub>4</sub>-트리아졸-(PEG)<sub>3</sub>-술폰아미드, 또는 Mal-(PEG)<sub>4</sub>-트리아졸-(PEG)<sub>3</sub>-디술폰아이드를 포함하는, 항체-약물 접합체.

**청구항 16**

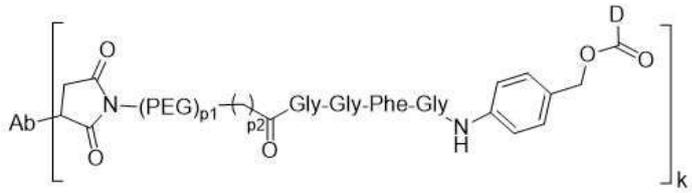
제12항에 있어서, Str이 다음 화학식으로 표시되는 화학 모이어티로부터 선택되는, 항체-약물 접합체:



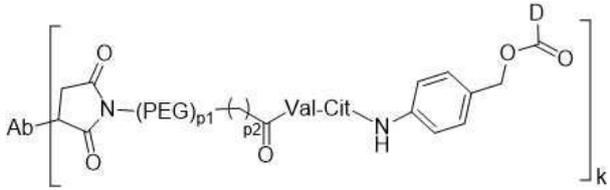
여기서 R<sup>8</sup>은 C<sub>1-10</sub> 알킬렌, C<sub>2-10</sub> 알케닐렌, (C<sub>1-10</sub> 알킬렌)O-, N(R<sup>d</sup>)-(C<sub>2-6</sub> 알킬렌)-N(R<sup>d</sup>), 및 N(R<sup>d</sup>)-(C<sub>2-6</sub> 알킬렌)으로 이루어진 군으로부터 선택되고; 각각의 R<sup>d</sup>는 독립적으로 H 또는 C<sub>1-6</sub> 알킬이다.

**청구항 17**

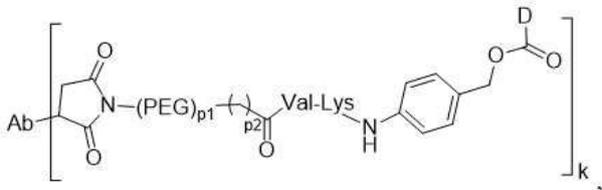
제1항 내지 제15항 중 어느 한 항에 있어서, 항체-약물 접합체가 다음 화학식으로 표시되는, 항체-약물 접합체:



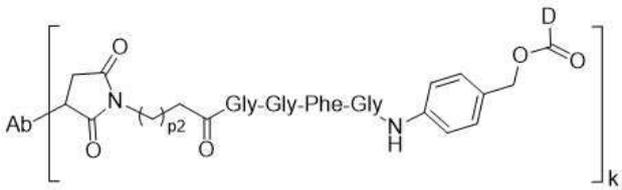
여기서 k는 1 내지 10으로 이루어진 균으로부터 선택되고 정수 또는 소수일 수 있고; p1은 2, 4, 6, 및 8로 이루어진 균으로부터 선택되고; p2는 0, 1, 및 2로 이루어진 균으로부터 선택됨;



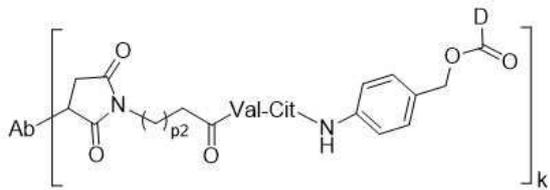
여기서 k는 1 내지 10으로 이루어진 균으로부터 선택되고 정수 또는 소수일 수 있고; p1은 2, 4, 6, 및 8로 이루어진 균으로부터 선택되고; p2는 0, 1, 및 2로 이루어진 균으로부터 선택됨;



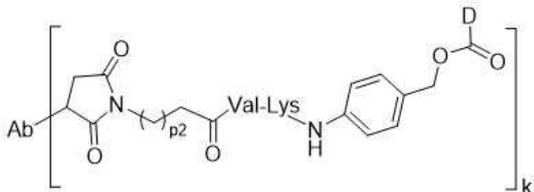
여기서 k는 1 내지 10으로 이루어진 균으로부터 선택되고 정수 또는 소수일 수 있고; p1은 2, 4, 6, 및 8로 이루어진 균으로부터 선택되고; p2는 0, 1, 및 2로 이루어진 균으로부터 선택됨;



여기서 k는 1 내지 10으로 이루어진 균으로부터 선택되고 정수 또는 소수일 수 있고; p2는 1 내지 6의 정수로 이루어진 균으로부터 선택됨;



여기서 k는 1 내지 10으로 이루어진 균으로부터 선택되고 정수 또는 소수일 수 있고; p2는 1 내지 6의 정수로 이루어진 균으로부터 선택됨;



여기서 k는 1 내지 10으로 이루어진 균으로부터 선택되고 정수 또는 소수일 수 있고; p2는 1 내지 6의 정수로 이루어진 균으로부터 선택됨;

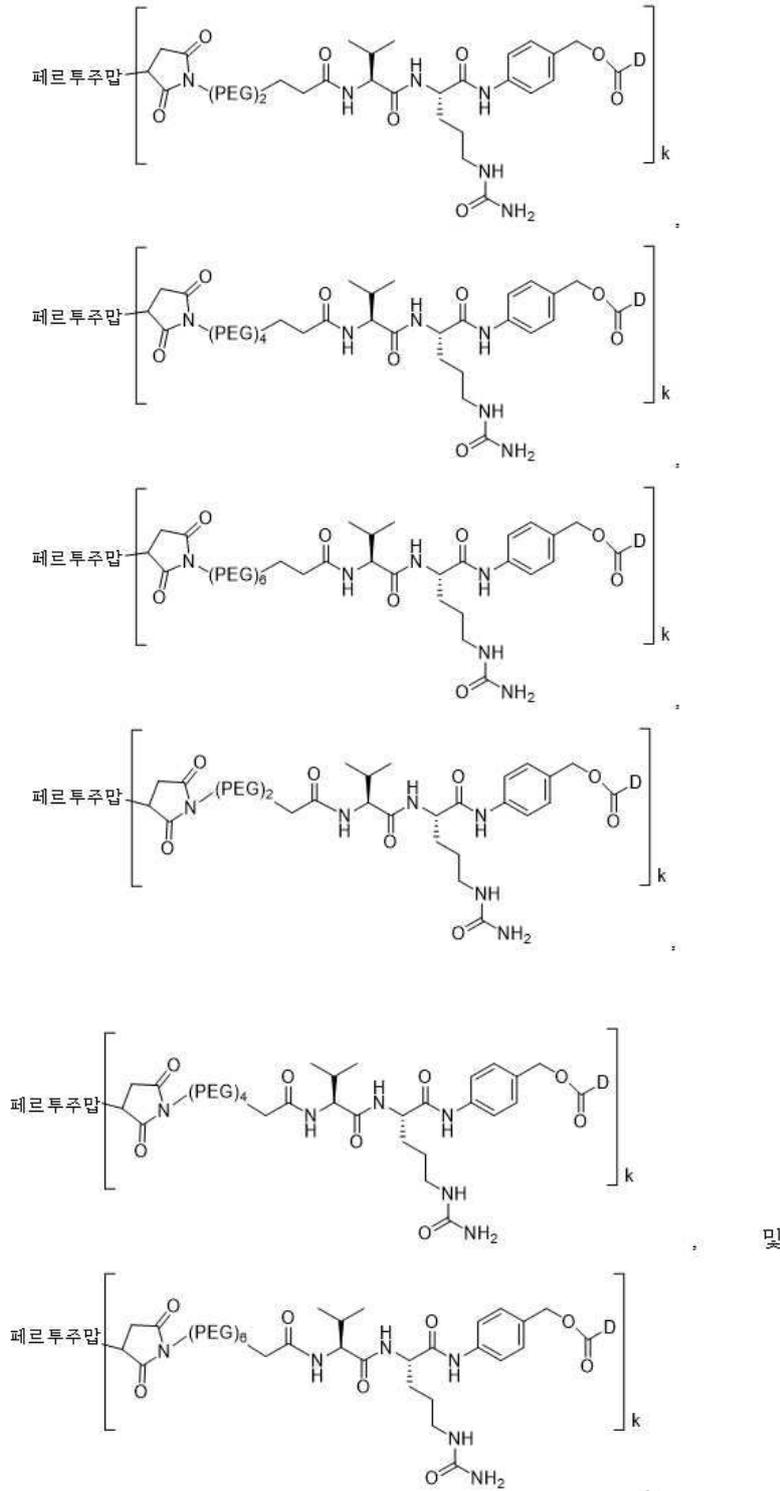
Ab 및 D는 제1항에 정의된 바와 같다.

청구항 18

제1항 내지 제17항 중 어느 한 항에 있어서, HER2 항체가 각각 서열번호: 1 및 2에 제시된 아미노산 서열을 갖는 경쇄 가변 영역 및 중쇄 가변 영역을 포함하고, 바람직하게는, HER2 항체가 각각 서열번호: 3 및 4에 제시된 아미노산 서열을 갖는 경쇄 및 중쇄를 포함하는, 항체-약물 접합체.

청구항 19

제1항 내지 제18항 중 어느 한 항에 있어서, 항체-약물 접합체가 다음 화학식으로 표시되는, 항체-약물 접합체:



여기서 k는 1 내지 10으로 이루어진 군으로부터 선택되고 정수 또는 소수일 수 있다.

**청구항 20**

제1항 내지 제19항 중 어느 한 항에 있어서, k가 2.0 내지 2.5, 2.5 내지 3.5, 및 3.5 내지 5.0으로 이루어진 군으로부터 선택되는, 항체-약물 접합체.

**청구항 21**

제1항 내지 제20항 중 어느 한 항에 따른 항체-약물 접합체의 동위원소 치환된 형태로서, 바람직하게는, 동위원소 치환이 중수소 원자로의 치환인, 동위원소 치환된 형태.

**청구항 22**

약제학적 조성물로서,

치료적 유효량의 제1항 내지 제20항 중 어느 한 항에 따른 항체-약물 접합체 또는 제21항에 따른 동위원소 치환된 형태, 및

약제학적으로 허용되는 담체, 희석제, 또는 부형제

를 포함하는, 약제학적 조성물.

**청구항 23**

종양을 치료 또는 예방하기 위한 약제의 제조에서 제1항 내지 제20항 중 어느 한 항에 따른 항체-약물 접합체, 또는 제21항에 따른 동위원소 치환된 형태, 또는 제22항에 따른 약제학적 조성물의 용도.

**청구항 24**

제23항에 있어서, 종양이 HER2의 도메인 II의 발현과 연관된 암이고, 암이 바람직하게는 유방암(breast cancer), 난소암(ovarian cancer), 자궁경부암(cervical cancer), 자궁암(uterine cancer), 전립선암(prostate cancer), 신장암(kidney cancer), 요로암(urinary tract cancer), 방광암(bladder cancer), 간암(liver cancer), 위암(gastric cancer), 자궁내막암(endometrial cancer), 타액선 암종(salivary gland carcinoma), 식도암(esophageal cancer), 흑색종(melanoma), 신경교종(neuroglioma), 신경모세포종(neuroblastoma), 육종(sarcoma), 폐암(lung cancer), 결장암(colon cancer), 직장암(rectal cancer), 대장암(colorectal cancer), 백혈병(leukemia), 골암(bone cancer), 피부암(skin cancer), 갑상선암(thyroid cancer), 췌장암(pancreatic cancer), 및 림프종(lymphoma)인, 용도.

**발명의 설명**

**기술 분야**

[0001] 본 개시내용은 에리블린(eribulin) 유도체의 약물 접합체에 관한 것이다.

**배경 기술**

[0002] 항체-약물 접합체(ADC)는 단클론 항체 또는 항체 단편을 안정한 화학적 링커 화합물을 통해 생물학적 활성 약물에 연결하여, 정상 세포 및 종양 세포의 표면 항원에 대한 항체의 결합 특이성 및 약물의 높은 효율을 충분히 이용하고, 또한 치료 효과가 좋지 않다는 전자의 단점, 독성 부작용이 심하다는 후자의 단점 등을 피한다. 이는 항체-약물 접합체가 종양 세포에 정확하게 결합할 수 있고 과거 통상적인 화학요법 약물과 비교하여 정상 세포에 대한 효과가 감소했다는 것을 의미한다.

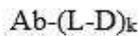
[0003] 최초의 항체-약물 접합체인 마일로타그(Mylotarg)(젬투주맙 오조가미신(gemtuzumab ozogamicin), Wyeth Pharmaceutical Co., Ltd.)가 2000년에 급성 골수성 백혈병(acute myeloid leukemia)의 치료를 위해 미국 FDA에 의해 승인된 이후, 총 164종의 ADC 약물이 임상 단계에 진입했으며, 대부분(n = 100)은 임상 I상, 46종은 임상 II상, 7종은 임상 III상, 그리고 3종은 BLA 적용 단계에 진입했다. 시판 중인 대표적인 3세대 항체-약물 접합체는 Genentech 및 Genetics가 공동 개발한 폴라투주맙 베도틴(polatuzumab vedotin)(상표명 Polivy, 2019년 6월에 시판), Agensys(Astellas의 자회사) 및 Seattle Genetics가 공동 개발한 엔포르투맙 베도틴(enfortumab vedotin)(상표명 Padcev, 2019년 12월에 시판), 및 Daiichi Sankyo가 개발한 팜-트라스투주맙 테룩스테칸(fam-

trastuzumab deruxtecan)(상표명 Enhertu)이다.

[0004] 미세소관은 세포내 이동 및 수송, 세포 신호전달, 및 세포 모양 유지를 포함한 다양한 세포 기능과 연관된 강력한 섬유질 세포골격 단백질이다. 미세소관은 또한 염색체가 2개의 딸 세포로 분열하는 데 필요한 유사분열 방추를 형성함으로써 유사분열 세포 분열에서 중요한 역할을 한다. 모든 세포에서 미세소관의 생물학적 기능은 중합 역학에 의해 대부분 조절되고, 미세소관의 중합은 미세소관의 양쪽 말단에 있는  $\alpha$  및  $\beta$  튜불린 이량체의 가역적 비공유 첨가에 의해 발생한다. 이 동적 거동 및 생성된 미세소관 길이의 제어는 유사분열 방추의 적절한 기능에 필수적이다. 미세소관 역학의 사소한 변화조차도 방추 체크포인트를 수반하고, 유사분열에서 세포 주기 진행을 억제하고, 후속적으로 세포 사멸을 유발한다. 암 세포는 빠르게 분열하므로, 이들은 일반적으로 튜불린에 결합하여 정상 세포보다 정상적인 기능을 파괴하는 화합물에 더 민감하다. 따라서, 튜블린 억제제 및 다른 미세소관 표적화제는 암의 치료를 위한 약물 부류일 것으로 예상된다.

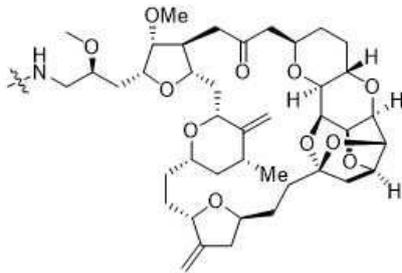
**발명의 내용**

[0005] 본 개시내용은 화학식 (I)의 구조를 갖는 항체-약물 접합체(ADC) 또는 이의 약제학적으로 허용되는 염 또는 용매화물을 제공한다:



(I)

[0006] 여기서 Ab는 HER2의 도메인 II에 결합하는 HER2 항체 또는 이의 항원 결합 단편이고,  
 [0007] L은 Ab를 D에 공유적으로 연결하는 링커이고, k는 1 내지 20(1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 또는 임의의 두 값 사이의 임의의 값 포함)이고;  
 [0008] D는 다음 식으로 제시된다:



[0010] 일부 구현예에서, 항체-약물 접합체  $\text{Ab-(L-D)}_k$ 에서 k는 1 내지 10으로 이루어진 군으로부터 선택될 수 있고 정수 또는 소수일 수 있다.  
 [0011] 일부 구현예에서, 링커는 세포외로 안정하여, ADC가 세포외 환경에 존재하는 경우 온전하게 유지되지만, 암 세포와 같은 세포에서 내재화되는 경우 절단될 수 있도록 한다. 일부 구현예에서, 에리블린 유도체 약물 모이어티는 ADC가 ADC의 항체 모이어티에 특이적인 항원을 발현하는 세포에 들어갈 때 항체 모이어티로부터 절단되고, 절단은 에리블린 유도체의 비변형된 형태를 방출한다.

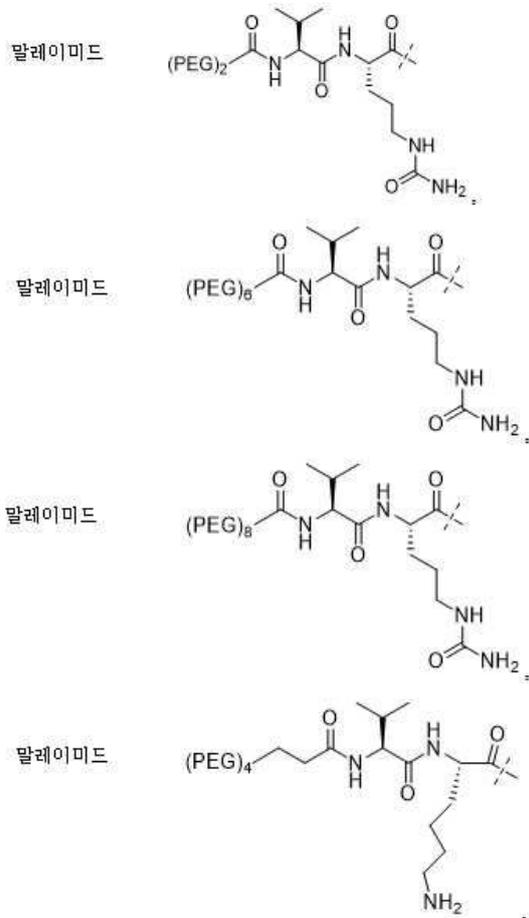
[0012] 일부 구현예에서, 링커 내 절단 가능한 모이어티는 절단 가능한 펩티드 모이어티이다. 일부 구현예에서, 절단 가능한 펩티드 모이어티를 포함하는 ADC는 더 낮은 응집 수준, 개선된 항체 대 약물 비율, 암 세포의 증가된 표적화 사멸, 비암 세포의 감소된 표적의 사멸, 및/또는 다른 절단 가능한 모이어티를 포함하는 ADC에 비해 더 높은 약물 로딩을 보여준다. 일부 구현예에서, 절단 가능한 모이어티의 첨가는 절단 가능하지 않은 링커에 비해 세포독성 및/또는 효능을 증가시킨다. 일부 구현예에서, 절단 가능한 펩티드 모이어티는 효소에 의해 절단될 수 있고, 링커는 효소에 의해 절단될 수 있는 것이다. 일부 구현예에서, 효소는 카텝신이고, 링커는 카텝신에 의해 절단될 수 있는 것이다. 특정 구현예에서, 효소-절단 가능한 링커(예를 들어, 카텝신-절단 가능한 링커)는 다른 절단 메커니즘과 비교하여 위에 기재된 개선된 특성 중 하나 이상을 나타낸다.

[0013] 일부 구현예에서, 링커는 아미노산 단위를 포함하고, 아미노산 단위는 바람직하게는 페닐알라닌, 글리신, 발린, 리신, 시트룰린, 세린, 글루탐산, 및 아스파르트산으로 이루어진 군으로부터 선택된 2 내지 7개의 아미노산으로 이루어진 펩티드 잔기, 보다 바람직하게는 발린-시트룰린(Val-Cit), 알라닌-알라닌-아스파라긴(Ala-Ala-Asn),

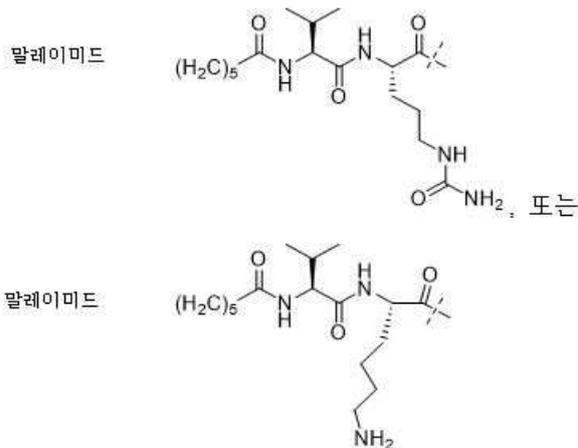
[0014] 일부 구현예에서, 링커는 아미노산 단위를 포함하고, 아미노산 단위는 바람직하게는 페닐알라닌, 글리신, 발린, 리신, 시트룰린, 세린, 글루탐산, 및 아스파르트산으로 이루어진 군으로부터 선택된 2 내지 7개의 아미노산으로 이루어진 펩티드 잔기, 보다 바람직하게는 발린-시트룰린(Val-Cit), 알라닌-알라닌-아스파라긴(Ala-Ala-Asn),

글리신-글리신-리신(Gly-Gly-Lys), 발린-리신(Val-Lys), 발린-알라닌(Val-Ala), 발린-페닐알라닌(Val-Phe), 및 글리신-글리신-페닐알라닌-글리신(Gly-Gly-Phe-Gly)을 포함한다.

[0015] 일부 구현예에서, 본 개시내용의 아미노산 단위를 포함하는 링커는 다음으로 이루어진 군으로부터 선택된다:



[0016]



[0017]

[0018] 일부 구현예에서, 아미노산 단위는 발린-시트룰린(Val-Cit)을 포함한다. 일부 구현예에서, Val-Cit를 포함하는 ADC는 증가된 안정성, 감소된 표적외 세포 사멸, 증가된 표적화 세포 사멸, 더 낮은 응집 수준, 및/또는 다른 아미노산 단위 또는 다른 절단 가능한 모이어티를 포함하는 ADC에 비해 더 높은 약물 로딩을 보여준다.

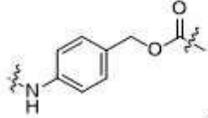
[0019] 또 다른 양태에서, 일부 구현예에 의해 제공되는 링커는 절단 가능한 술폰아미드 모이어티를 포함하고, 링커는 환원된 조건 하에 절단될 수 있다.

[0020] 일부 구현예에서, 링커는 절단 가능한 디설파이드 모이어티를 포함하고, 링커는 환원된 조건 하에 절단될 수 있

다.

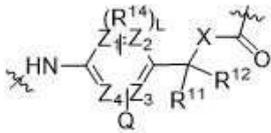
[0021] 또 다른 양태에서, 본 개시내용의 항체 접합체 내 링커는 에리블린 유도체 D를 절단 가능한 모이어티에 연결하는 적어도 하나의 스페이서 단위를 포함한다. 일부 구현예에서, 링커는 D에 연결하는 스페이서 단위를 포함한다.

[0022] 일부 구현예에서, 스페이서 단위는 *p*-아미노벤질옥시카르보닐(pAB)을 포함한다:



[0023]

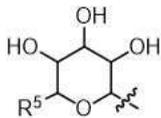
[0024] 일부 구현예에서, 스페이서 단위는 다음을 포함한다:



[0025]

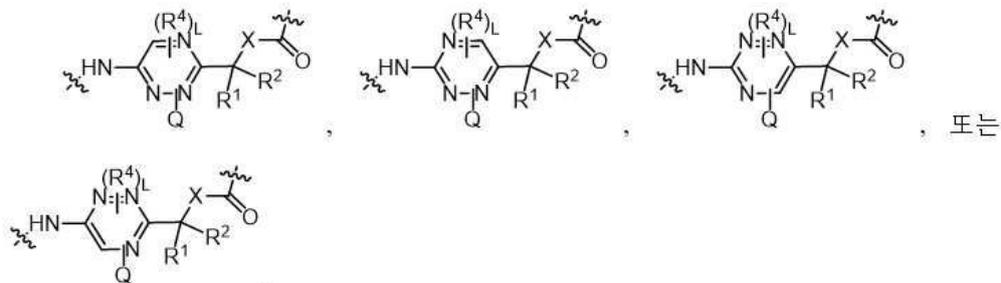
[0026] 여기서 Z<sub>1</sub>-Z<sub>4</sub>는 각각 독립적으로 탄소 원자 및 질소 원자로 이루어진 군으로부터 선택되고; R<sup>4</sup>는 알킬, 사이클로알킬, 아릴, 및 헤테로아릴로 이루어진 군으로부터 선택되고, 알킬, 사이클로알킬, 아릴, 및 헤테로아릴은 각각 독립적으로 알킬, 알콕시, 할로젠, 아미노, 시아노, 니트로, 하이드록시, 하이드록시알킬, 사이클로알킬, 헤테로사이클로알킬, 아릴, 및 헤테로아릴로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상의 치환기로 임의적으로 치환되고; R<sup>1</sup> 및 R<sup>2</sup>는 각각 독립적으로 수소, C<sub>1-6</sub> 알킬, 할로알킬, 및 C<sub>3-6</sub> 사이클로알킬, 바람직하게는 수소로 이루어진 군으로부터 선택되거나; R<sup>1</sup> 및 R<sup>2</sup>는 이들이 부착된 탄소 원자와 함께 C<sub>3-6</sub> 사이클로알킬을 형성하고; X는 -O- 및 -NH-로 이루어진 군으로부터 선택되고; L은 1 내지 4의 정수로 이루어진 군으로부터 선택되고;

[0027] Q는 V-E이고, V-E는 세포내에 위치한 글리코시다제에 의해 절단 가능한 글리코시드 결합을 제공하고, E는 -O-, -S-, 및 -NR<sup>3</sup>-으로 이루어진 군으로부터 선택되며, 여기서 R<sup>3</sup>은 수소 및 메틸로 이루어진 군으로부터 선택되고;



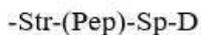
추가로, V는 로부터 선택되며, 여기서 R<sup>5</sup>는 -COOH 및 CH<sub>2</sub>OH로 이루어진 군으로부터 선택된다. 일부 구현예에서, V는 -COOH로부터 선택된다.

[0028] 일부 구현예에서, 스페이서 단위는 다음을 포함한다:



[0029]

[0030] 또 다른 양태에서, 본 개시내용의 항체 접합체(ADC) 내 L-D는 다음 화학식으로 표시되는 화학 모이어티이다:



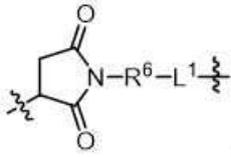
[0031]

[0032] 여기서 Str은 Ab에 공유적으로 연결되는 스트레처 단위(stretcher unit)이고,

[0033] Sp는 스페이서 단위이고,

[0034] Pep는 아미노산 단위로 이루어진 군으로부터 선택된다.

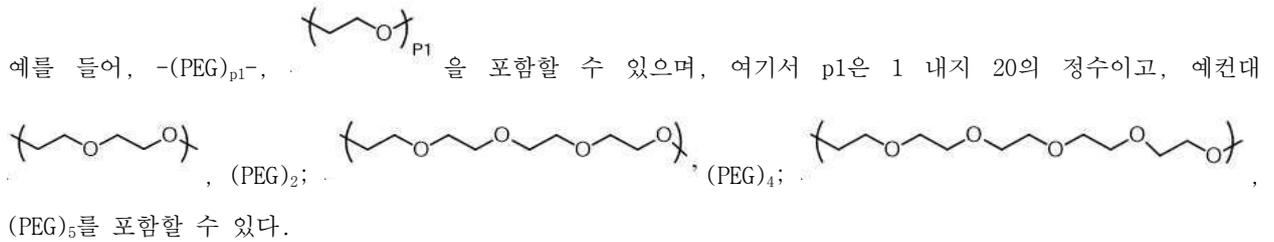
[0035] 또 다른 양태에서, ADC 내 Str은 다음 화학식으로 표시되는 화학 모이어티로부터 선택된다:



[0036] 여기서 R<sup>6</sup>은 -W-C(O)-, -C(O)-W-C(O)-, (CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O)<sub>p1</sub>C(O)-, (CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O)<sub>p1</sub>CH<sub>2</sub>C(O)-, 및 (CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O)<sub>p1</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>C(O)-로 이루어진 군으로부터 선택되며, 여기서 W는 C<sub>1-8</sub> 알킬렌, C<sub>1-8</sub> 알킬렌-사이클로알킬, 및 1 내지 8개의 원자를 갖는 선형 헤테로알킬렌으로 이루어진 군으로부터 선택되고, 헤테로알킬렌은 N, O, 및 S로 이루어진 군으로부터 선택된 1 내지 3개의 헤테로원자를 포함하며, 여기서 C<sub>1-8</sub> 알킬렌, C<sub>1-8</sub> 알킬렌-사이클로알킬, 및 선형 헤테로알킬렌은 각각 독립적으로 할로젠, 하이드록시, 시아노, 아미노, 알킬, 클로로알킬, 알콕시, 및 사이클로알킬로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상의 치환기로 임의적으로 추가로 치환되고;

[0037] L<sup>1</sup>은 -NR<sup>7</sup>(CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O)<sub>p1</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>C(O)-, -NR<sup>7</sup>(CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O)<sub>p1</sub>CH<sub>2</sub>C(O)-, -S(CH<sub>2</sub>)<sub>p1</sub>C(O)-, -(CH<sub>2</sub>)<sub>p1</sub>C(O)-, 및 화학 결합, 바람직하게는 화학 결합으로 이루어진 군으로부터 선택되며, 여기서 p1은 1 내지 20의 정수이고, R<sup>7</sup>은 수소, 알킬, 할로알킬, 및 하이드록시알킬로 이루어진 군으로부터 선택된다.

[0038] 일부 구현예에서, 링커는 적어도 하나의 폴리에틸렌 글리콜(PEG) 모이어티를 포함할 수 있다. PEG 모이어티는

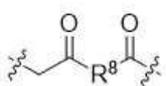


[0039] 일부 구현예에서, 링커의 스페이서 단위는 (PEG)<sub>2</sub>를 포함한다. 일부 구현예에서, 더 짧은 스페이서 단위(예를 들어, (PEG)<sub>2</sub>)를 포함하는 ADC는 더 낮은 응집 수준 및/또는 더 짧은 링커 길이에도 불구하고 더 긴 스페이서 단위(예를 들어, (PEG)<sub>8</sub>)를 포함하는 ADC에 비해 더 높은 약물 로딩을 보여준다.

[0040] 일부 구현예에서, 항체-약물 접합체 내 R<sup>7</sup>은 C<sub>1-6</sub> 알킬렌 C(O)-, -(CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>O)<sub>2</sub>C(O)-, -(CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>O)<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>C(O)-, -(CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>O)<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>C(O)-, -(CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>O)<sub>3</sub>C(O)-, 및 -(CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>O)<sub>4</sub>C(O)-로 이루어진 군으로부터 선택된다.

[0041] 일부 구현예에서, 항체-약물 접합체 내 링커 L은 말레이미드-(PEG)<sub>2</sub>-Val-Cit, 말레이미드-(PEG)<sub>6</sub>-Val-Cit, 말레이미드-(PEG)<sub>8</sub>-Val-Cit, 말레이미드-(PEG)<sub>4</sub>-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>C(O)-Val-lys, 말레이미드-(CH<sub>2</sub>)<sub>5</sub>-Val-Cit, 말레이미드-(CH<sub>2</sub>)<sub>5</sub>-Val-lys, 말레이미드-(CH<sub>2</sub>)<sub>5</sub>-Gly-Gly-Phe-Gly, 말레이미드-(PEG)<sub>2</sub>-Ala-Ala-Asn, 말레이미드-(PEG)<sub>6</sub>-Ala-Ala-Asn, 말레이미드-(PEG)<sub>8</sub>-Ala-Ala-Asn, 말레이미드-(PEG)<sub>4</sub>-트리아졸-(PEG)<sub>3</sub>-술폰아미드, 말레이미드-(PEG)<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>C(O)-Val-lys, 말레이미드-(PEG)<sub>4</sub>-트리아졸-(PEG)<sub>3</sub>-술폰아미드, 또는 Mal-(PEG)<sub>4</sub>-트리아졸-(PEG)<sub>3</sub>-디술폰아미드를 포함한다.

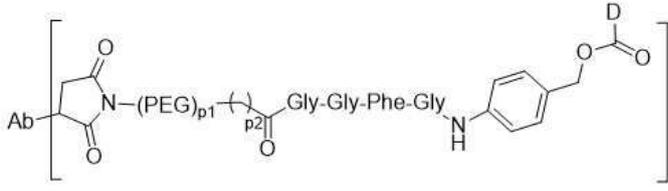
[0042] 또 다른 양태에서, 일부 구현예에 의해 제공되는 항체-약물 접합체 내 Str은 아래 화학식으로 표시되는 화학 모이어티로부터 선택된다:



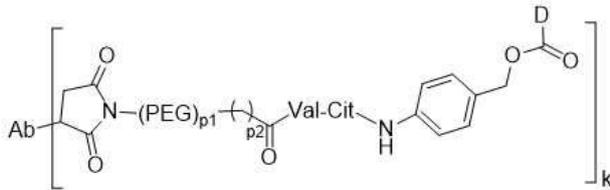
[0043] 여기서 R<sup>8</sup>은 C<sub>1-10</sub> 알킬렌, C<sub>2-10</sub> 알케닐, (C<sub>1-10</sub> 알킬렌)O-, N(R<sup>d</sup>)-(C<sub>2-6</sub> 알킬렌)-N(R<sup>d</sup>), 및

$N(R^d)-(C_{2-6}$  알킬렌)으로 이루어진 군으로부터 선택되고; 각각의  $R^d$ 는 독립적으로 H 또는  $C_{1-6}$  알킬이다.

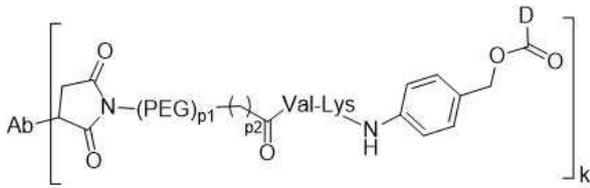
[0044] 일부 구현예에서, 항체-약물 접합체는 다음 화학식으로 표시된다:



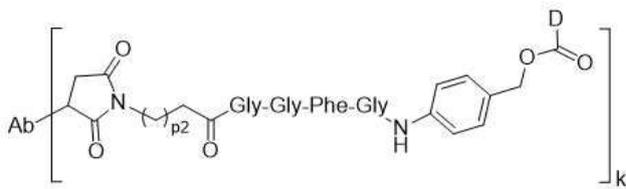
[0045] 여기서 k는 1 내지 10으로 이루어진 군으로부터 선택되고 정수 또는 소수일 수 있고; p1은 2, 4, 6, 및 8로 이루어진 군으로부터 선택되고; p2는 0, 1, 및 2로 이루어진 군으로부터 선택됨;



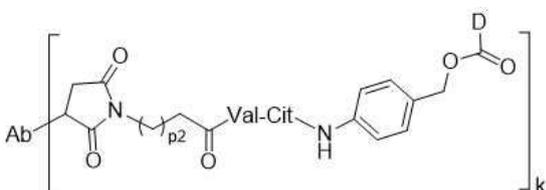
[0046] 여기서 k는 1 내지 10으로 이루어진 군으로부터 선택되고 정수 또는 소수일 수 있고; p1은 2, 4, 6, 및 8로 이루어진 군으로부터 선택되고; p2는 0, 1, 및 2로 이루어진 군으로부터 선택됨;



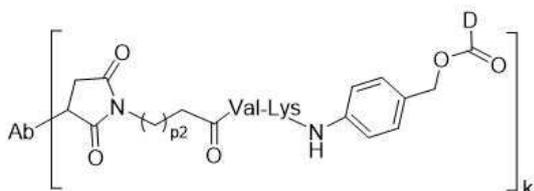
[0047] 여기서 k는 1 내지 10으로 이루어진 군으로부터 선택되고 정수 또는 소수일 수 있고; p1은 2, 4, 6, 및 8로 이루어진 군으로부터 선택되고; p2는 0, 1, 및 2로 이루어진 군으로부터 선택됨;



[0048] 여기서 k는 1 내지 10으로 이루어진 군으로부터 선택되고 정수 또는 소수일 수 있고; p2는 1 내지 6의 정수로 이루어진 군으로부터 선택됨;



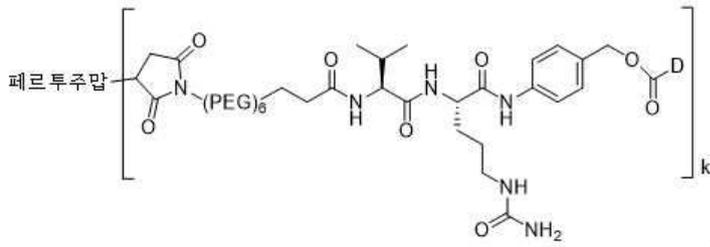
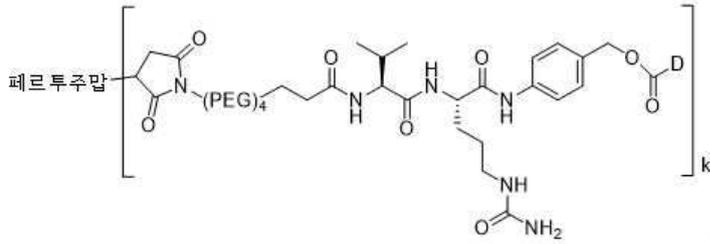
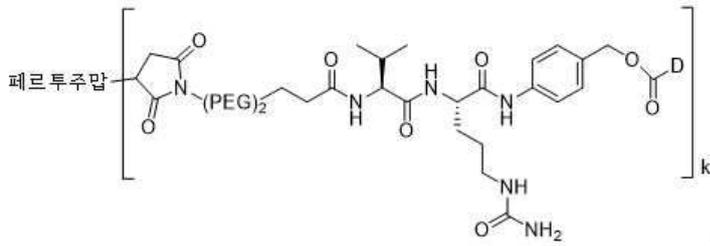
[0049] 여기서 k는 1 내지 10으로 이루어진 군으로부터 선택되고 정수 또는 소수일 수 있고; p2는 1 내지 6의 정수로 이루어진 군으로부터 선택됨;



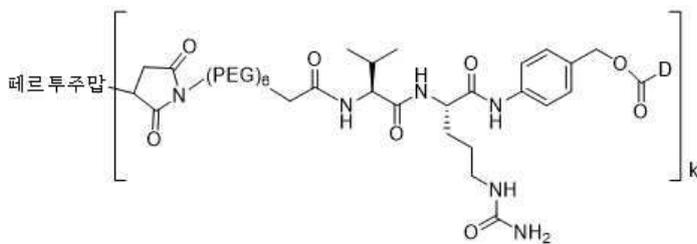
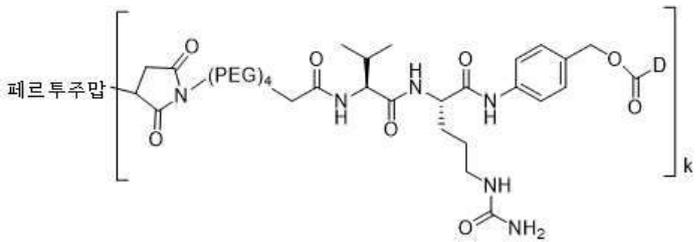
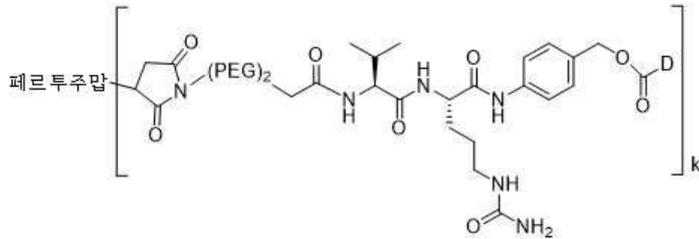
[0050] 여기서 k는 1 내지 10으로 이루어진 군으로부터 선택되고 정

수 또는 소수일 수 있고; p2는 1 내지 6의 정수로 이루어진 군으로부터 선택됨.

[0051] 추가로, 본 개시내용의 항체-약물 접합체(ADC)는 다음으로 이루어진 군으로부터 선택된다:



[0052]



[0053]

[0054] 여기서 k는 1 내지 10으로 이루어진 군으로부터 선택되고 정수 또는 소수일 수 있다.

[0055] 위에 기재된 HER2의 도메인 II가 결합하는 HER2 항체 또는 이의 항원 결합 단편의 중쇄 가변 영역 및 경쇄 가변

영역의 서열은 아래에 제시된다:

[0056] 경쇄 가변 영역

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCKASQDVSIGVAWYQQKPGKAPKLLIYSASYRY  
TGVPSRFSGSGSGTDFLTISLQPEDFATYYCQQYYIYPYTFGQGTKVEIK

[0057]

[0058] 서열번호: 1

[0059] 중쇄 가변 영역

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFTDYTMDWVRQAPGKGLEWVADVN  
PNSGGSIIYNQRFKGRFTLSVDRSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARNLGPSFYFDYW  
GQGTLVTVSS

[0060]

[0061] 서열번호: 2.

[0062] 다음은 페르투주맵의 서열이다:

[0063] 경쇄

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCKASQDVSIGVAWYQQKPGKAPKLLIYSASYRY  
TGVPSRFSGSGSGTDFLTISLQPEDFATYYCQQYYIYPYTFGQGTKVEIKRTVAAPS  
VFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDS  
TYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

[0064]

[0065] 서열번호: 3

[0066] 중쇄

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFTDYTMDWVRQAPGKGLEWVADVN  
PNSGGSIIYNQRFKGRFTLSVDRSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARNLGPSFYFDYW  
GQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTS  
GVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKT  
HTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDG  
VEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISK  
AKGQPREPQVYITLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTP  
PVLDSDDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVDFCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

[0067]

[0068] 서열번호: 4.

[0069] 다음은 트라스투주맵의 서열이다:

[0070] 경쇄

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDVNTAVAWYQQKPGKAPKLLIYSASFLY  
SGVPSRFSGSRSGTDFLTISLQPEDFATYYCQQHYTPPTFGQGTKVEIKRTVAAPSV  
FIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDST  
YLSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

[0071]

[0072] 서열번호: 5

[0073]

중쇄

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFMNIDTYIHWRQAPGKGLEWVARIYPT  
 NGYTRYADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCSRWGGDGFYAMDY  
 WGQGTILVTVSSASTKGPSVFLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGAL  
 TSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKEPKSCD  
 KTHTCPPCPAPELGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYV  
 DGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKT  
 ISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKT  
 TPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

[0074]

[0075]

서열번호: 6.

[0076]

일부 구현예에서, 본 개시내용의 항체 접합체에서 k는 2.0, 2.1, 2.2, 2.3, 2.4, 2.5, 또는 임의의 두 값 사이의 값을 포함한 2.0 내지 2.5로부터 선택된다.

[0077]

일부 다른 구현예에서, 본 개시내용의 항체 접합체에서 k는 2.5, 2.6, 2.7, 2.8, 2.9, 3.0, 3.1, 3.2, 3.3, 3.4, 3.6, 3.7, 3.8, 3.9, 4.0, 또는 임의의 두 값 사이의 값을 포함한 2.5 내지 3.5로부터 선택된다.

[0078]

일부 다른 구현예에서, 본 개시내용의 항체 접합체에서 k는 3.5, 3.6, 3.7, 3.8, 3.9, 4.0, 4.1, 4.2, 4.3, 4.4, 4.5, 4.6, 4.7, 4.8, 4.9, 5.0, 또는 임의의 두 값 사이의 값을 포함한 3.5 내지 5.0으로부터 선택된다.

[0079]

또 다른 양태에서, 본 개시내용은 또한 위에 기재된 항체 접합체의 동위원소 치환된 형태를 제공한다. 일부 구현예에서, 동위원소 치환된 형태는 중수소 원자로의 치환에 의해 획득된다.

[0080]

또 다른 양태에서, 본 개시내용은 또한 치료적 유효량의 위에 기재된 항체-약물 접합체 또는 이의 동위원소 치환된 형태 및 약제학적으로 허용되는 담체, 희석제, 또는 부형제를 포함하는 약제학적 조성물을 제공한다.

[0081]

일부 구현예에서, 약제학적 조성물의 단위 용량은 0.001 mg-1000 mg이다.

[0082]

특정 구현예에서, 약제학적 조성물은 조성물의 총 중량을 기준으로 0.01%-99.99%의 위에 기재된 항체-약물 접합체 또는 이의 동위원소 치환된 형태를 포함한다. 특정 구현예에서, 약제학적 조성물은 0.1%-99.9%의 위에 기재된 항체-약물 접합체 또는 이의 동위원소 치환된 형태를 포함한다. 특정 구현예에서, 약제학적 조성물은 0.5%-99.5%의 위에 기재된 항체-약물 접합체 또는 이의 동위원소 치환된 형태를 포함한다. 특정 구현예에서, 약제학적 조성물은 1%-99%의 위에 기재된 항체-약물 접합체 또는 이의 동위원소 치환된 형태를 포함한다. 특정 구현예에서, 약제학적 조성물은 2%-98%의 위에 기재된 항체-약물 접합체 또는 이의 동위원소 치환된 형태를 포함한다.

[0083]

특정 구현예에서, 약제학적 조성물은 조성물의 총 중량을 기준으로 0.01-99.99%의 약제학적으로 허용되는 부형제를 포함한다. 특정 구현예에서, 약제학적 조성물은 0.1-99.9%의 약제학적으로 허용되는 부형제를 포함한다. 특정 구현예에서, 약제학적 조성물은 0.5%-99.5%의 약제학적으로 허용되는 부형제를 포함한다. 특정 구현예에서, 약제학적 조성물은 1%-99%의 약제학적으로 허용되는 부형제를 포함한다. 특정 구현예에서, 약제학적 조성물은 2%-98%의 약제학적으로 허용되는 부형제를 포함한다.

[0084]

본 개시내용은 또한 종양을 치료 또는 예방하기 위한 약제의 제조에서 위에 기재된 항체-약물 접합체 또는 약제학적 조성물의 용도를 제공한다. 일부 구현예에서, 종양은 HER2의 도메인 II의 발현과 연관된 암이다.

[0085]

본 개시내용은 또한 암을 치료 및/또는 예방하기 위한 약제의 제조에서 위에 기재된 항체-약물 접합체 또는 약제학적 조성물의 용도를 제공한다. 일부 구현예에서, 암은 유방암(breast cancer), 난소암(ovarian cancer), 자궁경부암(cervical cancer), 자궁암(uterine cancer), 전립선암(prostate cancer), 신장암(kidney cancer), 요로암(urinary tract cancer), 방광암(bladder cancer), 간암(liver cancer), 위암(gastric cancer), 자궁내막암(endometrial cancer), 타액선 암종(salivary gland carcinoma), 식도암(esophageal cancer), 흑색종(melanoma), 신경교종(neuroglioma), 신경모세포종(neuroblastoma), 육종(sarcoma), 폐암(lung cancer), 결장암(colon cancer), 직장암(rectal cancer), 대장암(colorectal cancer), 백혈병(leukemia), 골암(bone cancer), 피부암(skin cancer), 갑상선암(thyroid cancer), 췌장암(pancreatic cancer), 및 림프종(lymphoma)으로 이루어진 군으로부터 선택된다.

[0086]

본 개시내용은 또한 환자에게 치료적 유효량의 위에 기재된 항체-약물 접합체 또는 이의 동위원소 치환된 형태

또는 위에 기재된 약제학적 조성물을 투여하는 것을 포함하는, 환자에서 HER2의 도메인 II의 발현과 연관된 암을 치료 또는 예방하는 방법을 제공한다.

[0087] 본 개시내용은 또한 HER2의 도메인 II의 발현과 연관된 암을 치료 또는 예방하는 데 사용하기 위한 위에 기재된 항체-약물 접합체 또는 이의 동위원소 치환된 형태 또는 위에 기재된 약제학적 조성물을 제공한다.

[0088] 활성 화합물은 임의의 적합한 경로에 의한 투여에 적합한 형태, 바람직하게는 단위 용량 형태, 또는 환자가 자기-투여할 수 있는 단위 용량의 형태로 제형화될 수 있다. 본 발명의 화합물 또는 조성물의 단위 용량은 정제, 캡슐, 샤셰(cachet), 바이알, 분말, 과립, 로젠지(lozenge), 좌제, 재생 분말, 또는 액체 제형의 형태로 표현될 수 있다.

[0089] **발명의 상세한 설명**

[0090] 달리 정의되지 않는 한, 본원에서 사용되는 모든 기술적 및 과학적 용어는 본 개시내용이 속하는 분야의 숙련자에 의해 통상적으로 이해되는 것과 동일한 의미를 갖는다. 본 개시내용의 것과 유사하거나 동등한 임의의 방법 및 재료가 또한 본 개시내용을 구현하거나 테스트하는 데 사용될 수 있지만, 바람직한 방법 및 재료가 본원에 기재된다. 본 개시내용을 기재하고 청구하는 데 있어서, 다음 용어는 아래 정의에 따라 사용된다.

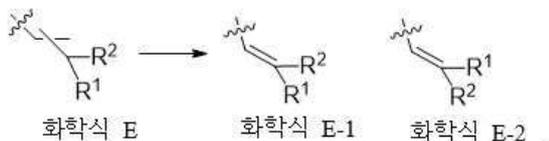
[0091] 상표명이 본 개시내용에서 사용되는 경우, 출원인은 상표명 하에 상용 제품의 제형을 포함하고, 상표명 하에 상용 제품의 비특히 약물 및 활성 약물 구성요소를 포함하는 것을 의도한다.

[0092] 달리 언급되지 않는 한, 명세서 및 청구범위에 사용되는 용어는 다음 의미를 갖는다.

[0093] 본 개시내용의 화합물은 특이적 기하학적 또는 입체이성질체 형태로 존재할 수 있다. 본 개시내용은 시스(cis) 및 트랜스(trans) 이성질체, (-)- 및 (+)-거울상이성질체, (R)- 및 (S)-거울상이성질체, 부분입체이성질체, (D)-이성질체, (L)-이성질체, 및 라세믹 혼합물 및 이의 다른 혼합물, 예컨대 거울상이성질체적으로 또는 부분입체이성질체적으로 풍부한 혼합물을 포함한 이러한 모든 화합물을 포괄하며, 이들 모두는 본 개시내용의 범위 내에 있다. 추가적인 비대칭 탄소 원자는 알킬기와 같은 치환기에 존재할 수 있다. 이러한 모든 이성질체 및 이의 혼합물은 본 개시내용의 범위 내에 포함된다. 비대칭 탄소 원자를 함유하는 본 개시내용의 화합물은 광학적 활성 순수 형태 또는 라세믹 형태로 단리될 수 있다. 광학적 활성 순수 형태는 라세믹 혼합물로부터 단리될 수 있거나 키랄 출발 물질 또는 키랄 시약을 사용하여 합성될 수 있다.

[0094] 광학적 활성 (R)- 및 (S)-거울상이성질체, 및 D- 및 L-이성질체는 키랄 합성, 키랄 시약 또는 다른 통상적인 기술에 의해 제조될 수 있다. 본 개시내용의 특정 화합물의 하나의 거울상이성질체가 바람직한 경우, 이는 비대칭 합성 또는 키랄 보조제를 사용한 유도체화에 의해 제조될 수 있으며, 여기서 부분입체이성질체의 생성된 혼합물은 분리되고 보조기는 절단되어 원하는 순수 거울상이성질체를 제공한다. 대안적으로, 분자가 염기성 작용기(예를 들어, 아미노) 또는 산성 작용기(예를 들어, 카르복실)를 함유하는 경우, 부분입체이성질체의 염은 적절한 광학적 활성 산 또는 염기로 형성된 후, 당업계에 알려진 통상적인 방법에 의해 부분입체이성질체를 분리하고, 순수 거울상이성질체는 회수에 의해 수득된다. 게다가, 거울상이성질체 및 부분입체이성질체의 분리는 일반적으로 키랄 정지상을 사용하여, 임의적으로 화학적 유도체화와 조합하여(예를 들어, 아민으로부터 카르바메이트 형성) 크로마토그래피에 의해 달성된다.

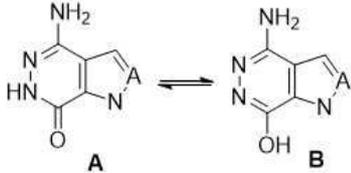
[0095] 본 개시내용의 화합물의 화학 구조에서, 결합 “”은 명시되지 않은 배열을 나타내며; 즉, 키랄 이성질체가 화학 구조에 존재하는 경우, 결합 “”은 “” 또는 “” 일 수 있거나, “” 및 “”의 배열을 모두 함유할 수 있다. 결합 “”은 시스(E) 또는 트랜스(Z) 배열을 포함한 명시되지 않은 배열을 나타낸다. 또는 본원에 기재된 “”는 이중 결합을 지칭하고, 이 결합을 통한 결합을 특징으로 하는 구조는 "시스 이성질체", "트랜스 이성질체" 또는 "임의의 비율의 시스 및 트랜스 이성질체의 혼합물"일 수 있다. 예를 들어, 화학식 E는 화학식 E-1, 화학식 E-2, 또는 임의의 비율의 둘 다의 혼합물을 나타낸다:



[0096]

[0097] 본원에 기재된 화합물의 화학 구조에서, 결합 “”은 배열로 명시되지 않으며; 즉, 이는 Z 배열 또는 E 배열 일 수 있거나, 두 배열을 함유할 수 있다.

[0098] 본 개시내용의 화합물 및 중간체는 또한 상이한 호변이성질체 형태로 존재할 수 있고, 이러한 형태는 모두 본 개시내용의 범위 내에 포함된다. 용어 "호변이성질체" 또는 "호변이성질체 형태"는 낮은 에너지 장벽을 통해 상호 전환될 수 있는 상이한 에너지의 구조적 이성질체를 지칭한다. 예를 들어, 양성자 호변이성질체(양성자 전달 호변이성질체로도 알려짐)는 케토-에놀, 이민-엔아민, 및 락탐-락탐 이성질체화와 같은 양성자 이동을 통한 상호 전환을 포함한다. 락탐-락탐 평형의 예는 아래 제시된 바와 같이 A와 B 사이에 존재한다:



[0099]

[0100] 본 개시내용의 모든 화합물은 형태 A 또는 형태 B로 도출될 수 있다. 모든 호변이성질체 형태는 본 개시내용의 범위 내에 있다. 화합물의 명명법은 임의의 호변이성질체를 배제하지 않는다.

[0101] 본 개시내용은 본원에 언급된 것과 동일하지만 자연에서 일반적으로 발견되는 원자 질량 또는 질량 수와 상이한 원자 질량 또는 질량 수를 갖는 원자에 의해 대체된 하나 이상의 원자를 갖는 동위원소로 표시된 화합물을 추가로 포함한다. 본 개시내용의 화합물에 혼입될 수 있는 동위원소의 예는 <sup>2</sup>H, <sup>3</sup>H, <sup>11</sup>C, <sup>13</sup>C, <sup>14</sup>C, <sup>13</sup>N, <sup>15</sup>N, <sup>15</sup>O, <sup>17</sup>O, <sup>18</sup>O, <sup>31</sup>P, <sup>32</sup>P, <sup>35</sup>S, <sup>18</sup>F, <sup>123</sup>I, <sup>125</sup>I 및 <sup>36</sup>Cl과 같은 수소, 탄소, 질소, 산소, 인, 황, 불소, 요오드, 및 염소의 동위원소를 포함한다.

[0102] 달리 언급되지 않는 한, 위치가 구체적으로 할당된 중수소(D)인 경우, 위치는 중수소의 자연 존재비(이는 0.015%임)보다 적어도 1000배 더 큰 존재비(즉, 적어도 10% 중수소 혼입)를 갖는 중수소로 해석되어야 한다. 예시 화합물은 자연 존재비보다 적어도 1000배, 자연 존재비보다 적어도 2000배, 자연 존재비보다 적어도 3000배, 자연 존재비보다 적어도 4000배, 자연 존재비보다 적어도 5000배, 자연 존재비보다 적어도 6000배, 또는 자연 존재비보다 더 많은 배수로 더 큰 존재비를 갖는 중수소를 포함한다. 본 개시내용은 화학식 (I)의 화합물의 다양한 중수소화 형태를 추가로 포함한다. 탄소 원자에 연결된 각각의 이용 가능한 수소 원자는 독립적으로 중수소 원자에 의해 대체될 수 있다. 당업자는 관련 문헌에 따라 화학식 (I)의 화합물의 중수소화 형태를 합성할 수 있다. 상업적으로 입수 가능한 중수소화 출발 물질은 화학식 (I)의 화합물의 중수소화 형태를 제조하는 데 사용될 수 있거나, 이들은 중수소화 보란, 테트라하이드로푸란 중 삼중수소화 보란, 중수소화 리튬 알루미늄 수소화물, 중수소화 요오도에탄, 중수소화 요오도메탄 등을 포함하나 이에 제한되지 않는 중수소화 시약을 사용한 통상적인 기술을 사용하여 합성될 수 있다.

[0103] "임의적으로" 또는 "임의적"은 후속적으로 기재된 사건 또는 상황이 반드시 일어나지 않지만 발생할 수 있고 사건 또는 상황이 발생하거나 발생하지 않는 경우를 설명에 포함할 수 있다는 것을 의미한다. 예를 들어, "할로젠 또는 시아노로 임의적으로 치환된 C<sub>1-6</sub> 알킬"은 할로젠 또는 시아노가 반드시 일어나지 않지만 존재할 수 있고 알킬이 할로젠 또는 시아노로 치환되는 경우 및 알킬이 할로젠 또는 시아노로 치환되지 않는 경우를 설명에 포함할 수 있다는 것을 의미한다.

[0104] "약제학적 조성물"은 본원에 기재된 화합물 또는 이의 생리학적으로/약제학적으로 허용되는 염 또는 전구약물, 및 다른 화학적 구성요소, 예를 들어, 생리학적으로/약제학적으로 허용되는 담체 및 부형제 중 하나 이상을 함유하는 혼합물을 지칭한다. 약제학적 조성물은 활성 성분의 흡수를 용이하게 하기 위해 유기체에 투여를 촉진하여, 생물학적 활성을 발휘하도록 의도된다.

[0105] "약제학적으로 허용되는 부형제"는 인간 또는 가축에서 사용하기 위해 허용되는 것으로 미국 식품의약국(U.S. Food and Drug Administration)에 의해 승인된 임의의 보조제, 담체, 부형제, 활주제, 감미료, 희석제, 보존제, 염료/착색제, 향미제, 계면활성제, 습윤제, 분산제, 현탁제, 안정화제, 등장성 제제, 용매 또는 유화제를 포함하나 이에 제한되지 않는다.

[0106] 본원에 기재된 "유효량" 또는 "치료적 유효량"은 의학적 장애의 증상 또는 장애를 개선하거나 예방하기에 충분한 양을 포함한다. 유효량은 또한 진단을 허용하거나 용이하게 하기에 충분한 양을 지칭한다. 특정 환자 또는

수의학 대상체에 대한 유효량은 치료될 장애, 환자의 일반적인 건강, 투여 방법 및 경로 및 투여량, 및 부작용 중증도와 같은 인자에 따라 달라질 수 있다. 유효량은 상당한 부작용 또는 독성 효과를 피하기 위한 최대 용량 또는 투여 레지멘일 수 있다.

[0107] 용어 "약물"은 세포독성 약물 또는 면역조절제를 지칭한다. 세포독성 약물은 종양 세포 내에서 정상적인 성장을 방해하기에 충분히 강한 화학 분자를 가질 수 있다. 세포독성 약물은 충분히 높은 농도에서 원칙적으로 종양 세포를 사멸할 수 있지만; 특이성의 부족으로 인해, 세포독성 약물은 종양 세포를 사멸하면서 정상 세포의 세포사멸사를 유발하여, 심한 부작용을 초래할 수 있다. 세포독성 약물은 박테리아, 진균, 식물 또는 동물 기원의 소분자 독소 또는 효소적 활성 독소, 방사성동위원소(예를 들어, At<sup>211</sup>, I<sup>131</sup>, I<sup>125</sup>, Y<sup>90</sup>, Re<sup>186</sup>, Re<sup>188</sup>, Sm<sup>153</sup>, Bi<sup>212</sup>, P<sup>32</sup> 및 Lu의 방사성 동위원소), 독소 약물, 화학요법 약물, 항생제 및 핵산분해 효소와 같은 독소를 포함한다. 면역조절제는 면역 체크포인트 분자의 억제제이다.

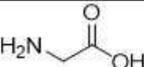
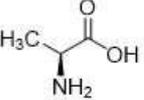
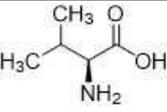
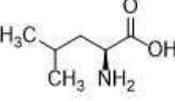
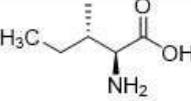
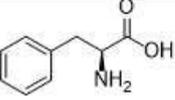
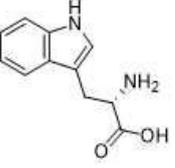
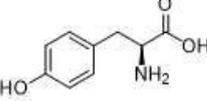
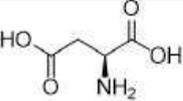
[0108] 용어 "링커", "링커 단위" 또는 "링커 단편"은 화학 구조적 단편 또는 결합을 지칭하며, 이는 한쪽 말단에서 리간드에 연결되어 있고 다른 쪽 말단에서 약물에 연결되어 있으며, 또한 다른 링커에 연결된 다음 약물에 연결될 수 있다.

[0109] 링커는 하나 이상의 링커 구성요소를 포함할 수 있다. 예시적인 링커 구성요소는 6-말레이미도카프로일(MC), 말레이미도프로피오닐(MP), 발린-시트룰린(Val-Cit 또는 vc), 알라닌-페닐알라닌(ala-phe), *p*-아미노벤질옥시카르보닐(PAB), 및 링커 시약에 대한 커플링으로부터 유도된 것들: *N*-숙신이미딜 4-(2-피리딜티오)펜타노에이트(SPP), *N*-숙신이미딜 4-(*N*-말레이미도메틸)사이클로hex산-1 카르복실레이트(SMCC, 본원에서 MCC로도 언급됨), 및 *N*-숙신이미딜(4-요오도-아세틸)아미노벤조에이트(SIAB)를 포함한다. 링커는 스트레처 단위, 스페이서 단위, 아미노산 단위 및 연장 단위를 포함할 수 있다. 링커는 US2005-0238649A1에 기재된 것들과 같은 당업계에서 알려진 방법을 사용하여 합성될 수 있다. 링커는 세포 내 약물 방출을 선호하는 "절단 가능한 링커"일 수 있다. 예를 들어, 산 불안정한 링커(예를 들어, 하이드라존), 프로테아제 민감성(예를 들어, 펩티다제 민감성) 링커, 광불안정성 링커, 디메틸 링커 또는 디술폰아이드 함유 링커가 사용될 수 있다(Chari et al., *Cancer Research* 52: 127-131(1992); 미국 특허 번호 5,208,020).

[0110] 용어 "스트레처 단위"는 한쪽 말단에서 탄소 원자를 통해 항체에 공유적으로 연결되고 다른 쪽 말단에서 아미노산 단위, 디술폰아이드 모이어티, 술폰아미드 모이어티 또는 비-펩티드 화학 모이어티에 연결되어 있는 화학 구조적 단편을 지칭한다.

[0111] 용어 "스페이서 단위"는 세포독성 약물이 아미노산 단위에 선택적으로 연결되는 방식으로 아미노산 단위를 세포독성 약물에 커플링하여 항체-약물 접합체를 형성하는 데 사용될 수 있는 이작용성 화합물 구조적 단편이다.

[0112] 용어 "아미노산"은 분자 구조에 아미노 및 카르복실기를 함유하고 아미노 및 카르복실 둘 다 -CH- 구조에 직접 연결되어 있는 유기 화합물을 지칭한다. 일반식은 H<sub>2</sub>NCHR<sub>1</sub>COOH이며, 여기서 R은 H, 치환 또는 비치환된 알킬 등이다. 아미노산은 카르복실산에서 아미노가 연결된 탄소 원자의 위치에 따라 α, β, γ, δ, ε...-아미노산으로 분류된다. 생물학적 분야에서, 천연 단백질을 구성하는 아미노산은 특이적 구조적 특성을 가지며; 즉, 그들의 아미노기는 α-탄소 원자, 즉 Gly(글리신), Ala(알라닌), Val(발린), Leu(류신), Ile(이소류신), Phe(페닐알라닌), Trp(트립토판), Tyr(티로신), Asp(아스파르트산), His(히스티딘), Asn(아스파라긴), Glu(글루탐산), Lys(리신), Gln(글루타민), Met(메티오닌), Arg(아르기닌), Ser(세린), Thr(트레오닌), Cys(시스테인), Pro(프롤린) 등을 포함한 α-아미노산에 직접 부착된다. 비천연 아미노산은 예를 들어, 시트룰린이다. 당업자에게 잘 알려진 바와 같이, 비천연 아미노산은 천연 단백질을 구성하지 않으며 따라서 본 개시내용에서 항체의 합성에 수반되지 않는다. 본 개시내용에서 사용되는 아미노산에 대한 3글자 및 1글자 코드는 *J. Biol. Chem.*, 243, p3558(1968)에 기재된 바와 같다.

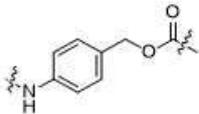
약칭	약어	이름	구조
G	Gly	글리신	
A	Ala	알라닌	
V	Val	발린	
L	Leu	류신	
I	Ile	이소류신	
F	Phe	페닐알라닌	
W	Trp	트립토판	
Y	Tyr	티로신	
D	Asp	아스파르트산	

[0113]

H	His	히스티딘	
N	Asn	아스파라긴	
E	Glu	글루탐산	
K	Lys	리신	
Q	Gln	글루타민	
C	Cit	시트룰린	

[0114]

[0115] 본 개시내용의 스페이서 단위는 *p*-아미노벤질옥시카르보닐 단편으로 표시되는 구조를 갖고, 화학식 (VI)으로 표시되는 구조를 갖고, D에 연결된 PAB이다:

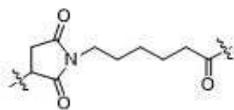


(VI).

[0116]

[0117] 링커 구성요소는 다음을 포함하나 이에 제한되지 않는다:

[0118] MC = 6-말레이미도카프로일, 이의 구조는 아래에 제시되어 있다:



[0119]

[0120] Val-Cit 또는 "vc" = 발린-시트룰린(프로테아제 절단 가능한 링커의 예시적인 디펩티드)

[0121] 시트룰린 = 2-아미노-5-우레이도펜탄산

[0122] Me-Val-Cit = N-메틸-발린-시트룰린(여기서 링커 펩티드 결합은 카텝신 B에 의해 절단되는 것을 방지하도록 변형됨)

[0123] MC(PEG)<sub>6</sub>-OH = 말레이미도카프로일-폴리에틸렌 글리콜(항체 시스테인에 부착 가능)

[0124] SPP = *N*-숙신이미딜 4-(2-피리딜티오)발레레이트

[0125] SPDP = *N*-숙신이미딜 3-(2-피리딜티오)프로피오네이트

[0126] SMCC = 숙신이미딜-4-(*N*-말레이미도메틸)사이클로헥산-1-카르복실레이트

[0127] IT = 이민노티올란

[0128] PBS = 포스페이트 완충 염수.

[0129] 용어 "항체-약물 접합체"는 리간드가 적합한 링커 단위에 의해 생물학적 활성 약물에 연결되어 있음을

의미한다. 본 개시내용에서, "항체-약물 접합체"(ADC)는 단클론 항체 또는 항체 단편이 안정한 링커 단위에 의해 생물학적 활성 독성 약물에 연결되어 있음을 의미한다.

[0130] 용어 "약물 로딩"은 약물의 양 대 항체의 양의 비율, 즉, ADC에서 항체 당 접합된 약물의 평균 수로 표현될 수 있다. 약물 로딩은 항체(Ab) 당 부착된 1 내지 20개, 바람직하게는 1 내지 10개 범위의 세포독성 약물(D)일 수 있다. 본 개시내용의 구현예에서, 약물 로딩은 k로 표시되며, 예시적으로 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 또는 임의의 두 값의 평균; 바람직하게는 평균 1 내지 10, 보다 바람직하게는 평균 1 내지 8, 또는 2 내지 8, 또는 2 내지 7, 또는 3 내지 8, 또는 3 내지 7, 또는 3 내지 6, 또는 4 내지 7, 또는 4 내지 6, 또는 4 내지 5일 수 있다. 커플링 반응 후 ADC 분자 당 약물의 평균 수는 UV/가시광선 분광법, 질량 분광법, ELISA 검정, 단클론 항체 분자 크기 변이 검정(CE-SDS) 및 HPLC와 같은 통상적인 방법으로 특성화할 수 있다.

[0131] 본 개시내용의 단클론 항체 분자 크기 변이 검정(CE-SDS)은 환원 및 비환원 조건 하에 분자량에 기반한 모세관 전기영동-나트륨 도데실 술페이트(CE-SDS) 자외선 검정을 채택하고 모세관 전기영동 방법(Chinese Pharmacopoeia 0542, 2015 Edition)에 따라 재조합 단클론 항체 생성물의 순도를 정량적으로 결정하기 위해 사용될 수 있다.

[0132] 항체-약물 접합체의 로딩은 다음을 포함한 비제한적인 방법에 의해 제어될 수 있다:

[0133] (1) 단클론 항체에 대한 연결 시약의 몰비 제어,

[0134] (2) 반응 시간 및 온도 제어, 및

[0135] (3) 상이한 반응 시약 선택.

[0136] 용어 "항체"는 쇠간 디설파이드 결합에 의해 2개의 동일한 중쇄와 2개의 동일한 경쇄 사이의 연결에 의해 형성된 테트라펩티드 쇠 구조인 면역글로불린을 지칭한다. 면역글로불린의 중쇄 불변 영역은 아미노산 조성 및 배열이 상이하므로, 항원성이 상이하다. 따라서, 면역글로불린은 5가지 클래스로 나눌 수 있으며, 달리 면역글로불린의 이소형, 즉 IgM, IgD, IgG, IgA 및 IgE로 불리며, 상응하는 중쇄는 각각  $\mu$  쇠,  $\delta$  쇠,  $\gamma$  쇠,  $\alpha$  쇠 및  $\epsilon$  쇠이다. 동일한 클래스의 Ig는 힌지 영역의 아미노산 조성 및 중쇄의 디설파이드 결합의 수 및 위치의 차이에 따라 상이한 하위클래스로 나눌 수 있으며; 예를 들어, IgG는 IgG1, IgG2, IgG3 및 IgG4로 나눌 수 있다. 경쇄는 불변 영역의 차이에 따라  $\kappa$  또는  $\lambda$  쇠로 나뉜다. Ig의 5가지 클래스 각각은  $\kappa$  쇠 또는  $\lambda$  쇠를 가질 수 있다. 항체의 중쇄 및 경쇄에서, N-말단 근처의 약 110개 아미노산의 서열은 상당히 달라지므로 가변 영역(Fv 영역)으로 언급되며; C-말단 근처의 나머지 아미노산 서열은 상대적으로 안정하므로 불변 영역으로 언급된다. 가변 영역은 비교적 보존적 서열을 갖는 3개의 초가변 영역(HVR) 및 4개의 프레임워크 영역(FR)을 포함한다. 3개의 초가변 영역은 항체의 특이성을 결정하므로 상보성 결정 영역(CDR)으로도 알려져 있다. 각 경쇄 가변 영역(LCVR) 또는 중쇄 가변 영역(HCVR)은 다음 순서로 아미노-말단에서 카르복실-말단으로 배열된 3개의 CDR 및 4개의 FR로 이루어진다: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3 및 FR4. 경쇄의 3개의 CDR은 LCDR1, LCDR2 및 LCDR3을 지칭하고, 중쇄의 3개의 CDR은 HCDR1, HCDR2 및 HCDR3을 지칭한다.

[0137] 본 개시내용의 항체는 무린 항체, 키메라 항체, 인간화 항체 및 완전 인간 유래 항체, 바람직하게는 인간화 항체 및 완전 인간 유래 항체를 포함한다.

[0138] 본원에 사용되는 용어 "무린 항체"는 당업계의 지식 및 기술에 따라 마우스로부터 제조된 항체를 지칭한다. 제조 동안, 테스트 대상체에게 특이적 항원을 주입한 다음, 원하는 서열 또는 기능적 특성을 갖는 항체를 발현하는 하이브리도마를 단리한다.

[0139] 용어 "키메라 항체"는 무린 항체의 가변 영역을 인간 항체의 불변 영역에 융합함으로써 획득된 항체를 지칭하며, 이는 무린 항체에 의해 유도된 면역 반응을 감소시킬 수 있다. 키메라 항체는 먼저 무린 특이적 단클론 항체를 분비하는 하이브리도마를 확립한 다음, 마우스 하이브리도마 세포로부터 가변 영역 유전자를 클로닝하고, 필요에 따라 인간 항체의 불변 영역 유전자를 클로닝하고, 마우스 가변 영역 유전자 및 인간 불변 영역 유전자를 키메라 유전자에 연결하고, 키메라 유전자를 발현 벡터에 삽입하고, 마지막으로 진핵생물 시스템 또는 원핵생물 시스템에서 키메라 항체 분자를 발현함으로써 확립된다.

[0140] CDR-이식 항체로도 알려진 용어 "인간화 항체"는 무린 CDR 서열을 인간 항체 가변 영역 프레임워크, 즉, 상이한 유형의 인간 생식계열 항체 프레임워크 서열에 이식함으로써 생산된 항체를 지칭한다. 이러한 항체는 다량의 마우스 단백질 구성요소를 보유하고 있기 때문에 키메라 항체에 의해 유도된 이중 반응을 극복할 수 있다. 이러한

프레임워크 서열은 생식계열 항체 유전자 서열을 포함하는 공개 DNA 데이터베이스 또는 공개된 참고문헌으로부터 수득될 수 있다. 예를 들어, 인간 중쇄 및 경쇄 가변 영역의 유전자의 생식계열 DNA 서열은 "VBase" 인간 생식계열 서열 데이터베이스(인터넷 주소 [www.mrccpe.com.ac.uk/vbase](http://www.mrccpe.com.ac.uk/vbase)에서 이용 가능), 뿐만 아니라 Kabat, E. A. et al., 1991 Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5<sup>th</sup> edition에서 찾을 수 있다. 면역원성의 감소로 인해 유발된 활성 감소를 피하기 위해, 인간 항체 가변 영역의 FR 서열은 최소 역 돌연변이 또는 복귀 돌연변이에 적용되어 활성을 유지할 수 있다. 본 개시내용의 인간화 항체는 또한 파지 디스플레이에 의해 CDR에 대한 추가의 친화도 성숙 후 형성된 인간화 항체를 포함한다. 접근 가능한 마우스 항체의 인간화에 사용되는 방법을 추가로 설명하는 문헌은 예를 들어, Queen et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 88, 2869, 1991을 포함하고, Winter 및 동료들에 의해 제공된 방법을 사용하여 인간화를 설명하는 문헌은 Jones et al., *Nature*, 321, 522 (1986); Riechmann et al., *Nature*, 332, 323-327 (1988), Verhoeyen et al., *Science*, 239, 1534 (1988)를 포함한다.

[0141] "완전 인간 유래 단클론 항체"로도 알려진 용어 "완전 인간 유래 항체", "완전 인간 항체" 또는 "완전히 인간 유래 항체"는 인간화 가변 영역 및 불변 영역을 모두 가질 수 있으므로, 면역원성 및 독성과 부작용을 제거할 수 있다. 단클론 항체의 발달은 4 단계, 즉 무린 단클론 항체, 키메라 단클론 항체, 인간화 단클론 항체 및 완전 인간 유래 단클론 항체가 있다. 본 개시내용의 항체는 완전 인간 유래 단클론 항체이다. 완전 인간 항체의 제조를 위한 주요 관련 기술은 인간 하이브리도마 기술, EBV-형질전환 B-림프구 기술, 파지 디스플레이 기술, 형질전환 마우스 항체 제조 기술, 단일 B-세포 항체 제조 기술 등을 포함한다.

[0142] 용어 "항원 결합 단편"은 항원에 특이적으로 결합하는 능력을 보유하는 항체의 하나 이상의 단편을 지칭한다. 이는 전장 항체의 단편을 사용하여 항체의 항원 결합 기능을 수행할 수 있음을 나타낸다. "항원 결합 단편"에 포함되는 결합 단편의 예는 (i) VL, VH, CL 및 CH1 도메인으로 이루어진 1가 단편인 Fab 단편; (ii) 힌지 영역에서 디설파이드 가교에 의해 연결된 2개의 Fab 단편을 포함하는 2가 단편인 F(ab')<sub>2</sub> 단편; (iii) VH 및 CH1 도메인으로 이루어진 Fd 단편; (iv) 항체의 단일 아암(arm)의 VH 및 VL 도메인으로 이루어진 Fv 단편; (v) VH 도메인으로 이루어진 단일 도메인 또는 dAb 단편(Ward et al., (1989) *Nature* 341: 544-546); 및 (vi) 단리된 상보성 결정 영역(CDR) 또는 (vii) 합성 링커에 의해 임의적으로 연결될 수 있는 2개 이상의 단리된 CDR의 조합을 포함한다. 게다가, Fv 단편의 2개 도메인인 VL 및 VH는 별도의 유전자에 의해 암호화되지만, 이들은 재조합 방법에 의해 합성 링커로 연결되므로, VL 및 VH 영역이 쌍을 이루어 1가 분자를 형성하는 단일 단백질 쇠(단일-쇄 Fv(scFv)로 언급됨; 예를 들어, Bird et al. (1988) *Science* 242: 423-426; 및 Huston et al. (1988) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85: 5879-5883 참조)를 생산할 수 있다. 이러한 단일-쇄 항체는 또한 항체의 "항원 결합 단편"이라는 용어에 포함되는 것으로 의도된다. 이러한 항체 단편은 당업자에게 알려진 통상적인 기술에 의해 수득되고, 온전한 항체와 동일한 방식으로 유용성에 대해 스크리닝된다. 항원 결합 모이어티는 재조합 DNA 기술 또는 효소 촉매작용 또는 온전한 면역글로불린의 화학 절단에 의해 생산될 수 있다. 항체는 상이한 이소형의 항체, 예를 들어, IgG(예를 들어, 하위유형 IgG1, IgG2, IgG3 또는 IgG4), IgA1, IgA2, IgD, IgE 또는 IgM 항체 일 수 있다.

[0143] Fab는 IgG 항체 분자를 프로테아제 파파인(H 쇠의 위치 224에서 아미노산 잔기 절단)으로 처리함으로써 수득된 단편 중에서 분자량이 약 50,000이고 항원 결합 활성을 갖는 항체 단편이며, 여기서 H 쇠의 N-말단 측의 거의 절반 및 전체 L 쇠는 디설파이드 결합에 의해 함께 연결된다.

[0144] F(ab')<sub>2</sub>는 분자량이 약 100,000이고 항원 결합 활성을 가지며 힌지 위치에서 연결된 2개의 Fab 영역을 포함하는 항체 단편이며, 이는 IgG 힌지 영역의 두 디설파이드 결합 아래 부분을 효소 썬으로 소화시켜 수득된다.

[0145] Fab'은 분자량이 약 50,000이고 항원 결합 활성을 갖는 항체 단편이며, 이는 위에 기재된 F(ab')<sub>2</sub>의 힌지 영역에서 디설파이드 결합을 절단시켜 수득된다.

[0146] 게다가, Fab'은 항체의 Fab' 단편을 암호화하는 DNA를 원핵생물 발현 벡터 또는 진핵생물 발현 벡터에 삽입하고 벡터를 원핵생물 또는 진핵생물에 도입하여 Fab'을 발현함으로써 생산될 수 있다.

[0147] 용어 "단일-쇄 항체", "단일-쇄 Fv" 또는 "scFv"는 링커에 의해 연결된 항체 중쇄 가변 도메인(또는 영역; VH) 및 항체 경쇄 가변 도메인(또는 영역; VL)을 포함하는 분자를 지칭한다. 이러한 scFv 분자는 일반적인 구조를 가질 수 있다: NH<sub>2</sub>-VL-링커-VH-COOH 또는 NH<sub>2</sub>-VH-링커-VL-COOH. 선행 기술의 적합한 링커는 반복된 GGGGS 아미노산 서열 또는 이의 변이체, 예를 들어, 1-4개의 반복된 변이체로 이루어진다(Holliger et al. (1993), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90: 6444-6448). 본 개시내용에 사용될 수 있는 다른 링커는 Alfthan et al. (1995),

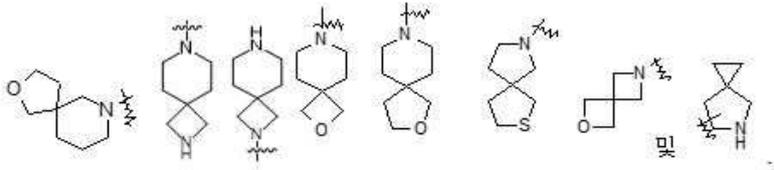
*Protein Eng.* 8:725-731; Choi et al. (2001), *Eur. J. Immunol.* 31:94-106; Hu et al. (1996), *Cancer Res.* 56:3055-3061; Kipriyanov et al. (1999), *J. Mol. Biol.* 293:41-56; 및 Roovers et al. (2001), *Cancer Immunol*에 기재되어 있다.

- [0148] 용어 "CDR"은 주로 항원 결합에 기여하는 항체의 가변 도메인 내 6개의 초가변 영역 중 하나를 지칭한다. 6개의 CDR에 대한 가장 흔한 정의 중 하나는 Kabat E.A. et al., (1991) *Sequences of proteins of immunological interest*. NIH Publication 91-3242에 제공되어 있다. 본원에 사용된 바와 같이, CDR의 Kabat 정의는 경쇄 가변 도메인의 CDR1, CDR2 및 CDR3(CDR L1, CDR L2, CDR L3 또는 L1, L2, L3), 및 중쇄 가변 도메인의 CDR2 및 CDR3(CDR H2, CDR H3 또는 H2, H3)에만 적용될 수 있다. 일반적으로, 각 중쇄 가변 영역에는 3개의 CDR(HCDR1, HCDR2 및 HCDR3)이 있고 각 경쇄 가변 영역에는 3개의 CDR(LCDR1, LCDR2 및 LCDR3)이 있다. CDR의 아미노산 서열 장벽은 "Kabat" 넘버링 체계(Kabat et al. (1991), "Sequences of Proteins of Immunological Interest", 5<sup>th</sup> edition, Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD 참조), "Chothia" 넘버링 체계(AI-Lazikani et al. (1997), *JMB* 273: 927-948 참조) 및 ImMunoGenTics (IMGT) 넘버링 체계(Lefranc M.P., *Immunologist*, 7, 132-136(1999); Lefranc, M.P. et al., *Dev. Comp. Immunol.*, 27, 55-77(2003) 참조) 등을 포함한 다양한 잘 알려진 체계 중 임의의 것을 사용하여 결정될 수 있다. 예를 들어, Kabat 체계에 따른 고전적인 형식의 경우, 중쇄 가변 도메인(VH)의 CDR 아미노산 잔기는 31-35(HCDR1), 50-65(HCDR2) 및 95-102(HCDR3)로 번호가 매겨지고; 경쇄 가변 도메인(VL)의 CDR 아미노산 잔기는 24-34(LCDR1), 50-56(LCDR2) 및 89-97(LCDR3)로 번호가 매겨진다. Chothia 체계에 따라, VH의 CDR 아미노산은 26-32(HCDR1), 52-56(HCDR2) 및 95-102(HCDR3)로 번호 매겨지고; VL의 아미노산 잔기는 26-32(LCDR1), 50-52(LCDR2) 및 91-96(LCDR3)으로 번호가 매겨진다. Kabat 체계 및 Chothia 체계에 제공된 CDR 정의의 조합에 따라, CDR은 인간 VH의 아미노산 잔기 26-35(HCDR1), 50-65(HCDR2) 및 95-102(HCDR3) 및 인간 VL의 아미노산 잔기 24-34(LCDR1), 50-56(LCDR2) 및 89-97(LCDR3)로 구성된다. IMGT 체계에 따라, VH의 CDR 아미노산 잔기는 대략 26-35(CDR1), 51-57(CDR2) 및 93-102(CDR3)로 번호 매겨지고, VL의 CDR 아미노산 잔기는 대략 27-32(CDR1), 50-52(CDR2) 및 89-97(CDR3)로 번호 매겨진다. IMGT 체계에 따라, 항체의 CDR은 프로그램 IMGT/ DomainGap Align을 사용하여 결정될 수 있다.
- [0149] 용어 "항체 프레임워크"는 가변 도메인의 항원 결합 루프(CDR)에 대한 프레임워크로서 역할을 하는 가변 도메인 VL 또는 VH의 일부를 지칭한다. 본질적으로 CDR이 없는 가변 도메인이다.
- [0150] 용어 "에피토프" 또는 "항원 결정기"는 면역글로불린 또는 항체가 특이적으로 결합하는 항원 상의 부위를 지칭한다. 에피토프는 일반적으로 고유한 공간 구성에 적어도 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14 또는 15개의 인접 또는 비인접 아미노산을 포함한다(예를 들어, *Epitope Mapping Protocols in Methods in Molecular Biology*, Vol. 66, G.E.Morris, Ed. (1996) 참조).
- [0151] 용어 "특이적 결합", "선택적 결합", "선택적으로 결합한다" 및 "특이적으로 결합한다"는 미리결정된 항원 상의 에피토프에 대한 항체의 결합을 지칭한다. 일반적으로, 항체는 약  $10^{-7}$  M 미만, 예를 들어, 약  $10^{-8}$  M,  $10^{-9}$  M, 또는  $10^{-10}$  M 미만 또는 그 이하의 친화도(KD)로 결합한다.
- [0152] 용어 "핵산 분자"는 DNA 분자 및 RNA 분자를 지칭한다. 핵산 분자는 단일 가닥 또는 이중 가닥일 수 있고, 바람직하게는 이중 가닥 DNA이다. 핵산은 또 다른 핵산 서열과의 기능적 관계에 놓일 때 "작동 가능하게 연결"된다. 예를 들어, 프로모터 또는 인핸서는 코딩 서열의 전사에 영향을 미치는 경우 코딩 서열에 작동 가능하게 연결된다.
- [0153] 용어 "벡터"는 연결된 또 다른 핵산을 수송할 수 있는 핵산 분자를 지칭한다. 하나의 구현예에서, 벡터는 추가적인 DNA 세그먼트가 결합될 수 있는 원형 이중 가닥 DNA 루프를 지칭하는 "플라스미드"이다. 또 다른 구현예에서, 벡터는 바이러스 벡터이며, 여기서 추가적인 DNA 세그먼트는 바이러스 게놈에 결합될 수 있다. 본원에 개시된 벡터는 도입되는 숙주 세포에서 자율적으로 복제할 수 있거나(예를 들어, 바이러스 복제 기점을 갖는 바이러스 벡터 및 에피솜 포유동물 벡터) 숙주 세포에 도입된 후 숙주 세포의 게놈으로 통합되어 숙주 게놈과 복제할 수 있다(예를 들어, 비-에피솜 포유동물 벡터).
- [0154] 항체 및 항원 결합 단편을 생산 및 정제하는 방법은 선행 기술, 예를 들어, "Antibodies: A Laboratory Manual", Cold Spring Harbor의 챕터 5-8 및 15에 기재된 것들에 잘 알려져 있다. 마찬가지로, 항원 결합 단편은 통상적인 방법에 의해 제조될 수 있다. 본 발명에 기재된 항체 또는 항원 결합 단편은 비-인간 유래 CDR에 하나 이상의 추가적인 인간 유래 FR을 함유하도록 유전적으로 조작된다. 인간 FR 생식계열 서열은 ImMunoGeneTics(IMGT)의 웹사이트 <http://imgt.cines.fr> 또는 면역글로불린 저널, 2001ISBN012441351에서,

IMGT 인간 항체 가변 영역 생식계열 유전자 데이터베이스를 MOE 소프트웨어와 비교함으로써 획득될 수 있다.

- [0155] 용어 "숙주 세포"는 발현 벡터가 도입된 세포를 지칭한다. 숙주 세포는 박테리아, 미생물, 식물 또는 동물 세포를 포함할 수 있다. 형질전환하기 쉬운 박테리아는 엔테로박테리아세아에(*Enterobacteriaceae*) 계열의 구성원, 예컨대 에스케리키아 콜라이(*Escherichia coli*) 또는 살모넬라(*Salmonella*) 계통; 바실라세아에(*Bacillaceae*) 계열의 구성원, 예컨대 바실루스 서브틸리스(*Bacillus subtilis*); 뉴모코쿠스(*Pneumococcus*); 스트렙토코쿠스(*Streptococcus*) 및 헤모필루스 인플루엔자에(*Haemophilus influenzae*)를 포함한다. 적합한 미생물은 사카로마이세스 세레비지아에(*Saccharomyces cerevisiae*) 및 피키아 파스토리스(*Pichia pastoris*)를 포함한다. 적합한 동물 숙주 세포주는 CHO(중국 햄스터 난소 세포주) 및 NSO 세포를 포함한다.
- [0156] 본 개시내용의 조각된 항체 또는 항원 결합 단편은 통상적인 방법에 의해 제조 및 정제될 수 있다. 예를 들어, 중쇄 및 경쇄를 암호화하는 cDNA 서열은 GS 발현 벡터로 클로닝 및 재조합될 수 있다. 재조합 면역글로불린 발현 벡터는 CHO 세포로 안정하게 형질감염될 수 있다. 보다 권장되는 선행 기술로서, 포유동물 발현 시스템은 특히 Fc 영역의 고도로 보존된 N-말단 부위에서 항체의 글리코실화를 초래할 것이다. 양성 클론은 생물반응기의 무혈청 배지에서 확장되어 항체를 생산한다. 분비된 항체를 함유하는 배양 배지는 통상적인 기술에 의해 정제될 수 있다. 예를 들어, 정제는 조정된 완충액을 함유하는 A 또는 G 세포파로스 FF 컬럼을 사용하여 수행된다. 비특이적으로 결합된 단편은 세척 제거된다. 결합된 항체는 pH 구배 방법에 의해 용출되고, 항체 단편은 SDS-PAGE에 의해 검출되고 수집된다. 항체는 통상적인 방법에 의해 여과되고 농축될 수 있다. 용해성 혼합물 및 중합체는 또한 분자체 및 이온 교환과 같은 통상적인 방법에 의해 제거될 수 있다. 생성된 생성물은 예를 들어, -70°C에서 즉시 동결되거나, 동결건조해야 한다.
- [0157] 아미노산 서열 "동일성"은 제1 서열 및 제2 서열에 의해 공유되는 아미노산 잔기의 백분율을 지칭하며, 여기서 아미노산 서열을 정렬하고 필요한 경우, 최대 퍼센트 서열 동일성을 달성하기 위해 갭이 도입되고, 임의의 보존적 치환은 서열 동일성의 일부로 간주되지 않는다. 퍼센트 아미노산 서열 동일성을 결정하는 목적을 위해, 정렬은 당업계의 기술 범위 내에 있는 다양한 방식으로, 예를 들어, BLAST, BLAST-2, ALIGN, ALIGN-2 또는 Megalign(DNASTAR) 소프트웨어와 같은 공개적으로 이용 가능한 컴퓨터 소프트웨어를 사용하여 달성될 수 있다. 당업자는 정렬된 서열의 전체 길이의 최대 정렬을 달성하기 위해 필요한 임의의 알고리즘을 포함하여 정렬 측정기에 적합한 매개변수를 결정할 수 있다.
- [0158] 용어 "펩티드"는 아미노산과 단백질 사이의 화합물 단편을 지칭한다. 화합물 단편은 2개 이상의 아미노산 분자를 펩티드 결합에 의해 연결함으로써 형성되며, 본질적으로 펩티드인 호르몬 및 효소와 같은 단백질의 구조적 및 기능적 단편이다.
- [0159] 용어 "당"은 C, H 및 O 원소로 이루어진 생체거대분자를 지칭한다. 이들은 단당류, 이당류, 다당류 등으로 분류될 수 있다.
- [0160] 용어 "형광 프로브"는 자외선-가시광선-근 적외선 영역에서 특징적 형광을 갖고 극성, 굴절률 및 점도와 같은 환경 특성이 변함에 따라 형광 특성(여기 및 방출 파장, 강도, 수명, 편광 등)이 민감하게 변할 수 있는 형광 분자 부류를 지칭한다. 이러한 형광 분자는 핵산(DNA 또는 RNA), 단백질 또는 다른 거대분자 구조와 비공유적으로 상호작용하여 하나 이상의 형광 특성을 변화시키므로, 거대분자 물질의 특성 및 거동을 연구하는 데 사용될 수 있다.
- [0161] 용어 "알킬"은 1 내지 20개의 탄소 원자를 함유하는 선형 또는 분지형 기인 포화 지방족 탄화수소 기, 바람직하게는 1 내지 12개의 탄소 원자를 함유하는 알킬, 보다 바람직하게는 1 내지 10개의 탄소 원자를 함유하는 알킬, 가장 바람직하게는 1 내지 6개의 탄소 원자를 함유하는 알킬을 지칭한다. 비제한적인 예는 메틸, 에틸, *n*-프로필, 이소프로필, *n*-부틸, 이소부틸, *tert*-부틸, *n*-헥실, 1-에틸-2-메틸프로필, 및 이의 다양한 분지형 이성질체 등을 포함한다. 1 내지 6개의 탄소 원자를 갖는 저급 알킬이 보다 바람직하며, 비제한적인 예는 메틸, 에틸, *n*-프로필, 이소프로필, *n*-부틸, 이소부틸, *tert*-부틸, *sec*-부틸, *n*-펜틸, 1,1-디메틸프로필, 1,2-디메틸프로필, 2,2-디메틸프로필, 1-에틸프로필, 2-메틸부틸 등을 포함한다. 알킬은 치환 또는 비치환될 수 있고, 치환되는 경우, 치환기는 임의의 접근 가능한 연결 부위에서 치환될 수 있고, 치환기는 바람직하게는 알킬, 알콕시, 할로젠, 아미노, 시아노, 니트로, 하이드록시, 하이드록시알킬, 사이클로알킬, 헤테로사이클릴, 아릴 및 헤테로아릴로 이루어진 군으로부터 독립적으로 선택된 하나 이상의 기이다.
- [0162] 용어 "헤테로알킬"은 N, O 및 S로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상의 헤테로원자를 함유하는 알킬을 지칭하며, 여기서 알킬은 위에 정의된 바와 같다.

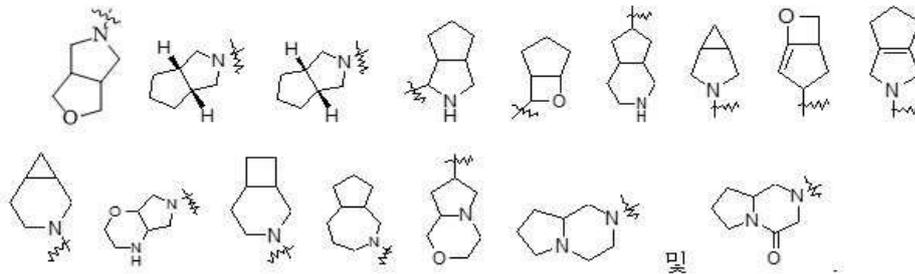
- [0163] 용어 "1가 기"는 화합물로부터 1가 원자 또는 기를 "공식적으로" 제거함으로써 수득된 원자 또는 기를 지칭한다. 용어 "일렌"은 화합물로부터 2개의 1가 원자 또는 1개의 2가 원자를 "공식적으로" 제거함으로써 형성된 원자 또는 원자 기를 지칭한다. 예시적인 "알킬"은 1개 수소 원자의 제거 후 남아있는 알칸 분자의 모이더티를 지칭하며, 1 내지 20개 탄소 원자의 선형 또는 분지형 1가 기를 포함한다. 1 내지 6개의 탄소 원자를 함유하는 알킬의 비제한적인 예는 메틸, 에틸, *n*-프로필, 이소프로필, *n*-부틸, 이소부틸, *tert*-부틸, *sec*-부틸, *n*-펜틸, 1,1-디메틸프로필, 1,2-디메틸프로필, 2,2-디메틸프로필, 이의 다양한 분지형 이성질체 등을 포함한다.
- [0164] 용어 "알킬렌"은 동일한 탄소 원자 또는 2개의 상이한 탄소 원자로부터 2개의 수소 원자를 제거함으로써 모 알칸으로부터 유래된 2개의 잔기를 갖는 포화 선형 또는 분지형 지방족 탄화수소 기를 지칭한다. 이는 1 내지 20개의 탄소 원자를 함유하는 선형 또는 분지형 기, 바람직하게는 1 내지 12개의 탄소 원자를 함유하는 알킬렌, 보다 바람직하게는 1 내지 6개의 탄소 원자를 함유하는 알킬렌이다. 알킬렌의 비제한적인 예는 메틸렌(-CH<sub>2</sub>-), 1,1-에틸리덴(-CH(CH<sub>3</sub>)-), 1,2-에틸리덴(-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-), 1,1-프로필리덴(-CH(CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>)-), 1,2-프로필리덴(-CH<sub>2</sub>CH(CH<sub>3</sub>)-), 1,3-프로필리덴(-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-), 1,4-부틸리덴(-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-), 1,5-부틸리덴(-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-) 등을 포함하나 이에 제한되지 않는다. 알킬렌은 치환 또는 비치환될 수 있고, 치환되는 경우, 치환기는 임의의 접근 가능한 연결 부위에서 치환될 수 있고, 치환기는 바람직하게는 독립적으로 할로겐, 하이드록시, 시아노, 아미노, 알킬, 클로로알킬, 알콕시 및 사이클로알킬 중 하나 이상으로부터 임의적으로 선택된다. 유사하게, "알케닐렌"은 위에 정의된 바와 같다.
- [0165] 용어 "알콕시"는 -O-(알킬) 및 -O-(비치환된 사이클로알킬)을 지칭하며, 여기서 알킬 또는 사이클로알킬은 위에 정의된 바와 같다. 알콕시의 비제한적인 예는 메톡시, 에톡시, 프로폭시, 부톡시, 사이클로프로필옥시, 사이클로부톡시, 사이클로펜틸옥시 및 사이클로헥실옥시를 포함한다. 알콕시는 임의적으로 치환 또는 비치환될 수 있고, 치환되는 경우, 치환기는 바람직하게는 알킬, 알케닐, 알키닐, 알콕시, 알킬티오, 알킬아미노, 할로겐, 술폰드릴, 하이드록시, 니트로, 시아노, 사이클로알킬, 헤테로사이클로알킬, 아릴, 헤테로아릴, 사이클로알콕시, 헤테로사이클로알콕시, 사이클로알킬티오 및 헤테로사이클로알킬티오로 이루어진 군으로부터 독립적으로 선택된 하나 이상의 기이다.
- [0166] 용어 "사이클로알킬"은 포화 또는 부분적 불포화 단환식 또는 다환식 탄화수소 치환기를 지칭한다. 사이클로알킬 고리는 3 내지 20개의 탄소 원자, 바람직하게는 3 내지 12개의 탄소 원자, 보다 바람직하게는 3 내지 10개의 탄소 원자, 가장 바람직하게는 3 내지 8개의 탄소 원자를 함유한다. 단환식 사이클로알킬의 비제한적인 예는 사이클로프로필, 사이클로부틸, 사이클로펜틸, 사이클로헥테닐, 사이클로헥실, 사이클로헥세닐, 사이클로헥사디에닐, 사이클로헵틸, 사이클로헵타트리에닐, 사이클로옥틸 등을 포함한다. 다환식 사이클로알킬은 스피로사이클로알킬, 융합된 사이클로알킬, 및 가교된 사이클로알킬을 포함한다.
- [0167] 용어 "헤테로사이클로알킬"은 3 내지 20개의 고리 원자를 함유하는 포화 또는 부분적 불포화 단환식 또는 다환식 탄화수소 치환기를 지칭하며, 여기서 고리 원자 중 하나 이상은 -O-O-, -O-S- 또는 -S-S-의 환식 부분을 제외하여 질소, 산소 및 S(O)<sub>m</sub>(여기서 m은 0 내지 2의 정수임)으로 이루어진 군으로부터 선택된 헤테로원자이고, 나머지 고리 원자는 탄소 원자이다. 헤테로사이클로알킬은 바람직하게는 3 내지 12개의 고리 원자를 함유하며, 그 중 1 내지 4개는 헤테로원자이고; 보다 바람직하게는 3 내지 10개의 고리 원자를 함유한다. 단환식 헤테로사이클로알킬의 비제한적인 예는 피롤리딘, 피페리딘, 피페라지닌, 모르폴리닌, 티오모르폴리닌, 호모피페라지닌 등을 포함한다. 다환식 헤테로사이클로알킬은 스피로 헤테로사이클릴, 융합된 헤테로사이클릴 및 가교된 헤테로사이클로알킬을 포함한다.
- [0168] 용어 "스피로 헤테로사이클로알킬"은 단환식 고리가 1개의 원자(스피로 원자로 언급됨)를 공유하는 5- 내지 20-원 다환식 헤테로사이클로알킬 기를 지칭하며, 여기서 하나 이상의 고리 원자는 질소, 산소 및 S(O)<sub>m</sub>(여기서 m은 0 내지 2의 정수임)으로 이루어진 군으로부터 선택된 헤테로원자이고, 나머지 고리 원자는 탄소 원자이다. 이는 하나 이상의 이중 결합을 함유할 수 있지만, 고리 중 어떤 것도 완전 공액 π-전자 시스템을 갖지 않는다. 바람직하게는 6- 내지 14-원이고, 보다 바람직하게는 7- 내지 10-원이다. 고리 중에 공유되는 스피로 원자의 수에 따라, 스피로 헤테로사이클로알킬은 모노스피로 헤테로사이클로알킬, 비스피로 헤테로사이클로알킬 또는 폴리스피로 헤테로사이클로알킬, 바람직하게는 모노스피로 헤테로사이클로알킬 및 비스피로 헤테로사이클로알킬, 보다 바람직하게는 4-원/4-원, 4-원/5-원, 4-원/6-원, 5-원/5-원 또는 5-원/6-원 모노스피로 헤테로사이클로알킬일 수 있다. 스피로 헤테로사이클로알킬의 비제한적인 예는 다음을 포함한다:



[0169]

[0170]

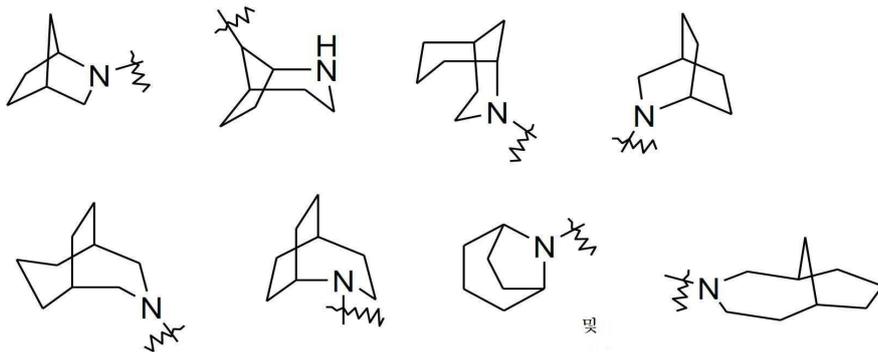
용어 "융합된 헤테로사이클로알킬"은 각 고리가 시스템 내의 다른 고리와 한 쌍의 인접한 원자를 공유하는 5- 내지 20-원 다환식 헤테로사이클로알킬 기를 지칭하며, 여기서 고리 중 하나는 하나 이상의 이중 결합을 함유할 수 있지만, 그들 중 어떤 것도 완전 공액  $\pi$ -전자 시스템을 갖지 않으며, 여기서 고리 원자 중 하나는 이상은 질소, 산소 또는  $S(O)_m$ (여기서  $m$ 은 0 내지 2의 정수임)으로 이루어진 군으로부터 선택된 헤테로원자이고, 나머지 고리 원자는 탄소 원자이다. 이는 바람직하게는 6- 내지 14-원이고, 보다 바람직하게는 7- 내지 10-원이다. 형성된 고리의 수에 따라, 융합된 헤테로사이클로알킬은 이환식, 삼환식, 사환식 또는 다환식, 바람직하게는 이환식 또는 삼환식, 보다 바람직하게는 5-원/5-원 또는 5-원/6-원 이환식 융합된 헤테로사이클로알킬일 수 있다. 융합된 헤테로사이클로알킬의 비제한적인 예는 다음을 포함한다:



[0171]

[0172]

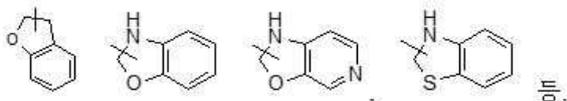
용어 "가교된 헤테로사이클로알킬"은 임의의 2개의 고리가 서로 직접 부착되지 않은 2개의 탄소 원자를 공유하는 5- 내지 14-원 다환식 헤테로사이클로알킬 기를 지칭하며, 여기서 이들 고리는 하나 이상의 이중 결합을 함유할 수 있지만, 그들 중 어떤 것도 완전 공액  $\pi$ -전자 시스템을 갖지 않으며, 고리 원자 중 하나는 이상은 질소, 산소 및  $S(O)_m$ (여기서  $m$ 은 0 내지 2의 정수임)으로 이루어진 군으로부터 선택된 헤테로원자이고, 나머지 고리 원자는 탄소 원자이다. 이는 바람직하게는 6- 내지 14-원이고, 보다 바람직하게는 7- 내지 10-원이다. 형성된 고리의 수에 따라, 가교된 헤테로사이클로알킬은 이환식, 삼환식, 사환식 또는 다환식, 바람직하게는 이환식, 삼환식 또는 사환식, 보다 바람직하게는 이환식 또는 삼환식일 수 있다. 가교된 헤테로사이클로알킬의 비제한적인 예는 다음을 포함한다:



[0173]

[0174]

헤테로사이클로알킬 고리는 아릴, 헤테로아릴 또는 사이클로알킬 고리에 융합될 수 있으며, 여기서 모 구조에 부착된 고리는 헤테로사이클로알킬이고; 그의 비제한적인 예는 다음을 포함하나 이에 제한되지 않는다:



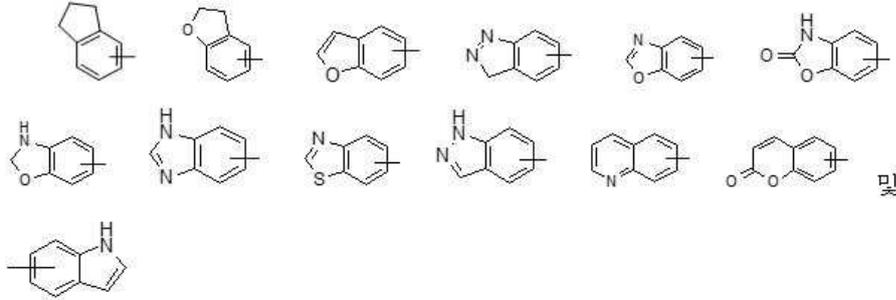
[0175]

[0176]

헤테로사이클로알킬은 임의적으로 치환 또는 비치환될 수 있고, 치환되는 경우, 치환기는 바람직하게는 알킬,

알케닐, 알킬닐, 알콕시, 알킬티오, 알킬아미노, 할로젠, 메르캅토, 하이드록시, 니트로, 시아노, 사이클로알킬, 헤테로사이클로알킬, 아릴, 헤테로아릴, 사이클로알콕시, 헤테로사이클로알콕시, 사이클로알킬티오, 헤테로사이클로알킬티오 및 옥소로 이루어진 군으로부터 독립적으로 선택된 하나 이상의 기이다.

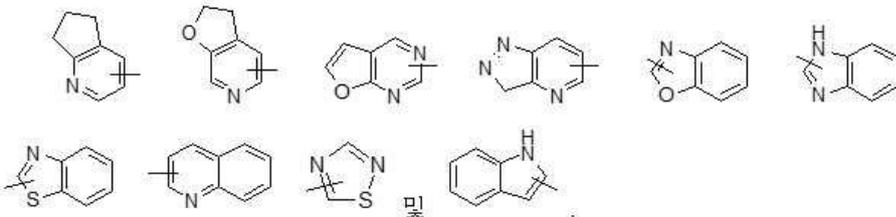
[0177] 용어 "아릴"은 페닐 및 나프틸, 바람직하게는 페닐과 같은 공액  $\pi$ -전자 시스템을 갖는 6- 내지 14-원, 바람직하게는 6- 내지 10-원, 탄소 단환식 또는 융합된 다환식(즉, 한 쌍의 인접한 탄소 원자를 공유하는 고리) 기를 지칭한다. 아릴 고리는 헤테로아릴, 헤테로사이클로알킬 또는 사이클로알킬 고리에 융합될 수 있으며, 여기서 모 구조에 부착된 고리는 아릴 고리이고; 그의 비제한적인 예는 다음을 포함하나 이에 제한되지 않는다:



[0178]

[0179] 아릴은 치환 또는 비치환될 수 있고, 치환되는 경우, 치환기는 바람직하게는 알킬, 알케닐, 알킬닐, 알콕시, 알킬티오, 알킬아미노, 할로젠, 메르캅토, 하이드록시, 니트로, 시아노, 사이클로알킬, 헤테로사이클로알킬, 아릴, 헤테로아릴, 사이클로알콕시, 헤테로사이클로알콕시, 사이클로알킬티오 및 헤테로사이클로알킬티오로 이루어진 군으로부터 독립적으로 선택된 하나 이상의 기이다.

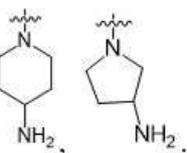
[0180] 용어 "헤테로아릴"은 1 내지 4개의 헤테로원자 및 5 내지 14개의 고리 원자를 함유하는 헤테로방향족 시스템을 지칭하며, 여기서 헤테로원자는 산소, 황 및 질소로 이루어진 군으로부터 선택된다. 헤테로아릴은 바람직하게는 5- 내지 10-원, 보다 바람직하게는 5- 또는 6-원, 예를 들어, 푸라닐, 티에닐, 피리딜, 피롤릴, N-알킬피롤릴, 피리미디닐, 피라지닐, 이미다졸릴 및 테트라졸릴이다. 헤테로아릴 고리는 아릴, 헤테로사이클로알킬 또는 사이클로알킬 고리에 융합될 수 있으며, 여기서 모 구조에 부착된 고리는 헤테로아릴이고; 그의 비제한적인 예는 다음을 포함한다:



[0181]

[0182] 헤테로아릴은 임의적으로 치환 또는 비치환될 수 있고, 치환되는 경우, 치환기는 바람직하게는 알킬, 알케닐, 알킬닐, 알콕시, 알킬티오, 알킬아미노, 할로젠, 메르캅토, 하이드록시, 니트로, 시아노, 사이클로알킬, 헤테로사이클로알킬, 아릴, 헤테로아릴, 사이클로알콕시, 헤테로사이클로알콕시, 사이클로알킬티오 및 헤테로사이클로알킬티오로 이루어진 군으로부터 독립적으로 선택된 하나 이상의 기이다.

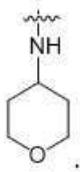
[0183] 용어 "아미노헤테로사이클로알킬"은 하나 이상의 아미노 기, 바람직하게는 하나의 아미노 기로 치환된 헤테로사이클로알킬을 지칭하며, 여기서 헤테로사이클로알킬은 위에 정의된 바와 같고, "아미노 기"는  $-NH_2$ 를 의미한다. 본 개시내용의 대표적인 예는 다음과 같다:



[0184]

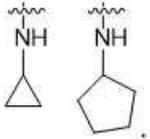
[0185] 용어 "헤테로사이클로알킬아미노"는 하나 이상의 헤테로사이클로알킬 기, 바람직하게는 하나의 헤테로사이클로알킬 기로 치환된 아미노를 지칭하며, 여기서 아미노는 위에 정의된 바와 같고, 헤테로사이클로알킬은 위에 정

의된 바와 같다. 본 개시내용의 대표적인 예는 다음과 같다:



[0186]

[0187] 용어 "사이클로알킬아미노"는 하나 이상의 사이클로알킬 기, 바람직하게는 하나의 사이클로알킬 기로 치환된 아미노를 지칭하며, 여기서 아미노는 위에 정의된 바와 같고, 사이클로알킬은 위에 정의된 바와 같다. 본 개시내용의 대표적인 예는 다음과 같다:



[0188]

[0189] 용어 "사이클로알킬알킬"은 하나 이상의 사이클로알킬 기, 바람직하게는 하나의 사이클로알킬 기로 치환된 알킬 기를 지칭하며, 여기서 알킬은 위에 정의된 바와 같고, 사이클로알킬은 위에 정의된 바와 같다.

[0190] 용어 "할로알킬"은 하나 이상의 할로젠으로 치환된 알킬을 지칭하며, 여기서 알킬은 위에 정의된 바와 같다.

[0191] 용어 "중수소화 알킬"은 하나 이상의 중수소 원자로 치환된 알킬을 지칭하며, 여기서 알킬은 위에 정의된 바와 같다.

[0192] 용어 "하이드록시"는 -OH 기를 지칭한다.

[0193] 용어 "할로젠"은 불소, 염소, 브롬 또는 요오드를 지칭한다.

[0194] 용어 "아미노"는 -NH<sub>2</sub>를 지칭한다.

[0195] 용어 "니트로"는 -NO<sub>2</sub>를 지칭한다.

[0196] 화학식에서, 약어 "Me"는 메틸을 지칭한다.

[0197] "임의적" 또는 "임의적으로"는 후속적으로 기재된 사건 또는 상황이 반드시 일어나지 않지만 발생할 수 있고, 사건 또는 상황이 발생하거나 발생하지 않는 경우가 설명에 포함됨을 의미한다. 예를 들어, "알킬로 임의적으로 치환된 헤테로사이클로알킬 기"는 알킬이 반드시 존재할 수 있고, 헤테로사이클로알킬 기가 알킬로 치환되거나 치환되지 않는 경우가 설명에 포함됨을 의미한다.

[0198] "치환된"은 기 내의 하나 이상, 바람직하게는 최대 5개, 보다 바람직하게는 1 내지 3개의 수소 원자가 상응하는 수의 치환기로 독립적으로 치환된다는 것을 의미한다. 치환기가 가능한 화학 위치에만 있다는 것은 말할 필요도 없고, 당업자는 과도한 노력 없이 (실험적으로 또는 이론적으로) 가능하거나 불가능한 치환을 결정할 수 있을 것이다. 예를 들어, 유리 수소가 있는 아미노 또는 하이드록시가 불포화(예를 들어, 올레핀) 결합을 갖는 탄소 원자에 결합되는 경우 불안정할 수 있다.

[0199] 용어 "약제학적으로 허용되는 염"은 본 개시내용의 항체-약물 접합체의 염, 또는 본 개시내용에 기재된 화합물의 염을 지칭한다. 이러한 염은 포유동물의 신체에서 사용될 때 안전하고 효과적이며 필요한 생물학적 활성을 보유한다. 본 개시내용의 항체-약물 접합체는 적어도 하나의 아미노기를 함유하므로 산으로 염을 형성할 수 있고, 약제학적으로 허용되는 염의 비제한적인 예는 하이드로클로라이드를 포함한다.

[0200] 용어 "용매화물"은 본 개시내용의 리간드-약물 접합체 화합물 및 하나 이상의 용매 분자에 의해 형성된 약제학적으로 허용되는 용매화물을 지칭하고, 용매 분자의 비제한적인 예는 물, 에탄올, 아세트니트릴, 이소프로판올, DMSO 및 에틸 아세테이트를 포함한다.

[0201] 본 개시내용의 약물에 대한 용어 "약물 담체"는 약물이 인체에 들어가는 방식 및 인체에서 약물의 분포를 변경하고, 약물의 방출 속도를 제어하고, 약물을 표적화된 장기로 전달할 수 있는 시스템을 지칭한다. 약물 담체 방출 및 표적화 시스템은 약물 분해 및 손실을 감소시키고, 부작용을 감소시키고 생체이용률을 개선할 수 있다.

예를 들어, 담체로서 사용될 수 있는 중합체성 계면활성제는 고유한 양친매성 구조로 인해 자기 조립하여 바람직한 예로서 미셀(micelle), 마이크로에멀전, 겔, 액정, 소포 등과 같은 다양한 응집체 형태를 형성할 수 있다. 응집체는 약물 분자를 캡슐화하는 능력이 있고 막에 대한 투과성이 우수하므로, 뛰어난 약물 담체로서 사용될 수 있다.

[0202] 용어 "부형제"는 주요 약물 외에, 약제학적 제형에 첨가되는 것이다. 이는 보조 물질로도 언급될 수 있다. 예를 들어, 정제 내 결합제, 충전제, 붕해제 및 윤활제; 반고체 연고 및 크림 제제 내 매트릭스 부분; 액체 제형 내 보존제, 항산화제, 교미제, 향료, 공용매, 유화제, 가용화제, 삼투압 조절제, 착색제 등이 모두 부형제로 언급될 수 있다.

[0203] 충전제로도 언급되는 용어 "회석제"는 주로 정제의 중량 및 부피를 증가시키는 데 사용된다. 회석제 첨가는 일정한 부피를 보장할 뿐만 아니라, 주요 성분의 용량 편차를 줄이고 약물의 압축 성형성 등을 개선시킨다. 정제 형태의 약물이 유성 구성요소를 함유하는 경우, 흡수제는 "건조" 상태를 유지하기 위해 유성 구성요소를 흡수하여 정제의 제조를 용이하게 하도록 반드시 첨가해야 한다.

[0204] "HER2의 이종이량체 결합 부위에 결합하는" HER2 항체는 도메인 II의 잔기에 결합하고(임의적으로 도메인 I 및 III의 잔기와 같이, HER2의 세포외 도메인 이외에 다른 도메인에 또한 결합하고) HER2-EGFR, HER2-HER3, 또는 HER2-HER4 이종이량체의 형성을 적어도 어느 정도 입체적으로 방해할 수 있다. Franklin et al., *Cancer Cell* 5: 317-328(2004)은 RCSB 단백질 데이터베이스(ID 코드 1S78)에 저장된 HER2-페르투주맙의 결정 구조를 보여주고 HER2의 이종이량체 결합 부위에 결합하는 예시적인 항체를 예시하였다.

[0205] "HER2의 도메인 II에 결합하는" 항체는 도메인 I 및 III의 잔기와 같이, 도메인 II 및 임의적으로 HER2의 다른 도메인의 잔기에 결합한다. 바람직하게는, 도메인 II에 결합하는 항체는 HER2의 도메인 I, II 및 III 사이의 접합부에 결합한다.

[0206] 본원에서, "페르투주맙"은 각각 서열번호: 1 및 2에 제시된 아미노산 서열을 갖는 경쇄 가변 영역 및 중쇄 가변 영역을 포함하는 항체를 지칭한다. 페르투주맙이 완전한 항체인 경우, 바람직하게는 각각 서열번호: 3 및 4에 제시된 아미노산 서열을 갖는 경쇄 및 중쇄를 포함한다. "페르투주맙"은 각각 서열번호: 1 및 2에 제시된 아미노산 서열을 갖는 경쇄 가변 영역 및 중쇄 가변 영역을 포함하는 항체를 지칭한다. 본 개시내용의 "트라스투주맙"은 각각 서열번호: 5 및 6에 제시된 아미노산 서열을 갖는 경쇄 및 중쇄를 포함한다. 제조 방법에 대해, WO2006033700을 참조하고, 관련 내용은 예시를 위해 본원에 포함된다.

**도면의 간단한 설명**

- [0207] 도 1은 N87/16-8 피하 이종이식 종양 모델 마우스의 종양 부피 변화를 보여주는 그래프이다.
- 도 2는 N87/16-8 피하 이종이식 종양 모델 마우스의 체중 변화를 보여주는 그래프이다.
- 도 3은 JIMIT-1 피하 이종이식 종양 모델 마우스의 종양 부피 변화를 보여주는 그래프이다.
- 도 4는 JIMIT-1 피하 이종이식 종양 모델 마우스의 체중 변화를 보여주는 그래프이다.

**발명을 실시하기 위한 구체적인 내용**

[0208] 본 개시내용은 실시예를 참조하여 아래에 추가로 기재되며, 이는 본 개시내용의 범위를 제한하는 것으로 의도되지 않는다.

[0209] 본 개시내용의 실시예에 명시된 조건이 없는 실험적 절차는 일반적으로 통상적인 조건에 따라, 또는 출발 물질 또는 상용 제품의 제조사에 의해 권장된 조건에 따라 수행되었다. 지시된 구체적 출처가 없는 시약은 상업적으로 입수 가능한 통상적인 시약이다.

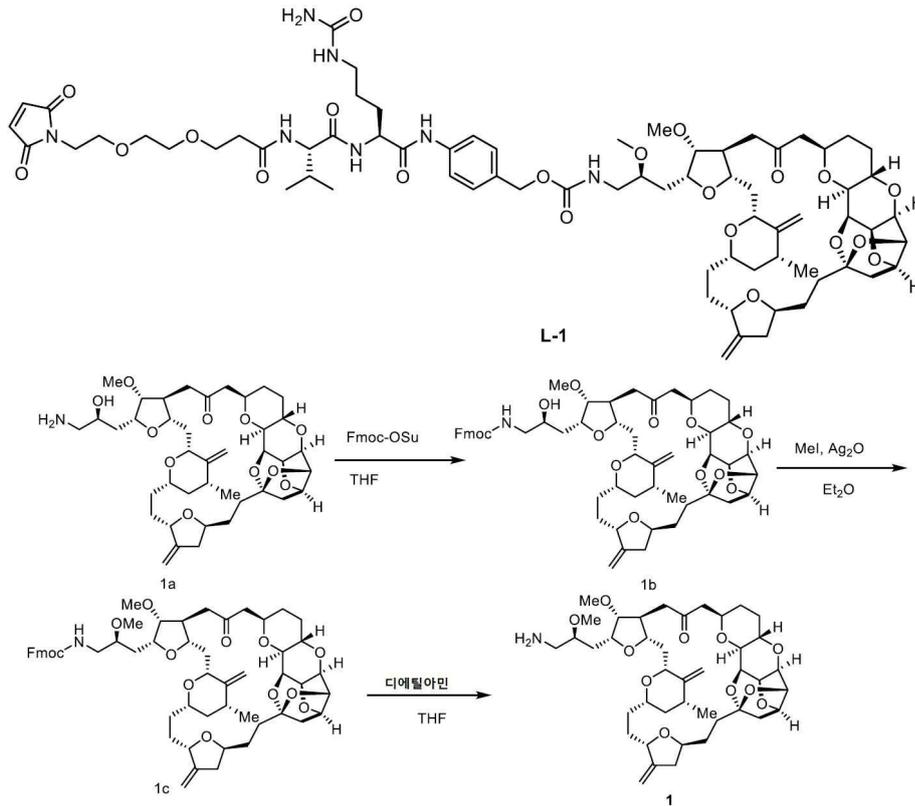
[0210] 화합물의 구조는 핵 자기 공명(NMR) 분광법 및/또는 질량 분광법(MS)에 의해 결정되었다. NMR 이동( $\delta$ )은 10<sup>6</sup>(ppm)으로 주어진다. NMR 분석은 디메틸 술폭사이드-D6(DMSO-*d*<sub>6</sub>), 클로로포름-D(CDC1<sub>3</sub>) 및 메탄올-D4(CD<sub>3</sub>OD)를 용매로서 사용하고 테트라메틸실란(TMS)을 내부 표준으로 사용하여 Bruker AVANCE-400 핵 자기 공명 기기에서 수행되었다.

[0211] MS 분석은 Agilent 1200/1290 DAD-6110/6120 Quadrupole MS 액체 크로마토그래피-질량 분광법

시스템(제조업체: Agilent; MS 모델: 6110/6120 Quadrupole MS)에서 수행되었다,

- [0212] waters ACQuity UPLC-QD/SQD(제조업체: waters; MS 모델: waters ACQuity Qda 검출기/waters SQ 검출기), 및 THERMO Ultimate 3000-Q Exactive(제조업체: THERMO; MS 모델: THERMO Q Exactive).
- [0213] 고성능 액체 크로마토그래피(HPLC) 분석은 다음 HPLC 기기를 사용하여 수행되었다: Agilent HPLC 1200DAD, Agilent HPLC 1200VWD 및 Waters HPLC e2695-2489.
- [0214] 키랄 HPLC 분석은 Agilent 1260 DAD 고성능 액체 크로마토그래프에서 수행되었다.
- [0215] 분취용 고성능 액체 크로마토그래피는 Waters 2545-2767, Waters 2767-SQ Detecor2, Shimadzu LC-20AP 및 Gilson GX-281 분취용 크로마토그래프에서 수행되었다.
- [0216] 분취용 키랄 크로마토그래피는 Shimadzu LC-20AP 분취용 크로마토그래프에서 수행되었다.
- [0217] 사용되는 CombiFlash 분취용 플래시 크로마토그래프는 CombiFlash Rf200(TELEDYNE ISCO)이었다.
- [0218] Yantai Huanghai HSGF254 또는 Qingdao GF254 실리카 겔 플레이트, 0.15 - 0.2 mm 층 두께가 박층 크로마토그래피(TLC) 분석에 채택되었고 0.4-0.5 mm 층 두께가 TLC 분리 및 정제에 채택되었다.
- [0219] 200-300 메쉬의 Yantai Huanghai 실리카 겔이 일반적으로 실리카 겔 컬럼 크로마토그래피에서 담체로서 사용된다.
- [0220] 본원에 기재된 알려진 출발 물질은 당업계에 알려진 방법에 따르거나 이를 사용하여 합성될 수 있거나, ABCR GmbH & Co. KG, Acros Organics, Aldrich Chemical Company, Accela ChemBio Inc., Chembee Chemicals, 및 다른 회사로부터 구입할 수 있다.
- [0221] 실시예에서, 반응은 모두 달리 명시되지 않는 한 아르곤 분위기 또는 질소 분위기에서 수행될 수 있다.
- [0222] 아르곤 분위기 또는 질소 분위기는 반응 플라스크가 약 1 L의 아르곤 또는 질소를 함유하는 풍선에 연결되어 있음을 의미한다.
- [0223] 수소 분위기는 반응 플라스크가 약 1 L의 수소를 함유하는 풍선에 연결되어 있음을 의미한다.
- [0224] 가압 수소화 반응은 Parr 3916EKX 수소화기 및 Qinglan QL-500 수소화기, 또는 HC2-SS 수소화기를 사용하여 수행되었다.
- [0225] 수소화 반응은 일반적으로 3주기의 진공화 및 수소 퍼징을 수반하였다.
- [0226] 마이크로파 반응은 CEM Discover-S 908860 마이크로파 반응기에서 수행되었다.
- [0227] 실시예에서, 용액은 달리 명시되지 않는 한 수용액이었다.
- [0228] 실시예에서, 반응은 달리 명시되지 않는 한 실온, 예를 들어, 20°C 내지 30°C에서 수행되었다.
- [0229] 화합물 정제에 사용되는 컬럼 크로마토그래피용 용리 시스템 및 박층 크로마토그래피용 전개 용매 시스템은 다음을 포함하였다: A: 디클로로메탄 및 이소프로판올 시스템, B: 디클로로메탄 및 메탄올 시스템, 및 C: 석유 에테르 및 에틸 아세테이트 시스템. 용매의 부피비는 화합물의 극성에 따라 조절되었거나, 소량의 트리에틸아민 및 산성 또는 염기성 시약을 첨가하여 조절되었다.

[0230] 실시예 1



[0231]

[0232] 단계 1: 화합물 1b의 제조

[0233] 화합물 1a(에리블린, ZL201010236637.2에 기재된 방법을 참조하여 제조됨)(72.91 mg, 0.1 mmol)를 빙수 속에서 테트라하이드로푸란 10 mL에 용해시킨 후, Fmoc-OSu(*N*-(9-플루오레닐메톡시카르보닐옥시)숙신이미드, 41 mg, 0.12 mmol)를 첨가하였다. 반응이 완료될 때까지 반응 시스템을 실온에서 교반하였다. 반응 시스템을 감압 하에 농축하여 조질 생성물을 획득하고, 이를 다음 단계에 직접 사용하였다.

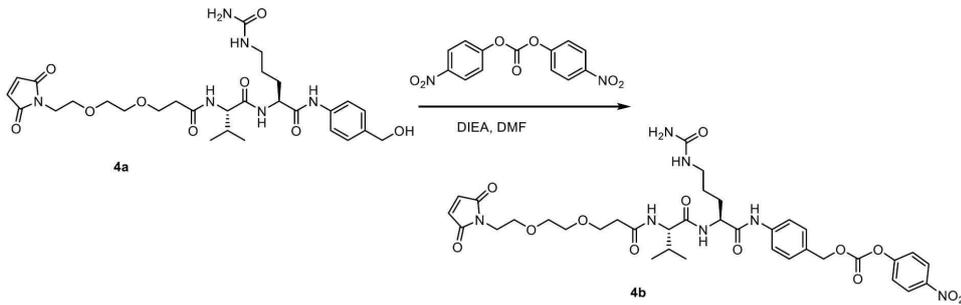
[0234] 단계 2: 화합물 1c의 제조

[0235] 이전 단계에서 획득된 화합물 1b의 조질 생성물을 무수 에테르 10 mL에 용해시킨 후, 산화은(34.8 mg, 0.15 mmol) 및 요오도메탄(28.4 mg, 0.2 mmol)을 첨가하였다. 반응이 완료될 때까지 반응 시스템을 실온에서 교반하였다. 반응 시스템을 여과하고 감압 하에 농축하여 조질 생성물을 획득하고, 이를 다음 단계에 직접 사용하였다.

[0236] 단계 3: 화합물 1의 제조

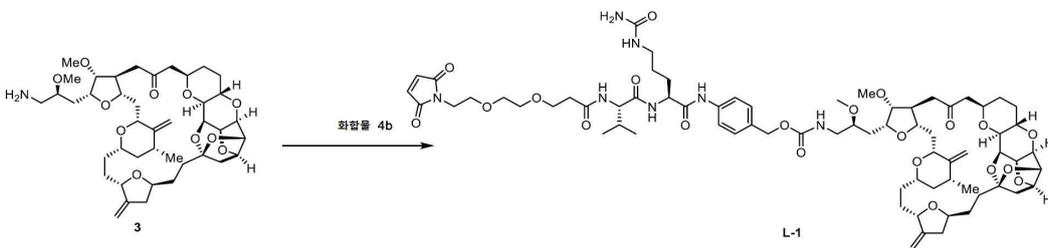
[0237] 이전 단계에서 획득된 화합물 1c의 조질 생성물을 테트라하이드로푸란 10 mL에 용해시킨 후, 디에틸아민 2 mL를 첨가하였다. 반응이 완료될 때까지 반응 시스템을 실온에서 교반하였다. 반응 시스템을 감압 하에 농축하여 조질 생성물을 획득하고, 이를 실리카 겔 컬럼 크로마토그래피(용리액: 디클로로메탄/에틸 아세테이트/석유 에테르)로 정제하여 표적 화합물 1 3 mg을 획득하였다.

[0238] LC/MS(ESI):  $m/z$  744.2  $[M+H]^+$ .



[0239]

[0240] **4a** (50 mg, 0.08 mmol, WO2017151979에 기재된 방법을 참조하여 제조됨)를 빙수 욕에서 *N,N*-디메틸포름아미드 1.5 mL에 용해시킨 후, DIPEA(*N,N*-디이소프로필에틸아민, 18 mg, 0.14 mmol) 및 비스(*p*-니트로페닐)카보네이트(49 mg, 0.16 mmol)를 첨가하였다. 반응 시스템을 실온에서 10분 동안 교반하고, 메틸 *tert*-부틸 에테르 20 mL를 첨가하였다. 그런 다음 반응 시스템을 20분 동안 교반하고, 여과하고, 건조시켜 고체 36 mg을 수득하였다.  
LC/MS(ESI):  $m/z$  784.1  $[M+H]^+$ .



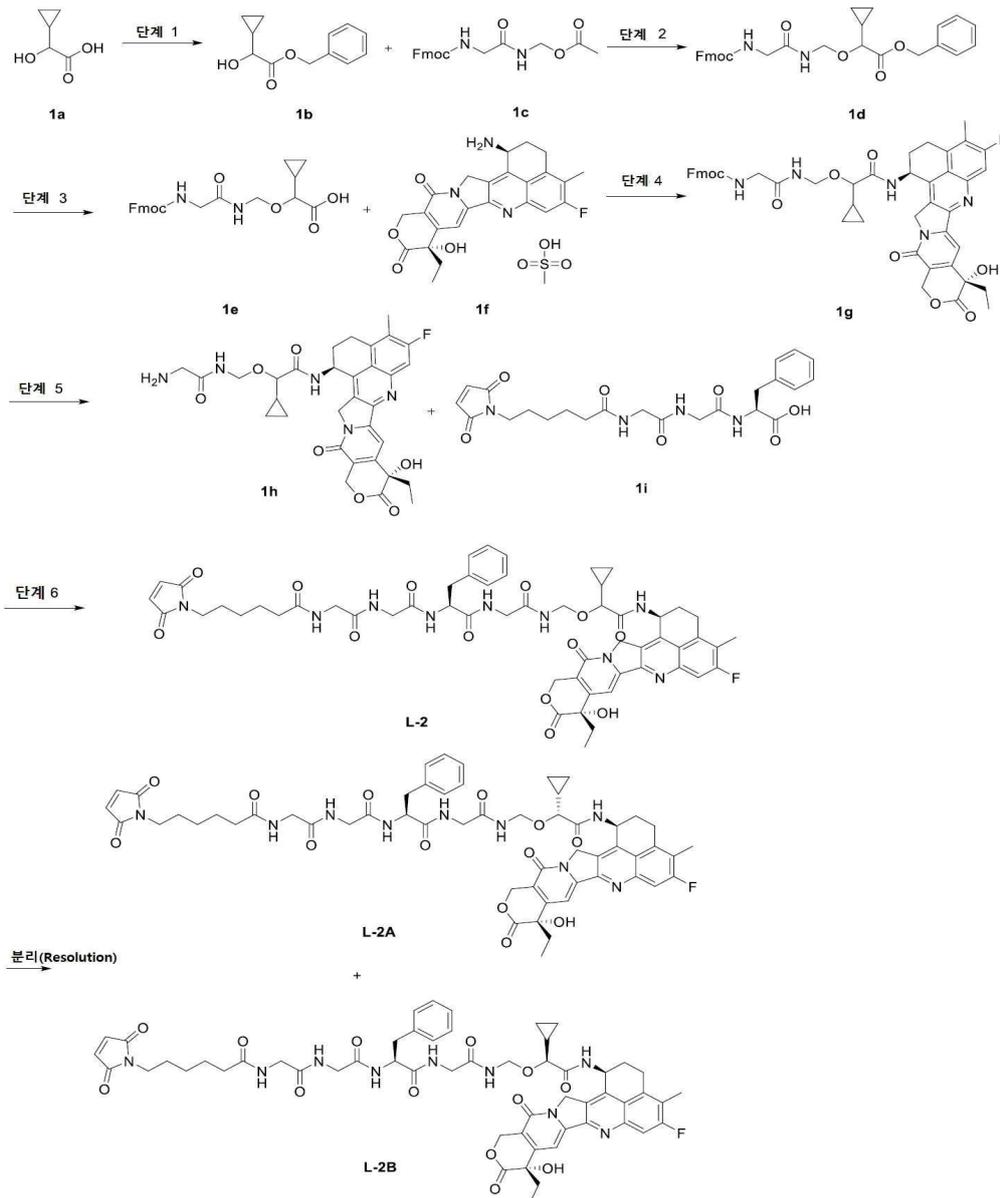
[0241]

[0242] 화합물 **1** (13.5 mg, 0.018 mmol)을 DMF 1.5 mL에 용해시킨 후, DIPEA(7 mg, 0.054 mmol)를 첨가하고 화합물 **4b** (18 mg, 1.3 mmol)를 나누어 첨가하였다. 반응이 실질적으로 완료될 때까지 반응 시스템을 교반한 다음 농축하여 조질 생성물을 수득하고, 이를 분취용 HPLC로 분리하여 화합물 L-1(96.95% 순도) 6.5 mg을 수득하였다.  
LC/MS(ESI):  $m/z$  1388.3  $[M+H]^+$ .

[0243] **실시예 2. ADC-001**

[0244] *N*-((2*R*, 10*S*)-10-벤질-2-사이클로프로필-1-(((1*S*, 9*S*)-9-에틸-5-플루오로-9-하이드록시-4-메틸-10, 13-디옥소-2, 3, 9, 10, 13, 15-헥사하이드로-1*H*, 12*H*-벤조[*de*]피라노[3', 4':6, 7]인돌리지노[1, 2-*b*]퀴놀린-1-일)아미노)-1, 6, 9, 12, 15-펜타옥소-3-옥사-5, 8, 11, 14-테트라아자헥사데크-16-일)-6-(2, 5-디옥소-2, 5-디하이드로-1*H*-피롤-1-일)헥산아미드 **L-2A**

[0245] *N*-((2*S*, 10*S*)-10-벤질-2-사이클로프로필-1-(((1*S*, 9*S*)-9-에틸-5-플루오로-9-하이드록시-4-메틸-10, 13-디옥소-2, 3, 9, 10, 13, 15-헥사하이드로-1*H*, 12*H*-벤조[*de*]피라노[3', 4':6, 7]인돌리지노[1, 2-*b*]퀴놀린-1-일)아미노)-1, 6, 9, 12, 15-펜타옥소-3-옥사-5, 8, 11, 14-테트라아자헥사데크-16-일)-6-(2, 5-디옥소-2, 5-디하이드로-1*H*-피롤-1-일)헥산아미드 **L-2B**



[0246]

[0247] 단계 1

[0248] 벤질 2-사이클로프로필-2-하이드록시아세테이트 **1b**

[0249] **1a**(1.3 g, 11.2 mmol; 특허 출원 "W02013/106717"에 개시된 방법에 따라 제조됨)를 아세트니트릴 50 mL에 용해시키고, 탄산칼륨(6.18 g, 44.8 mmol), 벤질 브로마이드(1.33 mL, 11.2 mmol), 및 테트라부틸암모늄 요오다이드(413 mg, 1.1 mmol)를 연속하여 첨가하였다. 반응 시스템을 실온에서 48시간 동안 교반하고 셀라이트를 통해 여과하고, 필터 케이크를 에틸 아세테이트(10 mL)로 행겼다. 여액을 합하고 감압 하에 농축하고, 생성된 잔류물을 용매 시스템 C로 전개하는 실리카 겔 컬럼 크로마토그래피로 정제하여 표제 생성물 **1b**(2 g, 86.9% 수율)를 수득하였다.

[0250] 단계 2

[0251] 벤질 10-사이클로프로필-1-(9H-플루오렌-9-일)-3,6-디옥소-2,9-디옥사-4,7-디아자운데칸-11-오에이트 **1d**

[0252] 반응 플라스크에 **1b**(120.9 mg, 0.586 mmol) 및 **1c**(180 mg, 0.489 mmol)를 첨가한 후, 테트라하이드로푸란 4 mL를 첨가하였다. 반응 시스템을 아르곤으로 3회 퍼지하고 빙수 욕에서 0-5°C로 냉각시킨 후, 칼륨 *tert*-부톡사이드(109 mg, 0.98 mmol)를 첨가하였다. 빙욕을 제거하고, 생성된 혼합물을 실온으로 가열하고 40분 동안 교반한 후, 빙수 10 mL를 첨가하였다. 혼합물을 에틸 아세테이트(20 mL x 2) 및 클로로포름(10 mL x 5)으로 추출하고, 유기 상을 합하고 농축하였다. 생성된 잔류물을 디옥산 4 mL에 용해시킨 후, 물 2 mL, 중탄산나트륨(49.2 mg,

0.586 mmol), 및 9-플루오레닐메틸 클로로포름에이트(126 mg, 0.49 mmol)를 첨가하였다. 생성된 혼합물을 실온에서 2시간 동안 교반하였다. 물 20 mL를 첨가하고, 반응물을 에틸 아세테이트(10 mL x 3)로 추출하였다. 유기상을 포화 염화나트륨 용액(20 mL)으로 세척하고, 무수 황산나트륨 상에서 건조시키고, 여과하였다. 여액을 감압 하에 농축하였다. 생성된 잔류물을 용매 시스템 C로 전개하는 실리카 겔 컬럼 크로마토그래피로 정제하여 표제 생성물 **1d**(48 mg, 19% 수율)를 수득하였다.

[0253] MS m/z(ESI): 515.0 [M+1].

[0254] 단계 3

[0255] 10-사이클로프로필-1-(9H-플루오렌-9-일)-3,6-디옥소-2,9-디옥사-4,7-디아자운데칸-11-오산 **1e**

[0256] **1d**(20 mg, 0.038 mmol)를 테트라하이드로푸란 및 에틸 아세테이트의 용매 혼합물(V:V = 2:1) 4.5 mL에 용해시키고, 탄소 상 팔라듐(12 mg, 10% 로딩, 건조)을 첨가하였다. 반응 시스템을 수소로 3회 퍼지하고 실온에서 1시간 동안 교반하였다. 반응 시스템을 셀라이트를 통해 여과하고, 필터 케이크를 에틸 아세테이트로 행겼다. 여액을 농축하여 표제 생성물 **1e**의 조질 생성물(13 mg)을 수득하고, 이를 정제 없이 다음 단계에서 직접 사용하였다.

[0257] MS m/z(ESI): 424.9 [M+1].

[0258] 단계 4

[0259] (9H-플루오렌-9-일)메틸(2-(((1-사이클로프로필-2-(((1S,9S)-9-에틸-5-플루오로-9-하이드록시-4-메틸-10,13-디옥소-2,3,9,10,13,15-헥사하이드로-1H,12H-벤조[de]피라노[3',4':6,7]인돌리지노[1,2-b]퀴놀린-1-일)아미노)-2-옥소에톡시)메틸)아미노)-2-옥소에틸)카르바메이트 **1g**

[0260] 반응 플라스크에 **1f**(10 mg, 18.8 μmol)를 첨가한 후, N,N-디메틸포름아미드 1 mL를 첨가하였다. 반응 시스템을 아르곤으로 3회 퍼지하고 빙수 욕에서 0-5°C로 냉각시킨 후 트리에틸아민 한 방울, **9c**의 조질 생성물(13 mg, 30.6 μmol), 및 4-(4,6-디메톡시-1,3,5-트리아진-2-일)-4-메틸모르폴리늄 클로라이드(16.9 mg, 61.2 μmol)를 첨가하였다. 생성된 반응 시스템을 빙욕에서 40분 동안 교반하였다. 물 10 mL를 첨가하고, 혼합물을 에틸 아세테이트(10 mL x 3)로 추출하였다. 유기 상을 합하고, 포화 염화나트륨 용액(10 mL x 2)으로 세척하고, 무수 황산나트륨 상에서 건조시키고, 여과하였다. 여액을 감압 하에 농축하였다. 생성된 잔류물을 용매 시스템 B로 전개하는 박층 크로마토그래피로 정제하여 표제 생성물 **1g**(19 mg, 73.6% 수율)를 수득하였다.

[0261] MS m/z(ESI): 842.1 [M+1].

[0262] 단계 5

[0263] 2-((2-아미노아세틸아미노)메톡시)-2-사이클로프로필-N-((1S,9S)-9-에틸-5-플루오로-9-하이드록시-4-메틸-10,13-디옥소-2,3,9,10,13,15-헥사하이드로-1H,12H-벤조[de]피라노[3',4':6,7]인돌리지노[1,2-b]퀴놀린-1-일)아세트아미드 **1h**

[0264] **1g**(19 mg, 22.6 μmol)를 디클로로메탄 2 mL에 용해시키고, 디에틸아민 1 mL를 첨가하였다. 반응 시스템을 실온에서 2시간 동안 교반하고 감압 하에 농축하였다. 톨루엔 1 mL를 첨가하고, 생성된 반응 시스템을 감압 하에 농축하고, 질차를 2번 반복하였다. 잔류물을 n-헥산 3 mL로 슬러리화하고 방치하였다. 그런 다음 상청액을 제거하고, 고체 상태로 유지하였다. 고체 잔류물을 감압 하에 농축하고 오일 펌프를 사용하여 건조시켜 표제 생성물 **1h**의 조질 생성물(17 mg)을 수득하고, 이를 정제 없이 다음 단계에서 직접 사용하였다.

[0265] MS m/z(ESI): 638.0 [M+18].

[0266] 단계 6

[0267] N-((2R,10S)-10-벤질-2-사이클로프로필-1-(((1S,9S)-9-에틸-5-플루오로-9-하이드록시-4-메틸-10,13-디옥소-2,3,9,10,13,15-헥사하이드로-1H,12H-벤조[de]피라노[3',4':6,7]인돌리지노[1,2-b]퀴놀린-1-일)아미노)-1,6,9,12,15-펜타옥소-3-옥사-5,8,11,14-테트라아자헥사데크-16-일)-6-(2,5-디옥소-2,5-디하이드로-1H-피롤-1-일)헥산아미드 **9-A**

[0268] N-((2S,10S)-10-벤질-2-사이클로프로필-1-(((1S,9S)-9-에틸-5-플루오로-9-하이드록시-4-메틸-10,13-디옥소-2,3,9,10,13,15-헥사하이드로-1H,12H-벤조[de]피라노[3',4':6,7]인돌리지노[1,2-b]퀴놀린-1-일)아미노)-1,6,9,12,15-펜타옥소-3-옥사-5,8,11,14-테트라아자헥사데크-16-일)-6-(2,5-디옥소-2,5-디하이드로-1H-피롤-

1-일)헥산아미드 9-B

[0269] **1h**의 조질 생성물(13.9 mg, 22.4  $\mu$ mol)을 *N,N*-디메틸포름아미드 0.6 mL에 용해시켰다. 반응 시스템을 아르곤으로 3회 퍼지하고 빙수 욕에서 0-5°C로 냉각시킨 후 *N,N*-디메틸포름아미드 및 4-(4,6-디메톡시-1,3,5-트리아진-2-일)-4-메틸모르폴리늄 클로라이드(18.5 mg, 67.3  $\mu$ mol) 0.3 mL 중 **11**(21.2 mg, 44.8  $\mu$ mol)의 용액을 첨가하였다. 생성된 반응 시스템을 빙욕에서 10분 동안 교반하였다. 그런 다음 빙욕을 제거하고, 반응 시스템을 실온으로 가열하고 1시간 동안 교반하여 화합물 **L-2**를 수득하였다. 반응 시스템을 고성능 액체 크로마토그래피(분리 조건: 크로마토그래피 컬럼: XBridge Prep C18 OBD 5  $\mu$ m 19 x 250 mm; 이동상: A-물(10 mmol NH<sub>4</sub>OAc), B-아세트오닐트릴, 구배 용리, 유속: 18 mL/분)로 정제하였다. 상응하는 분획을 수집하고 감압 하에 농축하여 표제 생성물(L-2A: 2.4 mg, L-2B: 1.7 mg)을 수득하였다.

[0270] MS m/z(ESI): 1074.4 [M+1].

[0271] 체류 시간이 더 짧은 화합물 L-2A 및 L-2B의 것:

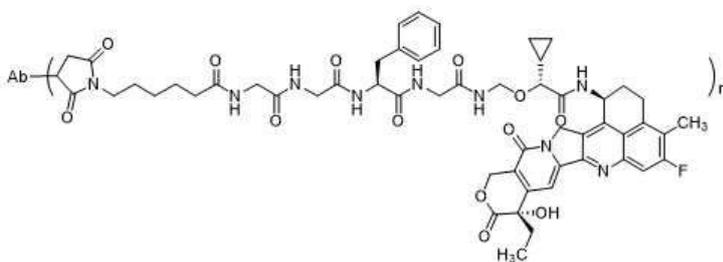
[0272] UPLC 분석: 체류 시간: 1.14분; 순도: 85%(크로마토그래피 컬럼: ACQUITY UPLC BEH C18 1.7  $\mu$ m 2.1 x 50 mm; 이동상: A-물(5 mmol NH<sub>4</sub>OAc), B-아세트오닐트릴).

[0273] <sup>1</sup>H NMR(400 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>):  $\delta$  8.60(t, 1H), 8.51-8.49(d, 1H), 8.32-8.24(m, 1H), 8.13-8.02(m, 2H), 8.02-7.96(m, 1H), 7.82-7.75(m, 1H), 7.31(s, 1H), 7.26-7.15(m, 4H), 6.99(s, 1H), 6.55-6.48(m, 1H), 5.65-5.54(m, 1H), 5.41(s, 2H), 5.35-5.15(m, 3H), 4.74-4.62(m, 1H), 4.54-4.40(m, 2H), 3.76-3.64(m, 4H), 3.62-3.48(m, 2H), 3.20-3.07(m, 2H), 3.04-2.94(m, 1H), 2.80-2.62(m, 1H), 2.45-2.30(m, 3H), 2.25-2.15(m, 2H), 2.15-2.04(m, 2H), 1.93-1.78(m, 2H), 1.52-1.39(m, 3H), 1.34-1.12(m, 5H), 0.87(t, 3H), 0.64-0.38(m, 4H).

[0274] 체류 시간이 더 긴 화합물 L-2A 및 L-2B의 것:

[0275] UPLC 분석: 체류 시간: 1.16분; 순도: 89%(크로마토그래피 컬럼: ACQUITY UPLC BEH C18 1.7  $\mu$ m 2.1 x 50 mm; 이동상: A-물(5 mmol NH<sub>4</sub>OAc), B-아세트오닐트릴).

[0276] <sup>1</sup>H NMR(400 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>):  $\delta$  8.68-8.60(m, 1H), 8.58-8.50(m, 1H), 8.32-8.24(m, 1H), 8.13-8.02(m, 2H), 8.02-7.94(m, 1H), 7.82-7.75(m, 1H), 7.31(s, 1H), 7.26-7.13(m, 3H), 6.99(s, 1H), 6.55-6.48(m, 1H), 5.60-5.50(m, 1H), 5.41(s, 2H), 5.35-5.15(m, 2H), 4.78-4.68(m, 1H), 4.60-4.40(m, 2H), 3.76-3.58(m, 4H), 3.58-3.48(m, 1H), 3.20-3.10(m, 2H), 3.08-2.97(m, 2H), 2.80-2.72(m, 2H), 2.45-2.30(m, 3H), 2.25-2.13(m, 2H), 2.13-2.04(m, 2H), 2.03-1.94(m, 2H), 1.91-1.78(m, 2H), 1.52-1.39(m, 3H), 1.34-1.12(m, 4H), 0.91-0.79(m, 3H), 0.53-0.34(m, 4H).



[0277] .

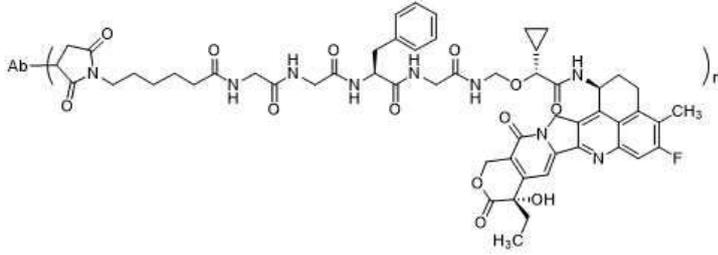
[0278] PBS(pH 6.5에서 0.05 M 수성 PBS 완충 용액; 10.0 mg/mL, 1.50 mL, 101 nmol) 중 항체 페르투주맙의 수성 완충 용액에 트리스(2-카르복시에틸)포스핀 하이드로클로라이드(TCEP-HCl)(10 mM, 16.2  $\mu$ L, 162 nmol)의 제조된 수 용액을 37°C에서 첨가하였다. 반응 시스템을 수욕 진탕기에서 37°C로 3시간 동안 진탕한 다음, 반응을 중단시켰다. 반응 시스템을 수욕에서 25°C로 냉각시켰다.

[0279] 체류 시간이 더 짧은 화합물 L-2A 및 L-2B의 것(0.87 mg, 810 nmol)을 디메틸 술폭사이드 66  $\mu$ L에 용해시키고, 혼합물을 위에 기재된 반응 시스템에 첨가하였다. 생성된 반응 시스템을 수욕 진탕기에서 25°C로 3시간 동안 진탕한 다음, 반응을 중단시켰다. 반응 시스템을 탈염화하고 Sephadex G25 겔 컬럼(용리상: pH 6.5에서 0.05 M 수성 PBS 완충 용액, 0.001 M EDTA 함유)을 통해 정제하여 PBS 완충액(1.16 mg/mL, 12.0 mL) 중 표제 생성물을

수득하고, 이를 4°C에서 냉장하였다.

[0280] RP-HPLC에 의해 계산된 평균:  $n = 2.67$ .

[0281] 실시예 3. ADC-002



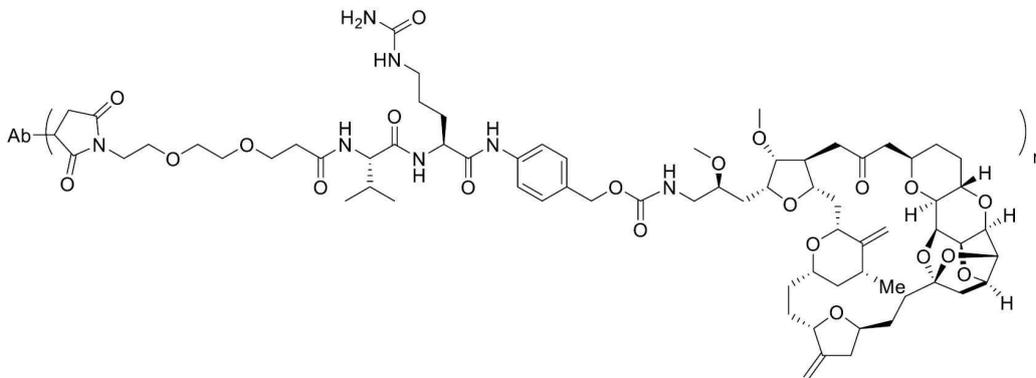
[0282]

[0283] PBS(pH 6.5에서 0.05 M 수성 PBS 완충 용액; 10.0 mg/mL, 1.50 mL, 101 nmol) 중 항체 페르투주맙의 수성 완충 용액에 트리스(2-카르복시에틸)포스핀 하이드로클로라이드(TCEP-HCl)(10 mM, 28.4  $\mu$ L, 284 nmol)의 제조된 수 용액을 37°C에서 첨가하였다. 반응 시스템을 수욕 진탕기에서 37°C로 3시간 동안 진탕한 다음, 반응을 중단시켰다. 반응 시스템을 수욕에서 25°C로 냉각시켰다.

[0284] 체류 시간이 더 짧은 화합물 L-2A 및 L-2B의 것(1.09 mg, 1015 nmol)을 디메틸 술폭사이드 84  $\mu$ L에 용해시키고, 혼합물을 위에 기재된 반응 시스템에 첨가하였다. 생성된 반응 시스템을 수욕 진탕기에서 25°C로 3 시간 동안 진탕한 다음, 반응을 중단시켰다. 반응 시스템을 탈염화하고 Sephadex G25 겔 컬럼(용리상: pH 6.5에서 0.05 M 수성 PBS 완충 용액, 0.001 M EDTA 함유)을 통해 정제하여 PBS 완충액(1.06 mg/mL, 12.0 mL) 중 표 제 생성물을 수득하고, 이를 4°C에서 냉장하였다.

[0285] RP-HPLC에 의해 계산된 평균:  $n = 4.51$ .

[0286] 실시예 4. ADC-003



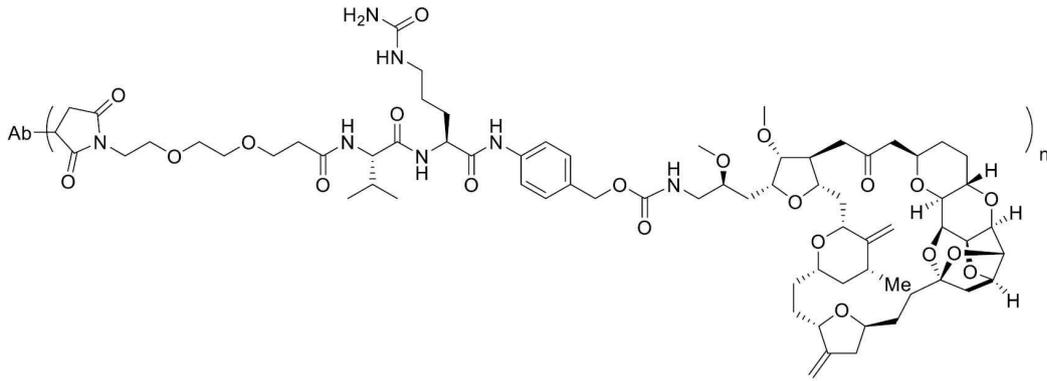
[0287]

[0288] PBS(pH 6.5에서 0.05 M 수성 PBS 완충 용액; 10.0 mg/mL, 1.43 mL, 97 nmol) 중 항체 페르투주맙의 수성 완충 용액에 트리스(2-카르복시에틸)포스핀 하이드로클로라이드(TCEP-HCl)(10 mM, 15.5  $\mu$ L, 155 nmol)의 제조된 수 용액을 37°C에서 첨가하였다. 반응 시스템을 수욕 진탕기에서 37°C로 3시간 동안 진탕한 다음, 반응을 중단시켰다. 반응 시스템을 수욕에서 25°C로 냉각시켰다.

[0289] 화합물 L-1(1.07 mg, 771 nmol)을 디메틸 술폭사이드 50  $\mu$ L에 용해시키고, 혼합물을 위에 기재된 반응 시스템에 첨가하였다. 생성된 반응 시스템을 수욕 진탕기에서 25°C로 3시간 동안 진탕한 다음, 반응을 중단시켰다. 반응 시스템을 탈염화하고 Sephadex G25 겔 컬럼(용리상: pH 6.5에서 0.05 M 수성 PBS 완충 용액, 0.001 M EDTA 함유)을 통해 정제하여 PBS 완충액(1.21 mg/mL, 10.8 mL) 중 표제 생성물을 수득하고, 이를 4°C에서 냉장하였다.

[0290] CE-SDS에 의해 계산된 평균:  $n = 2.04$ .

[0291] 실시예 5. ADC-004



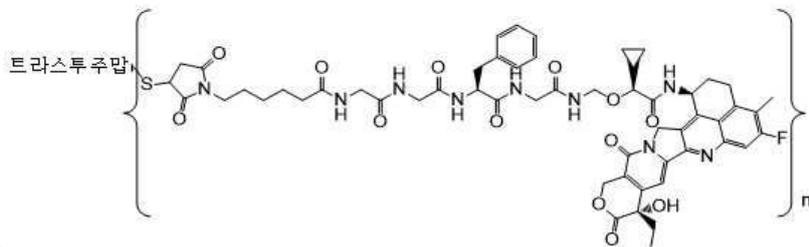
[0292]

[0293] PBS(pH 6.5에서 0.05 M 수성 PBS 완충 용액; 10.0 mg/mL, 1.43 mL, 97 nmol) 중 항체 페르투주맵의 수성 완충 용액에 트리스(2-카르복시에틸)포스핀 하이드로클로라이드(TCEP-HCl)(10 mM, 24.2  $\mu$ L, 242 nmol)의 제조된 수 용액을 37°C에서 첨가하였다. 반응 시스템을 수욕 진탕기에서 37°C로 3시간 동안 진탕한 다음, 반응을 중단시켰다. 반응 시스템을 수욕에서 25°C로 냉각시켰다.

[0294] 화합물 L-1(1.34 mg, 965 nmol)을 디메틸 술폭사이드 60  $\mu$ L에 용해시키고, 혼합물을 위에 기재된 반응 시스템에 첨가하였다. 생성된 반응 시스템을 수욕 진탕기에서 25°C로 3시간 동안 진탕한 다음, 반응을 중단시켰다. 반응 시스템을 탈염화하고 Sephadex G25 겔 컬럼(용리상: pH 6.5에서 0.05 M 수성 PBS 완충 용액, 0.001 M EDTA 함유)을 통해 정제하여 PBS 완충액(1.24 mg/mL, 9.8 mL) 중 표제 생성물을 수득하고, 이를 4°C에서 냉장하였다.

[0295] CE-SDS에 의해 계산된 평균: n = 3.17.

[0296] 실시예 6. ADC-005



[0297]

[0298] 실시예 3의 방법을 참조하여, 체류 시간이 더 긴 화합물 L-2A 및 L-2B의 것 및 트라스투주맵(WO2006033700에 기재된 방법을 참조하여 제조됨)을 출발 물질로서 사용하여 PBS 완충액(1.24 mg/mL, 9.8 mL) 중 표적 생성물을 제조하고, 이를 4°C에서 냉장하였다.

[0299] CE-SDS에 의해 계산된 평균: n = 6.

[0300] 시험예 1. 시험관 내에서 배양된 인간 유방암 BT-474 및 인간 위암 NCI-N87, NCI-N87/16-8 및 NCI-N87/8-2 세포의 증식 억제

[0301] 1.1 약물 정보

서열	약물 코드	농도(%)	순도(%)
1	ADC-001	1.16	96.06
2	ADC002	1.06	95.13
3	ADC-003	1.21	98.18
4	ADC-004	1.24	97.57
5	ADC-005	5	/
6	kadcyla	10	/

참고: 위 샘플은 Shanghai Hengrui Pharmaceutical Co., Ltd.에서 제공되었으며, 여기서 페르투주맵은 WO2006033700의 방법과 유사한 방법으로 제조되었다. kadcyla: 트라스투주맵-마이탄신 접합체.

[0302]

[0303] 1.2 테스트 세포

[0304] NCI-N87 및 BT-474 세포는 아메리칸 타입 컬처 콜렉션(ATCC)에서 구입하였다. NCI-N87에 대한 T-DM1의 장기간 효과에 의해 유도된 T-DM1-내성 NCI-N87/16-8 및 NCI-N87/8-2 세포를 이 실험실에서 구축하였다. 세포를 10% 소 태아 혈청(FBS)이 함유된 RPMI 1640/DMEM(1:1)에서 배양하였다.

[0305] 1.3 기기 및 시약

[0306] RPMI 1640 및 DMEM은 Gibco BRL에서 구입하였고; FBS는 Gibco에서 구입하였고; 술포로다민 B(SRB)는 Sigma에서 구입하였다.

[0307] 마이크로플레이트 판독기 Synergy H4는 BioTek에서 구입하였다.

[0308] 1.4 실험 절차

[0309] 로그 성장 단계의 특정 수의 세포를 96-웰 배양 플레이트에 시딩하였다. 세포를 24시간 동안 부착 배양한 후, 약물을 상이한 농도(10000 ng/mL, 3000 ng/mL, 1000 ng/mL, 300 ng/mL, 100 ng/mL, 30 ng/mL, 10 ng/mL, 3 ng/mL, 및 1 ng/mL)로 첨가하였다. 120시간의 약물 처리 후, 세포를 트리클로로아세트산으로 고정시켰다. 그런 다음 세포를 SRB 용액으로 염색하고; 마지막으로, Tris 용액을 첨가하여 SRB를 용해시켰다. 510 nm 파장에서의 OD 값을 마이크로플레이트 판독기를 사용하여 판독하고, 세포 성장 억제율을 다음 식에 따라 계산하였다:

[0310] 억제율 = (대조군 웰의 OD 값 - 투약 웰의 OD 값) / 대조군 웰의 OD 값 x 100%

[0311] 절반 최대 억제 농도(IC<sub>50</sub> values)를 GraphPad Prism 7 소프트웨어를 사용하여 각 농도에서의 억제율로부터 계산하였다.

[0312] 표 1. HER2-양성 종양 세포의 증식 억제(IC<sub>50</sub>)(ng/mL)

	NCI-N87	NCI-N87/16-8	NCI-N87/8-2	BT-474
ADC-001	≈10000	≈10000	≈10000	>10000
ADC-001	1186	832.4	1257	>10000
ADC-003	13.0	104.5	55.4	8.7
ADC-004	8.1	33.6	13.0	5.6
ADC-005	391.3	235.7	96.5	>10000
ADC-005	26.3	≈10000	≈10000	77.3

[0313]

[0314] 시험예 2. 화합물 1의 시험관 내 세포독성 활성 스크리닝

[0315] 1.1. 원리 및 방법

[0316] 이 실험에서, 종양 세포의 생존 조건을 반영하기 위해 CTG를 사용하여 ATP 함량을 결정하였다. 먼저, 세포를 상이한 밀도로 시딩하고 3일 및 5일 동안 배양한 다음, IC<sub>50</sub> 및 최대 억제율에 기반하여 최종 배양 조건을 결정하였다. 그런 다음 이 조건에 따라 독소 분자의 사멸 효과를 검정하였다.

[0317] 1.2. 세포주의 선택

[0318] 실험 목적에 따라, 유방암 및 NSCLC의 2가지 질환 모델을 선택하고, 스크리닝을 위해 SKBR3 종양 세포(HER2+, ATCC, Cat# HTB-30), MDA-MB-468(HER2-, ATCC, Cat# HTB-132) 및 A549(인간 비소세포 폐암 세포, ATCC, Cat# CCL-185)의 3가지 세포주를 선택하였다.

[0319] 1.3. 세포 배양 조건 결정

[0320] 1) 세포 배양: A549, SK-BR-3 및 MDA-MB-468 세포를 각각 10% FBS(Gibco, 10099-141)를 함유하는 Ham의 F-12K(Kaighn's) 배지(Gibco, 21127030), McCoy의 5A 배지(ThermoFisher, Cat# 16600108) 및 Leibovitz의 L-15 배지(ThermoFisher, Cat# 11415-114)에서 배양하였다.

[0321] 2) 세포 플레이팅: A549 세포를 판크레아틴으로 소화시킨 다음, 위의 배지를 사용하여 소화를 종료시켰다. 세포를 계수하고, 4.3 x 10<sup>5</sup>개, 7.2 x 10<sup>5</sup>개 및 11.5 x 10<sup>5</sup>개 세포를 각각 배양 용액에 첨가하여 26 mL의 최종 부피를 획득하였다. 세포 현탁액 180 µL를 96-웰 플레이트(Corning, Cat# 3903)의 컬럼 2 내지 11의 각 웰에 첨가하여 웰 당 3K, 5K 및 8K의 세포 밀도를 획득하였다. 컬럼 12의 웰을 각각 배양 용액 200 µL로 채우고 나머지 웰을 각각 PBS로 채웠다. SKBR3 및 MDA-MB-468 세포를 위에 기재된 동일한 작업에 적용하였다. 각 샘플을 중복하여 실행하였다.

[0322] 2) 약물 제조: 양성 대조군 에리블린 및 본 개시내용의 화합물의 스톡 용액을 96-웰 환저 플레이트(Corning, Cat# 3788) 내 DMSO에서 제조하였다. 2 mM 스톡 용액(DMSO 중에 10-배로 희석된 스톡 용액)을 약물 제조 플레이트 1의 컬럼 1에서 제조한 다음, 컬럼 10을 통해 DMSO 중 10-배 구배 희석을 수행하고, 컬럼 11의 웰을 DMSO로 채웠다. 상응하는 배양 용액 95 µL를 약물 제조 플레이트 2의 컬럼 2에서 컬럼 11까지 각 웰에 첨가하고, 약물 제조 플레이트 1의 컬럼 2에서 컬럼 11까지 용액 5 µL를 약물 제조 플레이트 2로 피펫팅하였다. 용액을 잘 혼합하고, 용액 20 µL를 피펫팅하여 플레이팅된 세포에 첨가하였다. 그런 다음 세포를 3일 및 5일 동안 배양하였다.

[0323] 3) CTG 검정(Cell Titer-Glo™, 발광 세포 생존력 검정, Promega): 세포 플레이트를 3일차 및 5일차에 꺼내어 실온으로 평형화하였다. CTG 90 µL를 각 웰에 첨가하고, 혼합물을 실온에서 10분 동안 암실에서 반응시켰다. 마이크로플레이트 판독기를 사용하여 흡수값을 판독하고 IC<sub>50</sub>을 계산하였다.

[0324] 1.4. 데이터 결과

[0325] 표 2

화합물	SKBR3		MDA-MB-468		A549	
	IC <sub>50</sub> (nM)	최대 억제율(%)	IC <sub>50</sub> (nM)	최대 억제율(%)	IC <sub>50</sub> (nM)	최대 억제율(%)
에리블린	0.7147	94.90	0.4819	87.47	0.6609	81.50
화합물 1	0.2052	96.87	0.1827	88.01	0.5151	81.34

[0326]

[0327] 시험예 3. 화합물 1의 약동학 연구

[0328] 1. 개요

[0329] 실험을 받은 적이 있는(non-naive) 비글을 테스트 동물로 이용하고, 비글에게 화합물 D-1 및 에리블린을 정맥내 투여한 후 상이한 시점에서의 혈장 농도를 LC/MS/MS를 사용하여 측정하였다. 본 개시내용의 화합물의 비글에서의 약동학 성능을 연구하고 이의 약동학 프로필을 평가하였다.

[0330] 2. 테스트 프로토콜

- [0331] 2.1. 테스트 화합물
- [0332] 화합물 D-1 및 에리블린
- [0333] 2.2. 테스트 동물
- [0334] Shanghai Medicilon Inc.에서 구입한 수컷 비글 6마리를 3마리씩 2개 그룹으로 나누고, 투여 테스트를 적용하였다.
- [0335] 2.3. 화합물 제조
- [0336] 화합물 D-1을 계량하고 5%(v/v) DMSO, 20%(v/v) PG 및 20%(v/v) PEG400에 용해시킨 다음, 55%(v/v) 생리식염수를 첨가하여 0.25 mg/mL 무색 투명한 용액을 수득하였다.
- [0337] 에리블린을 계량하고 5%(v/v) DMSO, 20%(v/v) PG 및 20%(v/v) PEG400에 용해시킨 다음, 55%(v/v) 생리식염수를 첨가하여 0.25 mg/mL 무색 투명한 용액을 수득하였다.
- [0338] 2.4. 투여
- [0339] 한 그룹의 비글에게 화합물 D-1을 0.5 mg/kg 용량 및 2 mL/kg 부피로 정맥내 주사하였다.
- [0340] 또 다른 그룹의 비글에게 에리블린을 0.5 mg/kg 용량 및 2 mL/kg 부피로 정맥내 주사하였다.
- [0341] 3. 절차
- [0342] 비글에게 화합물 D-1을 주사하고, 투여 전 및 투여 후 5분, 0.25시간 0.5시간, 1.0시간, 2.0시간, 4.0시간, 8.0시간, 12.0시간 및 24.0시간에 혈액 1 mL를 수집하였다. 수집된 혈액 샘플을 각각 EDTA-K2 항응고 혈액 수집 튜브에 넣고 수집된 전혈을 얼음 위에 놓고 1시간 이내에 원심분리하여 혈장을 분리하였다(원심력: 2200 g, 원심분리 시간: 10분, 2-8°C). 혈장 샘플은 테스트하기 전에 -80°C의 냉장고에서 저장하였다.
- [0343] 비글에게 에리블린을 주사하고, 투여 전 및 투여 후 5분, 0.25시간 0.5시간, 1.0시간, 2.0시간, 4.0시간, 8.0시간, 12.0시간 및 24.0시간에 혈액 1 mL를 수집하였다. 수집된 혈액 샘플을 각각 EDTA-K2 항응고 혈액 수집 튜브에 넣고, 수집된 전혈을 얼음 위에 놓고 1시간 이내에 원심분리하여 혈장을 분리하였다(원심력: 2200 g, 원심분리 시간: 10분, 2-8°C). 혈장 샘플은 테스트하기 전에 -80°C의 냉장고에서 저장하였다.
- [0344] 주사 후 비글 혈장 내 테스트 화합물의 함량을 결정하였다: 투여 후 각 시점에서의 비글 혈장 25 µL를 내부 표준 용액 캄포테신(Institute of Biological Products, National Institutes for Food and Drug Control) 50 µL(100 ng/mL) 및 아세트니트릴 200 µL와 함께 혼합하였다. 혼합물을 5분 동안 볼텍싱하고 10분 동안 원심분리하고(3700 rpm), LC/MS/MS 검정(API4000 삼중 4극자 탠덤 질량 분광계(No. 2), Applied Biosystems, USA; Shimadzu, LC-30AD 초고성능 액체 크로마토그래피 시스템, Shimadzu, 일본)을 위해 혈장 샘플의 상청액 3-4 µL를 취하였다.
- [0345] 4. 약동학 매개변수
- [0346] 본 개시내용의 화합물에 대한 약동학 매개변수는 아래 표 3에 제시되어 있다.
- [0347] 표 3

번호	비글에 대한 약동학 실험					
	혈장 농도	곡선하 면적	반감기	체류 시간	청소율	겉보기 분포량
	C5분 (ng/mL)	AUC0-t (ng/mL*h)	T1/2 (h)	MRT (h)	CL (ml/분/kg)	Vz (ml/kg)
화합물 1	82.1	433	29.3	41.1	8.9	22039
에리블린	217	106	3.5	3.7	78	15556

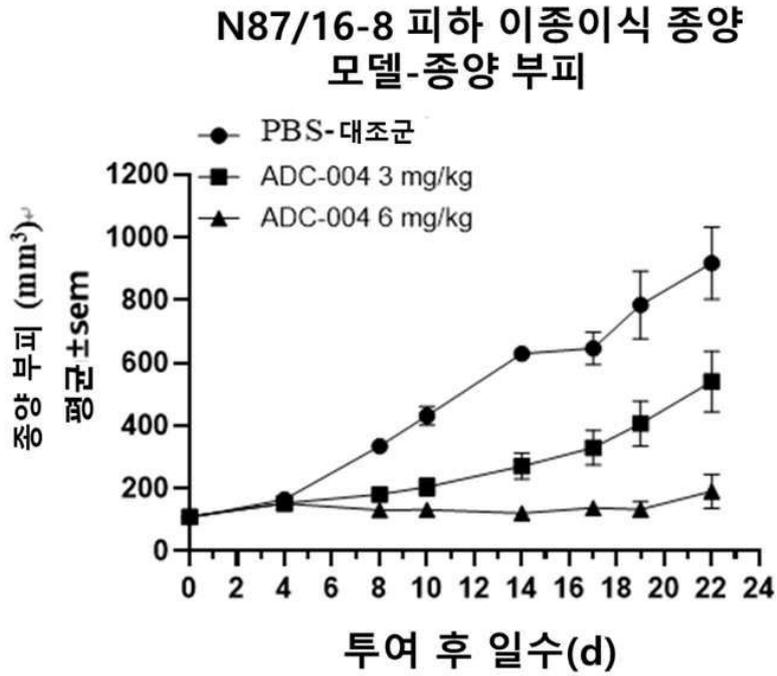
- [0348]
- [0349] 시험예 4: 인간 위암 NCI-N87/16-8 누드 마우스 피하 이종이식 종양에 대한 ADC-004의 치료 효과

- [0350] 1. 목적
- [0351] 목적은 인간 위암 NCI-N87/16-8 누드 마우스 피하 이종이식 종양에 대한 ADC-004의 치료 효과를 평가하는 것이다.
- [0352] 2. 테스트 화합물
- [0353] ADC-004, 식염수로 원하는 농도로 희석됨.
- [0354] 3. 세포
- [0355] 인간 위암 NCI-N87 세포는 아메리칸 타입 컬처 콜렉션에서 구입하였다. NCI-N87을 T-DM1로 장기간 유도하여 T-DM1에 대한 내성을 발달시키고 NCI-N87/16-8로 명명하였다. 세포를 10% 소 태아 혈청, 페니실린 및 스트렙토마이신을 함유하는 RPMI 1640 배지(Gibco)가 있는 10 cm 페트리 접시에서 5% CO<sub>2</sub>를 사용한 37°C 인큐베이터에서 배양하였다. 계대배양을 주 2-3회 수행하였다. 세포가 기하급수적 성장 단계에 있을 때, 이들을 판크레아틴으로 소화시키고, 수집하고, 계수하고 접종하였다.
- [0356] 4. 테스트 동물
- [0357] Jiangsu GemPharmatech Co., Ltd에서 구입한 4주령 암컷 BALB/cJGpt-Foxn1<sup>tm</sup>/Gpt 마우스. 생산 허가 번호: SCXK(Jiangsu) 2019-0009; 동물 인증 번호: 202004958. 사육 환경: SPF.
- [0358] 5. 테스트 절차
- [0359] 각 누드 마우스에  $1 \times 10^7$ 개의 NCI-N87/16-8 세포를 피하 접종하고, 종양이 100-150 mm<sup>3</sup>까지 성장한 후, 동물을 종양 부피 및 체중(D0)에 따라 그룹으로 나누었다. 마우스에 0.3 mg/mL 및 0.6 mg/mL의 ADC-004를 10 mL/kg 부피로 정맥내 주사하였다. 종양 부피 및 체중을 주 2회 측정하고 결과를 기록하였다.
- [0360] 6. 테스트 지표
- [0361] 실험 지표는 종양 성장에 대한 약물의 영향을 조사하는 것이었으며, 구체적인 지표는 T/C% 또는 종양 성장 억제 (TGI%)였다.
- [0362] 종양 직경은 버니어 캘리퍼를 사용하여 주 2회 측정하였고 종양 부피(V)는 다음 식에 따라 계산하였다:
- [0363]  $V = 1/2 \times a \times b^2$ , 여기서 a 및 b는 각각 길이 및 너비를 나타낸다.
- [0364]  $T/C(\%) = (T - T_0)/(C - C_0) \times 100$ , 여기서 T 및 C는 실험 종료 시 동물의 종양 부피를 나타내고; T<sub>0</sub> 및 C<sub>0</sub>은 실험 시작 시 동물의 종양 부피를 나타낸다.
- [0365] 종양 성장 억제 %(TGI%) = 100 - T/C(%).
- [0366] 종양이 퇴행하기 시작할 때, 종양 성장 억제 %(TGI%) = 100 - (T - T<sub>0</sub>)/T<sub>0</sub> x 100.
- [0367] 종양 부피가 초기 부피와 비교하여 줄어들면, 즉, T < T<sub>0</sub> 또는 C < C<sub>0</sub>인 경우, 종양의 부분 관해(PR)로 정의되고; 종양이 완전히 사라지는 경우, 종양의 완전 관해(CR)로 정의된다.
- [0368] 실험 종료 시, 실험 종료점에서, 또는 용매 그룹의 평균 종양 부피가 1500 mm<sup>3</sup>에 도달했을 때, 동물을 CO<sub>2</sub> 마취로 희생시키고 해부하여 종양을 수득하였다. 종양을 사진찍었다.
- [0369] 7. 통계 분석
- [0370] 달리 지시되지 않는 한, 두 그룹의 종양 부피 사이의 비교는 양측 스튜던트 t-검정(two-tailed Student's t-test)으로 이루어졌으며, P < 0.05는 통계적으로 유의한 차이로 정의되었다.
- [0371] 8. 결과
- [0372] 3 mg/kg 및 6 mg/kg의 용량으로 단일 투여 후 22일차에, ADC-004는 누드 마우스 피하 이종이식 종양 모델에서 NCI-N87/16-8 세포의 성장을 억제할 수 있었고, 종양 억제율은 각각 46.77% 및 90.18%였다(PBS 대조군 대비 P < 0.01). 종양 보유 마우스는 ADC-004에 잘 견딜 수 있었으며, 체중 손실과 같은 증상은 발견되지 않았다.

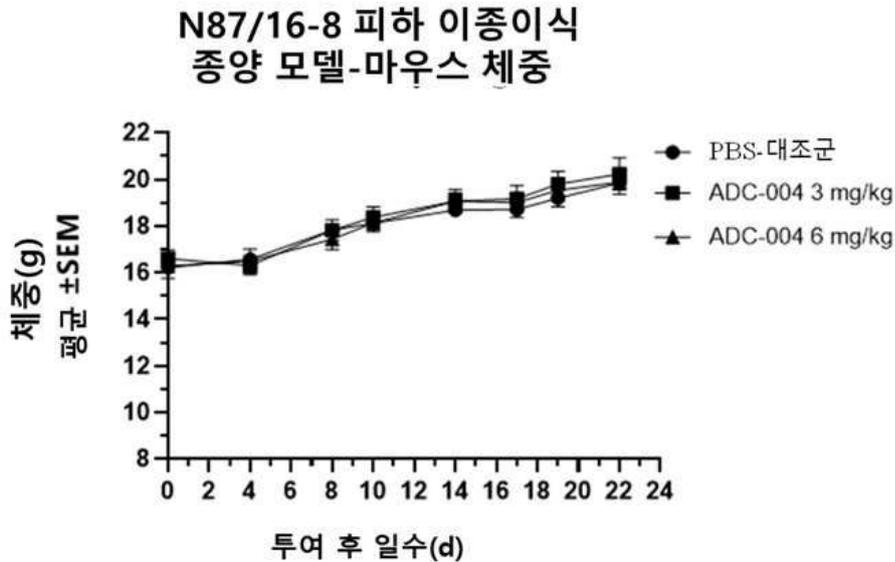
- [0373] 9. 결론
- [0374] ADC-004는 누드 마우스 피하 이종이식 종양 모델에서 인간 위암 NCI-N87/16-8 세포의 성장을 효과적으로 억제할 수 있고, 종양 보유 마우스는 ADC-004에 잘 견딜 수 있다.
- [0375] **시험예 5: JIMIT-1 누드 마우스 피하 이종이식 종양에 대한 ADC-004의 치료 효과**
- [0376] 1. 테스트 화합물
- [0377] ADC-004, PBS를 사용하여 원하는 농도로 희석됨.
- [0378] 2. 세포
- [0379] 인간 유방암 JIMIT-1 세포.
- [0380] 4. 테스트 동물
- [0381] 암컷 Balb/c 누드 마우스
- [0382] 5. 테스트 절차
- [0383] BALB/c 누드 마우스 각각에 JIMIT1 세포  $5 \times 10^5$ 개의 JIMIT1 세포를 오른쪽 등 부분에 피하 접종하였다. 종양 부피가 80-100 mm<sup>3</sup>에 도달하였을 때, 마우스를 종양 부피 및 체중에 따라 6마리 그룹으로 무작위로 나누었고, 그룹화 날부터 투여를 시작하였다. HRA00092-C063-004를 PBS를 사용하여 0.6 mg/mL로 희석하고 10 mL/kg의 부피로 정맥내 주사하였고, 대조군 그룹의 마우스에 PBS를 동일한 부피로 정맥내 주사하였다.
- [0384] 종양의 긴 직경 및 짧은 직경을 버니어 캘리퍼를 사용하여 주 2회 측정하고 마우스의 체중을 또한 측정하였다.
- [0385] 종양 부피(V)는 다음 식에 따라 계산하였다:
- [0386]  $V = 1/2 \times a \times b^2$ , 여기서 a 및 b는 각각 길이 및 너비를 나타낸다.
- [0387]  $T/C(\%) = (T - T_0)/(C - C_0) \times 100$ , 여기서 T 및 C는 실험 종료 시 동물의 종양 부피를 나타내고; T<sub>0</sub> 및 C<sub>0</sub>은 실험 시작 시 동물의 종양 부피를 나타낸다.
- [0388] 종양 성장 억제 %(TGI%) = 100 - T/C(%).
- [0389] 달리 지시되지 않는 한, 두 그룹의 종양 부피 사이의 비교는 양측 스튜던트 t-검정으로 이루어졌으며, P < 0.05는 통계적으로 유의한 차이로 정의되었다.
- [0390] 6. 결과
- [0391] 단일 투여 후 24일차에, ADC-004는 누드 마우스 피하 이종이식 종양 모델에서 JIMIT-1 세포의 성장을 유의하게 억제할 수 있고, 종양 억제율은 121.3%였고, 5 마리 마우스에서 종양 퇴행이 발견되었다(< 50 mm<sup>3</sup>). 종양 보유 마우스는 ADC-004에 잘 견딜 수 있었고, 체중 손실과 같은 증상은 발견되지 않았다.

도면

도면1

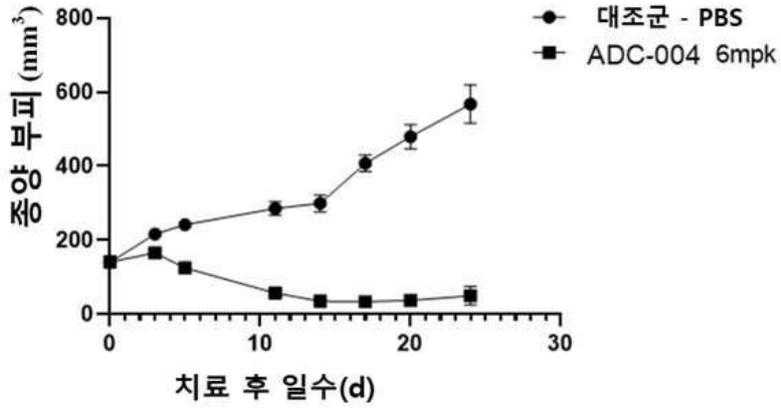


도면2



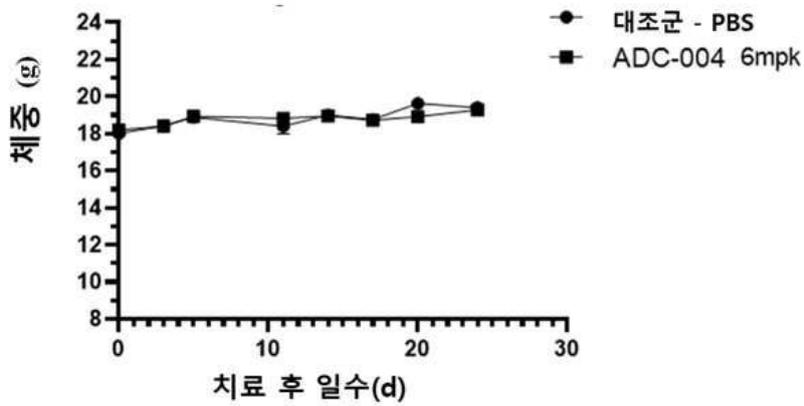
도면3

### JIMIT-1 피하 이종이식 종양의 종양 부피



도면4

### JIMIT-1 피하 이종이식 종양을 보유하는 마우스의 체중



서 열 목 록 (첨부)



아이콘을 클릭하시면 서열목록 파일이 열립니다.

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