발명의 설명

발명의 명칭: 캄프토테신 유도체를 포함하는 항-NECTIN-4 항체-약물 접합체

기술분야

[1] 본 발명은 화학식 1에 따른 화합물이 링커를 통해 항체와 연결된 구조를 가지는 항-Nectin-4 항체-약물 접합체에 관한 것이다.

[2] 또한 본 발명은, 상기 항체-약물 접합체를 이용하여 암을 치료 또는 예방하기 위한 방법에 관한 것이며, 상기 항체-약물 접합체를 유효성분으로 포함하는 암을 치료 또는 예방하기 위한 약학적 조성물, 이를 투여하는 단계를 포함하는 암의 치료 또는 예방 방법 및 용도에 관한 것이다.

배경기술

[3] 암은 중대 질병 중의 하나이며, 세계보건기구(WHO)의 통계자료에 따르면 매년 전세계 암 발병이 증가하고 있어 신규한 항암 약물 개발이 의약 업계에서 요구되고 있다. 이와 관련하여, 캄프토테신(Camptothecin, CPT)은 다비디아과 식물에서 분리한 알칼로이드로서 토포이소머라제(Topoisomerase)를 억제하여 세포독성 항암 물질로서의 효능이 밝혀져, 국내외에서 캄프토테신계 약물로 이리노테칸(CPT-11), 토포테칸, 10-히드록시 캄프토테신, 벨로테칸(CKD-602), 엑사테칸 등이 개발된 바 있다. 또한 최근에는 DXd라는 물질이 개발되기도 한 바, 신규한 캄프토테신 유도체의 개발은 지속적으로 진행되고 있다.

[4] 그러나 세포독성 항암 물질은 세포 선택성이 없어, 암 세포뿐만 아니라 정상세포도 공격하여 예기치 못한 부작용이 발생하므로, 암 세포 표면의 특정 표적 항원에 결합하는 항체와 세포독성 효능을 갖는 약물을 컨주게이션시켜 만든 항체-약물 접합체(Antibody-drug conjugate; ADC)로 제조되기도 한다.

[5] 한편, Nectin(넥틴)은 발달 및 성인기 동안 상피, 내피, 면역 및 신경 세포의 극성, 증식, 분화 및 이동과 같은 다양한 생물학적 과정에서 핵심적인 역할을 하는 세포 접착 분자이며, Nectin-4는 4개의 구성원을 포함하는 넥틴 계열의 단백질에 속하는 표면 단백질이다. Nectin-4는 태아 발달 동안 발현되고, 성인 조직에서 다른 넥틴의 광범위한 발현과 대조적으로 Nectin-4는 성인기에서는 발현이 감소한다. Nectin-4는 유방암을 비롯한 다양한 암종에서 발암성 특성을 갖는 종양 관련 항원으로 재발현되는 것으로 나타남에 따라, 항암 치료에 있어서 임상적으로 중요한 치료 표적으로 주목받고 있다.

[6] 이에, 캄프토테신 유도체 화합물을 약물로서 포함하여 높은 세포독성 효능을 가지면서 Nectin-4를 발현하는 암세포에 특이적으로 작용하는 항체-약물 접합체의 개발이 새로운 과제가 되고 있다.

발명의 내용

기술적 과제

[7] 이에 본 발명의 과제는 우수한 세포독성(cytotoxicity) 활성을 갖고 Nectin-4를 발현하는 세포에 대한 표적특이성이 우수한, 캄프토테신 유도체를 포함하는 항-Nectin-4 항체-약물 접합체 및 이의 약학적 용도를 제공하기 위한 것이다.

과제 해결 수단

[8] 상기 과제를 해결하기 위하여, 본 발명은 화학식 1에 따른 화합물 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염, 입체이성질체, 호변이성질체, 전구약물, 수화물, 용매화물 또는 동위원소 표지 유사체가 링커를 통해 항-Nectin-4 항체와 연결된 구조를 가지는 항체-약물 접합체를 제공한다.

[9] 본 발명의 또 다른 일 측면은, 상기 항체-약물 접합체를 암 세포와 접촉시키는 단계를 포함하는 암을 치료 또는 예방하기 위한 방법을 제공한다.

[10] 본 발명의 또 다른 일 측면은, 상기 항체-약물 접합체를 유효성분으로 포함하는 암을 치료 또는 예방하기 위한 약학적 조성물, 이를 투여하는 단계를 포함하는 암의 치료 또는 예방 방법 및 용도를 제공한다.

발명의 효과

[11] 본원발명에 따른 항체-약물 접합체는, Nectin-4를 발현하는 세포에 대해 표적특이적으로 화학식 1의 화합물 약물의 효과를 나타낼 수 있다.

[12] 화학식 1의 화합물은 DDX5 단백질 및 E3 리가아제에 결합하도록 설계된 활성형 캄프토테신 유도체로서, 분자접착제(molecular glue)로 E3 리가아제에 결합할 수 있고/있거나; 분자접착제(molecular glue) 기전(MoA)을 통해 DDX5 단백질을 발현하는 표적 세포를 사멸시킬 수 있고/있거나; 제1형 토포이소머라제 저해 능력과 함께 종양단백질(oncoprotein) DDX5를 분해하는 작용기전(MoA)를 갖는 것일 수 있다.

[13] 본원발명의 항체-약물 접합체는 화학식 1 화합물의 소수성(hydrophobicity)으로 인해 세포막을 쉽게 투과할 수 있으며, 암세포 내 이입하여 종양에서 고도로 발현되는 리소좀 프로테아제에 의해 링커가 특이적으로 절단되면서 화학식 1의 약물이 방출되고 암세포를 사멸한다. 이후 약물은 방출되어 주변 암세포를 사멸시키는 방관자 효과(Bystander effect)를 일으킬 수 있다. 이로 인해 Nectin-4를 고발현하는 암세포뿐만 아니라 발현이 낮은 암세포까지 뛰어난 사멸 효과를 나타낼 수 있다.

도면의 간단한 설명

[14] 도 1은 Enfortumab-PBX-7016 DAR 7.9의 monomer 순도 SEC 그래프이다.

[15] 도 2는 Enfortumab-PBX-7016 DAR 4.1의 monomer 순도 SEC 그래프이다.

[16] 도 3은 Nectin-4를 발현하는 세포주를 선별하는 과정에서 시판용 단일클론 항체(AF488-mAb, FAB2659G)에 대한 유세포분석 결과이다.

[17] 도 4는 Nectin-4를 발현하는 세포주를 선별하는 과정에서 Enfortumab & FITC-anti human IgG Fc (410720) 및 PADCEV™ & FITC-anti human IgG Fc (410720)에 대한 유세포분석 결과이다.

[18] 도 5는 Nectin-4를 발현하는 세포주를 선별하는 과정에서 시판용 단일클론 항체 (AF488-mAb, FAB2659G)에 대한 유세포분석 결과이다.

[19] 도 6은 Nectin-4를 발현하는 세포주를 선별하는 과정에서 Enfortumab & FITC-anti human IgG Fc (410720)에 대한 유세포분석 결과이다.

[20] 도 7은 Nectin-4를 발현하는 세포주를 선별하는 과정에서 시판용 단일클론 항체 (AF488-mAb, FAB2659G) 및 Enfortumab & FITC-anti human IgG Fc (410720)에 대한 유세포분석 결과이다.

[21] 도 8은 PC-3(전립선암 세포주) 및 SUM190PT(유방암 세포주)에서 ADC를 처리했을 때의 in-vitro cell viability 평가 결과이다.

[22] 도 9는 PC-3(전립선암 세포주) 및 H322M(폐암 세포주)에서 ADC를 처리했을 때의 in-vitro cell viability 평가 결과이다.

[23] 도 10은 Nectin4-HEK293(과발현 세포주)에서 ADC를 처리했을 때의 in-vitro cell viability 평가 결과이다.

[24] 도 11은 T47D(유방암 세포주)에서 ADC를 처리했을 때의 in-vitro cell viability 평가 결과이다.

[25] 도 12는 다양한 종의 Nectin-4에 대한 Enfortumab mAb의 결합력을 나타낸 것이다.

[26] 도 13은 재조합 마우스, 래트, 사이노몰거스 원숭이 또는 인간 Nectin-4에 대한 Enfortumab-PBX-7016 (본원발명에 따른 ADC) 및 Enfortumab mAb의 결합력을 나타낸 것이다.

[27] 도 14는 인간 Nectin-1, Nectin-2, Nectin-3 또는 Nectin-4에 대한 Enfortumab-PBX-7016 (본원발명에 따른 ADC) 및 Enfortumab mAb의 결합력을 나타낸 것이다.

[28] 도 15는 xxT47D가 이식된 암컷 BALB/c 누드 마우스의 그룹별 체중 변화를 나타낸 것이다.

[29] 도 16은 xxT47D가 이식된 암컷 BALB/c 누드 마우스의 그룹별 종양 성장 곡선을 나타낸 것이다.

[30] 도 17은 방광암 세포가 이종이식된 암컷 NOD/SCID 마우스의 그룹별 체중 변화를 나타낸 것이다.

[31] 도 18은 방광암 세포가 이종이식된 암컷 NOD/SCID 마우스의 그룹별 종양 성장 곡선을 나타낸 것이다.

[32]

발명의 실시를 위한 최선의 형태

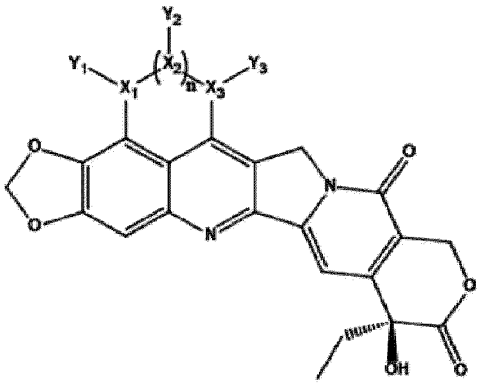
[33] 이하 본 발명을 보다 구체적으로 설명한다.

[34] 본 발명의 구현예들은 여러가지 다른 형태로 변형될 수 있으며, 본 발명의 범위가 이하 설명하는 구현예들로 한정되는 것은 아니다. 또한 본 발명의 구현예들은 당해 기술분야에서 평균적인 지식을 가진 자에게 본 발명을 더욱 완전하게 설명하기 위해서 제공되는 것이다. 나아가, 명세서 전체에서 어떤 구성요소를 "포

함"한다는 것은 특별히 반대되는 기재가 없는 한 다른 구성요소를 제외하는 것이 아니라 다른 구성요소를 더 포함할 수 있다는 것을 의미한다.

[35] 본 발명의 일 측면에 따르면, 하기 화학식 1에 따른 화합물 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염, 입체이성질체, 호변이성질체, 전구약물, 수화물, 용매화물 또는 동위원소 표지 유사체가 링커를 통해 항-Nectin-4 항체와 연결된 구조를 가지는, 항체-약물 접합체(Antibody-drug conjugate; ADC)를 제공한다:

[36] [화학식 1]

[37] 

[38] 여기서,

[39] X_1 및 X_3는 각각 독립적으로 탄소, 산소, 질소, 또는 황이고, X_1 및 X_3는 동일 또는 상이할 수 있으며,

[40] X_2는 탄소, 산소, 질소, 황, 단일결합 또는 이중결합이고,

[41] n은 0, 1 또는 2이며,

[42] Y_1, Y_2 및 Y_3는 각각 독립적으로 수소이거나, 또는 산소, 질소, 인 또는 황을 포함하는 작용기일 수 있다.

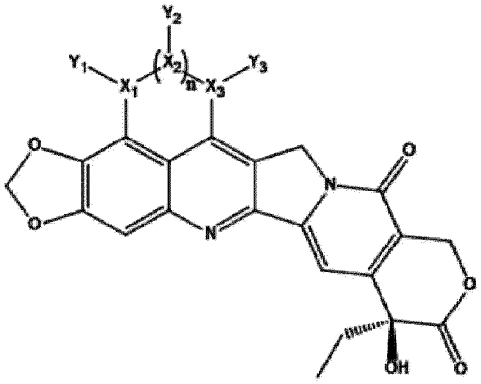
[43] 여기서, 상기 X_2가 단일결합 또는 이중결합인 경우, n은 0일 수 있다. 보다 구체적으로, X_1 및 X_3을 결합시키는 단일결합 또는 이중결합일 수 있다.

[44] 여기서, 산소, 질소, 인 또는 황을 포함하는 작용기(functional group)의 비제한적인 예들은 -CHO, -COOH, $-NH_2$, -SH, $-CONH_2$, $-PO_3H$, $-PO_4H_2$, $-OPO_4H$, $-PO_2(OR^1)(OR^2)$(R^1, R^2=$C_sH_tN_uO_wS_xP_yX_z$, X = -F, -Cl, -Br 또는 -I, $0\le s\le 20$, $0\le t\le 2(s+u)+1$, $0\le u\le 2s$, $0\le w\le 2s$, $0\le x\le 2s$, $0\le y\le 2s$, $0\le z\le 2s$), $-SO_3H$, $-OSO_3H$, $-NO_2$, $-N_3$, $-NR_3OH$(R=C_nH_{2n+1}, $0\le n\le 16$), $-NR_3^+X^-$(R= C_nH_m, $0\le n\le 16$, $0\le m\le 34$, X = OH, Cl 또는 Br), $NR_4^+X^-$(R = C_nH_m, $0\le n\le 16$, $0\le m\le 34$, X = OH, Cl 또는 Br), -COSH, -COOCO-, -CORCO- (R = C_nH_m, $0\le n\le 3$, $0\le m\le 2l+1$), -COOR, -CN, $-N_3$, $-N_2$, -NROH(R = $C_sH_tN_uO_wS_xP_yX_z$, X = -F, -Cl, -Br 또는 -I, $0\le s\le 20$, $0\le t\le 2(s+u)+1$, $0\le u\le 2s$, $0\le w\le 2s$, $0\le x\le 2s$, $0\le y\le 2s$, $0\le z\le 2s$), $-NR^1NR^2R^3$(R^1, R^2, R^3 = $C_sH_tN_uO_wS_xP_yX_z$, X = -F, -Cl, -Br 또는 -I, $0\le s\le 20$, $0\le t\le 2(s+u)+1$, $0\le u\le 2s$, $0\le w\le 2s$, $0\le x\le 2s$, $0\le y\le 2s$, $0\le z\le 2s$), $-CONHNR^1R^2$(R^1, R^2= $C_sH_tN_uO_wS_xP_yX_z$, X = -F, -Cl, -Br 또는 -I, $0\le s\le 20$, $0\le t\le 2(s+u)+1$, $0\le u\le 2s$, $0\le w\le 2s$, $0\le$

x≤2s, 0≤y≤2s, 0≤z≤2s), -$NR^1R^2R^3X'$(R^1, R^2, R^3 = $C_sH_tN_uO_wS_xP_yX_z$, X = -F, -Cl, -Br 또는 -I, X'= F-,Cl-,Br-,또는 I-, 0≤s≤20, 0≤t≤2(s+u)+1, 0≤u≤2s, 0≤w≤2s, 0≤x≤2s, 0≤y≤2s, 0≤z≤2s), -OH, -O-, >C=O, -SS-, -SO-, -NO_2, -COX(X = F, Cl, Br 또는 I), -COOCO-, -CONH-, -CN, -$SCOCH_3$, -SCN, -NCS, -NCO, -OCN, -CN, -F, -Cl, -I, -Br, 에폭시기, -하이드라존, -ONO_2, -$PO(OH)_2$, -C=NNH_2, -HC=CH-, -C=C-, -C≡C- 및 탄소 수 2개 이상의 탄화수소로 구성된 군으로부터 선택되는 작용기를 포함하는 것일 수 있다.

[45] 본 발명의 일 측면에 따르면, 하기 화학식 1에 따른 화합물 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염, 입체이성질체, 호변이성질체, 전구약물, 수화물, 용매화물 또는 동위원소 표지 유사체가 링커를 통해 항-Nectin-4 항체와 연결된 구조를 가지는, 항체-약물 접합체(Antibody-drug conjugate; ADC)를 제공한다:

[46] [화학식 1]

[47] 

[48] 여기서,

[49] X_1 및 X_3는 각각 독립적으로 탄소, 산소, 질소, 또는 황이고, X_1 및 X_3는 동일 또는 상이할 수 있으며,

[50] X_2는 탄소, 산소, 질소, 황, 단일결합 또는 이중결합이고,

[51] X_1, $(X_2)n$ 및 X_3는 함께 6원 또는 7원 고리를 형성할 수 있으며, 이때 n은 1 또는 2이며,

[52] Y_1, Y_2 및 Y_3는 각각 독립적으로 수소이거나, 또는 산소, 질소, 인 또는 황을 포함하는 작용기일 수 있다.

[53] 여기서, 산소, 질소, 인 또는 황을 포함하는 작용기(functional group)의 비제한적인 예들은 -CHO, -COOH, -NH_2, -SH, -$CONH_2$, -PO_3H, -PO_4H_2, -OPO_4H, -$PO_2(OR^1)(OR^2)$(R^1, R^2=$C_sH_tN_uO_wS_xP_yX_z$, X = -F, -Cl, -Br 또는 -I, 0≤s≤20, 0≤t≤2(s+u)+1, 0≤u≤2s, 0≤w≤2s, 0≤x≤2s, 0≤y≤2s, 0≤z≤2s), -SO_3H, -OSO_3H, -NO_2, -N_3, -NR_3OH(R=C_nH_{2n+1}, 0≤n≤16), -$NR_3^+X^-$(R= C_nH_m, 0≤n≤16, 0≤m≤ 34, X = OH, Cl 또는 Br), $NR_4^+X^-$(R = C_nH_m, 0≤n≤16, 0≤m≤34, X = OH, Cl 또는 Br), -COSH, -COOCO-, -CORCO- (R = C_nH_m, 0≤n≤3, 0≤m≤2l+1), -COOR, -CN, -N_3, -N_2, -NROH(R = $C_sH_tN_uO_wS_xP_yX_z$, X = -F, -Cl, -Br 또는 -I, 0≤s≤20, 0≤t≤2(s+u)+1, 0≤u≤2s, 0≤w≤2s, 0≤x≤2s, 0≤y≤2s, 0≤z

≤2s), -$NR^1NR^2R^3$(R^1, R^2, R^3 = $C_sH_tN_uO_wS_xP_yX_z$, X = -F, -Cl, -Br 또는 -I, 0≤s≤20, 0≤t≤2(s+u)+1, 0≤u≤2s, 0≤w≤2s, 0≤x≤2s, 0≤y≤2s, 0≤z≤2s), -$CONHNR^1R^2$(R^1, R^2 = $C_sH_tN_uO_wS_xP_yX_z$, X = -F, -Cl, -Br 또는 -I, 0≤s≤20, 0≤t≤2(s+u)+1, 0≤u≤2s, 0≤w≤2s, 0≤x≤2s, 0≤y≤2s, 0≤z≤2s), -$NR^1R^2R^3X'$(R^1, R^2, R^3 = $C_sH_tN_uO_wS_xP_yX_z$, X = -F, -Cl, -Br 또는 -I, X'= F-,Cl-,Br-,또는 I-, 0≤s≤20, 0≤t≤2(s+u)+1, 0≤u≤2s, 0≤w≤2s, 0≤x≤2s, 0≤y≤2s, 0≤z≤2s), -OH, -O-, >C=O, -SS-, -SO-, -NO_2, -COX(X = F, Cl, Br 또는 I), -COOCO-, -CONH-, -CN, -$SCOCH_3$, -SCN, -NCS, -NCO, -OCN, -CN, -F, -Cl, -I, -Br, 에폭시기, -하이드라존, -ONO_2, -$PO(OH)_2$, -C=NNH_2, -HC=CH-, -C=C-, -C≡C- 및 탄소 수 2개 이상의 탄화수소로 구성된 군으로부터 선택되는 작용기를 포함하는 것일 수 있다.

[54] 본 발명의 일 측면에 따르면, 상기 화학식 1에서,

[55] X_1, X_2 및 X_3는 각각 독립적으로 탄소일 수 있고,

[56] n은 1일 수 있으며,

[57] Y_1 및 Y_2는 각각 독립적으로 수소일 수 있고,

[58] Y_3는 수소이거나, 또는 산소, 질소, 인 또는 황을 포함하는 작용기일 수 있다.

[59] 여기서, 산소, 질소, 인 또는 황을 포함하는 작용기(functional group)의 비제한적인 예들은 상기 예시와 동일할 수 있다.

[60] 본 발명의 일 측면에 따르면 상기 화학식 1에서,

[61] X_1 및 X_3는 각각 독립적으로 탄소, 산소, 질소, 또는 황이고, X_1 및 X_3는 동일 또는 상이할 수 있으며,

[62] X_2는 탄소, 산소, 질소, 황, 단일결합 또는 이중결합이고,

[63] n은 0, 1 또는 2이며,

[64] Y_1, Y_2 및 Y_3는 각각 독립적으로 수소이거나, 또는 산소, 질소, 인 또는 황을 포함하는 작용기일 수 있다.

[65] 상기 질소를 포함하는 작용기는 -NZ_1Z_2일 수 있으며,

[66] Z_1 및 Z_2는 각각 독립적으로 수소, 할로겐, 하이드록실, C_{1-3} 알킬, C(=O)H, C(=O)(C_{1-3} 알킬), C(=O)(C_{2-3} 알케닐), C(=O)NH_2, C(=O)NH(C_{1-3} 알킬), $(CH_2)_{2-4}$OH, $(CH_2)_{2-4}O$(C_{1-3} 알킬), $(CH_2)_{2-4}NH_2$, $(CH_2)_{2-4}$NH(C_{1-3} 알킬), $(CH_2)_{2-4}N$(C_{1-3} 알킬)$_2$ 또는 C(=O)$CR^1R^2R^3$로 구성된 군으로부터 선택되는 작용기를 포함하는 것일 수 있고,

[67] 이 때 R^1, R^2 및 R^3는 각각 독립적으로 수소, 하이드록실, C_{1-3} 알킬, C_{3-7} 사이클로알킬 또는 C_{1-3} 할로알킬일 수 있다.

[68] 본 발명의 일 측면에 따르면, 상기 화학식 1에서,

[69] X_1, X_2 및 X_3는 각각 독립적으로 탄소일 수 있고,

[70] n은 1일 수 있으며,

[71] Y_1 및 Y_2는 각각 독립적으로 수소일 수 있고,

[72] Y_3는 수소이거나, 또는 산소, 질소, 인 또는 황을 포함하는 작용기일 수 있다.

[73] 여기서, 산소, 질소, 인 또는 황을 포함하는 작용기(functional group)의 비제한적인 예들은 상기 예시와 동일할 수 있다.

[74] 본 발명의 일 측면에 따르면 상기 화학식 1에서,

[75] X_1 및 X_3는 각각 독립적으로 탄소, 산소, 질소, 또는 황이고, X_1 및 X_3는 동일 또는 상이할 수 있으며,

[76] X_2는 탄소, 산소, 질소, 황, 단일결합 또는 이중결합이고,

[77] X_1, $(X_2)n$ 및 X_3는 함께 6원 또는 7원 고리를 형성할 수 있으며, 이때 n은 1 또는 2이며,

[78] Y_1, Y_2 및 Y_3는 각각 독립적으로 수소이거나, 또는 산소, 질소, 인 또는 황을 포함하는 작용기일 수 있다.

[79] 상기 질소를 포함하는 작용기는 $-NZ_1Z_2$일 수 있으며,

[80] Z_1 및 Z_2는 각각 독립적으로 수소, 할로겐, 하이드록실, C_{1-3} 알킬, C(=O)H, C(=O)(C_{1-3} 알킬), C(=O)(C_{2-3} 알케닐), C(=O)NH_2, C(=O)NH(C_{1-3} 알킬), $(CH_2)_{2-4}OH$, $(CH_2)_{2-4}O(C_{1-3}$ 알킬), $(CH_2)_{2-4}NH_2$, $(CH_2)_{2-4}NH(C_{1-3}$ 알킬), $(CH_2)_{2-4}N(C_{1-3}$ 알킬$)_2$ 또는 C(=O)$CR^1R^2R^3$로 구성된 군으로부터 선택되는 작용기를 포함하는 것일 수 있고,

[81] 이 때 R^1, R^2 및 R^3는 각각 독립적으로 수소, 하이드록실, C_{1-3} 알킬, C_{3-7} 사이클로알킬 또는 C_{1-3} 할로알킬일 수 있다.

[82] 본 발명의 일 측면에 따르면, 상기 화학식 1에서,

[83] X_1, X_2 및 X_3는 각각 독립적으로 탄소일 수 있고,

[84] n은 1일 수 있으며,

[85] Y_1 및 Y_2는 각각 독립적으로 수소일 수 있고,

[86] Y_3는 $-NZ_1Z_2$일 수 있으며,

[87] Z_1 및 Z_2는 각각 독립적으로 수소, 할로겐, 하이드록실, C_{1-3} 알킬, C(=O)H, C(=O)(C_{1-3} 알킬), C(=O)(C_{2-3} 알케닐), C(=O)NH_2, C(=O)NH(C_{1-3} 알킬), $(CH_2)_{2-4}OH$, $(CH_2)_{2-4}O(C_{1-3}$ 알킬), $(CH_2)_{2-4}NH_2$, $(CH_2)_{2-4}NH(C_{1-3}$ 알킬), $(CH_2)_{2-4}N(C_{1-3}$ 알킬$)_2$ 또는 C(=O)$CR^1R^2R^3$로 구성된 군으로부터 선택되는 작용기를 포함하는 것일 수 있고,

[88] 이 때 R^1, R^2 및 R^3는 각각 독립적으로 수소, 하이드록실, C_{1-3} 알킬, C_{3-7} 사이클로알킬 또는 C_{1-3} 할로알킬일 수 있다.

[89] 본 발명의 일 측면에 따르면, 상기 화학식 1에서,

[90] X_1, X_2 및 X_3는 각각 독립적으로 탄소일 수 있고,

[91] n은 1일 수 있으며,

[92] Y_1 및 Y_2는 각각 독립적으로 수소일 수 있고,

[93] Y_3는 $-NZ_1Z_2$일 수 있으며,

[94] Z_1 및 Z_2는 각각 독립적으로 수소, C(=O)H, C(=O)(C_{1-3} 알킬), C(=O)(C_{2-3} 알케닐), C(=O)NH_2, C(=O)NH(C_{1-3} 알킬) 또는 C(=O)$CR^1R^2R^3$일 수 있고,

[95] 이 때 R^1, R^2 및 R^3는 각각 독립적으로 수소, 하이드록실, C_{1-3} 알킬, C_{3-7} 사이클로알킬 또는 C_{1-3} 할로알킬일 수 있다.

[96] 본 발명의 일 측면에 따르면, 상기 화학식 1에서,

[97] X_1, X_2 및 X_3는 각각 독립적으로 탄소일 수 있고,

[98] n은 1일 수 있으며,

[99] Y_1 및 Y_2는 각각 독립적으로 수소일 수 있고,

[100] Y_3는 $-NZ_1Z_2$일 수 있으며,

[101] Z_1은 수소이고, Z_2는 $C(=O)(C_{2-3}$ 알케닐) 또는 $C(=O)CR^1R^2R^3$ 일 수 있으며,

[102] 이 때 R^1, R^2 및 R^3는 각각 독립적으로 수소, 하이드록실, C_{1-3} 알킬, C_{3-5} 사이클로알킬 또는 C_{1-3} 할로알킬일 수 있다.

[103] 본 발명의 일 측면에 따르면, 상기 화학식 1에서,

[104] X_1, X_2 및 X_3는 각각 독립적으로 탄소일 수 있고,

[105] n은 1일 수 있으며,

[106] Y_1 및 Y_2는 각각 독립적으로 수소일 수 있고,

[107] Y_3는 $-NZ_1Z_2$일 수 있으며,

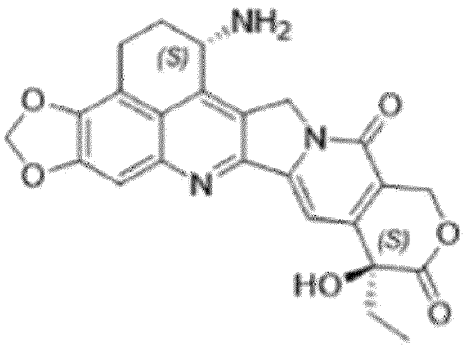
[108] Z_1은 수소이고, Z_2는 $C(=O)CR^1R^2R^3$ 일 수 있으며,

[109] 이 때 R^1, R^2 및 R^3는 각각 독립적으로 수소, 하이드록실 또는 C_{1-3} 알킬일 수 있다.

[110] 본 발명의 일 측면에 따르면, 상기 화학식 1의 화합물은 하기 화학식 2 내지 11 중 어느 하나로 표시되는 화합물 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염, 입체이성질체, 호변이성질체, 전구약물, 수화물, 용매화물 또는 동위원소 표지 유사체인 것인, 항체-약물 접합체일 수 있다.

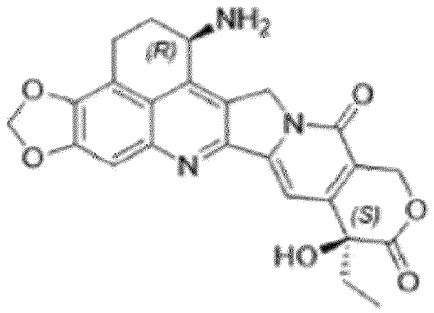
[111] [화학식 2]

[112]



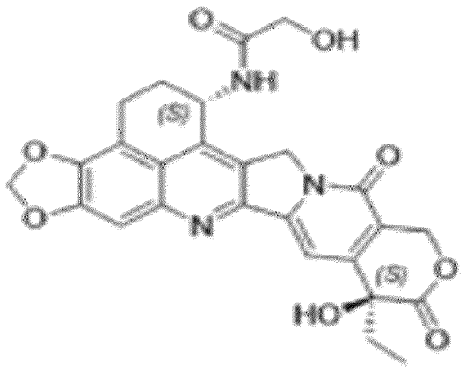
[113] [화학식 3]

[114]



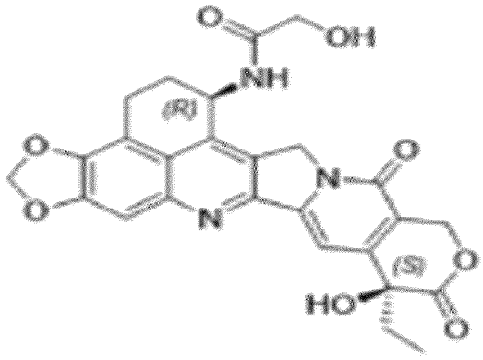
[115] [화학식 4]

[116]



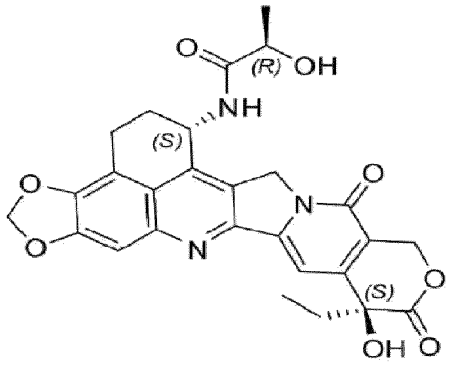
[117] [화학식 5]

[118]



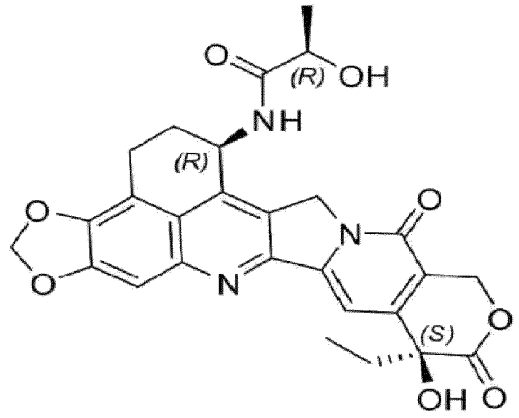
[119] [화학식 6]

[120]



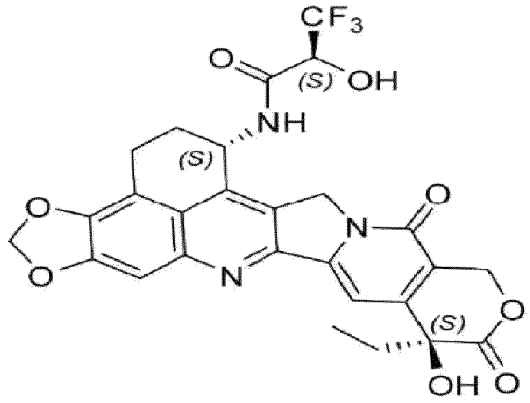
[121] [화학식 7]

[122]



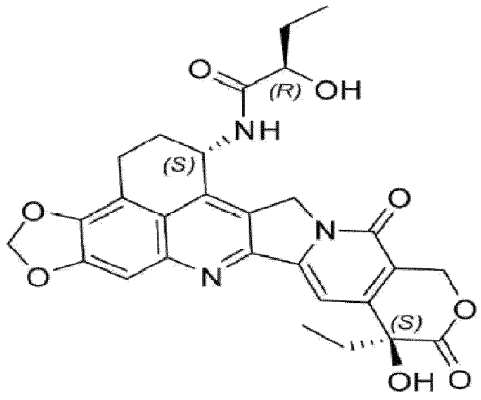
[123] [화학식 8]

[124]



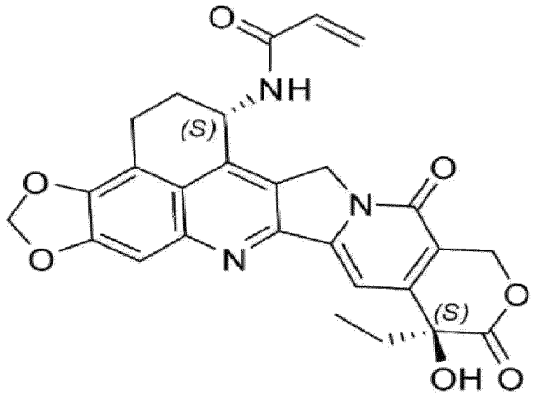
[125] [화학식 9]

[126]



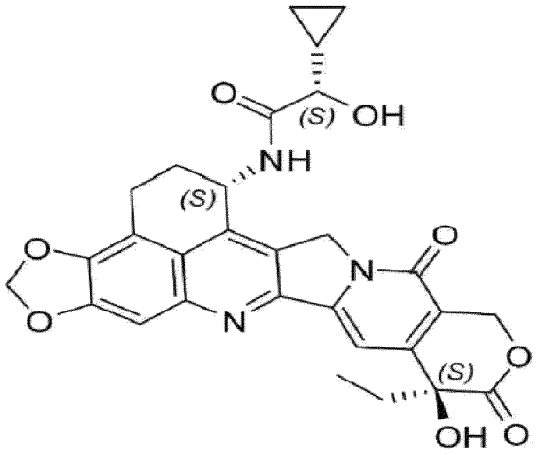
[127] [화학식 10]

[128]



[129] [화학식 11]

[130]



[131] 본 발명의 일 측면에 따르면, 상기 화학식 1의 화합물은 DDX5 단백질 및 E3 리가아제에 결합하도록 설계된 활성형 캄프토테신 유도체일 수 있다. 본 발명의 일 측면에 따르면, 상기 화학식 1의 화합물은 분자접착제(molecular glue)로 E3 리가아제에 결합하는 것일 수 있다.

[132] 본 발명의 일 측면에 따르면, 상기 화학식 1의 화합물은 분자접착제(molecular glue) 기전(MoA)을 통해 DDX5 단백질을 발현하는 표적 세포를 사멸시킬 수 있다.

[133] 상기 표적 세포는 암세포 또는 노화세포일 수 있다. 노화세포에는 장기 고유의 특징적인 기능을 수행하지 않는 세포도 포함한다.

[134] 본 발명의 일 측면에 따르면, 상기 화학식 1의 화합물은 제1형 토포이소머라제 저해 능력과 함께 종양단백질(oncoprotein) DDX5를 분해하는 작용기전(MoA)를 갖는 것일 수 있다.

[135] 본 발명에서 사용되는 용어 "약물" 또는 "페이로드"는 상기 화학식 1 내지 11로 이루어진 군으로부터 선택된 어느 하나의 화합물을 의미하는 것일 수 있다. 본

발명의 약물 또는 페이로드는 링커 및 항-Nectin-4 항체와 결합하여 항체-약물 접합체를 생성할 수 있다.

[136] 본 발명에서 사용되는 용어 "항체-약물 접합체(Antibody-drug conjugate; ADC)"는 화학적으로 안정한 링커를 통해 단일 클론 항체 또는 이의 항원 결합 단편을 생물학적 활성의 세포독소(Cytotoxin)와 결합할 수 있도록 하여, 암 세포의 표면 항원에 대한 항체 결합의 특이성과 세포독소의 높은 효율성을 최대한 활용하면서, 항체 치료제의 낮은 효능이나 세포독소의 독성 문제를 회피할 수 있다. 이는, 통상적인 항암 치료제와 비교해서, ADC가 암 세포에 정확하게 결합하고 정상 세포에 미치는 영향을 줄일 수 있도록 한다. 본 발명의 항체-약물 접합체는 Nectin-4를 발현하는 세포에 대해 특이적으로 결합하므로, 약물을 특이적으로 표적화할 수 있다.

[137] 상기 항체-약물 접합체는 화학식 1 화합물의 소수성(hydrophobicity)으로 인해 세포막을 쉽게 투과할 수 있으며, 암세포 내 이입하여 종양에서 고도로 발현되는 리소좀 프로테아제에 의해 링커가 특이적으로 절단되면서 화학식 1의 약물이 방출되고 암세포를 사멸시키는 것을 특징으로 한다.

[138] 상기 항체-약물 접합체는 세포 사멸 이후 약물은 방출되어 주변 암세포를 사멸시키는 방관자 효과(Bystander effect)를 일으켜, Nectin-4 발현이 낮은 암세포까지 뛰어난 사멸 효과를 보유하는 것을 특징으로 한다.

[139] 본 발명에서 사용되는 용어 "항체(antibody)"는 항체 또는 이의 항원 결합 단편(antigen-binding fragment)를 의미하는 것일 수 있으며, 그에 결합하는 표적 세포 집단에 관련된 항원 또는 수용체를 인식하고 이에 결합할 수 있는 거대 분자 화합물(macromolecule compound)를 의미할 수 있다. 상기 항체는 뮤린 항체, 인간화 항체, 키메라 항체, 토끼 항체, 파지 디스플레이 항체, 효모 디스플레이 항체, CDR 이식된 항체, 또는 재조합 인간 항체일 수 있으나 이에 제한되지는 않는다. 특히, 본 발명에서 사용되는 용어 항체는 "항-Nectin-4 항체"를 의미하며, 이는 Nectin-4에 특이적으로 결합하는 항체 또는 이의 항원 결합 단편을 의미할 수 있다.

[140] 본 발명의 항체는 바람직하게는 단일 클론 항체(monoclonal antibody)일 수 있으며, 상기 항원 결합 단편은 항원에 대한 특이적 결합 능력을 보유하는 항체의 하나 이상의 단편일 수 있다.

[141] 본 발명의 항체는 항체 상의 헤테로 원자를 통해 링커와 결합을 형성할 수 있다.

[142] 본 발명의 항체는 항-Nectin-4 항체로서, 상기 항-Nectin-4 항체의 비제한적인 예시로는 엔포투맙(Enfortumab), Inserm사 N41, Emergence사 ch-15A7.5이거나, ADC인 Kelun사 SKB410에 사용된 항체로부터 선택될 수 있다.

[143] 본 발명의 항체는 엔포투맙(Enfortumab)일 수 있다.

[144] 본 발명의 항체는 i) 각각 서열번호 1,2 및 3의 아미노산 서열을 갖는 CDR-H1, CDR-H2 및 CDR-H3을 포함하는 중쇄 및 ii) 각각 서열번호 4, 5 및 6의 아미노산 서

열을 갖는 CDR-L1, CDR-L2 및 CDR-L3을 포함하는 경쇄를 갖는 항체 또는 이의 항원 결합 단편일 수 있다.

[145] 본 발명의 항체는 i) 서열번호 7의 아미노산 서열을 갖는 중쇄 가변영역 및 ii) 서열번호 8의 아미노산 서열을 갖는 경쇄 가변영역을 포함하는 항체 또는 이의 항원 결합 단편일 수 있다.

[146] 본 발명의 항체는 i) 서열번호 9의 아미노산 서열을 갖는 중쇄 및 ii) 서열번호 10의 아미노산 서열을 갖는 경쇄를 포함하는 항체 또는 이의 항원 결합 단편일 수 있다.

[147] 본 발명의 항체당 연결된 평균 약물 수를 의미하는 항체-약물 비율(Drug to Antibody Ratio; DAR)은 약 1 내지 약 20의 범위일 수 있으며, 구체적으로 약 1 내지 약 8, 약 2 내지 약 8, 약 3 내지 약 8, 약 4 내지 약 8, 약 5 내지 약 8, 약 6 내지 약 8, 약 7 내지 약 8 또는 약 7.5 내지 약 8의 범위일 수 있다. 또한, 구체적으로 약 3 내지 5, 약 3.5 내지 약 4.5 또는 약 3 내지 약 4의 범위일 수 있다.

[148] 본 발명의 일 측면에서, 본 발명의 항체-약물 접합체의 DAR은 7 내지 8 또는 3 내지 4의 범위일 수 있다. 본 발명의 바람직한 일 측면에서, 본 발명의 항체-약물 접합체의 DAR은 7 내지 8일 수 있다. 본 발명의 바람직한 일 측면에서, 본 발명의 항체-약물 접합체의 DAR은 3 내지 4일 수 있다.

[149] 본 발명에서 사용되는 용어 "링커(linker)"는 한쪽 말단에서 항체에 연결되고 다른 쪽 말단에서 약물에 연결되거나, 또는 다른 링커에 연결된 다음, 약물에 연결되는 화학 구조 단편 또는 결합을 나타낸다.

[150] 보다 구체적으로, 상기 링커는 분해성(cleavable) 또는 비분해성(non-cleavable)일 수 있으며, 상기 분해성 링커는 항체와 약물을 함께 연결하는 역할을 할 뿐만 아니라 암 주변 환경의 특정 pH, 효소(protease, phosphatase, glycosidase, sulfatase), 글루타치온(GSH) level에 의하여 선택적으로 분리되어 약물을 방출할 수 있다.

[151] 보다 구체적으로, 상기 링커는 C_{1-6}알킬렌, 카보닐, 말레이미드, 숙신이미드 -O-, 당, 당산, β-글루쿠로나이드, β-갈락토사이드, 포스포디에스터, PEG, PSAR(polysarcosine), 디설파이드, PAB(p-aminobenzyloxycarbonyl), 트리아졸, 하이드라존, 포스페이트, 디에스터, 티오에터 및 펩티드로 이루어진 군에서 선택되는 적어도 하나를 포함할 수 있으나, 이에 제한되지는 않는다.

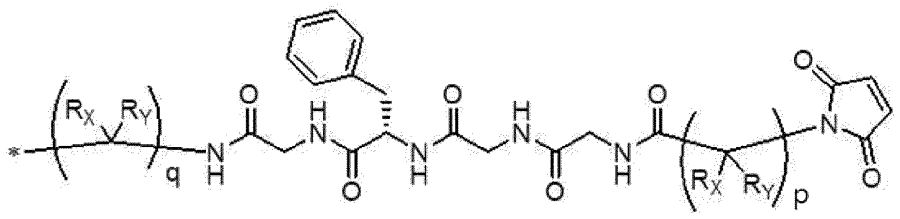
[152] 보다 구체적으로 상기 펩티드 잔기는 알라닌(A), 아스파라긴(N), 글루타민(Q), 오르니틴(Ornithine), 프롤린(P), 트레오닌(T), 페닐알라닌(F), 글리신(G), 발린(V), 라이신(K), 시트룰린(Citrulline), 세린(S), 글루탐산(E), 및 아스파르트산(D)으로 이루어지는 군으로부터 선택된 하나 이상의 아미노산으로 구성된 펩티드 잔기일 수 있고, 보다 구체적으로 발린, 시트룰린, 페닐알라닌 및 글리신으로 이루어지는 군으로부터 선택된 하나 이상의 아미노산으로 구성된 펩티드 잔기일 수 있고, 보다 구체적으로 디펩티드, 트리펩티드 또는 테트라펩티드 잔기일 수 있고, 보다 구체적으로 발린-시트룰린, 발린-알라닌 및 페닐알라닌-글라이신의

디펩티드 잔기 또는 GGFG(글리신-글리신-페닐알라닌-글리신)의 테트라펩티드 잔기일 수 있다. 여기서, 펩티드 잔기는 아미노산 잔기의 일부가 선택적으로 치환될 수 있다.

[153] 본 발명의 "링커"는 하기 화학식 12로 표시되는 것일 수 있다:

[154] [화학식 12]

[155]



[156] 여기서,

[157] R_X 및 R_Y는 각각 독립적으로 수소 또는 C_{1-6}알킬이고,

[158] p 및 q는 각각 독립적으로 1 내지 6의 정수이고,

[159] *은 페이로드와 결합하는 부위이다.

[160] 본 발명의 일 측면에 따르면, 상기 화학식 12에서,

[161] R_X 및 R_Y는 각각 독립적으로 수소 또는 C_{1-3}알킬일 수 있고,

[162] p는 4 내지 6의 정수일 수 있고,

[163] q는 1 내지 3의 정수일 수 있다.

[164] 본 발명의 일 측면에 따르면, 상기 화학식 12에서,

[165] R_X 및 R_Y는 각각 독립적으로 수소일 수 있고,

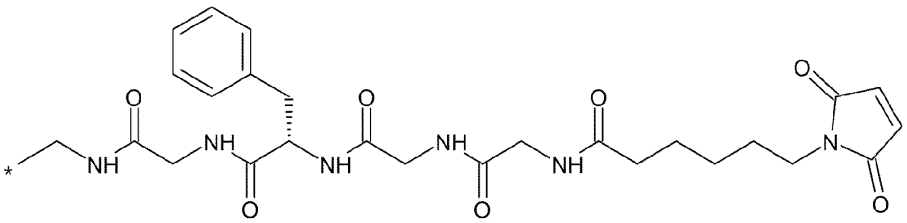
[166] p는 5일 수 있고,

[167] q는 1일 수 있다.

[168] 본 발명의 일 측면에 따르면, 상기 화학식 12의 화합물은 화학식 13의 화합물일 수 있다.

[169] [화학식 13]

[170]

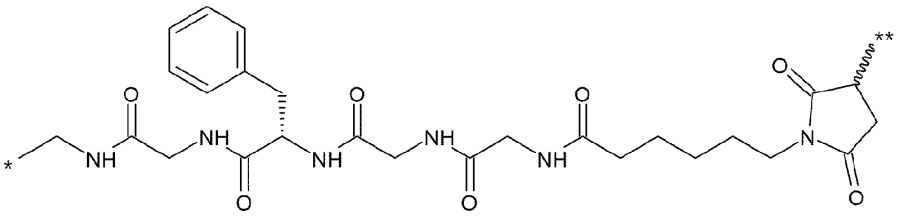


[171] 여기서 *은 페이로드와 결합하는 부위이다.

[172] 본 발명의 일 측면에서, 상기 화학식 12의 화합물은 말레이미드(maleimide) 고리가 항체의 아미노산 잔기와 연결될 수 있다. 본 발명의 바람직한 측면에서, 화학식 12 화합물은 말레이미드(maleimide) 고리의 $-CH_2=CH_2-$ 구조의 탄소 중 어느 하나가 항체의 아미노산 잔기 중 시스테인(Cysteine)과 결합할 수 있다.

[173] 본 발명의 일 측면에서 상기 화학식 13의 화합물이 항체와 결합되는 경우 화학식 14의 형태로 연결될 수 있다.

[174] [화학식 14]

[175] 

[176] 여기서, *은 페이로드와 결합하는 부위이고, **은 항체와 결합하는 부위이다.

[177] 본 발명의 일 측면에서, 화학식 14의 화합물에 표시된 **은 항체와 결합하는 부위이다. 본 발명의 바람직한 측면에서, 화학식 14 화합물은 ** 부위에서 항체의 아미노산 잔기 중 시스테인(Cysteine)과 결합할 수 있다.

[178] 본 발명에서 사용되는 용어 “mc-GGFG”는 화학식 13의 화합물 또는 화학식 14의 화합물 구조의 링커를 의미한다.

[179] 본 발명에 따른 화학식 1의 화합물은 약학적으로 허용가능한 염, 입체이성질체, 호변이성질체, 전구약물, 수화물, 용매화물 또는 동위원소 표시 유사체의 형태로 존재할 수 있다. 이에 본 발명의 화합물의 범주에는 상기 화학식 1의 화합물 및 이의 약학적으로 허용가능한 염, 입체이성질체, 호변이성질체, 전구약물, 수화물, 용매화물 또는 동위원소 표시 유사체가 포함되며, 이를 기반으로 하는 약물-링커 화합물 및 항체-약물 접합체에도 마찬가지로 적용될 수 있다.

[180] 본 명세서에서 용어 "약학적으로 허용가능한 염"이란 환자에게 비교적 비독성이고 무해한 유효 작용을 갖는 농도로서 이 염에 기인한 부작용이 모 화합물의 이로운 효능을 저하시키지 않는 상기 화합물의 임의의 모든 유기산 또는 무기산 부가염을 의미한다.

[181] 특히, 상기 약학적으로 허용가능한 염은, 유리산 (free acid)에 의해 형성된 산 부가염일 수 있다. 여기서, 산 부가염은 염산, 질산, 인산, 황산, 브롬화수소산, 아이오딘화수소산, 아질산, 아인산 등과 같은 무기산류, 지방족 모노 및 디카복실레이트, 페닐-치환된 알카노에이트, 하이드록시 알카노에이트 및 알칸다이오에이트, 방향족 산류, 지방족 및 방향족 설폰산류 등과 같은 무독성 유기산, 트라이플루오로아세트산, 아세테이트, 안식향산, 구연산, 젖산, 말레인산, 글루콘산, 메탄설폰산, 4-톨루엔설폰산, 주석산, 푸마르산 등과 같은 유기산으로부터 얻을 수 있다.

[182] 이러한 약학적으로 허용가능한 염의 종류로는 설페이트, 설파이트, 니트레이트, 포스페이트, 피로포스페이트, 클로라이드, 브로마이드, 아이오다이드, 플루오라이드, 아세테이트, 트리플루오로아세테이트, 프로피오네이트, 데카노에이트, 카프릴레이트, 아크릴레이트, 포메이트, 아이소부티레이트, 카프레이트, 헵타노에이트, 프로피올레이트, 옥살레이트, 말로네이트, 석시네이트, 수베레이

트, 세바케이트, 푸마레이트, 말리에이트, 벤조에이트, 프탈레이트, 벤젠설포네이트, 톨루엔설포네이트, 페닐아세테이트, 페닐프로피오네이트, 페닐부티레이트, 시트레이트, 락테이트, 글리콜레이트, 말레이트, 타트레이트, 만델레이트 등을 포함할 수 있다.

[183] 상기 산 부가염은 통상의 방법으로 제조할 수 있으며, 예를 들면 해당 화합물을 메탄올, 에탄올, 아세톤, 메틸렌클로라이드, 아세토나이트릴 등과 같은 유기용매에 녹이고 유기산 또는 무기산을 가하여 생성된 침전물을 여과, 건조시켜 제조하거나, 용매와 과량의 산을 감압 증류한 후 건조시켜 유기용매 하에서 결정화시켜서 제조할 수 있다.

[184] 또한, 상기 약학적으로 허용가능한 염은, 염기를 사용하여 얻어진 염 또는 금속염일 수 있다. 금속염의 일 예로서, 알칼리금속 또는 알칼리 토금속 염은, 화합물을 과량의 알칼리금속 수산화물 또는 알칼리 토금속 수산화물 용액 중에 용해하고, 비용해 화합물 염을 여과하고, 여액을 증발 및 건조시켜 얻을 수 있다. 알칼리 금속염으로는 나트륨, 칼륨 또는 칼슘염이 제약상 적합할 수 있다. 또한, 이에 대응하는 염은 알칼리금속 또는 알칼리 토금속 염을 적당한 은염 (예, 질산은)과 반응시켜 얻을 수 있다.

[185] 또한, 본 발명의 화합물은 수화물 및 용매화물을 포함할 수 있다. 상기 수화물이란 비공유결합성 분자간의 힘에 의해 구속된 화학양론적 또는 비화학양론적 양의 물을 더 포함하는 화합물 또는 이의 염을 의미한다. 상기 수화물은 예를 들어 1수화물, 2수화물, 3수화물, 4수화물 등을 포함한다. 상기 용매화물이란 본 발명 화합물에 대한 1개 또는 복수의 용매 분자의 회합에 의해 형성되는 함용매화합물(a solvent-containing compound)을 의미한다. 상기 용매화물은 예를 들어 단일용매화물, 이용매화물, 삼용매화물, 사용매화물을 포함한다. 상기 수화물 및 용매화물은 공지된 방법을 사용하여 제조될 수 있으며, 무독성 및 수용성인 것이 바람직하다. 특히, 바람직하게는 상기 수화물 및 용매화물은 각각 물, 알코올성 용매(특히, 메탄올, 에탄올 등), 트리플루오로아세트산, 포름산, 암모니아일 수 있으나 이에 제한되지 않는다.

[186] 또한 본 발명의 화합물은, 그 자체로 약리학적 활성이 거의 또는 전혀 없지만, 체내로 투여될 때, 예를 들어 가수 분해에 의해 원하는 활성을 갖는 화합물로 전환될 수 있는 전구약물의 형태로 준비될 수 있다. 이와 같은 전구약물은 생물학적 반응성 작용기를 포함하는 화합물의 유도체일 수 있고, 생물학적 반응성 작용기는 화합물로부터 절단되거나, 생물학적 조건 (생체내 또는 시험 관내)하에서 화합물을 제공하기 위해 다른 방식으로 반응할 수 있다. 통상적으로, 전구약물은 불활성이거나, 적어도 화합물보다 낮은 활성을 갖는데, 이는 생물학적 반응성 작용기로부터 절단된 후에 화합물이 그의 활성을 나타내도록 만든다. 생물학적 반응성 작용기는 생물학적 조건하에서 가수분해되거나 산화되어 화합물을 생성할 수 있다. 예를 들어, 전구약물은 생물학적으로 가수분해 가능한 기를 포함할 수 있다. 생물학적으로 가수분해 가능한 기의 예는 생물학적으로 가수분해

가능한 포스페이트, 생물학적으로 가수분해 가능한 에스테르, 생물학 적으로 가수분해 가능한 아미드, 생물학적으로 가수분해 가능한 탄산 에스테르, 생물학적으로 가수분해 가능한 카바메이트 및 생물학적으로 가수분해 가능한 우레이드를 포함하나 이에 제한되는 것은 아니다.

[187] 또한 본 발명의 화합물은 입체이성질체(stereoisomer)의 형태를 가질 수 있다. 상기 입체이성질체는 동일한 화학식 또는 분자식을 가지지만 입체적으로 다른 화합물을 의미하고, 거울상이성질체(enantiomer), 부분입체 이성질체(diastereomer), 기하이성질체(geometric isomer)(또는 시스/트랜스 이성질체), 회전이성질체(rotamer) 및 회전장애이성질체(atropisomer)를 포함하며, 이들 각각의 이성질체 및 이들의 혼합물도 본 발명의 범위에 포함된다. 예를 들어, 본 발명의 화합물은 카이랄 탄소 중심을 가질 수 있으며, 이에 따라 개개의 거울상 이성질체(enanatiomer) 또는 이들의 혼합물(예를 들어 라세미 혼합물)도 본 발명의 범주에 속할 수 있다. 이 외에도 본 발명의 화합물은 회전이성질체(rotamer)와 같은 형태이성질체(conformational isomer) 및 기하이성질체(geometric isomer)(또는 시스/트랜스 이성질체)를 포함하는 부분입체 이성질체(diastereomer)의 형태를 가질 수 있으며, 이러한 모든 입체이성질체(stereoisomer) 및 이들의 혼합물은 모두 본 발명의 범주에 속할 수 있다. 이런 관점에서, 본 발명의 식 (I)은 입체 화학구조가 특정되지 않기 때문에 식 (I)의 상기 입체이성질체들을 포함할 수 있다. 구체적으로 화학 구조식에서 비대칭 탄소 원자와 연결되는 실선 결합()은 입체 중심의 절대적 배열을 나타내는 쐐기형 실선 결합() 및 쐐기형 점선 결합()을 포함할 수 있다. 또한 본 명세서에 기재된 실시예 화합물의 입체이성질체들도 본 발명의 범위에 포함되는 것으로 해석해야 한다.

[188] 또한 본 발명의 화합물은 호변이성질체(tautomer)의 형태로 존재할 수 있다. 호변이성질체는 분자의 한 원자로부터 동일한 분자의 또 다른 원자로 양성자가 시프트된 것을 구조를 가질 수 있으며, 단일 결합 및 인접한 이중 결합의 전환에 수반되는 수소 원자의 이동에 의해 상호전환될 수 있다. 호변이성질화가 가능한 용액에서, 호변이성질체의 화학적 평형이 존재할 것이다. 호변이성질체의 정확한 비율은 온도, 용매 및 pH를 포함하는 여러 인자에 좌우된다.

[189] 또한 본 발명의 화합물은 동위원소 표지 유사체(isotopically labeled analog)를 더 포함한다. 구체적으로, 본 발명의 화합물은 수소, 탄소, 질소, 산소, 인, 황, 불소 및 염소의 동위원소(각각 ^{2}H, ^{3}H, ^{13}C, ^{11}C, ^{14}C, ^{15}N, ^{18}O, ^{17}O, ^{31}P, ^{32}P, ^{35}S, ^{18}F 및 ^{36}Cl)를 포함할 수 있다. 상기 동위원소 및/또는 다른 원자의 다른 동위원소를 포함하는 본 발명의 화합물은 모두 본 발명의 범위 내에 속한다.

[190] 본 발명의 일 측면에 따르면, 상기 항체-약물 접합체를 암 세포와 접촉시키는 단계를 포함하는, 암을 치료 또는 예방하기 위한 방법을 제공한다.

[191] 본 발명에 따른 항체-약물 접합체는 암 세포의 활성을 억제할 수 있다. 따라서 본 발명은 상기 항체-약물 접합체를 유효성분으로 포함하는 암을 치료 또는 예방하기 위한 약학적 조성물 또는 항암제를 제공한다.

[192] 여기서 "치료"는 상기 화합물의 투여로 상기 질환의 증세가 호전되거나 이롭게 변경되는 모든 행위를 의미하고, "예방"이란 상기 화합물의 투여로 상기 질환의 발생, 확산 및 재발을 억제시키거나 지연시키는 모든 행위를 의미한다.

[193] 여기서 "투여"란, 임의의 적절한 방법으로 이를 필요로 하는 대상에게 소정의 물질을 제공하는 것을 의미하며, 본 발명의 항체-약물 접합체의 투여 경로는 목적 조직에 도달할 수 있는 한 경구 또는 비경구 등 어떠한 일반적인 경로를 통하여 투여될 수 있다.

[194] 여기서 "암"은 토포이소머라제 I의 억제, 및/또는 DDX5, 서바이빈 (survivin), Mcl-1, XIAP 및 cIAP2로 이루어진 군에서 선택된 어느 하나 이상의 암-관련 생존 유전자 (cancer-associated survival genes)의 억제로 치료 가능한 모든 암을 포함하며, 고형암 또는 혈액암일 수 있다. 예컨대, 상기 암은 가성점액종, 간내 담도암, 간모세포종, 간암, 갑상선암, 결장암, 고환암, 골수이형성증후군, 교모세포종, 구강암, 구순암, 균상식육종, 급성골수성백혈병, 급성림프구성백혈병, 기저세포암, 난소상피암, 난소생식세포암, 남성유방암, 뇌암, 뇌하수체선종, 다발성골수종, 담낭암, 담도암, 대장암, 만성골수성백혈병, 만성림프구백혈병, 망막모세포종, 맥락막흑색종, 바터팽대부암, 방광암, 복막암, 부갑상선암, 부신암, 비부비동암, 비소세포폐암, 설암, 성상세포종, 소세포폐암, 소아뇌암, 소아림프종, 소아백혈병, 소장암, 수막종, 식도암, 신경교종, 신우암, 신장암, 심장암, 십이지장암, 악성 연부조직 암, 악성골암, 악성림프종, 악성중피종, 악성흑색종, 안암, 외음부암, 요관암, 요도암, 요로상피암, 원발부위불명암, 위림프종, 위암, 위유암종, 위장관간질암, 윌름스암, 유방암, 육종, 음경암, 인두암, 임신융모질환, 자궁경부암, 자궁내막암, 자궁육종, 전립선암, 전이성골암, 전이성뇌암, 종격동암, 직장암, 직장유암종, 질암, 척수암, 청신경초종, 췌장암, 침샘암, 카포시 육종, 파제트병, 편도암, 편평상피세포암, 폐선암, 폐암, 폐편평상피세포암, 피부암, 항문암, 횡문근육종, 후두암, 흉막암, 혈액암, 및 흉선암으로 이루어진 군으로부터 선택되는 1종 이상인 것일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다. 또한, 상기 암은 원발성 암뿐 아니라 전이성 암도 포함한다.

[195] 본 발명의 일 측면에 따르면, 암은 신장암, 요로상피암, 방광암, 유방암, 비소세포폐암, 두경부암, 위암 및 식도암으로 이루어진 군으로부터 선택되는 1종 이상일 수 있다.

[196] 또 다른 관점에서, 본 발명은 상기 항체-약물 접합체를 대상체에 투여하는 단계를 포함하는, 암의 치료 또는 예방 방법에 관한 것이다.

[197] 본 발명에서 용어 "대상체"는 “개체”와 동의어로 사용되며, 상기 대상체는 포유동물, 예를 들면, 인간, 쥐, 소, 말, 돼지, 개, 양, 염소 또는 고양이일 수 있다.

[198] 전술한 본 발명의 약학적 조성물과 중복된 내용은 그 기재를 생략한다.

[199] 또 다른 관점에서, 본 발명은 상기 항체-약물 접합체의 암의 치료 또는 예방 용도에 관한 것이다.

[200] 전술한 본 발명의 약학적 조성물과 중복된 내용은 그 기재를 생략한다.

[201] 또 다른 관점에서, 본 발명은 암의 치료 또는 예방용 약학적 조성물을 제조하기 위한 상기 항체-약물 접합체의 용도에 관한 것이다.

[202] 전술한 본 발명의 약학적 조성물과 중복된 내용은 그 기재를 생략한다.

[203] 본 발명의 모든 조성물, 치료방법 및 용도에서 언급된 사항은 서로 모순되지 않는 한 동일하게 적용된다.

발명의 실시를 위한 형태

[204] **[실시예]**

[205] 이하, 본 발명의 구성이 실시예를 통해 구체적으로 기술되나, 이하의 실시예는 본 발명의 이해를 돕기 위한 것일 뿐 본 발명의 범위가 이들로 제한되는 것은 아니다. 이하 실시예에 기재된 시약, 용매 및 출발 물질은, 시중에서 쉽게 구입할 수 있는 물질의 경우 이들의 입수처를 특별히 기재하지 않았다.

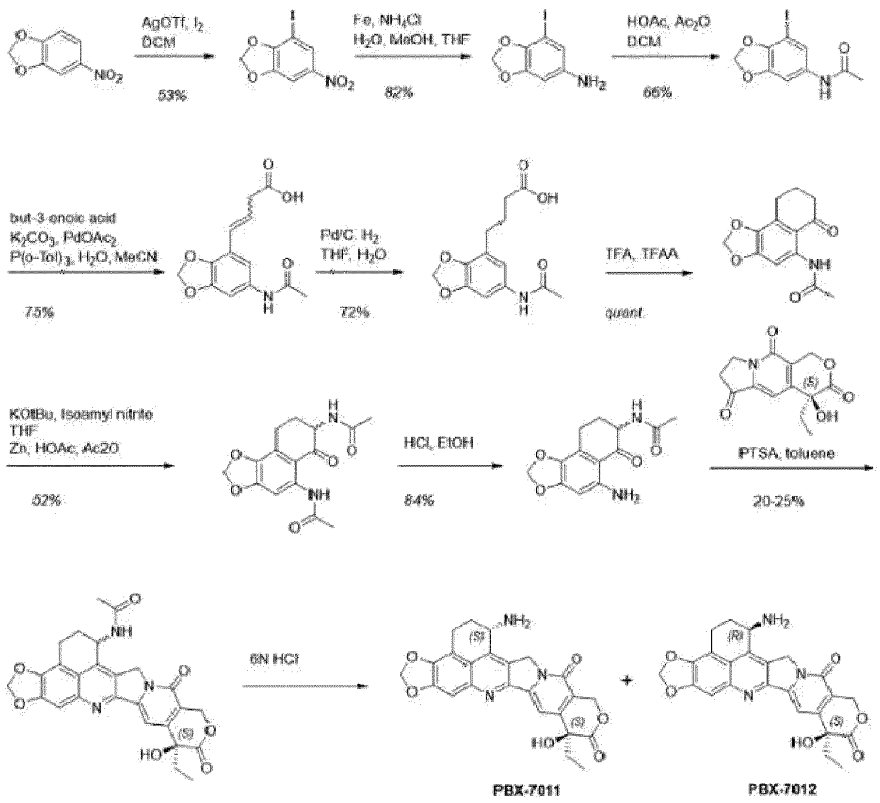
[206]

[207] 본 발명에 따른 캄프토테신 유도체의 제조방법은 하기와 같다.

[208] **제조예: PBX 페이로드의 합성**

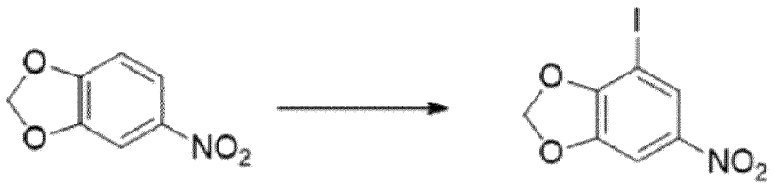
[209] **제조예 1: 화학식 2 또는 화학식 3의 활성형 캄프토테신 유도체(PBX-7011 및 PBX-7012)의 합성**

[210]



[211] **1-1. 화합물 2의 합성**

[212]



1 2

[213] 디클로로메탄(748ml) 플라스크 중 5-니트로벤조[d][1,3]디옥솔(25g, 150mmol) 용액에 은 트리플레이트(57.7g, 224mmol) 및 요오드(57.0g, 224mmol)를 첨가하였다. 이 용액을 N_2 분위기 하에 실온의 암실에서 교반하였다.

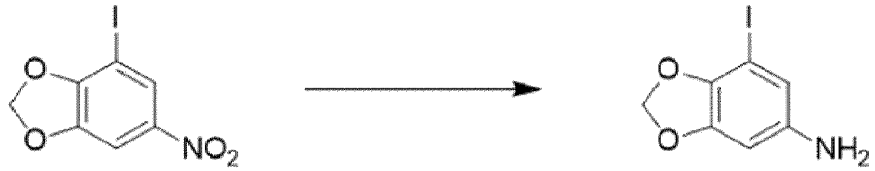
[214] 여과에 의해 AgI를 제거하고 고형물을 디클로로메탄(100mL)으로 세척하였다. 용매를 감압 하에 제거하고 잔류물을 EtOAc(250mL)와 5%(v/v) NH_4OH/H_2O 용액(200mL) 사이에 분배하였다. 유기층을 분리하고 1M Na_2SO_3(5 x 200 mL) 및 염수(200 mL)로 세척하고 Na_2SO_4로 건조시키고 활성탄으로 처리하고 셀라이트를 통해 여과하였다. 용매를 감압 하에 증발시켜 미정제물을 갈색 고형물로 제공하였다. 이것을 빙냉 EtOH(400mL)로부터 분쇄하고, 여과하고, 고형물을 빙냉(ice-cold)EtOH(100mL)로 세척하여 생성물을 옅은 갈색-회색 고형물(14.3g)로 제공하였다. 여액으로부터 용매를 제거하고 미정제물을 빙냉 EtOH(300mL)로부터 두 번째로 분쇄하였다. 고형물을 여과에 의해 수집하고, EtOH(50mL)로 세척하여 추가량의 생성물(10.2g)을 암갈색-회색 고체로서 제공하였다. 두 배치 모두 추가 정제 없이 그대로 사용되었다.

[215] SC_ACID: m/z 294.2 $[M+H]^+$

[216]

[217] **1-2. 화합물 3의 합성**

[218]



2 3

[219] 물(80ml), 메탄올(40.0ml) 및 테트라히드로푸란(40.0ml)의 혼합물 중 4-요오도-6-니트로벤조[d][1,3]디옥솔(8.75g, 29.9mmol)의 현탁액에 철 분말(6.67g, 119mmol) 및 염화암모늄(6.39g, 119mmol)을 첨가하였다. 현탁액을 75℃로 가열하고 16.5시간 동안 교반하였다. 반응 혼합물을 실온으로 냉각시키고 감압하에 농축시켰다. 생성된 흑색 고형물을 에틸 아세테이트(100ml)에 현탁시키고 용액을 따라내었다. 잔류물을 EtOAc(3 x 50mL)로 세척하였다. 혼합물을 분별 깔때기로 옮기고, 물을 첨가하고, 수성 층을 제거하였다. 유기층을 포화 수성 $NaHCO_3$용액(150

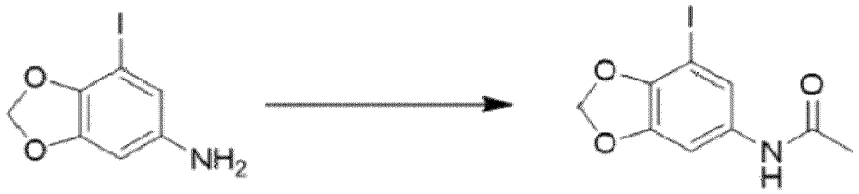
mL) 및 염수(150mL)로 세척하였다. 유기층을 Na_2SO_4로 건조시키고 용매를 감압하에 제거하여 갈색 고체를 수득하였다(4.75g, 60% 수율). 철 잔류물을 에틸 아세테이트로 철저히 세척하여 추가 생성물을 회수하였다. 이어서, 유기 분획을 포화 수성 $NaHCO_3$용액(150mL), 염수(150mL)로 세척하고 Na_2SO_4로 건조시켰다. 용매를 감압하에 제거하여 갈색 고형물을 얻었다(1.74g, 22% 수율).

[220] SC_ACID: m/z 264.0 $[M+H]^+$

[221]

[222] **1-3. 화합물 4의 합성**

[223]



3 4

[224] 디클로로메탄(49ml) 중 7-요오도벤조[d][1,3]디옥솔-5-아민(6.39g, 24.29mmol)의 용액에 아세트산 무수물(2.75mL, 29.2mmol) 및 트리에틸아민(4.06mL, 29.2mmol)을 첨가하였다. 반응 혼합물을 실온에서 밤새 교반하였다. 몇 시간 후에 추가 DCM(10ml)을 첨가하였다. 현탁액을 소결 깔때기를 통해 여과하고 빙냉 DCM(10mL)으로 세척하였다. 생성물을 추가로 감압하에 건조시켜 밝은 회색 고체(4.46g)를 얻었다. 여액을 감압 하에 농축시키고 잔류물을 EtOAc에 용해시키고, 물 및 염수로 세척하고, Na_2SO_4상에서 건조시키고, 감압 하에 농축시켜 갈색 고체 (~3g)를 수득하였다. 갈색 고체를 플래시 컬럼 크로마토그래피(80g Si, 헵탄 중 0-100% 에틸 아세테이트)로 정제했다. 생성물의 모든 배치를 빙냉 EtOAc(5-10 ml)로부터 분쇄하였다. 두 배치를 합하고 추가로 건조시켜 회백색 고체를 얻었다.

[225] 총 수율: 5.0g, 66%

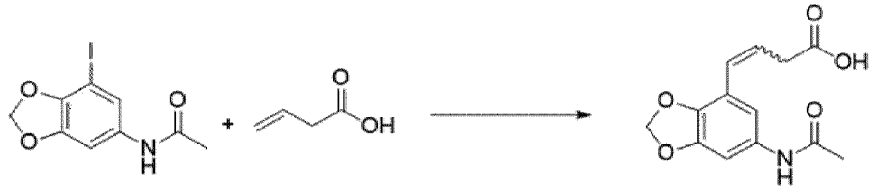
[226] SC_ACID: m/z 306.0 $[M+H]^+$

[227] 1H NMR (400 MHz, DMSO-d6) δ 9.88 (s, 1H), 7.39 (d, J = 1.9 Hz, 1H), 7.17 (d, J = 1.9 Hz, 1H), 6.04 (s, 2H), 1.99 (s, 3H).

[228]

[229] **1-4. 화합물 5의 합성**

[230]



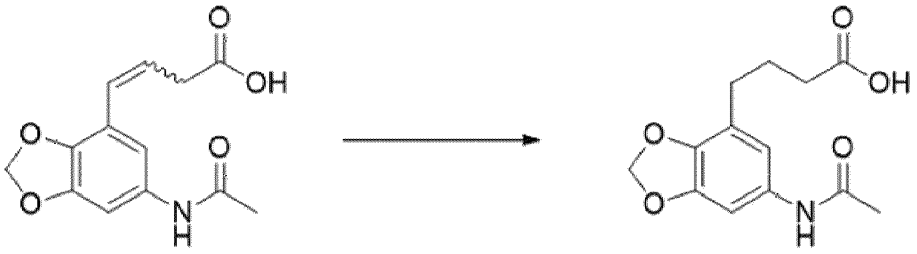
4 5

[231] 콘덴서가 장착된 3-neck 플라스크에 아세토니트릴(40mL) 중 N-(7-요오도벤조[d][1,3]디옥솔-5-일)아세트아미드(5.06g, 16.59mmol), 부트-3-엔산(1.69mL, 19.90mmol) 및 탄산칼륨(2.98 g, 21.56mmol)의 슬러리를 0 ~ 5℃로 냉각시켰다. 물(13.33 mL)을 천천히 첨가하여 기체를 발생시켰다. 기체 발생이 중단되면 혼합물을 Ar로 30분 동안 탈기시켰다. 트리-o-톨릴포스핀(0.505g, 1.659mmol) 및 팔라듐 아세테이트(0.186g, 0.829mmol)를 첨가하고 혼합물을 다시 30분 동안 탈기시킨 후 Ar 하에 환류 가열하였다. 반응물을 실온으로 냉각시키고 셀라이트를 통해 여과하였다. 필터 케이크를 H_2O 및 EtOAc로 세척하였다. 유기 용매를 진공 하에 여액으로부터 제거하고 수성 물질을 진한 용액으로 산성화시켰다. pH = 1-2가 될 때까지 HCl. 수성층을 EtOAc로 추출하고, 합한 유기상을 염수로 세척하고, Na_2SO_4상에서 건조시키고, 여과하고, 감압 하에 농축하여 조 생성물을 수득하였다. 조 물질을 빙냉 EtOAc(30 mL)로부터 분쇄하고 고체를 여과에 의해 수집하여 생성물을 갈색고체로 제공하였다. 모액을 감압 하에 농축하고 플래쉬 크로마토그래피(80g Si, 헵탄 중 0 - 100% EtOAc)를 통해 정제하였다. 생성물 분획을 감압 하에 농축하여 연갈색 발포체를 수득하였다. 총 수율: 3.46g, 75%. E/Z 이성질체의 혼합물을 얻었다.

[232] SC_ACID: m/z 264.4 $[M+H]^+$

[233]

[234] **1-5. 화합물 6의 합성**

[235] 

5 6

[236] 테트라히드로푸란(50mL)/물(50mL) 중 4-(6-아세트아미도벤조[d][1,3]디옥솔-4-일)부트-3-엔산(3.47g, 13.18mmol)의 현탁액)를 15분 동안 N_2로 탈기시켰다. H_2 하(풍선)에서 40℃로 가열하기 전에 Pd/C(2.97g, 1.397mmol)를 첨가하고 현탁액을 H_2로 5분 동안 탈기시켰다. 24시간 후, 반응 혼합물을 질소 및 추가의 Pd/C(2.97 g, 1.397 mmol)을 첨가하였다. 반응 혼합물을 수소로 10분 동안 버블링하고 수소 하에 45℃에서 밤새 교반하였다. 반응물을 셀라이트를 통해 여과하였다. 필터 케이크를 H_2O (50 mL)로 세척하였다 및 EtOAc(50 mL) 및 EtOAc(50 mL) 및 유기 용매를 진공하에 여과액으로부터 제거하였다. 수성 용액을 진한 HCl로 pH = 1이 될 때까지 산성화하고 암갈색/녹색 침전물을 소결 깔때기를 통한 여과에 의해 수집하였다. 수성 여과액을 추출하였다. 합한 유기상을 염수로 세척하고, Na_2

SO_4로 건조하고, 여과하고, 용매를 진공하에 제거하여 갈색 오일을 얻었다. 생성물 회수율이 낮았으므로, 필터 케이크를 EtOAc(50 ml), 물(200ml) 및 나 OH(400 ml). 물/EtOAc 플러시를 MeOH 플러시로부터의 고체를 함유하는 플라스크에 첨가하였다. 수성 층을 진한 농도로 산성화하였다. pH = 1이 될 때까지 HCl 및 회백색 침전물이 형성되었으며, 이를 소결 깔때기를 통한 여과에 의해 수집하였다. 수성 여액을 EtOAc(3x200 mL)로 추출한 후, LCMS는 모든 생성물이 수성에서 제거되었음을 나타내었다. 합한 유기상을 염수로 세척하고, Na_2SO_4상에서 건조시키고, 여과하고, 용매를 진공하에 제거하여 밝은 갈색 고체를 수득하였다. 모든 제품 배치를 합하고 플래시 컬럼 크로마토그래피(40g Si, DCM 중 0-10% MeOH)를 통해 정제했다. 생성물 분획을 농축하여 밝은 갈색 고체를 얻었다. 수율: 2.52 g, 72%.

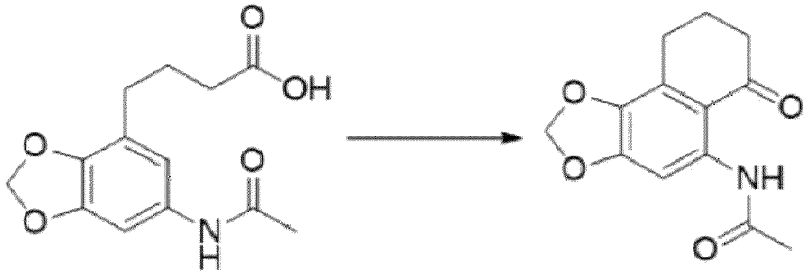
[237] SC_ACID: 266.2 $[M+H]^+$

[238] 1H NMR (400 MHz, DMSO-d6) δ 12.07 (s, 1H), 9.78 (s, 1H), 7.14 (d, J = 2.0 Hz, 1 H), 6.80 (d, J = 2.2 Hz, 1H), 5.95 (s, 2H), 2.50 - 2.46 (m, 2H), 2.23 (t, J = 7.4 Hz, 2H), 1.98 (s, 3H), 1.84 - 1.70 (m, 2H).

[239]

[240] **1-6. 화합물 7의 합성**

[241]



6 7

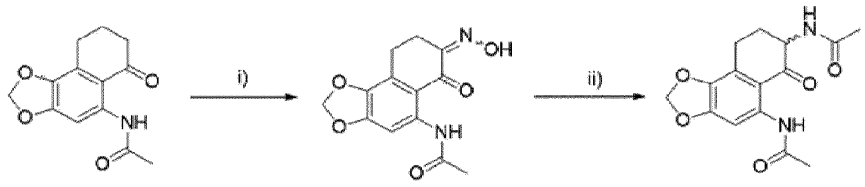
[242] TFA(433μL, 5.65mmol) 중의 4-(6-아세트아미도벤조[d][1,3]디옥솔-4-일)부탄산(150mg, 0.565mmol)의 현탁액을 얼음 위에서 냉각시켰다. TFAA(157μL, 1.131mmol)를 첨가하였다. 혼합물을 0-5℃에서 1시간 동안 교반하고, 시간이 지남에 따라 어두운 용액으로 변하였다. 반응 혼합물을 빙냉 포화 수성 $NaHCO_3$용액(10mL)에 적가하고 수성 용액을 에틸 아세테이트(3 x 25 mL)로 추출하였다. 합한 유기층을 sat. $NaHCO_3$ 및 염수를 Na_2SO_4로 건조시키고 여과하고 용매를 진공하에 제거하여 연어 핑크색 고체를 수득하였다. 수율: 140mg, 100%

[243] SC_ACID: m/z 248.2 $[M+H]^+$

[244] 1H NMR (400 MHz, DMSO-d6) δ 12.34 (s, 1H), 8.11 (s, 1H), 6.13 (s,2H), 2.80 (t, J = 6.2 Hz, 2H), 2.66 - 2.58 (m, 2H), 2.12 (s, 3H), 2.01 - 1.91(m, 2H).

[245]

[246] **1-7. 화합물 8의 합성**

[247] 

7 8

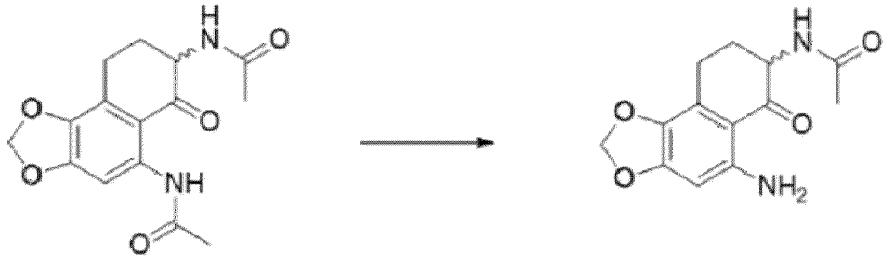
[248] 테트라히드로푸란 (1.2 mL) 중 N-(6-옥소-6,7,8,9-테트라히드로나프토[1,2-d][1,3]디옥솔-5-일)아세트아미드 (50 mg, 0.202 mmol)의 현탁액을 0℃로 냉각시키고 칼륨 tert-부톡사이드(27.2mg, 0.243mmol) 및 이소아밀 아질산염(35.0μL, 0.263mmol)을 첨가하였다. 짙은 녹색 혼합물을 얼음(< 5℃) 위에서 1.5시간 동안 교반하였다. 아세트산(170μL, 2.94mmol), 아세트산 무수물(170μL, 1.810mmol) 및 아연, 더스트(66.1mg, 1.011mmol)를 반응 혼합물에 첨가하였다. 현탁액을 0℃에서 2시간 동안 교반하였다. 반응 혼합물을 셀라이트 상에서 여과하고 DCM으로 플러싱하였다. 여액을 감압 농축하여 흑색 유상 물질을 얻었다. 조 생성물을 플래시 컬럼 크로마토그래피(4g Si, DCM 중 0-4% MeOH)를 통해 정제하였다. 생성물 분획을 농축하여 80-90% 순도로 회색 고체(32 mg, 52%)를 수득하였다. 정제용 MPLC로 정제하면 더 높은 순도의 샘플을 얻을 수 있다.

[249] SC_ACID: m/z 305.4 $[M+H]^+$

[250] 1H NMR (400 MHz, DMSO-d6) δ 12.10 (s, 1H), 8.21 (d, J = 8.0Hz, 1H), 8.12 (s, 1H), 6.15 (d, J = 9.3 Hz, 2H), 4.66 - 4.56 (m, 1H), 2.93(dd, J = 8.9, 4.0 Hz, 2H), 2.14 (s, 3H), 2.13 - 1.93 (m, 2H), 1.91 (s, 3H).

[251]

[252] **1-8. 화합물 9의 합성**

[253] 

8 9

[254] N,N'-(6-옥소-6,7,8,9-테트라히드로나프토[1,2-d][1,3]디옥솔-5,7-디일)디아세트아미드 (244 mg, 0.802 mmol)를 에탄올/물 (5/1) 중 2M 염산(4.69 mL, 9.38 mmol)에 현탁시켰다. 혼합물을 4시간 동안 55℃로 가열하였다. 흑색 혼합물을 0-5℃로 냉각시켰다. 교반하면서 트리에틸아민(1.4mL, 10.04mmol)을 적가하였다. 그 다음 혼합물을 EtOH로 희석하고 증발 건조시켰다. 잔류물을 물과 DCM 사이에 분배하였다. 층을 분리하고 수성 층을 DCM으로 1회 추출하였다. 합한 유기층을 Na

$_2SO_4$로 건조하고 농축하여 생성물을 갈색 고체(178 mg, 73%)로서 86% 순도로 수득하였다.

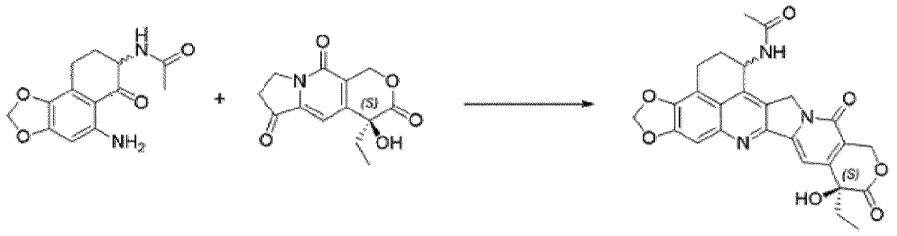
[255] SC_ACID: m/z 263.0 $[M+H]^+$

[256] 1H NMR (400 MHz, DMSO) δ 8.04 (d, J = 8.0 Hz, 1H), 6.20 (s, 1H), 5.94 (d, J = 6.0 Hz, 2H), 4.48 - 4.41 (m, 1H), 3.08 (s, 2H), 2.88 - 2.69(m, 2H), 2.15 - 2.03 (m, 1H), 1.88 (s, 3H), 1.86 - 1.75 (m, 1H).

[257]

[258] **1-9. 화합물 10의 합성**

[259]



9 10

[260] (4S)-4-에틸-7,8-디히드로-4-히드록시-1H-피라노[3,4-f]인돌리진-3,6,10(4H)-트리온 (146 mg, 0.555 mmol) 및 N- (5-아미노-6-옥소-6,7,8,9-테트라히드로나프토[1,2-d][1,3]디옥솔-7-일)아세트아미드(112 mg, 0.427 mmol)를 건조 톨루엔(4.5ml). PPTS(21mg, 0.085mmol)를 첨가하고 반응 혼합물을 115℃에서 40시간 동안 교반하였다.

[261] 반응 혼합물을 실온으로 냉각시켰다. 현탁액을 2mL DCM으로 희석하고 여과하였다. 흑색 잔류물(210 mg)을 얻었다.

[262] 조 생성물을 컬럼 크로마토그래피(12g Si, DCM 중 0-7% 메탄올)로 정제하여 생성물(45 mg, 21%)을 갈색 고체로 수득하였다.

[263] LCMS 분석은 2개의 부분입체이성질체를 보여주었다.

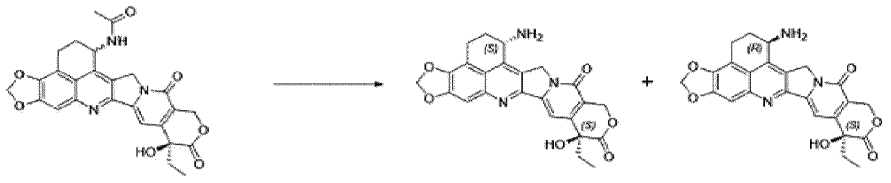
[264] SC_ACID: m/z 490.2 $[M+H]^+$

[265] 1H NMR (400 MHz, DMSO-d6) δ 8.47 (t, J = 9.3 Hz, 1H), 7.42 (s, 1H), 7.24 (s, 1H), 6.49 (s, 1H), 6.29 (d, J = 5.2 Hz, 2H), 5.57 - 5.49 (m, 1H), 5.41 (s, 2H), 5.23 - 5.07 (m, 2H), 3.09 - 3.00 (m, 2H), 2.11 - 2.01 (m, 2H), 1.91 (s, 3H), 1.89 - 1.79 (m, 2H), 0.87 (t, J = 7.1 Hz, 3H).

[266]

[267] **1-10. PBX-7011 및 PBX-7012의 합성**

[268]



10 PBX-7011 PBX-7012

[269] N-((10S)-10-에틸-10-히드록시-11,14-디옥소-2,3,10,11,14,16-헥사히드로-1H,13H-벤조[de][1,3]디옥솔로[4,5-g]피라노[3',4':6,7]인돌리지노[1,2-b]퀴놀린-1-일)아세트아미드(73.5mg, 0.150mmol)를 1.0mL 6N HCl에 용해시키고, 90℃에서 8시간 동안 이어서 실온에서 밤새도록 교반하였다. 반응 혼합물을 감압 하에 농축하고 산성 분취용 MPLC를 통해 2회 실행(Luna2-30)하여 정제하였다. 분리된 부분입체이성질체를 함유하는 분획을 3N HCl 5방울로 산성화하고 동결건조하여 생성물을 황색 고체로 수득하였다.

[270] 1st eluting isomer: PBX-7011, 23 mg, 34% yield

[271] U_AN_ACID: m/z 448.4 $[M+H]^+$

[272] 1H NMR (400 MHz, DMSO-d6) δ 8.54 (s, 3H), 7.50 (s, 1H), 7.27 (s, 1H), 6.52 (s, 1H), 6.34 (d, J = 13.3 Hz, 2H), 5.77 (d, J = 19.3 Hz, 1H), 5.44(s, 2H), 5.37 (d, J = 19.3 Hz, 1H), 5.05 (s, 1H), 3.19 - 3.02 (m, 2H), 2.46(s, 1H), 2.20 - 2.03 (m, 1H), 1.94 - 1.81 (m, 2H), 0.88 (t, J = 7.3 Hz, 3H).

[273]

[274] 2nd eluting isomer: PBX-7012, 28 mg, 41% yield

[275] U_AN_ACID: m/z 448.2 $[M+H]^+$

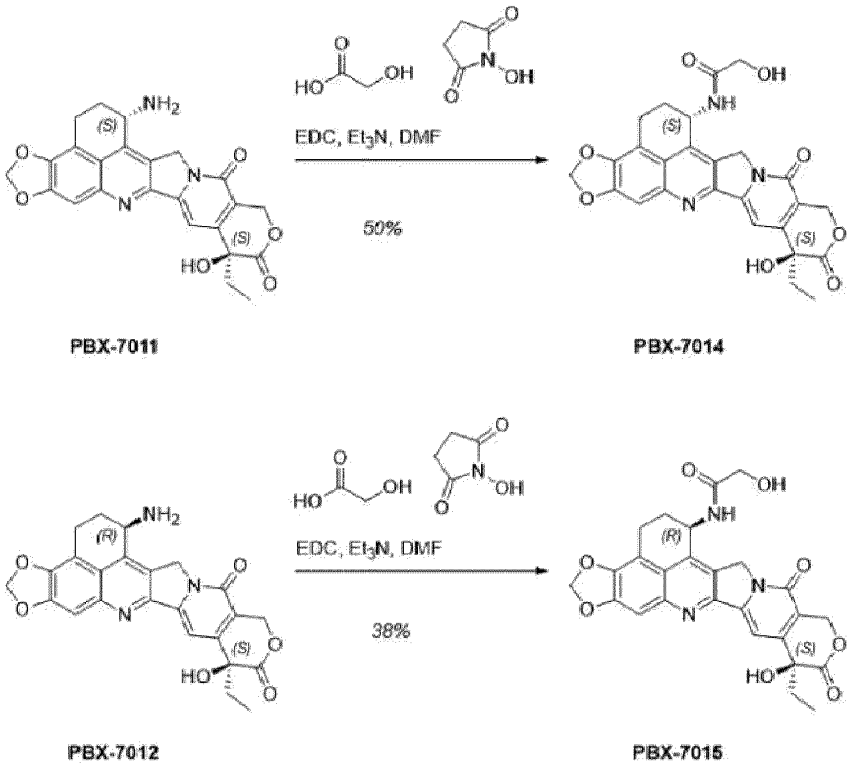
[276] 1H NMR (400 MHz, DMSO-d6) δ 8.57 (d, J = 4.7 Hz, 3H), 7.51 (s, 1H), 7.27 (s, 1H), 6.52 (s, 1H), 6.34 (d, J = 12.2 Hz, 2H), 5.76 (d, J = 19.4 Hz, 1H), 5.44 (s, 2H), 5.37 (d, J = 19.4 Hz, 1H), 5.08 (s, 1H), 3.16 - 2.98(m, 2H), 2.46 (s, 1H), 2.18 - 2.06 (m, 1H), 1.94 - 1.80 (m, 2H), 0.87 (t, J = 7.3 Hz, 3H).

[277]

[278] **제조예 2: 화학식 4 또는 화학식 5의 활성형 캄프토테신 유도체(PBX-7014 및 PBX-7015)의 합성**

[279] 본 실시예는 Exatecan-하이브리드 화합물(PBX-7011 및 PBX-7012)의 두 개의 분리된 부분입체이성질체로부터 시작하여 화합물 PBX-7014 및 PBX-7015의 합성을 설명한다.

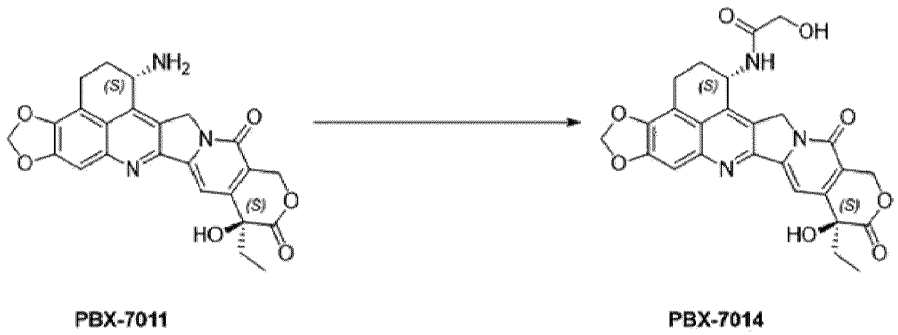
[280]



[281]

[282] **2-1: PBX-7014의 합성**

[283]



[284] 다음 절차에 따라 활성화된 글리콜산의 스톡 용액을 제조했다:

[285] 글리콜산(17mg, 0.224mmol)을 N,N-디메틸포름아미드 1mL에 용해시켰다. HOSu(25.7mg, 0.223mmol) 및 EDC(42.8mg, 0.223mmol)를 첨가하였다. 반응 혼합물을 실온에서 1시간 동안 교반하였다.

[286] 이어서, N,N-디메틸포름아미드(2.5mL) 중 (1S,10S)-1-아미노-10-에틸-10-히드록시-1,2,3,10,13,16-헥사히드로-11H,14H-벤조[de][1,3]디옥솔로[4,5-g]피라노[3',4':6,7]인돌리지노[1,2-b]퀴놀린-11,14-디온 (40 mg, 0.089 mmol) 및 트리에틸아민(0.025ml, 0.179mmol)의 현탁액에 0.4mL의 활성화된 산 용액을 첨가하였다. 혼합물을 실온에서 3시간 동안 교반하였다. 새로 제조된 활성화된 산 용액 0.05mL를

첨가하였다. 이어서, 반응 혼합물을 실온에서 추가로 2시간 동안 교반하였다. 반응 혼합물을 증발 건조시켰다. 조 생성물을 컬럼 크로마토그래피(클로로포름 중 0-8% 메탄올)로 정제하였다. 이것은 PBX-7014 생성물 및 잔류 숙신이미드를 함유하는 황색 고체를 제공하였다. 생성물을 산성 분취용 MPLC(Luna5-40)에 의해 추가로 정제하여 생성물 분획의 동결건조 후 밝은 황색 고체를 얻었다. 수율: 20 mg, 50%

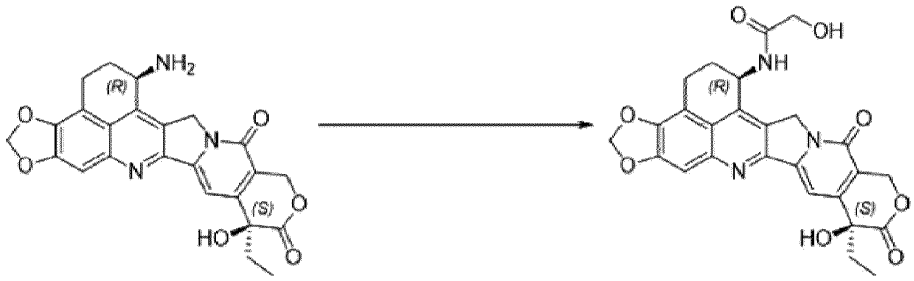
[287] U_AN_ACID: m/z 506.2 $[M+H]^+$

[288] 1H NMR (400 MHz, DMSO-d6) δ 8.40 (d, J = 8.9 Hz, 1H), 7.40 (s, 1H), 7.23 (s, 1 H), 6.49 (s, 1H), 6.28 (d, J = 4.6 Hz, 2H), 5.61 - 5.45 (m, 2H), 5.45 - 5.35 (m, 2H), 5.1 9 - 5.06 (m, 2H), 3.95 (s, 2H), 3.13 - 2.96 (m, 2H), 2.21 - 2.02 (m, 2H), 1.94 - 1.77 (m, 2H), 0.87 (t, J = 7.3 Hz, 3H).

[289]

[290] **2-2: PBX-7015의 합성**

[291]



PBX-7012 PBX-7015

[292] 다음 절차에 따라 활성화된 산의 스톡 용액을 제조했다:

[293] 글리콜산(17.00mg, 0.223mmol)을 N,N-디메틸포름아미드 1mL에 용해시켰다. HOSu(25.7mg, 0.223mmol) 및 EDC(42.8mg, 0.223mmol)를 첨가하였다. 반응 혼합물을 실온에서 1시간 동안 교반하였다.

[294] 이어서, N,N-디메틸포름아미드(2.5mL) 중 (1R,10S)-1-아미노-10-에틸-10-히드록시-1,2,3,10,13,16-헥사히드로-11H,14H-벤조[de][1,3]디옥솔로[4,5-g]피라노[3',4':6,7]인돌리지노[1,2-b]퀴놀린-11,14-디온 (25 mg, 0.056 mmol) 및 트리에틸아민 (0.016ml, 0.112mmol)의 현탁액에 0.25 mL의 활성화된 산 용액을 첨가하였다. 혼합물을 실온에서 밤새 교반하였다. 새로 제조된 활성화된 산 용액 0.03mL를 첨가하였다. 이어서, 반응 혼합물을 실온에서 2시간 동안 교반하였다. 반응 혼합물을 이전의 더 작은 배치와 합하고 증발 건조시켰다. 조 생성물을 컬럼 크로마토그래피로 정제하였다. 이것은 PBX-7015 생성물 및 잔류 숙신이미드를 함유하는 황색 고체를 제공하였다. 생성물을 산성 분취용 MPLC(Luna5-40)로 정제하였다. 생성물 분획을 동결건조시켜 밝은 황색 고체를 수득하였다. 수율: 15mg, 38%

[295] U_AN_ACID: 506.2 $[M+H]^+$

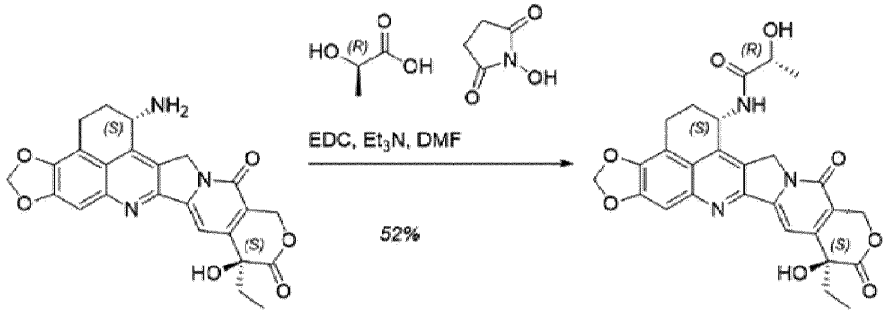
[296] 1H NMR (400 MHz, DMSO) δ 8.44 (d, J = 9.0 Hz, 1H), 7.41 (s, 1H), 7.24 (s, 1H), 6.48 (s, 1H), 6.29 (d, J = 2.3 Hz, 2H), 5.61 - 5.44 (m, 2H), 5.44 - 5.36 (m, 2H), 5.20 - 5.07 (m, 2H), 3.96 (s, 2H), 3.10 - 2.96 (m, 2H), 2.20 - 2.06 (m, 2H), 1.95 - 1.79 (m, J = 7.3 Hz, 2H), 0.87 (t, J = 7.3 Hz, 3H).

[297]

[298] **제조예 3: 화학식 6의 활성형 캄프토테신 유도체(PBX-7016)의 합성 또는 화학식 7의 활성형 캄프토테신 유도체(PBX-7017)의 합성**

[299] 본 실시예는 Exatecan-하이브리드 화합물(PBX-7011)로부터 시작하여 화합물 PBX-7016의 합성을 설명한다.

[300]



PBX-7011 PBX-7016

[301] 활성화된 D-락트산의 스톡 용액은 다음 절차에 따라 제조되었다.

[302] D-락트산(22 mg, 0.244 mmol)을 N,N-디메틸포름아미드 1mL에 용해시켰다. HOSu(27 mg, 0.235 mmol) 및 EDC(38.6 mg, 0.201 mmol)를 첨가하였다. 반응 혼합물을 실온에서 2시간 동안 교반하였다.

[303] 이어서, N,N-디메틸포름아미드(2.5ml) 중 (1S,10S)-1-아미노-10-에틸-10-히드록시-1,2,3,10,13,16-헥사히드로-11H,14H-벤조[de][1,3]디옥솔로[4,5-g]피라노[3',4':6,7]인돌리지노[1,2-b]퀴놀린-11,14-디온 (36 mg, 0.080 mmol) 및 트리에틸아민(0.022 ml, 0.161 mmol)의 용액에 0.3 mL의 활성화된 산 용액을 첨가 하였다. 혼합물을 실온에서 6시간 동안 교반하였다. 제조된 활성산 용액 0.05mL를 첨가하였다. 이어서, 반응 혼합물을 실온에서 밤새 교반하였다. 반응 혼합물을 산성 분취용 MPLC(Luna10-50)로 직접 정제하여 생성물 분획의 동결건조 후 밝은 황색 고체를 얻었다.

[304] 수율: 22mg, 52%

[305] U_AN_ACID: m/z 520.2 $[M+H]^+$

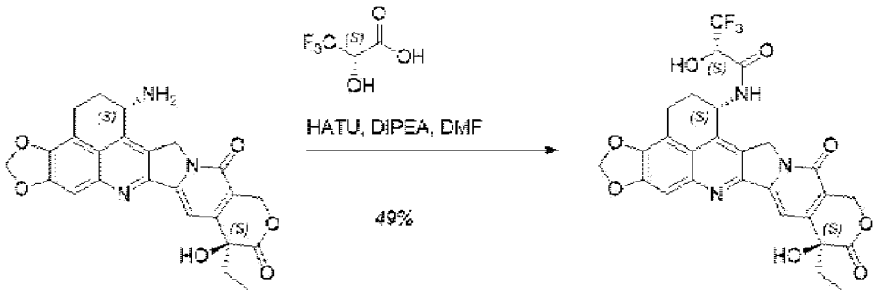
[306] 1H NMR (400 MHz, DMSO) δ 8.43 (d, J = 9.1 Hz, 1H), 7.41 (s, 1H), 7.23 (s, 1H), 6.50 (s, 1H), 6.29 (d, J = 2.1 Hz, 2H), 5.62 - 5.58 (m, 1H), 5.58 - 5.51 (m, 1H), 5.41 (s, 2H), 5.21 - 5.01 (m, 2H), 4.17 - 4.07 (m, 1H), 3.14 - 2.95 (m, 2H), 2.19 - 2.04 (m, 2H), 1.92 - 1.78 (m, 2H), 1.39 (d, J = 6.8 Hz, 3H), 0.87 (t, J = 7.3 Hz, 3H).

[307] 전술한 바와 같이, 화학식 6의 PBX-7016는 화학식 2의 PBX-7011로부터 합성가능하므로, 동일한 방법으로 화학식 7의 PBX-7017은 화학식 3의 PBX-7012로부터 합성가능하다.

[308]

[309] **제조예 4: 화학식 8의 활성형 캄프토테신 유도체(PBX-7018)의 합성**

[310]



PBX-7011 PBX-7018

[311] (S)-3,3,3-트리플루오로-2-하이드록시프로파노산(11.59 mg, 0.080 mmol)을 N,N-디메틸포름아미드(2 ml))에 용해하고 HATU(Hexafluorophosphate Azabenzotriazole Tetramethyl Uronium)(30.6 mg, 0.080 mmol)를 첨가하였다.

[312] 혼합물을 3분 동안 교반한 후 PBX-7011라 명명된 (1S,10S)-1-아미노-10-에틸-10-하이드록시-1,2,3,10,13,16-헥사 하이드로-11H,14H-벤조[de][1,3]디 옥솔로[4,5-g]피라노[3',4':6,7]인돌리지노[1,2-b]퀴놀린-11,14-디온 (30 mg, 0.067 mmol) 및 DIPEA(N,N-Diisopropylethylamine) (0.047 ml, 0.268 mmol)를 첨가하고 반응 혼합물을 실온에서 1.5시간 동안 교반하였다. 반응 혼합물을 산성 preparative MPLC(Luna10-50)로 직접 정제하고 생성물 분획물을 동결 건조하여 회백색 고체로 생성물을 얻었다. (수율: 19 mg, 49%)

[313] 상기 PBX-7011은 PCT/KR2023/009854호 등에 기재된 방법에 의해 수득될 수 있지만 이에 한정되는 것은 아니다.

[314]

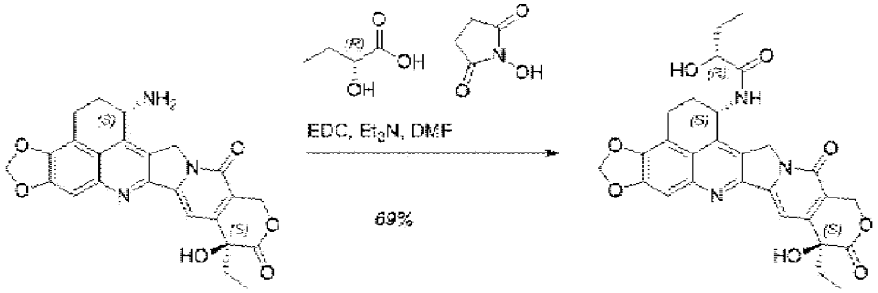
[315] U_AN_ACID: m/z 574.2 $[M+H]^+$

[316] ^{1}H NMR (400 MHz, DMSO-d6) δ 8.95 (d, *J* = 8.6 Hz, 1H), 7.42 (s, 1H), 7.24 (s, 1H), 7.18 (d, *J* = 6.2 Hz, 1H), 6.48 (s, 1H), 6.29 (d, *J* = 7.1 Hz, 2H), 5.61 - 5.52 (m, 1H), 5.46 - 5.35 (m, 2H), 5.21 (d, *J* = 19.2 Hz, 1H), 5.06 (d, *J* = 19.2 Hz, 1H), 4.66 - 4.55 (m, 1H), 3.08 - 2.97 (m, 2H), 2.18 - 2.03 (m, 2H), 1.93 - 1.77 (m, 2H), 0.87 (t, *J* = 7.3 Hz, 3H).

[317]

[318] **제조예 5: 화학식 9의 활성형 캄프토테신 유도체(PBX-7020)의 합성**

[319]



PBX-7011 PBX-7020

[320] (R)-2-하이드록시부티르산(20.9 mg, 0.201 mmol)을 1mL DMF에 용해시켰다. HOSu(23.1 mg, 0.201 mmol) 및 EDC(38.6 mg, 0.201 mmol)를 첨가하고 반응 혼합물을 실온에서 2시간 동안 교반하였다.

[321] 그런 다음 0.3 mL의 활성산 용액을 PBX-7011 (30 mg, 0. 067 mmol) 및 트리 에틸 아민 (0.019 ml, 0.134 mmol)을 N,N- 디메틸 포름 아미드 (2 ml)에 용해시킨 현탁액에 첨가하였다. 혼합물을 실온에서 23 시간 동안 교반 하였다. 반응 혼합물은 생성물 분획의 동결 건조 후 회백색 고체를 제공하는 산성 preparative MPLC (Luna10-50)에 의해 직접 정제하였다. (수율: 25 mg, 69%)

[322]

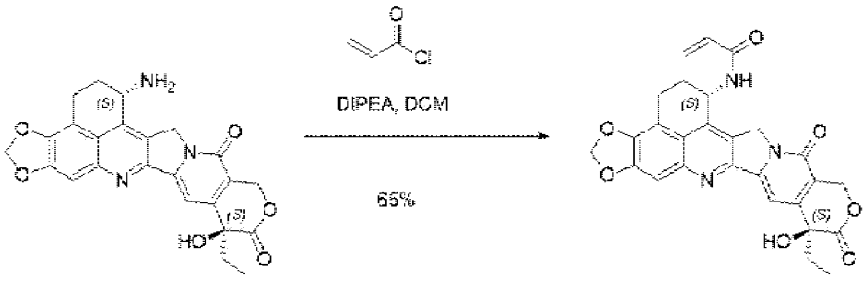
[323] U_AN_ACID: m/z 534.2 $[M+H]^+$

[324] ^{1}H NMR (400 MHz, DMSO) δ 8.39 (d, J = 8.9 Hz, 1H), 7.41 (s, 1H), 7.23 (s, 1H), 6.48 (s, 1H), 6.29 (d, J = 3.6 Hz, 2H), 5.57 - 5.50 (m, 1H), 5.48 - 5.44 (m, 1H), 5.41 (s, 2H), 5.13 (s, 2H), 3.92 - 3.86 (m, 1H), 3.06 - 3.00 (m, 2H), 2.15 - 2.05 (m, 2H), 1.92 - 1.74 (m, 3H), 1.71 - 1.62 (m, 1H), 0.93 (t, J = 7.4 Hz, 3H), 0.87 (t, J = 7.3 Hz, 3H).

[325]

[326] **제조예 6: 화학식 10의 활성형 캄프토테신 유도체(PBX-7022)의 합성**

[327]



PBX-7011 PBX-7022

[328] 디클로로메탄(건조)(1 mL)에 PBX-7011 (30 mg, 0. 067 mmol) 및 DIPEA(0.047 mL, 0.268 mmol)을 넣은 현탁액을 0 ℃로 냉각하였다. 0.1 mL의 DCM에 아크릴로일 클로라이드 용액(5.44 μl, 0.067 mmol)을 한 방울씩 첨가하였다. 반응 혼합물을 0°C에서 교반하고 30분 후, 0.15 당량의 염화 아크릴로이드를 DCM의 스톡 용액으로 첨가하였다. 총 2시간 동안 교반한 후, 반응 혼합물을 감압 농축하였다.

잔류물을 DMSO에 용해하고 산성 preparative MPLC(Reprosil10-50 방법)를 통해 정제하였다. 생성물 분획물을 수집하고 동결 건조하여 담황색의 폭신한 고체를 얻었다. (수율: 22mg, 65%)

[329]

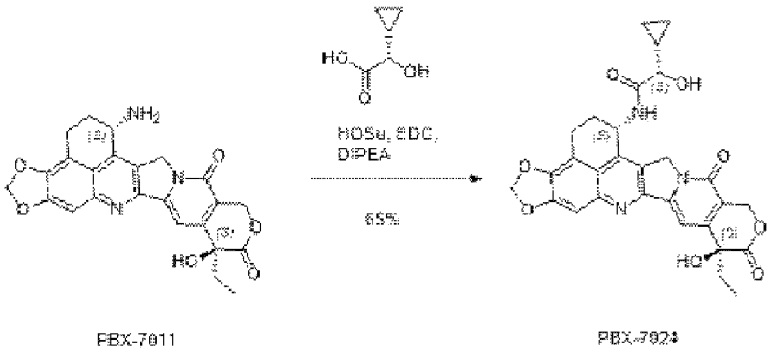
[330] U_AN_ACID: m/z 502.2 $[M+H]^+$

[331] ^{1}H NMR (400 MHz, DMSO-d6) δ 8.71 (d, *J* = 8.8 Hz, 1H), 7.43 (s, 1H), 7.23 (s, 1H), 6.49 (s, 1H), 6.30 (d, *J* = 4.2 Hz, 2H), 6.28 - 6.21 (m, 2H), 5.69 (dd, *J* = 8.5, 3.7 Hz, 1H), 5.65 - 5.58 (m, 1H), 5.40 (s, 2H), 5.25 - 5.12 (m, 1H), 5.12 - 4.99 (m, 1H), 3.10 - 3.02 (m, 2H), 2.16 - 2.06 (m, 2H), 1.92 - 1.78 (m, 2H), 0.86 (t, *J* = 7.3 Hz, 3H).

[332]

[333] **제조예 7: 화학식 11의 활성형 캄프토테신 유도체(PBX-7024)의 합성**

[334]



[335]

[336] PBX-7011 화합물에 (2S)-2-시클로프로필-2-하이드록시아세트산을 결합시켜 PBX-7024를 높은 수율로 제조하였다.

[337] (2S)-2-시클로프로필-2-하이드록시아세트산 (26 mg, 0.244 mmol)을 N,N-디메틸포름아미드 1 mL에 용해시켰다. HOSu(26 mg, 0.226 mmol) 및 EDC(42 mg, 0.219 mmol)를 첨가하였다. 반응 혼합물을 실온에서 2시간 동안 교반하였다. 이어서, N,N-디메틸포름아미드(2.5 ml) 중 (1S,10S)-1-아미노-10-에틸-10-히드록시-1,2,3,10,13,16-헥사히드로-11H,14H-벤조[de][1,3]디옥솔로[4,5-g]피라노[3',4':6,7]인돌리지노[1,2-b]퀴놀린-11,14-디온 (40 mg, 0.089 mmol) 및 DIPEA(0.047 ml, 0.268 mmol)의 용액에 0.6 mL의 활성화된 산 용액을 첨가하였다. 혼합물을 실온에서 밤새 교반하였다. 반응 혼합물을 산성 분취용 MPLC(Luna10-50)로 직접 정제하여 생성물 분획의 동결건조 후 밝은 흰색 고체를 얻었다.

[338] 수율: 32 mg, 65%

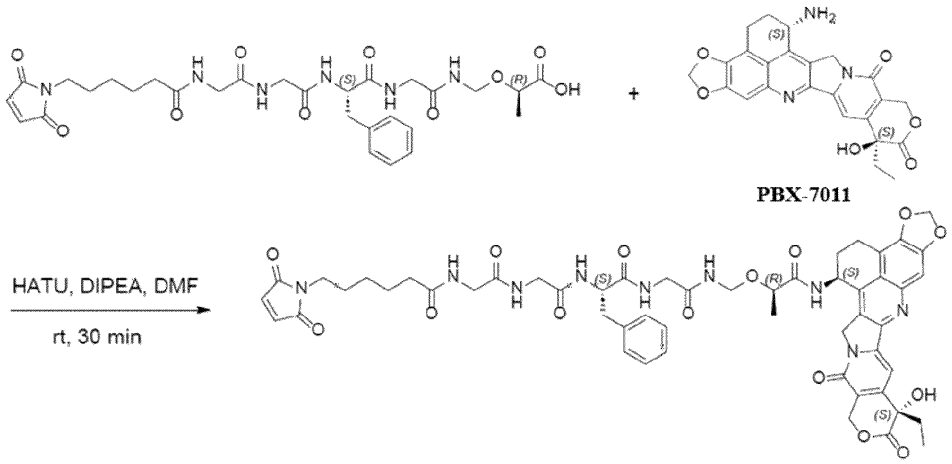
[339] U_AN_ACID: m/z 520.2 $[M+H]^+$

[340] 1H NMR (400 MHz, DMSO-d6) δ 8.33 (d, J = 8.7 Hz, 1H), 7.39 (s, 1H), 7.23 (s, 1H), 6.48 (s, 1H), 6.28 (d, J = 4.9 Hz, 2H), 5.50 (q, J = 6.7 Hz, 1H), 5.40 (s, 3H), 5.23 - 5.06 (m, 2H), 3.62 (d, J = 6.3 Hz, 1H), 3.03 (q, J = 6.2 Hz, 2H), 2.21 - 2.02 (m, 2H), 1.92 - 1.79 (m, 2H), 1.18 - 1.08 (m, 1H), 0.87 (t, J = 7.3 Hz, 3H), 0.47 - 0.30 (m, 4H).

[341]

[342] **제조예 8: 링커-페이로드(mc-GGFG-PBX-7016) 화합물의 합성**

[343]



[344] PBX-7011 (410 mg, 754 umol)과 mc-ggfg구조를 가지는 (2R,10S)-10-벤질-23-(2,5-디옥소-2,5-디하이드로-1H-피롤-1-일)-2-메틸-6,9,12,15,18-펜타-옥소-3-옥사-5,8,11,14,17-펜타아자트리코사노익 산((2R,10S)-10-benzyl-23-(2,5-dioxo-2,5-dihydro-1H-pyrrol-1-yl)-2-methyl-6,9,12,15,18-penta-oxo-3-oxa-5,8,11,14,17-pentaazatricosanoic acid)(466 mg, 739 umol)을 N,N-디메틸포름아미드 10 mL에 용해시켰다. DIPEA (439 mg, 3.39 mmol)과 HATU (430 mg, 1.13 mmol)을 이어서 용해시킨 후 상온에서 30분간 교반하였다. 이 후 혼합물은 산성 분취용 MPLC(Luna10-50) 정제를 3회 진행하였고, 동결 건조를 통해 mc-GGFG-PBX-7016 화합물을 밝은 노란색 고체로 수득하였다.

[345] 수율 : 510 mg, 63%

[346] U_AN_ACID: m/z 1060.02 $[M+H]^+$

[347] 1H NMR (400 MHz, DMSO-d6) δ 8.62 (t, J = 6.6 Hz, 1H), 8.50 (d, J = 9.1 Hz, 1H), 8.29 (t, J = 5.9 Hz, 1H), 8.13 - 7.96 (m, 3H), 7.39 (s, 1H), 7.27 - 7.12 (m, 6H), 6.99 (s, 2H), 6.48 (s, 1H), 6.26 (d, J = 6.0 Hz, 2H), 5.61 - 5.51 (m, 1H), 5.45 - 5.33 (m, 2H), 5.20 - 4.99 (m, 2H), 4.72 - 4.63 (m, 1H), 4.57 - 4.41 (m, 2H), 4.11 (q, J = 6.7 Hz, 1H), 3.78 - 3.53 (m, 6H), 3.40 - 3.34 (m, 2H), 3.16 - 2.95 (m, 3H), 2.74 (dd, J = 13.8, 9.5 Hz, 1H), 2.17 - 2.03 (m, 4H), 1.91 - 1.78 (m, 2H), 1.52 - 1.35 (m, 7H), 1.25 - 1.12 (m, 2H), 0.87 (t, J = 7.3 Hz, 3H).

[348]

[349] **실시예: 화학식 1의 화합물(PBX 페이로드)을 포함하는 항-Nectin-4 ADC**

[350] **항체-약물 접합체(ADC)의 제조**

[351] 상기 제조예에서 제조된 PBX 페이로드를 포함하는 항-Nectin-4 ADC를 제조하였다(표 1).

[352] [표1]

No.	페이로드	링커	항체
실시예 1	PBX-7011	mc-GGFG	항-Nectin-4 항체 (Enfortumab)
실시예 2	PBX-7014		
실시예 3	PBX-7016		
실시예 4	PBX-7018		
실시예 5	PBX-7020		
실시예 6	PBX-7022		
실시예 7	PBX-7024		

[353] PBX 페이로드를 포함하고 enzymatically cleavable linker system인 GGFG를 도입한 링커-페이로드를 합성하였다. 구체적으로, 상기 링커-페이로드의 분자구조는 mc-GGFG-PBX페이로드를 가지며, 링커는 화학식 13의 구조를 갖는 것을 사용하였다. 상기 링커를 페이로드와 반응시켜 먼저 링커-페이로드 접합체를 생성하였다. 예를 들어, 실시예 3에 포함되는 링커-페이로드는 상기 제조예 8에 기재된 방법으로 합성하였다.나아가, 항-Nectin-4 항체로서, Enfortumab(Abinvivo)와 컨주게이션하여 ADC를 합성하였다. 상기 ADC는 다음과 같은 방법으로 제조하였다. 준비된 Enfortumab은 NAP-5 column(Cytiva), 또는 PD-10 desalting column(Cytiva)을 이용하여 Reaction buffer (150mM NaCl, 50mM Histidine pH 6.0)로 buffer exchange 후 50 mM TCEP(Tris(2-carboxyethyl)phosphine hydrochloride)(Merck) 12~30 당량을 항체에 25℃ 2시간 처리하여 항체의 disulfide로부터 반응에 필요한 thiol 자리를 만들었다. 이후 NAP-5 column, 또는 PD-10 desalting column을 이용하여 여분의 TCEP을 제거하고 Reduction buffer (25 mM Histidine, pH 6.0)으로 교환하였다. 상기 제조된 5 mM 링커-페이로드 화합물 6~12 당량과 reduction 된 Enfortumab을 4℃에서 1시간 반응하여 컨주게이션 반응을 진행하였다. 그 결과, 항-Nectin-4 항체에 링커-페이로드 화합물이 결합된 ADC가 제조되었다.

[354] **항체-약물 접합체(ADC)의 평가**

[355] **실시예 3-1 및 3-2의 평가**

[356] 상기 실시예 3 제조 시, 50 mM TCEP 30 당량을 항체에 처리하고, 5 mM 링커-페이로드 화합물 12 당량을 반응시켜 실시예 3-1을 제조하였고, 50 mM TCEP 12 당량을 항체에 처리하고, 5 mM 링커-페이로드 화합물 6 당량을 반응시켜 실시예 3-2를 제조하였다. 사이즈 배제 크로마토그래피 (Size Exclusion Chromatography, SEC)를 이용하여 이의 ADC monomer 순도를 확인하였다(도 1 및 2).

[357] LC-MS를 통한 질량 (Da) - 면적의 분석으로 DAR을 평가하여 표 2 및 3에 나타내었다. 실시예 3-1 및 3-2의 SEC는 모두 >96%이었다.

[358] [표2]

실시예 3-1	**Mass (Da)**	**Area**	**비율**	**DAR**

경쇄 (Light Chain)	**D0**	23121.5	7487.1	2.5	1.0	**7.9**
	D1	24181.6	291042.2	97.5		
	D2	-	-	0.0		
중쇄 (Heavy Chain)	**D0**	50212.5	-	0.0	3.0	
	D1	51272.0	-	0.0		
	D2	52332.6	-	0.0		
	D3	53392.3	136375.7	100.0		

[359] [표3]

실시예 3-2		Mass (Da)	Area	Delta Mass	비율		DAR
경쇄 (Light Chain)	**D0**	23121.5	172 244.0	-	46.5	0.5	**4.1**
	D1	24181.6	198 459.0	1060.1	53.5		
	D2	-	-	-	0.0		
중쇄 (Heavy Chain)	**D0**	50212.5	67234.5		28.8	1.5	
	D1	51272.0	49782.6	1059.5	21.4		
	D2	52332.6	39155.3	1060.6	16.8		
	D3	53392.3	76930.6	1059.7	33.0		

[360]

[361] **비교예: Isotype ADC 및 페이로드가 다른 항-Nectin-4 ADC의 제조**

[362] PBX-7016을 페이로드로 하여 항-SARS-CoV-2 항체(P63) 또는 항-인플루엔자 A 항체(Navivumab, P23)이 각각 컨주게이션된 ADC를 상기 실시예에 기재된 방법으로 제조하였다. 또한, MMAE(Monomethyl auristatin E)를 페이로드로 하여 항-SARS-CoV-2 항체(P63) 또는 항-인플루엔자 A 항체(Navivumab, P23)이 각각 컨주게이션된 ADC를 상기 실시예에 기재된 방법으로 제조하였다. 마지막으로, MMAE를 페이로드로 하여 항-Nectin-4 항체(Enfortumab)가 컨쥬게이션 된 ADC를 상기 실시예에 기재된 방법으로 제조하였다.

[363] MMAE(Monomethyl auristatin E)는 MedChemExpress에서 구입하였고, Exatecan는 Medchemexpress에서 구입하였으며, PADCEV™은 Jupiter Research Service LLC에서 구입하여 사용하였다. PBX-7016을 페이로드로 하는 ADC는 링커로 mc-GGFG를 사용하여 링커-페이로드(mc-GGFG-PBX-7016) 형태로 사용하였다.

[364] 상기 각 ADC에 대한 SEC 및 DAR 값은 하기 표 4에 기재된 바와 같다.

[365] [표4]

	ADC	SEC	DAR
1	PADCEV (Enfortumab-MMAE)	-	4
2	P63-PBX-7016(DAR8)	>96%	8
3	P63-PBX-7016(DAR4)	>96%	4
4	P63-MMAE	>96%	3.7
5	P23-PBX-7016(DAR8)	>96%	8
6	P23-PBX-7016(DAR4)	>96%	4
7	P23-MMAE	>96%	4

[366]

[367] **실험예 1: PBX 페이로드 항-Nectin-4 ADC의 cell viability assay**

[368] **실험예 1-1. Nectin-4 발현 세포주 선별**

[369] 유세포분석기를 이용하여 Nectin-4를 발현하는 세포주를 선별하였다. 사용한 세포주는 PC-3(전립선암 세포주), SUM190PT(유방암 세포주) 및 H322M(폐암 세포주), T47D(유방암 세포주) 및 Nectin4 HEK(N4-HEK, 과발현 세포주)이다.

[370] 구체적으로, PC-3(전립선암 세포주) 및 SUM190PT(유방암 세포주)에서 시판용 단일클론 항체(AF488-mAb, FAB2659G)를 이용하여 항체 결합력 및 유세포 분석을 시행하였고(도 3 참조), SUM190PT(유방암 세포주)에서 Enfortumab & FITC-anti human IgG Fc (410720) 및 PADCEV™ & FITC-anti human IgG Fc (410720)을 이용하여 항체 결합력 및 유세포분석을 시행하였다(도 4 참조). 그 결과, Enfortumab 및 PADCEV™의 Nectin-4 결합력이 동등한 수준임을 확인하였다.

[371] 한편, PC-3(전립선암 세포주) 및 H322M(폐암 세포주)에서 시판용 단일클론 항체(AF488-mAb, FAB2659G)를 이용하여 항체 결합력 및 유세포 분석을 시행하였고(도 5 참조), H322M(폐암 세포주) 및 T47D(유방암 세포주)에서 Enfortumab & FITC-anti human IgG Fc (410720)를 이용하여 항체 결합력 및 유세포분석을 시행하였다(도 6 참조). 과발현 세포주 Nectin4 HEK에서 AF488-mAb (FAB2659G) 및 Enfortumab & FITC-anti human IgG Fc (410720)를 이용하여 유세포 분석을 시행하였다(도 7 참조).

[372] SUM190PT(유방암 세포주)에서 가장 높은 수준의 Nectin-4 발현이 관찰되었고, H322M(폐암 세포주)에서는 중간 수준의 Nectin-4 발현이 관찰되었으며, PC-3(전립선암 세포주)에서 가장 낮은 수준의 Nectin-4 발현이 관찰되었으며, 각 세포주에서의 staining index 밀 발현 수준은 하기 표 5에 기재된 바와 같다.

[373] [표5]

세포주	조직 (암종)	**Staining Index**	**Expression Level**	**Class**

PC-3	전립선 (Prostate)	1	-	Negative
SUM190PT	유방 (Breast)	418	+++	High
N4-HEK	overexpressed	399	+++	High
T47D	유방 (Breast)	28	++	Mid
H322M	폐 (Lung)	11	+	Mid-Low

[374]

[375] **실험예 1-2. Cell viability assay**

[376] 상기 실시예 3과 비교예의 표 4에 기재된 ADC 및 PBX-7016 페이로드 화합물, Exatecan 페이로드 화합물 및 MMAE 페이로드 화합물을 이용하여 실험예 1-1에서 선별한 세포주에 대한 in-vitro cell viability assay를 수행하였다. Exatecan 및 MMAE는 Medchemexpress에서 구입하였다.

[377] 구체적으로, 96-well plate에 well당 상기 표 5에 기재된 세포주를 각각 파종(seeding)하고 항온배양(37℃ 5% CO_2)하였으며, 24시간 후, 9개 농도(1000nM부터 1/4씩 serial dilution)의 페이로드 화합물 또는 ADC 약물100ul를 세포에 처리하였다. 이 때, 아무런 처리하지 않은 대조군(약물 농도 0)도 준비하였다. 이후 6일 동안 항온배양(37℃ 5% CO_2) 시킨 후, well에 CellTiter-Glo reagent(CellTiter-Glo® Luminescent Cell Viability Assay kit (Promega, G7571)를 사용)를 100ul씩 추가한 후 파이펫팅해 주었다. 10분동안 항온배양 (RT)후 형광을 측정하였다. 약물농도가 0일 때의 형광 값을 100%로 볼 때, 50%의 형광 값을 나타내는 농도를 IC_{50}값으로 측정하였다.

[378] 그 결과, Enfortumab-PBX-7016의 ADC가 우수한 세포 억제능을 가지고 있음을 확인하였다. 각 ADC에 대한 구체적인 IC_{50} 값(단위: nM)은 하기 표 6에 나타난 바와 같다(도 8 내지 11 참조).

[379] [표6]

	발현양	PBX-7016	MMAE	Exatecan	PADCEV	Enf-PBX-7016 (DAR 7.9)	Enf-PBX-7016 (DAR 4.1)	P63-PBX-7016(DAR 8)	P63-PBX-7016(DAR 4)
PC-3 (Negative)	-	3.51	0.42	0.62	268.6	280.8	-	116.6	601.8
SUM190PT	+++	9.4	0.07	2.3	0.016	123.69	-	257.64	-

N4-HEK	+++	1.359	-	-	0.026	0.003	0.005	5.538	0.198
T47D	++	0.47	-	-	0.265	0.27	8.32	36.87	97.5
H322M	+(+)	1.7	0.196	0.188	96.8	135.9	-	-	224.4

[380]

[381] 구체적으로, SUM190PT(유방암 세포주), H322M(폐암 세포주)에서 Enfortumab-PBX-7016 ADC가 Isotype ADC (P63-PBX-7016) 대비 향상된 세포독성을 보였으며, 추가로 Padcev 대비 in vivo에서 효능을 확인하고자 하였다.

[382] 한편, Nectin-4가 과발현하는 T47D, N4-HEK 세포주에서는 Isotype ADC 대비 향상된 세포독성과 Padcev에 필적하는 수준의 세포독성이 관찰되었다.

[383] 이로써, 화학식 1의 캄프토테신 유도체 화합물을 페이로드로 하며 Nectin-4에 대해 특이적인 본원발명의 Enfortumab-PBX-7016 ADC는 Nectin-4가 발현되는 세포에 대해 우수한 억제효과를 나타내어 암 치료 또는 예방용도로 사용될 수 있음을 알 수 있다.

[384]

[385] **실험예 2. Enfortumab-PBX-7016 ADC 및 Enfortumab mAb 의 Nectin-4에 대한 결합 친화성 및 특이성**

[386] Enfortumab mAb는 본원발명에 따른 Enfortumab-PBX-7016 ADC를 제조하는데 사용된 항-Nectin-4 mAb이며, 이의 중쇄 및 경쇄 서열은 서열번호 9 및 10에 기재된 서열을 사용하였다.

[387] 먼저, Enfortumab mAb의 재조합 인간 및 ortholog (마우스(mouse), 래트(rat), 사이노몰거스 원숭이(cynomolgus) 및 인간(human)) Nectin-4 단백질에 대한 결합 활성을 효소 결합 면역 흡착 분석(ELISA)으로 평가한 결과, Enfortumab mAb는 재조합 마우스, 래트, 사이노몰거스 원숭이 및 인간 Nectin-4에 특이적으로 결합하며, 마우스 Nectin-4 단백질에는 최소한으로 결합하는 것이 확인되었다(도 12).

[388] 다음으로, ELISA 분석을 수행하여 Enfortumab-PBX-7016 ADC 및 Enfortumab mAb가 재조합 마우스, 래트, 사이노몰거스 원숭이 및 인간 Nectin-4에 결합하는 것을 비교한 결과, Enfortumab-PBX-7016 ADC 및 Enfortumab mAb가 래트, 사이노몰거스 원숭이 및 인간 Nectin-4에 대해 유사한 EC_{50} 값을 보이며, 마우스 Nectin-4에 대한 결합이 최소임을 보였다(도 13 및 표 7).

[389] [표7]

	Enfortumab mAb EC_{50} (ng/mL)	Enfortumab-PBX-7016 EC_{50} (ng/mL)
마우스 (Mouse)	N.C*	N.C*
래트 (Rat)	9.63	9.88

사이노멀거스 원숭이 (Cynomolgus monkey)	8.43	7.94
인간 (Human)	8.38	8.31

[390] *N.C : not calculated

[391] 표 7에서 보듯이, 시험관 내에서 Enfortumab-PBX-7016 ADC 및 Enfortumab mAb는 농도 의존적 방식으로 재조합 인간 Nectin-4 단백질에 결합했으며, 각각 8.31 ng/mL 및 8.38 ng/mL의 유사한 EC_{50} 값을 나타내었다. Enfortumab mAb의 결합 특성은 링커 페이로드 중간체, 즉, mc-GGFG 링커 및 PBX-7016이 결합된 구조의 화합물에 대한 접합에 의해 변경되지 않았다.

[392] Enfortumab mAb 및 Enfortumab-PBX-7016 ADC의 Nectin-4 단백질(래트, 원숭이 또는 인간)에 대한 결합 친화도를 평가하기 위해 Biolayer 간섭계(BLI) 분석법으로 측정하였고, Enfortumab-PBX-7016 ADC 및 Enfortumab mAb의 래트, 원숭이 및 인간 Nectin-4에 대한 결합 친화도 상수(KD)를 표 8에 기재하였다. Enfortumab-PBX-7016 및 Enfortumab mAb 사이에서 유의미한 차이를 보이지 않았으며 KD 값은 나노몰(10^{-9}M)로 추정된 동일한 범위에 있음을 확인하였다.

[393] [표8]

단백질 유래	**로딩 샘플**	**Response**	**KD (nM)**	**kon(1/Ms)**	**kdis(1/s)**	**Full R^2**
래트 (Rat)	Enfortumab mAb	0.6057	3.96	3.76.E+05	1.49.E-03	0.9749
	Enfortumab-PBX-7016	0.5113	3.20	4.45.E+05	1.42.E-03	0.9457
사이노멀거스 원숭이 (Cynomolgus monkey)	Enfortumab mAb	0.6697	6.05	3.16.E+05	1.91.E-03	0.9835
	Enfortumab-PBX-7016	0.6433	1.78	3.72.E+05	6.61.E-04	0.9458
인간 (Human)	Enfortumab mAb	0.6811	5.02	2.71.E+05	1.36.E-03	0.9871
	Enfortumab-PBX-7016	0.6206	2.89	3.03.E+05	8.75.E-04	0.9796

[394]

[395] 한편, Enfortumab-PBX-7016 ADC 및 Enfortumab mAb가 Nectin 세포 접착 분자 패밀리인 Nectin-1 내지 Nectin-4에 대해 특이적으로 결합하는지 확인하였다. ELISA 분석 결과 Enfortumab-PBX-7016 및 Enfortumab mAb는 재조합 인간 Nectin-1,

Nectin-2 또는 Nectin-3에 결합하지 않았고, 재조합 인간 Nectin-4 단백질에 특이적으로 결합함을 확인하였다(도 14).

[396]

[397] **실험예 3: *in vivo* 항종양 효능 평가 (1)**

[398] **실험예 3-1.T47D 인간 유방암 이종이식 모델에서의 항암 효과 확인**

[399] **실험 설계**

[400] BALB/c 누드 계통 마우스의 세포주 T47D 인간 유방암 이식 모델을 이용한 항종양 효능을 평가하기 위해 다음과 같이 실험을 설계하였다(표 9). 체중이 17 내지 22g인 6 내지 8주의 암컷 마우스 140 마리를 준비하였다.

[401] [표9]

그룹	마우스 개체수 (N)	치료	투여량 (mg/kg)	투여부피 (mL/kg)	투여경로	스케쥴
G1	10	Isotype m Ab(P63)	5	5	*i.v.*	D0, D5, D13
G2	10	Palbociclib	50	10	*p.o.*	QD x 4 weeks
G3	10	Isotype-MMAE	2.5	5	*i.v.*	D0, D5, D13
G4	10	Isotype-MMAE	5	5	*i.v.*	D0, D5, D13
G5	10	Isotype-PBX-7016 (DAR4)	2.5	5	*i.v.*	D0, D5, D13
G6	10	Isotype-PBX-7016 (DAR4)	5	5	*i.v.*	D0, D5, D13
G7	10	Isotype-PBX-7016 (DAR8)	2.5	5	*i.v.*	D0, D5, D13
G8	10	Isotype-PBX-7016 (DAR8)	5	5	*i.v.*	D0, D5, D13
G9	10	Padcev	2.5	5	*i.v.*	D0, D5, D13
G10	10	Padcev	5	5	*i.v.*	D0, D5, D13
G11	10	Enfortumab-PBX-7016	2.5	5	*i.v.*	D0, D5, D13

		(DAR4)				
G12	10	Enfortumab-PBX-7016 (DAR4)	5	5	*i.v.*	D0, D5, D13
G13	10	Enfortumab-PBX-7016(DAR8)	2.5	5	*i.v.*	D0, D5, D13
G14	10	Enfortumab-PBX-7016(DAR8)	5	5	*i.v.*	D0, D5, D13

[402]

[403] 구체적으로, 상기 표 9에서 Isotype mAb은 SARS-CoV-2 mAb(P63)이고, Isotype-MMAE는 Isotype mAb(P63) 및 MMAE가 mc-vc-PAB 링커로 연결된 ADC이고, Isotype-PBX-7016는 Isotype mAb(P63) 및 PBX-7016이 mc-GGFG 링커로 연결된 ADC이다. 한편, 본원발명에 따른 Enfortumab-PBX-7016 ADC는 항-Nectin4 mAb 및 PBX-7016가 mc-GGFG 링커로 연결된 구조를 갖는다. Padcev™는 항-Nectin4 mAb 및 MMAE가 mc-vc-PAB 링커로 연결된 ADC이다. Palbociclib은 MedChem Express에서 구입하여 사용하였다.

[404] 사용된 항-Nectin4 mAb의 중쇄 및 경쇄 서열은 서열번호 9 및 10에 기재된 서열이고, Isotype mAb (SARS-CoV-2 mAb(P63))의 중쇄 및 경쇄 서열은 서열번호 11 및 12에 기재된 서열이다.

[405]

[406] **세포 배양**

[407] xxT47D 세포주는 T47D에서 유래하며, xxT47D 종양 세포를 37℃, 공기 중 5% CO_2 하에서 10% 태아우시혈청 및 1% 항생제-항진균제를 보충한 RPMI 1640 배지에서 시험관 내에서 유지하였다. 종양 세포를 트립신-EDTA 처리로 주 2회 정기적으로 계대 배양하였고, 지수 성장 단계에서 성장하는 세포를 수확하여 종양 접종을 위해 계수하였다.

[408]

[409] **종양 접종 및 시험 물질 투여**

[410] 각 마우스의 오른쪽 측면에 0.2mL의 PBS 및 Matrigel(1:1 혼합)로 xxT47D 종양 세포(10×10^6 세포/마우스)를 피하 접종하였고, 세포 이식 3일전에 17베타-에스트라디올 정제(0.36mg, 60일 방출)를 피하 주사로 이식하였다. 동물은 무작위로 배정한 다음, 평균 종양 부피가 188mm^3에 도달했을 때 치료를 시작하였다.

[411] 상기 표 9에 표시된 요법에 따라 마우스에 시험 물질을 투여하였다.

[412]

[413] 정기 모니터링 시 동물의 이동성, 음식 및 물 소비, 체중 증가/감소(체중은 주 2회 측정), 눈/털 뭉침 및 기타 비정상적인 효과와 같은 정상적인 행동에 대한 종양 성장 및 치료의 영향을 확인하였다. 사망 및 관찰된 임상 징후는 각 하위 집합 내 동물 수를 기준으로 기록하였고, 또한 마우스를 모니터링하여 에스트로겐 독성 징후를 확인하였다. 펠릿 이식 후 처음 1~2주 동안 주 2회 방광 촉진을 확인하여 방광이 비대해지는 시점을 모니터링하였고, 독성 징후가 나타나 1~2주 후 동물을 매일 모니터링하였으며, 방광이 비대해지면 방광을 짜내 소변 배출을 유도하였다. 17베타-에스트라디올 정제를 이식한지 약 2주 후에 최종 농도 0.25mg/ml로 음용수에 엔로플록사신을 첨가하였다.

[414]

[415] **종양 측정 및 통계 분석**

[416] 주요 목표는 종양 성장을 지연시키거나 마우스를 치료할 수 있는지를 확인하는 것이었다. 종양 부피(Tumor volume)는 캘리퍼를 사용하여 주 2회 2차원으로 측정하였고, 부피(mm^3)는 다음 공식을 사용하여 나타내었다:

[417] $V = 0.5\ a \times b^2$

[418] (a: 종양의 긴 직경, b: 종양의 짧은 직경)

[419] 종양 크기를 T/C(대조군 부피에 대한 종양 부피) 및 TGI(종양 성장 억제) 값을 계산하는 데 사용하였다. T/C 값(%)은 항종양 효과를 나타내며, T 및 C는 각각 주어진 날의 치료군 및 대조군의 평균 부피이고, T/C 값(%)은 같은 날 치료군의 종양 부피를 비히클 군의 종양 부피로 나누어 계산하였다. 각 군의 TGI는 다음 공식을 사용하여 계산하였다:

[420] $TGI(\%) = [1-(T_i-T_0)/(V_i-V_0)] \times 100\%$

[421] (T_i: 특정 날의 치료군의 평균 종양 부피, T_0: 치료 첫날의 치료군의 평균 종양 부피, V_i: T_i와 같은 날의 대조군의 평균 종양 부피, V_0: 치료 첫날의 대조군의 평균 종양 부피)

[422] 종양 중량은 연구 종료 시 측정하였다. T/C_{weight} 값(%)은 다음 공식을 사용하여 계산하였다:

[423] $T/C_{weight}(\%) = T_{weight}/C_{weight} \times 100\%$

[424] (T_{weight}: 치료군의 평균 종양 중량, C_{weight}: 비히클 대조군의 평균 종양 중량)

[425] 각 그룹의 종양 부피에 대한 각 시간 지점에서 평균 및 평균 오차(SEM 포함)를 확인하였다. 치료 시작 후 28일째에 얻은 데이터에 대해 그룹 간 종양 부피와 종양 중량 차이에 대한 통계 분석을 실시하였다. 그룹 간 종양 부피와 종양 중량을 비교하기 위해 일원 분산 분석을 수행했으며, 유의한 F -statistics (치료 분산 대 오차 분산의 비율)을 얻었고, 그룹 간 비교는 Games-Howell 검정을 사용하여 수행하였다. 모든 데이터는 SPSS 29.0을 사용하여 분석하였다($p < 0.05$는 통계적으로 유의한 것으로 간주함).

[426]

[427] 독성의 간접적 척도로 동물 체중을 정기적으로 모니터링하였고, 그룹별 체중 변화 (Body weight change %) 및 종양 성장 (Tumor volume, mm^3) 곡선을 도 15 및 16에 나타내었다.시간 경과에 따른 평균 종양 부피를 표 10에 나타내었고, 치료 시작 후 28일째의 종양 부피 측정을 기준으로 TGI를 계산하여 표 11에 나타내었다. 치료 시작 후 28일째의 종양 중량 측정을 기준으로 T/C_{weight}를 계산하여 표 12에 나타내었다.

[428] [표10]

그룹	종양 부피 (Tumor volume (mm^3)) [a]								
	0[b]	3	7	10	14	17	21	24	28
G1	188 ± 11	249 ± 15	309 ± 17	375 ± 25	487 ± 39	598 ± 52(n=9)	717 ± 63(n=9)	836 ± 79(n=9)	934 ± 105(n=8)
G2	188 ± 10	249 ± 17	290 ± 22	328 ± 23	342 ± 26	344 ± 29	360 ± 36	384 ± 42	407 ± 49
G3	188 ± 10	253 ± 16	312 ± 17	417 ± 29	524 ± 42	685 ± 76	845 ± 100	999 ± 129	1,192 ± 166(n=9)
G4	188 ± 11	244 ± 11	290 ± 18	339 ± 27	428 ± 44	502 ± 59	583 ± 70	679 ± 93	820 ± 100
G5	188 ± 10	230 ± 19	292 ± 30	356 ± 40	451 ± 53	538 ± 70	653 ± 84	786 ± 104	950 ± 108
G6	188 ± 11	242 ± 15	277 ± 23	334 ± 39	441 ± 63	496 ± 78	594 ± 101	686 ± 118	806 ± 123
G7	188 ± 11	244 ± 18	271 ± 22	322 ± 32	404 ± 42	468 ± 55	590 ± 76	702 ± 92	828 ± 119
G8	188 ± 10	247 ± 12	296 ± 24	337 ± 36	363 ± 42	393 ± 47	426 ± 55	468 ± 59	593 ± 83
G9	188 ± 9	231 ± 16	258 ± 21	260 ± 23	216 ± 37	218 ± 47	224 ± 50	266 ± 67	296 ± 75
G10	188 ± 10	226 ± 17	230 ± 35	201 ± 36	144 ± 27	120 ± 30	118 ± 30	112 ± 30	96 ± 25(n=9)
G11	188 ± 9	227 ± 11	201 ± 22	175 ± 36	152 ± 40	147 ± 36	152 ± 39	170 ± 51	207 ± 52(n=9)
G12	188 ± 11	228 ± 14	166 ± 11	121 ± 7	80 ± 8	58 ± 5	57 ± 8	67 ± 10	69 ± 12

G13	188 ± 11	238 ± 17	179 ± 18	152 ± 18	96 ± 22	76 ± 16	74 ± 16	75 ± 22	77 ± 18(n=9)
G14	188 ± 11	245 ± 16	148 ± 11	110 ± 8	61 ± 8	46 ± 7	38 ± 7 (n=9)	36 ± 7 (n=9)	34±6(n=9)

[429] a. 평균 ± SEM

[430] b. 치료 시작 후 일수

[431]

[432] [표11]

그룹	마우스 개체수 (N)	종양 부피 (Tumor Volume (mm^3))[a] on day 28	T/C[b] (%)	TGI[c] (%)	*p* value[d]
G1	8[e]	934 ± 105	--	--	--
G2	10	407 ± 49	43.63	70.93	0.033
G3	9[e]	1,192 ± 166	127.67	-32.51	0.978
G4	10	820 ± 100	87.81	16.26	1.000
G5	10	950 ± 108	101.78	-1.03	1.000
G6	10	806 ± 123	86.35	18.07	1.000
G7	10	828 ± 119	88.74	15.11	1.000
G8	10	593 ± 83	63.57	46.24	0.438
G9	10	296 ± 75	31.75	85.65	0.011
G10	9[e]	96 ± 25	10.31	111.74	0.002
G11	9[e]	207 ± 52	22.21	96.78	0.003
G12	10	69 ± 12	7.34	115.81	0.002
G13	9[e]	77 ± 18	8.24	114.80	0.002
G14	9[e]	34 ± 6	3.59	120.70	0.002

[433] a. 평균 ± SEM

[434] b. T/C (%) = T/C × 100% (T 및 C는 각각 치료군 및 대조군의 치료 후 28일차 평균 부피임)

[435] c. TGI (%) = $[1-(T_{28}-T_0)/(V_{28}-V_0)] \times 100\%$

[436] d. p 값은 종양 부피를 기준으로 계산됨

[437] e. 사망한 마우스의 데이터는 데이터 분석에서 제외함

[438]

[439] [표12]

그룹	마우스 개체수 (N)	종양 중량 (Tumor Weight (g))[a] on day 28	T/Cweight[b] (%)	*p* value[c]
G1	8	0.949 ± 0.117	--	--
G2	10	0.396 ± 0.047	41.79	0.049
G3	9	1.171 ± 0.165	123.41	0.995
G4	10	0.852 ± 0.107	89.85	1.000
G5	10	0.948 ± 0.092	99.93	1.000
G6	10	0.819 ± 0.108	86.39	1.000
G7	10	0.814 ± 0.125	85.78	1.000
G8	10	0.597 ± 0.085	62.94	0.511
G9	10	0.285 ± 0.07	30.09	0.016
G10	9	0.090 ± 0.024	9.45	0.004
G11	9	0.201 ± 0.046	21.20	0.007
G12	10	0.074 ± 0.015	7.84	0.004
G13	9	0.067 ± 0.015	7.08	0.003
G14	9	0.032 ± 0.004	3.33	0.003

[440] a. 평균 ± SEM

[441] b. $T/C_{weight}(\%) = T_{weight}/C_{weight} \times 100\%$

[442] c. p 값은 종양 중량을 기준으로 계산됨

[443]

[444] 테스트된 투여 요법의 모든 시험 물질은 xxT47D이 이식된 암컷 BALB/c 누드 마우스에서 안전한 것으로 확인되었다. 실험 중에 140마리 중 7마리가 죽어 이를 부검하였으나, 에스트로겐 정제의 부작용으로 인해 죽은 것으로 확인되었다. 한편, G6, G13 및 G14의 세 그룹에서 각각 한 마리의 마우스가 연구 기간 동안 체중이 10% 이상 또는 15% 미만 감소하였으나, 그 중 두 마리는 연구 종료 시 회복되었다.

[445] 표 10 내지 12에서 보듯이, G1의 평균 종양 크기는 치료 시작 후 28일째에 934 mm^3에 도달하였다. G1과 비교했을 때G11 (T/C = 22.21%, TGI = 96.78%, p = 0.003), G12 (T/C = 7.34%, TGI = 115.81%, p = 0.002), G13 (T/C = 8.24%, TGI = 114.80%, p = 0.002) 및 G14(T/C = 3.59%, TGI = 120.70%, p = 0.002)에서 각각 평균 종양 부피가 각각 207 mm^3, 69 mm^3, 77 mm^3 및 34 mm^3로 상당한 항종양 활성이 나타났다. G11 내지 G14 (Enfortumab-PBX-7016)에서 우수한 항종양 활성이 나타났고, 특히, G14에서 TGI 값이 가장 크게 나타나 항종양 효과가 매우 강력함을 확인

하였다. 종양 중량 결과는 종양 부피와 일치하였다. 따라서 본 발명의 항체-약물 접합체(ADC)가 우수한 종양 성장 억제 활성을 나타내는 것을 알 수 있다.

[446]

[447] **실험예 4: *in vivo* 항종양 효능 평가 (2)**

[448] **실험예 4-1.** 방광암 이종이식 모델에서의 항암 효과 확인

[449] **실험 설계**

[450] NOD/SCID 계통 암컷 마우스에서 HuPrime® 방광암 이종이식 모델(BL9200)을 이용한 항종양 효능을 평가하기 위해 다음과 같이 실험을 설계하였다(표 13). 6 내지 9주의 암컷 마우스 80 마리를 준비하였다.

[451] [표13]

그룹	마우스 개체 수 (N)	치료	투여량 (mg/kg)	투여액량(mg/ml)	투여부피(μL/g)	투여경로	투여주기 및 스케쥴
G1	10	Isotype mAb (P23)	10	2	5	i.v.	QW×3wks
G2	10	Isotype-PBX-7016 (DAR8)	10	2	5	i.v.	QW×3wks
G3	10	Padcev	5	1	5	i.v.	QW×3wks
G4	10	Padcev	10	2	5	i.v.	QW×3wks
G5	10	Enfortumab-PBX-7016 (DAR4)	5	1	5	i.v.	QW×3wks
G6	10	Enfortumab-PBX-7016 (DAR4)	10	2	5	i.v.	QW×3wks
G7	10	Enfortumab-PBX-7016 (DAR8)	5	1	5	i.v.	QW×3wks
G8	10	Enfortumab-PBX-7016 (DAR8)	10	2	5	i.v.	QW×3wks

[452] 구체적으로, 상기 표 13에서 Isotype mAb(P23)은 나비부맙(Navivumab)으로서 항-influenza A mAb이고, Isotype-PBX-7016은 Isotype mAb(P23) 및 PBX-7016이 mc-GGFG 링커로 연결된 ADC이다. 한편, 본원발명에 따른 Enfortumab-PBX-7016 ADC는 항-Nectin4 mAb 및 PBX-7016가 mc-GGFG 링커로 연결된 구조를 갖는다. Padcev™는 항-Nectin4 mAb가 및 MMAE가 mc-vc-PAB 링커로 연결된 ADC이다. 사용된 항-Nectin4 mAb의 중쇄 및 경쇄 서열은 서열번호 9 및 10에 기재된 서열이고, Isotype mAb(P23)의 중쇄 및 경쇄 서열은 서열번호 13 및 14에 기재된 서열이다.

[453]

[454] **종양 접종 및 시험 물질 투여**

[455] 각 마우스의 오른쪽 상부 측면에 인간 종양 이식 모델(BL9200) 종양 세포 조각(지름 2-3 mm)을 마우스의 오른쪽 상부 측면에 피하로 주입하여 종양을 유도하였다. 평균 종양 부피가 164mm^{3}에 도달했을 때 8개 그룹에 10마리의 마우스를 무작위로 배정하였고, 무작위 배정일을 day 0으로 표시하고 치료를 시작하였다. 상기 표 13에 표시된 요법에 따라 마우스에 시험 물질을 투여하였다.

[456]

[457] **종양 측정 및 통계 분석**

[458] 종양 세포 주입 후 매일 마우스의 상태를 관찰하여 사망 및 건강 이상 여부를 확인하였다. 일상적인 모니터링에서는 종양 성장, 이동성, 음식 및 물 섭취, 체중 증가/감소(무작위 배정 후 주2회 체중 측정), 눈 및 털 상태, 기타 이상에 미치는 영향을 관찰하였고, 사망 및 임상 징후는 개별 마우스에 대해 상세히 기록하였다. 모든 투여, 종양 및 체중 측정은 무균 환경(Laminar Flow Cabinet)에서 수행하였고, StudyDirectorTM 소프트웨어(버전 3.1.399.19)를 사용하여 체중 및 종양 부피를 기록하였다. 종양 부피는 캘리퍼를 사용하여 주 2회 2차원으로 측정하였고, 부피(mm^3)는 다음 공식을 사용하여 나타내었다:

[459] $V = 0.5\ a \times b^2$

[460] (a: 종양의 긴 직경, b: 종양의 짧은 직경)

[461] 종양 부피를 T/C(대조군 부피에 대한 종양 부피) 및 TGI(종양 성장 억제) 값을 계산하는 데 사용하였다. T/C 값(%)은 항종양 효과를 나타내며, T 및 C는 각각 주어진 날의 치료군 및 대조군의 평균 부피이고, T/C 값(%)은 같은 날 치료군의 종양 부피를 비히클 군의 종양 부피로 나누어 계산하였다. 각 군의 TGI는 다음 공식을 사용하여 계산하였다:

[462] $TGI(\%) = [1-(T_i-T_0)/(C_i-C_0)] \times 100\%$

[463] (T_i: 특정 날의 치료군의 평균 종양 부피, T_0: 치료 첫날의 치료군의 평균 종양 부피, C_i: T_i와 같은 날의 대조군의 평균 종양 부피, C_0: 치료 첫날의 대조군의 평균 종양 부피)

[464] 그룹 간 종양 부피 비교를 위해 먼저 Bartlett's 테스트로 분산의 동질성을 확인한 후, p값이 0.05 이상일 경우 ANOVA을, 그렇지 않을 경우 Kruskal-Wallis 테스트를 사용하였다. ANOVA 또는 Kruskal-Wallis 테스트에서 유의미한 차이가 있을 경우, Tukey's HSD, Dunnett's 또는 Conover의 비모수 테스트로 후속 쌍별 비교를 수행하였고, 또한 다중 비교 보정 없이 Welch's t-테스트 또는 Mann-Whitney U 테스트로 쌍별 비교를 실시하였다. 모든 통계 분석은 R 통계 소프트웨어(버전 3.3.1)를 사용하여 분석하였다($p < 0.05$는 통계적으로 유의한 것으로 간주함).

[465]

[466] 그룹별 체중 변화 (Body weight change, %) 및 종양 성장 (Tumor volume, mm^3) 곡선을 도 17 및 18에 나타내었고, 치료 마지막 투여일인 25일차의 종양 크기 데이터를 기준으로 TGI 및 T/C 값을 계산하여 표 14에 나타내었으며, 그룹 간 종양 성장 억제 다중 비교 결과를 표 15에 나타내었다.

[467] [표14]

그룹	치료	투여량 (mg/kg)	Day 25			
			종양 부피 (Tumor Volume) (mean ± SEM)	ΔT/ΔC (%)	TGI (%)	*P* Value
G1	Isotype mAb (P23)	10	1786.94 +/- 86.67(10)	-	-	-
G2	Isotype-PBX-7016 (DAR8)	10	606.35 +/- 115.13(7)	27.9	72.1	>0.05
G3	Padcev	5	27.26 +/- 2.75(10)	-8.4	108.4	<0.001
G4	Padcev	10	11.07 +/- 3.12(10)	-9.4	109.4	<0.001
G5	Enfortumab-PBX-7016 (DAR4)	5	95.26 +/- 21.57(10)	-4.2	104.2	<0.05
G6	Enfortumab-PBX-7016 (DAR4)	10	10.64 +/- 2.93(10)	-9.5	109.5	<0.001
G7	Enfortumab-PBX-7016 (DAR8)	5	15.03 +/- 4.49(10)	-9.2	109.2	<0.001
G8	Enfortumab-PBX-7016 (DAR8)	10	1.95 +/- 1.95(10)	-10.0	110.0	<0.001

[468] $\Delta T/\Delta C = (T_{25} - T_0)/(C_{25} - C_0) \times 100\%$.

[469]

[470] [표15]

In Vivo 데이터 통계 분석				
Hypothesis testing with *p*value adjustment for DeltaTV at Day 27				
	Test 유형	그룹	*p*value	significance.level
1	Bartlett's test	All groups	4.74E-26	***
2	Kruskal-Wallis test	All groups	2.28E-09	***

3	Conover's all-pairs test	G01 - G02	0.869	ns
4	Conover's all-pairs test	G01 - G03	8.14E-08	***
5	Conover's all-pairs test	G01 - G04	4.68E-11	***
6	Conover's all-pairs test	G01 - G05	0.019	*
7	Conover's all-pairs test	G01 - G06	6.2E-11	***
8	Conover's all-pairs test	G01 - G07	2.2E-10	***
9	Conover's all-pairs test	G01 - G08	0.00	***
10	Conover's all-pairs test	G02 - G03	0.000221	***
11	Conover's all-pairs test	G02 - G04	0.00000073	***
12	Conover's all-pairs test	G02 - G05	0.631	ns
13	Conover's all-pairs test	G02 - G06	0.0000 00832	***
14	Conover's all-pairs test	G02 - G07	0.00000182	***
15	Conover's all-pairs test	G02 - G08	1.76E-08	***
16	Conover's all-pairs test	G03 - G04	0.741	ns
17	Conover's all-pairs test	G03 - G05	0.0285	*
18	Conover's all-pairs test	G03 - G06	0.762	ns

19	Conover's all-pairs test	G03 - G07	0.87	ns
20	Conover's all-pairs test	G03 - G08	0.171	ns
21	Conover's all-pairs test	G04 - G05	0.000133	***
22	Conover's all-pairs test	G04 - G06	1.00	ns
23	Conover's all-pairs test	G04 - G07	1.00	ns
24	Conover's all-pairs test	G04 - G08	0.974	ns
25	Conover's all-pairs test	G05 - G06	0.000152	***
26	Conover's all-pairs test	G05 - G07	0.000332	***
27	Conover's all-pairs test	G05 - G08	0.00000283	***
28	Conover's all-pairs test	G06 - G07	1.00	ns
29	Conover's all-pairs test	G06 - G08	0.968	ns
30	Conover's all-pairs test	G07 - G08	0.916	ns

[471]

[472] 표 14에서 보듯이, G1과 비교했을 때, G2(Isotype-PBX-7016, 10mg/kg)를 제외한 모든 치료 그룹은 항종양 효과를 보다. G5 내지 G8에서 우수한 항종양 활성이 나타났고, 특히 G8에서 TGI 값이 가장 크게 나타나 항종양 효과가 매우 강력함을 확인하였다. 따라서 본 발명의 항체-약물 접합체(ADC)가 우수한 종양 성장 억제 활성을 나타내는 것을 알 수 있다.

[473]

[474] <u>서열목록</u>

[475] 본 발명에서 사용한 항체의 서열목록은 하기 표 16에 기재된 것과 같다.

[476] [표16]

서열번호	서열명칭	서열
1	Anti-Nectin 4 mAb CDR -H1	SYNMN
2	Anti-Nectin 4 mAb CDR -H2	YISSSSSTIYYADSVKG
3	Anti-Nectin 4 mAb CDR -H3	AYYYGMDV
4	Anti-Nectin 4 mAb CDR -L1	RASQGISGWLA
5	Anti-Nectin 4 mAb CDR -L2	AASTLQS
6	Anti-Nectin 4 mAb CDR -L3	QQANSFPPT
7	Anti-Nectin4 mAb heavy chain variable region	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYNMNW VRQAPGKGLEWVSYISSSSSTIYYADSVKGRFTISRDNA KNSLSLQMNSLRDEDTAVYYCARAYYYGMDVWG QGTTVTVSS
8	Anti-Nectin 4 mAb light chain variable region	DIQMTQSPSSVSASVGDRVTITCRASQGISGWLAWY QQKPGKAPKFLIYAASTLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTI SSLQPEDFATYYCQQANSFPPTFGGGTKVEIK
9	Anti-Nectin4 mAb heavy chain	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYNMNW VRQAPGKGLEWVSYISSSSSTIYYADSVKGRFTISRDNA KNSLSLQMNSLRDEDTAVYYCARAYYYGMDVWG QGTTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVK DYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLS SVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKS CDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPE

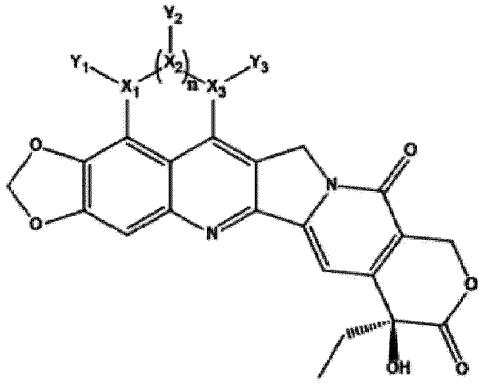
		VTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREE QYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPA PIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLV KGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFF LYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSL SLSPGK
10	Anti-Nectin 4 mAb light chain	DIQMTQSPSSVSASVGDRVTITCRASQGISGWLAWY QQKPGKAPKFLIYAASTLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTI SSLQPEDFATYYCQQANSFPPTFGGGTKVEIKRTVAAPS VFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKV DNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADY EKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
11	Isotype m Ab (P63) hea vy chain	EVQLVQSGGGLIQPGGSLRLSCAASEFIVSSNYMTW VRQAPGKGLEWVSIIYPGGSTYYADSVKGRFTISRD NSKNTLYLRMNSLRAEDTAVYYCARDLPLTGTTLDY WGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAAL GCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSG LYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEP KSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRT PEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPR EEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKAL PAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTC LVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGS FFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQK SLSLSPGK
12	Isotype m Ab (P63) lig ht chain	ELVLTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSISSYLNWYQQK PGKAPKLLIYAASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSL QPEDFATYYCQQSYSTPLTFGGGTKLEIKRTVAAPSVFI FPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNA LQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKH KVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
13	Isotype m Ab (P23) hea vy chain	MDWTWSILFLVAAATGAHSQVQLVQSGAEVKKPGAS VKVSCKTSGYSFSTYGVSWVRQAPGQGPEWVGWISA YTGITDYAQKFQGRVTLTTDATTATAFLDLRSLRPD DTATYFCARDKVQGRVEVGSGGRHDYWGQGTLVIVS SASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVT VSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSS

		SLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCP PCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDV SHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRV VSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISK AKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDI AVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVD KSRWQQGNVFSCSVMHEGLHNHYTQKSLSLSPGK*
14	Isotype m Ab (P23) light chain	METPAQLLFLLLLWLPDTTGEVVLTQSPGTLALPPG ERATLSCRASHRVGSTYIAWYQQKSGQAPRRLIYGA SNRATDIPDRFSGSGSGTDFTLTIRRLEPEDSAVYYCQQ FSVSPWTFGQGTRVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGT ASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTE QDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGL SSPVTKSFNRGEC

청구범위

[청구항 1] 하기 화학식 1에 따른 화합물 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염, 입체이성질체, 호변이성질체, 전구약물, 수화물, 용매화물 또는 동위원소 표지 유사체가 링커를 통해 항-Nectin-4 항체와 연결된 구조를 가지는, 항체-약물 접합체(Antibody-drug conjugate; ADC):

[화학식 1]



여기서,

X_1 및 X_3는 각각 독립적으로 탄소, 산소, 질소, 또는 황이고, X_1 및 X_3는 동일 또는 상이할 수 있으며,

X_2는 탄소, 산소, 질소, 황, 단일결합 또는 이중결합이고,

n은 0, 1 또는 2이며,

Y_1, Y_2 및 Y_3는 각각 독립적으로 수소이거나, 또는 산소, 질소, 인 또는 황을 포함하는 작용기이다.

[청구항 2] 제1항에 있어서,

X_1, X_2 및 X_3는 각각 독립적으로 탄소이고,

n은 1이며,

Y_1 및 Y_2는 각각 독립적으로 수소이고,

Y_3는 $-NZ_1Z_2$이며,

Z_1 및 Z_2는 각각 독립적으로 수소, 할로겐, 하이드록실, C_{1-3} 알킬, C(=O)H, C(=O)(C_{1-3} 알킬), C(=O)(C_{2-3} 알케닐), $C(=O)NH_2$, C(=O)NH(C_{1-3} 알킬), $(CH_2)_{2-4}OH$, $(CH_2)_{2-4}O(C_{1-3}$ 알킬), $(CH_2)_{2-4}NH_2$, $(CH_2)_{2-4}NH(C_{1-3}$ 알킬), $(CH_2)_{2-4}N(C_{1-3}$ 알킬)$_2$ 또는 $C(=O)CR^1R^2R^3$로 구성된 군으로부터 선택되는 작용기를 포함하고,

이 때 R^1, R^2 및 R^3는 각각 독립적으로 수소, 하이드록실, C_{1-3} 알킬, C_{3-7} 사이클로알킬 또는 C_{1-3} 할로알킬인, 항체-약물 접합체.

[청구항 3] 제1항에 있어서,

X_1, X_2 및 X_3는 각각 독립적으로 탄소이고,

n은 1이며,

Y_1 및 Y_2는 각각 독립적으로 수소이고,

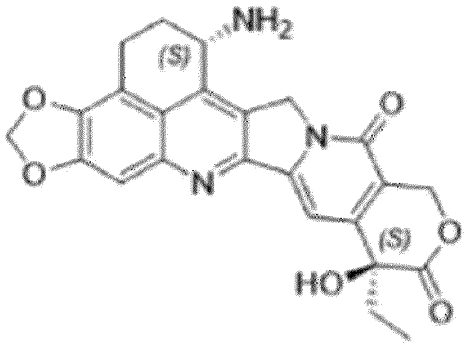
Y_3는 $-NZ_1Z_2$이며,

Z_1은 수소이고, Z_2는 $C(=O)(C_{2-3}$ 알케닐) 또는 $C(=O)CR^1R^2R^3$ 일 수 있고, 이 때 R^1, R^2 및 R^3는 각각 독립적으로 수소, 하이드록실, C_{1-3} 알킬, C_{3-7} 사이클로알킬 또는 C_{1-3} 할로알킬인, 항체-약물 접합체.

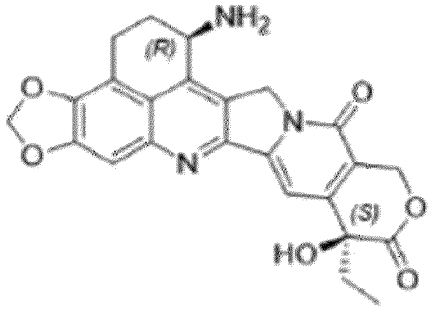
[청구항 4] 제1항에 있어서,

상기 화학식 1의 화합물은 하기 화학식 2 내지 11 중 어느 하나로 표시되는, 항체-약물 접합체:

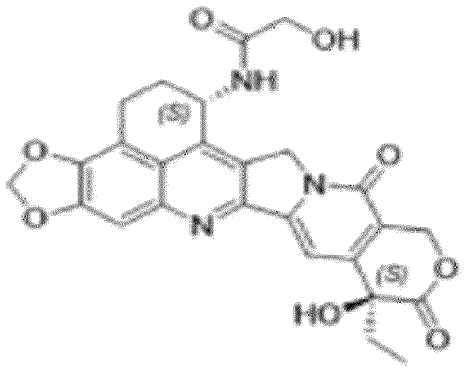
[화학식 2]



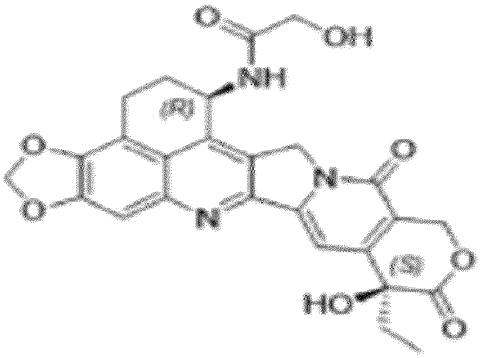
[화학식 3]



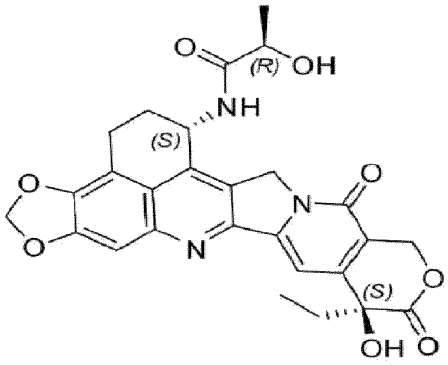
[화학식 4]



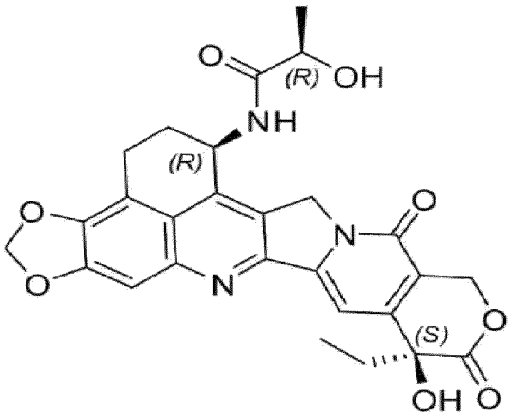
[화학식 5]



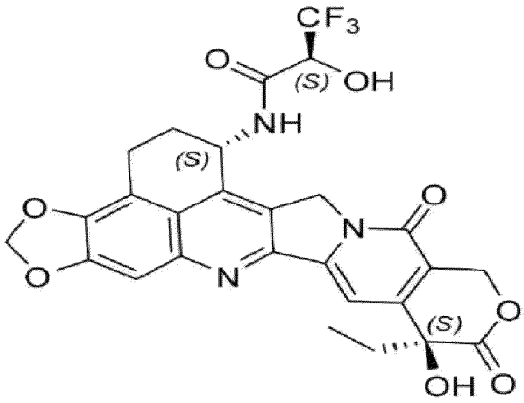
[화학식 6]



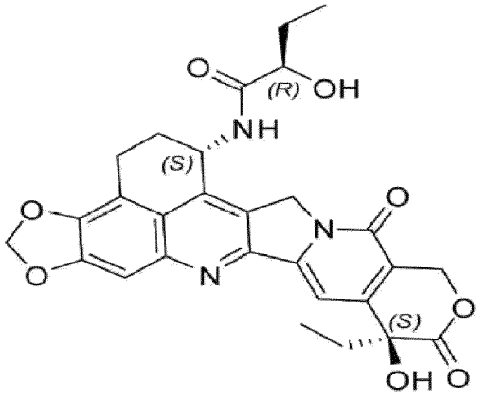
[화학식 7]



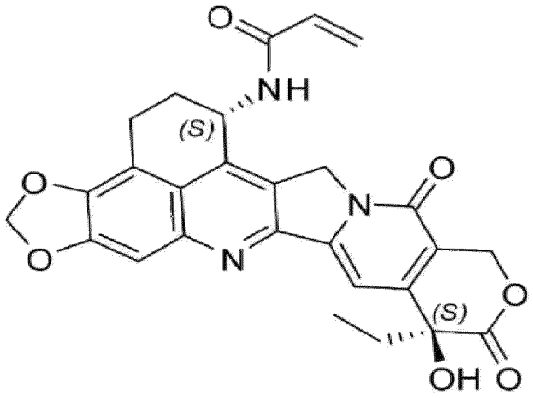
[화학식 8]



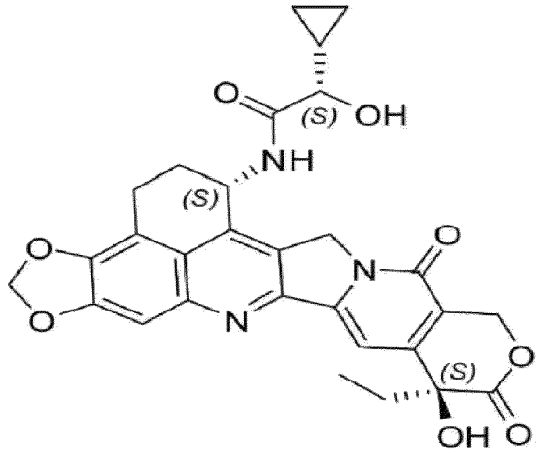
[화학식 9]



[화학식 10]



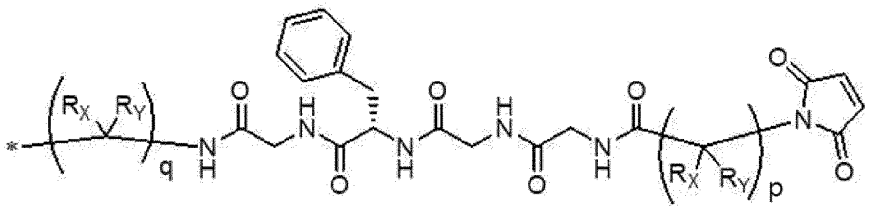
[화학식 11]



[청구항 5] 제1항에 있어서,

상기 링커는 하기 화학식 12로 표시되는 것인, 항체-약물 접합체:

[화학식 12]



여기서,

R_X 및 R_Y는 각각 독립적으로 수소 또는 C_{1-6}알킬이고,

p 및 q는 각각 독립적으로 1 내지 6의 정수이고,

*은 페이로드와 결합하는 부위다.

[청구항 6] 제1항에 있어서,

상기 항-Nectin-4 항체는 엔포투맙(Enfortumab), N41, ch-15A7.5 및 SKB410의 항체로 이루어진 군으로부터 선택되는 것인, 항체-약물 접합체.

[청구항 7] 제1항에 있어서,
상기 항-Nectin-4 항체는 엔포투맙(Enfortumab)인, 항체-약물 접합체.

[청구항 8] 제1항에 있어서,
상기 항-Nectin-4 항체는 i) 각각 서열번호 1,2 및 3의 아미노산 서열을 갖는 CDR-H1, CDR-H2 및 CDR-H3을 포함하는 중쇄 및 ii) 각각 서열번호 4, 5 및 6의 아미노산 서열을 갖는 CDR-L1, CDR-L2 및 CDR-L3을 포함하는 경쇄를 갖는 항체 또는 이의 항원 결합 단편인 것인, 항체-약물 접합체.

[청구항 9] 제1항에 있어서,
상기 항-Nectin-4 항체는 i) 서열번호 7의 아미노산 서열을 갖는 중쇄 가변영역 및 ii) 서열번호 8의 아미노산 서열을 갖는 경쇄 가변영역을 포함하는 항체 또는 이의 항원 결합 단편인 것인, 항체-약물 접합체.

[청구항 10] 제1항에 있어서,
상기 항-Nectin-4 항체는 i) 서열번호 9의 아미노산 서열을 갖는 중쇄 및 ii) 서열번호 10의 아미노산 서열을 갖는 경쇄를 포함하는 항체 또는 이의 항원 결합 단편인 것인, 항체-약물 접합체.

[청구항 11] 제1항 내지 제10항 중 어느 한 항에 따른 항체-약물 접합체를 유효성분으로 포함하는, 암을 치료 또는 예방하기 위한 약학적 조성물.

[청구항 12] 제11항에 있어서,
상기 암은 가성점액종, 간내 담도암, 간모세포종, 간암, 갑상선암, 결장암, 고환암, 골수이형성증후군, 교모세포종, 구강암, 구순암, 균상식육종, 급성골수성백혈병, 급성림프구성백혈병, 기저세포암, 난소상피암, 난소생식세포암, 남성유방암, 뇌암, 뇌하수체선종, 다발성골수종, 담낭암, 담도암, 대장암, 만성골수성백혈병, 만성림프구백혈병, 망막모세포종, 맥락막흑색종, 바터팽대부암, 방광암, 복막암, 부갑상선암, 부신암, 비부비동암, 비소세포폐암, 설암, 성상세포종, 소세포폐암, 소아뇌암, 소아림프종, 소아백혈병, 소장암, 수막종, 식도암, 신경교종, 신우암, 신장암, 심장암, 십이지장암, 악성 연부조직 암, 악성골암, 악성림프종, 악성중피종, 악성흑색종, 안암, 외음부암, 요관암, 요도암, 요로상피암, 원발부위불명암, 위림프종, 위암, 위유암종, 위장관간질암, 윌름스암, 유방암, 육종, 음경암, 인두암, 임신융모질환, 자궁경부암, 자궁내막암, 자궁육종, 전립선암, 전이성골암, 전이성뇌암, 종격동암, 직장암, 직장유암종, 질암, 척수암, 청신경초종, 췌장암, 침샘암, 카포시 육종, 파제트병, 편도암, 편평상피세포암, 폐선암, 폐암, 폐편평상피세포암, 피부암, 항문암, 횡문근육종, 후두암, 흉막암, 혈액암, 및 흉선암으로 이루어진 군으로부터 선택되는 것인, 약학적 조성물.

[청구항 13] 제11항에 있어서,
상기 암은 신장암, 요로상피암, 방광암, 유방암, 비소세포폐암, 두경부암, 위암 및 식도암으로 이루어진 군으로부터 선택되는 것인, 약학적 조성물.

[청구항 14] 제1항 내지 제10항 중 어느 한 항에 따른 항체-약물 접합체를 대상체에 투여하는 단계를 포함하는, 암의 치료 또는 예방 방법.

[청구항 15] 제1항 내지 제10항 중 어느 한 항에 따른 항체-약물 접합체의 암의 치료 또는 예방 용도.

[청구항 16] 암의 치료 또는 예방용 약학적 조성물을 제조하기 위한 제1항 내지 제10항 중 어느 한 항에 따른 항체-약물 접합체의 용도.