



(19) 대한민국특허청(KR)  
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2021년01월20일  
(11) 등록번호 10-2204805  
(24) 등록일자 2021년01월13일

- (51) 국제특허분류(Int. Cl.)  
C07D 498/04 (2006.01) A61K 47/68 (2017.01)  
C07C 201/12 (2006.01) C07C 205/37 (2006.01)  
C07C 213/02 (2006.01) C07C 215/78 (2006.01)  
C07D 498/18 (2006.01) C07K 16/12 (2006.01)
- (52) CPC특허분류  
C07D 498/04 (2013.01)  
A61K 47/6803 (2017.08)
- (21) 출원번호 10-2018-7027989
- (22) 출원일자(국제) 2017년03월03일  
심사청구일자 2018년09월28일
- (85) 번역문제출일자 2018년09월28일
- (65) 공개번호 10-2018-0118173
- (43) 공개일자 2018년10월30일
- (86) 국제출원번호 PCT/US2017/020711
- (87) 국제공개번호 WO 2017/152083  
국제공개일자 2017년09월08일
- (30) 우선권주장  
62/303,556 2016년03월04일 미국(US)
- (56) 선행기술조사문헌  
KR1020160015227 A\*  
US20140356375 A1  
WO2014194247 A1  
\*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

- (73) 특허권자  
제넨테크, 인크.  
미합중국 캘리포니아 (우편번호 94080-4990) 사우스샌프란시스코 디엔에이 웨이 1
- (72) 발명자  
바흐만, 스테판  
스위스 4070 바젤 그렌짜체스트라쎄 124 에프. 호프만-라 로슈 아게 내  
판타지아, 세레나 마리아  
스위스 4070 바젤 그렌짜체스트라쎄 124 에프. 호프만-라 로슈 아게 내  
(뒷면에 계속)
- (74) 대리인  
장덕순, 이귀동

전체 청구항 수 : 총 20 항

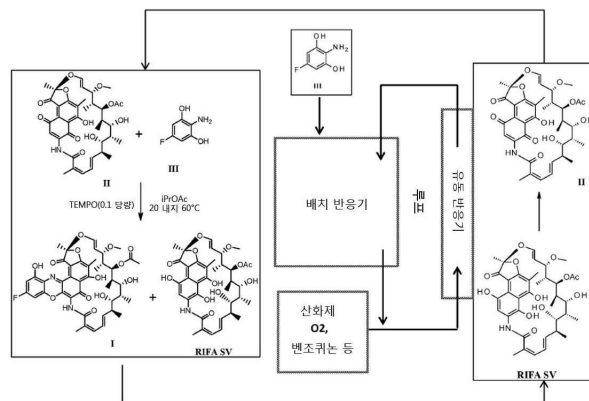
심사관 : 강신권

(54) 발명의 명칭 항체-리파마이신 접합체의 제조 방법

(57) 요약

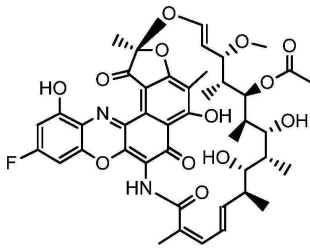
본 발명은 이하의 화학식 I의 F-벤족사지노리파마이신: 및 항체와의 접합을 위한 중간체의 제조 공정을 (뒷면에 계속)

대표도



기재한다:

[화학식 I]



I

(52) CPC특허분류

- A61K 47/6835 (2017.08)
- C07C 201/12 (2013.01)
- C07C 205/37 (2013.01)
- C07C 213/02 (2013.01)
- C07C 215/78 (2013.01)
- C07D 498/18 (2013.01)
- C07K 16/1267 (2013.01)
- C07K 16/1271 (2013.01)
- C07K 2317/77 (2013.01)

(72) 발명자

**안센, 미하엘**

스위스 4070 바젤 그렌짜체스트라쎄 124 에프. 호  
프만-라 로슈 아게 내

**콰니크, 스테판**

미국 94080 캘리포니아주 사우스 샌 프란시스코 디  
엔에이 웨이 1 제넨테크, 인크. 내

**링후, 진**

미국 94080 캘리포니아주 사우스 샌 프란시스코 디  
엔에이 웨이 1 제넨테크, 인크. 내

**리트, 세바스티안**

스위스 4070 바젤 그렌짜체스트라쎄 124 에프. 호  
프만-라 로슈 아게 내

**세그레이브스, 나다니엘 엘.**

미국 94080 캘리포니아주 사우스 샌 프란시스코 디  
엔에이 웨이 1 제넨테크, 인크. 내

**조그, 안드레아스**

스위스 4070 바젤 그렌짜체스트라쎄 124 에프. 호  
프만-라 로슈 아게 내

명세서

청구범위

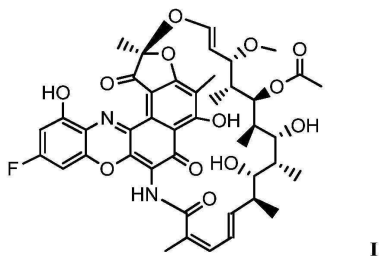
청구항 1

이하의 화학식 I의 F-벤족사지노리파마이신의 제조 방법으로서,

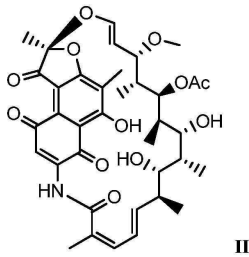
이하의 화학식 II의 리파마이신 S; 이하의 화학식 III의 2-아미노-5-플루오로벤젠-1,3-디올; 및 2,2,6,6-테트라메틸-1-피페리디닐옥시(TEMPO), 반응 기체상의 5v/v% 내지 100v/v%에 해당하는 산소 기체, 및 벤조퀴논으로 이루어진 균부터 선택된 하나 이상의 산화제를 반응시켜 이하의 화학식 I를 형성하는 단계를 포함하며,

상기 산화제가 화학식 III의 2-아미노-5-플루오로벤젠-1,3-디올로부터 분리된 상태로 유지되는 것인, 방법.

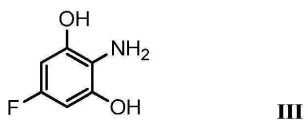
[화학식 I]



[화학식 II]



[화학식 III]



청구항 2

제1항에 있어서, 상기 산화제는 산소 기체를 포함하는, 방법.

청구항 3

제2항에 있어서, 상기 산화제는 촉매량의 TEMPO를 포함하는, 방법.

청구항 4

제2항에 있어서, 상기 산화제는 반연속 공정에 의해 상기 화학식 III으로부터 분리되고, 상기 화학식 II는 루프 공정(loop process)를 통해 개질 및 재생되는, 방법.

청구항 5

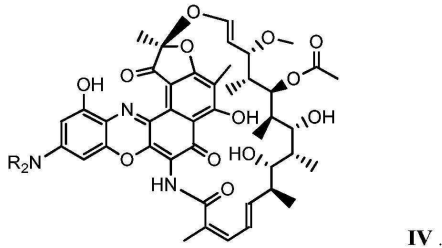
제1항에 있어서, 상기 화학식 II와 상기 화학식 III의 반응은 이소프로필 아세테이트, 에틸 아세테이트, 톨루엔,

메탄올 및 테트라하이드로푸란으로부터 선택된 용매 중에서 실시되는, 방법.

**청구항 6**

제1항에 있어서, 상기 화학식 I의 F-rifa 및 2차 아민인 R<sub>2</sub>NH를 반응시켜 이하의 화학식 IV를 형성하는 단계를 더 포함하되, 상기 2차 아민은 디메틸아민, 디에틸아민, 디-n-프로필아민, 1-메틸피페라진, N1-이소부틸피페라진 및 N,N-디메틸피페리딘-4-아민으로부터 선택되는, 방법:

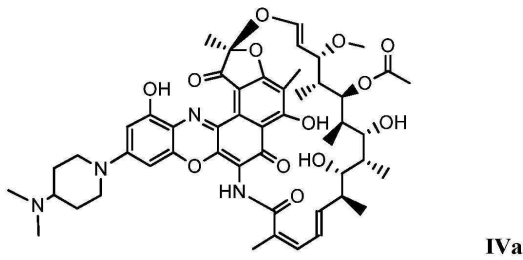
[화학식 IV]



**청구항 7**

제6항에 있어서, 상기 2차 아민은 N,N-디메틸피페리딘-4-아민이고, 상기 화학식 IV는 이하의 화학식 IVa의 구조를 갖는, 방법:

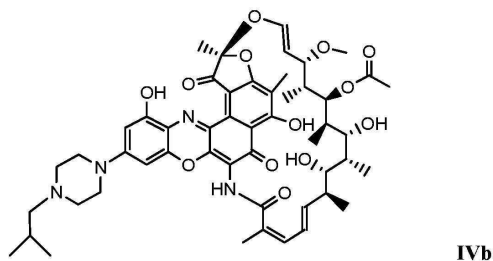
[화학식 IVa]



**청구항 8**

제6항에 있어서, 상기 2차 아민은 N1-이소부틸피페라진이고, 상기 화학식 IV는 이하의 화학식 IVb의 구조를 갖는, 방법:

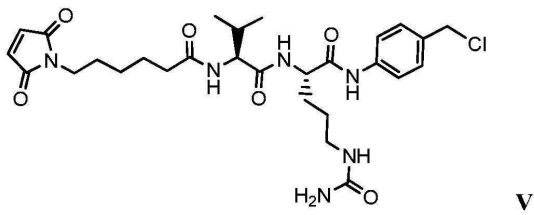
[화학식 IVb]



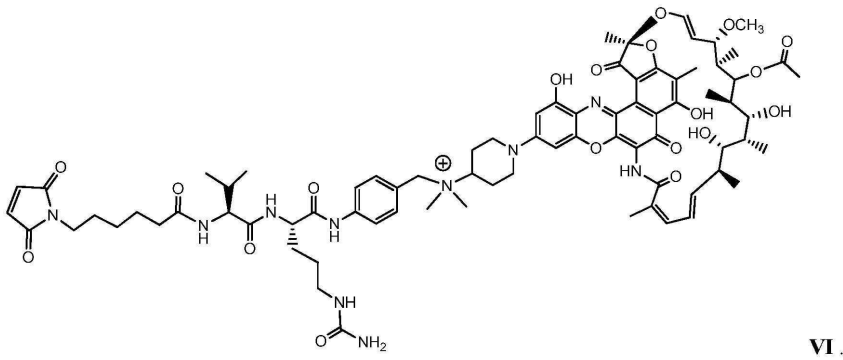
**청구항 9**

제6항에 있어서, 화학식 IVa 및 이하의 화학식 V를 반응시켜 이하의 화학식 VI의 링커-항생제를 형성하는 단계를 더 포함하는 방법:

[화학식 V]



[화학식 VI]



**청구항 10**

제9항에 있어서, 수성 혼합물에서 상기 화학식 VI을 항체와 반응시켜 항체-리파마이신 접합체(conjugate)를 형성하는 단계를 더 포함하는 방법.

**청구항 11**

제10항에 있어서, 상기 수성 혼합물은 프로필렌 글리콜, N-메틸피롤리돈(NMP), 디메틸포름아미드(DMF), 디메틸아세트아미드(DMA) 및 디메틸설폭사이드(DMSO)로부터 선택된 용매를 포함하는, 방법.

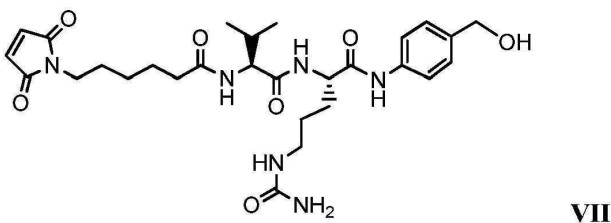
**청구항 12**

제10항에 있어서, 상기 항체는 항-벽 테이코산 항체(anti-wall teichoic acid antibody)인, 방법.

**청구항 13**

제9항에 있어서, 이하의 화학식 VII 및 염화티오닐을 반응시켜 상기 화학식 V를 형성하는 단계를 더 포함하는 방법:

[화학식 VII]



**청구항 14**

제13항에 있어서, 상기 화학식 V는 물로부터 단리되는, 방법.

**청구항 15**

이하의 화학식 I의 F-벤족사지노리파마이신의 제조를 위한 반연속 루프 공정으로서,

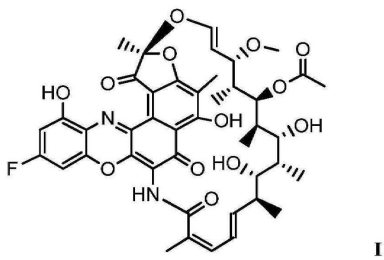
(i) 이하의 화학식 II의 리파마이신 S, 및 이하의 화학식 III의 2-아미노-5-플루오로벤젠-1,3-디올이 배치 반응기 용기 내에서 반응하여 화학식 I을 형성하는 단계로써, 이하의 리파마이신 SV가 부산물로 형성되고 유동-반응기로 전달되는 단계;

(ii) 유동 반응기 내에서 하나 이상의 산화제가 리파마이신 SV를 산화시켜 화학식 II를 형성하는 단계로써, 하나 이상의 산화제가 2,2,6,6-테트라메틸-1-피페리디닐옥시(TEMPO), 반응 기체상의 5v/v% 내지 100v/v%에 해당하는 산소 기체, 및 벤조퀴논으로 이루어진 군으로부터 선택된 것인, 단계; 및

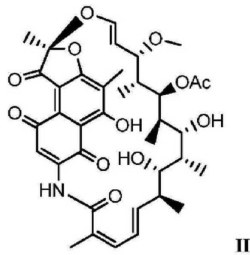
(iii) 유동-반응기에서 형성된 화학식 II가 배치 반응기 용기로 전달되는 단계를 포함하며,

상기 하나 이상의 산화제와 2-아미노-5-플루오로벤젠-1,3-디올이 분리된 상태로 유지되는 것인, 반연속 루프 공정.

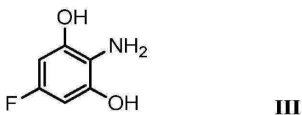
[화학식 I]



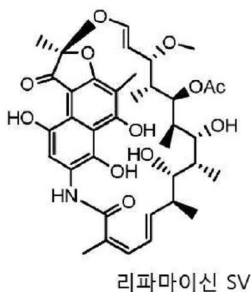
[화학식 II]



[화학식 III]



[리파마이신 SV]



**청구항 16**

제15항에 있어서, 상기 하나 이상의 산화제가 2,2,6,6-테트라메틸-1-피페리디닐옥시(TEMPO), 및 산소 기체로부터 선택된 것인, 반연속 루프 공정.

**청구항 17**

제16항에 있어서, 상기 하나 이상의 산화제가 2,2,6,6-테트라메틸-1-피페리디닐옥시(TEMPO)인 것인, 반연속 루프 공정.

**청구항 18**

제15항에 있어서, 상기 하나 이상의 산화제가 벤조퀴논인 것인, 반연속 루프 공정.

**청구항 19**

제15항에 있어서, 화학식 II의 리파마이신 S, 및 화학식 III의 2-아미노-5-플루오로벤젠-1,3-디올이 배치 반응기 용기 내에서 이소프로필 아세테이트(iPrOAc)에 용해된 것인, 반연속 루프 공정.

**청구항 20**

제15항에 있어서, 상기 하나 이상의 산화제가 유동-반응기 내에서 이소프로필 아세테이트(iPrOAc)에 용해된 것인, 반연속 루프 공정.

**청구항 21**

삭제

**청구항 22**

삭제

**발명의 설명**

**기술 분야**

[0001] **관련 출원의 상호 참조**

[0002] 37 CFR § 1.53(b) 하에 출원된 본 정규 출원은 2016년 3월 4일자로 35 USC § 119(e) 하에 출원된 미국 가출원 제62/303,556호의 이익을 주장하며, 이의 전문은 본원에 전체가 참고로 인용된다.

[0003] **본 발명의 기술분야**

[0004] 본 발명은 항체-리파마이신 접합체 화합물을 제조하는 방법에 관한 것이다.

**배경 기술**

[0005] 면역접합체로도 공지되어 있는 항체-약물 접합체(ADC)는 강력한 세포독성 약물을 항원-발현 종양 세포에 표적화 시켜(문헌 참고: Teicher, B.A.(2009) Curr.Cancer Drug Targets 9:982-1004), 효능을 최대화하고 표적외 독성을 최소화함으로써 치료 지수를 증대시키는 항체 및 세포독성 약물 둘 모두의 이상적인 성질이 조합된 표적화된 화학치료 분자이다(문헌 참고: Carter, P.J. and Senter P.D.(2008) The Cancer Jour.14(3):154-169; Chari, R. V. (2008) Acc. Chem. Res. 41:98-107. ADC는 링커 유닛을 통해 세포독성 약물 모이어티에 공유적으로 부착된 표적화 항체를 포함한다. 면역접합체는 약물 모이어티의 종양으로의 표적화된 전달 및 그 내부에서의 세포내 축적을 허용하고, 여기서 비접합된 약물의 전신 투여는 제거되어야 할 종양 세포 뿐만 아니라 정상 세포에 대해 허용 불가능한 수준의 독성을 유발할 수 있다(문헌 참고: Polakis P.(2005) Curr. Opin. Pharmacol, 5:382-387).

[0006] 암 치료에서 ADC의 개념은 약물 부분이 항생제인 항균 치료로 확대되었으며, 그 결과 항체-항생제 접합체(AAC)를 얻었다. 항-WTA 단클론성 항체는 하나 이상의 리파마이신형 항생제 모이어티(문헌 참고: Lehar, S. et al (2015) "Novel antibody-antibiotic conjugate eliminates intracellular S. aureus" Nature 527(7578) 323-328; Staben, L.R., et al (2016) "Targeted drug delIVery through the traceless release of tertiary and heteroaryl amines from antibody-drug conjugates" Nature Chemistry 8 (12):1112-1119; Zhou, C., et al (2016) "Pharmacokinetics and pharmacodynamics of DSTA4637A: A novel ThioMab™ antibody antibiotic conjugate against Staphylococcus aureus in mice" MABS 8 (8):1612-1619; WO 2014/194247) 및 기타 항생제

(WO 2014/193722)에 대한 링커의 공유적 부착에 의해 접합되었다. 마우스에서 *S. 아우레우스*의 세포내 저장소는 반코마이신의 존재 하에서도 감염을 확립할 수 있는 독성 서브세트의 박테리아를 포함하는 것으로 증명되었다.

**발명의 내용**

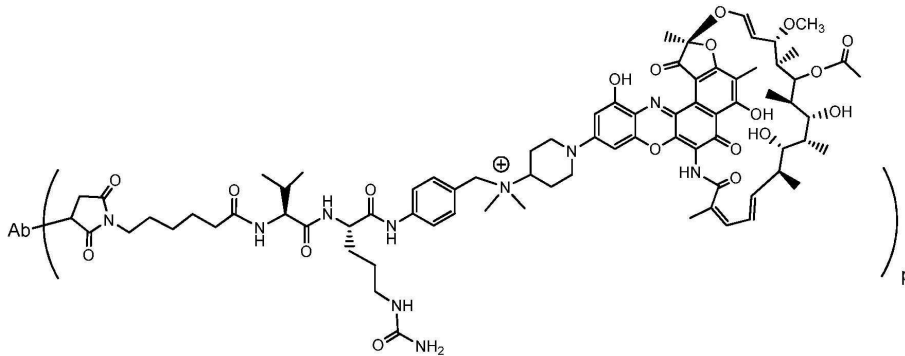
**해결하려는 과제**

[0007] 항-WTA 리파마이신 접합체는 세포내 *S. 아우레우스*(*S. aureus*)를 효과적으로 살해하는 신규한 치료제이다. 이러한 항체-항생제 접합체(AAC)는 고효능 항생제에 접합된 항체를 표적화하는 *S. 아우레우스*로 구성되며, 이는 파고라이소솜(phagolysosome)의 단백질 가수분해 환경에서 방출된 이후에만 활성화된다. 상기 항체-항생제 접합체는 균혈증(bacteremia)의 치료에 있어 반코마이신보다 우수하며, 세포내 *S. 아우레우스*가 침습성 감염의 중요 요소라는 직접적인 증거를 제공한다.

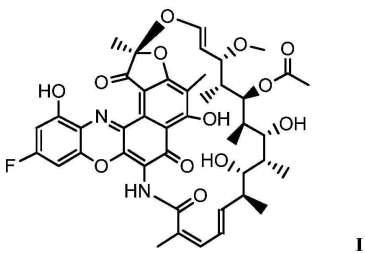
**과제의 해결 수단**

[0008] **본 발명의 요약**

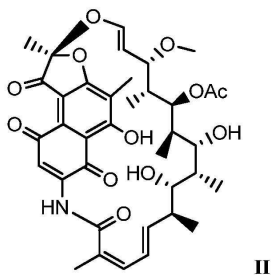
[0009] 본 발명은 이하의 항체-리파마이신 접합체 화합물을 제조하는 방법에 관한 것이다:



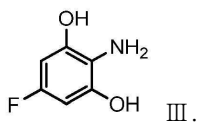
[0010] 본 발명의 일 양태는 이하의 화학식 I의 F-벤족사지노리파마이신의 제조 공정으로,  
 [0011] [화학식 I]



[0012] 이하의 화학식 II의 리파마이신 S, 이하의 화학식 III의 2-아미노-5-플루오로벤젠-1,3-디올 및 산화제를 반응시켜 화학식 I을 형성하는 단계를 포함하되, 상기 산화제는 TEMPO, 벤조퀴논 및 구리염으로부터 선택된다:  
 [0013] [화학식 II]



[0014] [화학식 III]



[0018]

[0019]

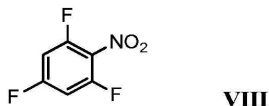
본 발명의 다른 양태는 상기 화학식 III의 2-아미노-5-플루오로벤젠-1,3-디올의 제조 공정이다:

[0020]

(a) 이하의 화학식 VIII의 1,3,5-트리플루오로-2-니트로벤젠, 벤질 알코올, 염기성 시약 및 알콕시드 시약을 반응시켜 이하의 화학식 IX의 ((5-플루오로-2-니트로-1,3-페닐렌)비스(옥시))비스(메틸렌)디벤젠을 형성하되, 상기 염기성 시약은 리튬 비스(트리메틸실릴아미드), 리튬 디이소프로필아미드로부터 선택되는 단계;

[0021]

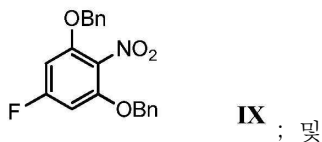
[화학식 VIII]



[0022]

[0023]

[화학식 IX]



[0024]

[0025]

(b) 상기 화학식 IX를 수소 기체 및 이중 금속 촉매와 반응시켜 상기 화학식 III을 형성하는 단계를 포함하는, 상기 화학식 III의 2-아미노-5-플루오로벤젠-1,3-디올의 제조 공정.

**도면의 간단한 설명**

[0026]

도 1은 유동식 반응기 및 배치식 반응기를 이용한 반연속 루프 공정 (semi-continuous loop process)에 의해 화학식 I의 F-벤조사지노리파마이신(반응식 1)을 제공하기 위해 화학식 III의 2-아미노-5-플루오로벤젠-1,3-디올에 의한 화학식 II의 리파마이신 S의 산화적 고리화를 위한 일반 공정에 대한 개략도를 나타낸다.

**발명을 실시하기 위한 구체적인 내용**

[0027]

정의

[0028]

"키랄(chiral)"이란 용어는 거울상 파트너의 비중첩성(non-superimposability) 특성을 갖는 분자를 지칭하는 반면, "아키랄(achiral)"이란 용어는 이들의 거울상 파트너 상에 중첩 가능한 분자를 지칭한다.

[0029]

"입체 이성질체(stereomer)"란 용어는 동일한 화학 구조식을 갖지만 공간 내 원자 또는 기의 배열에 대해 서로 다른 화합물을 지칭한다.

[0030]

"부분입체이성질체(diastereomer)"는 2개 이상의 키랄성(chirality) 중심을 갖는 입체이성질체를 지칭하며, 이의 분자들은 서로에 대해 서울상이 아니다. 부분입체이성질체는 상이한 물리적 성질, 예를 들어 용점, 비점, 스펙트럼 성질 및 반응성을 갖는다. 부분입체이성질체의 혼합물은 전기영동 및 크로마토그래피와 같은 고해상도 분석 과정 하에 분리할 수 있다.

[0031]

"거울상이성질체(enantiomer)"는 서로 대해 비-중첩성 거울상인 화합물의 2개의 입체이성질체를 지칭한다.

[0032]

본원에 사용된 입체화학적 정의 및 관례는 일반적으로 다음 문헌을 따른다: S.P.Parker, Ed., *McGraw-Hill Dictionary of Chemical Terms* (1984) McGraw-Hill Book Company, New York; and Eliel, E. and Wilen, S., "Stereochemistry of Organic Compounds" John Wiley & Sons, Inc., New York, 1994. 본 발명의 화합물은 비대칭 또는 키랄 중심(입체 중심)을 함유할 수 있으며, 따라서 상이한 입체 이성질체 형태로 존재한다. 부분입체이성질체, 거울상이성질체 및 회전장애이성질체(atropisomer)뿐만 아니라 그리고 라세미 혼합물과 같은 이들의 혼합물을 포함하지만 이에 제한되지 않는 본 발명의 화합물의 모든 입체이성질체 형태는 본 발명의 일부를 형성하는 것으로 의도된다. 많은 유기 화합물은 광학 활성 형태로 존재하고, 즉 이들은 평면 편광의 평면을 회전시키는 능력을 갖는다. 광학적으로 활성인 화합물을 기재할 때, 접두사 D 및 L 또는 R 및 S는 분자의 키랄 중심(들)에 대하여 분자의 절대 배열을 표시하기 위해 사용된다. d 및 l 또는 (+) 및 (-)란 접두어는 화합물의 평

면 편광의 회전 징후를 지정하기 위해 사용되고, (-) 및 1은 상기 화합물이 좌회전성임을 의미한다. (+) 또는 d의 접두어를 갖는 화합물은 우회전성이다. 소정의 화학 구조에 대해, 이들 입체이성질체는 이들이 서로에 대해 거울상이라는 것을 제외하고는 동일하다. 특정 입체이성질체는 또한 거울상이성질체로서 지칭될 수 있고, 상기 이성질체의 혼합물은 흔히 거울상이성질체 혼합물로서 지칭된다. 거울상이성질체의 50:50 혼합물은 라세미 혼합물 또는 라세미체로 지칭되고, 이는 화학 반응 또는 공정에서 입체선택성 또는 입체특이성이 없는 경우 발생할 수 있다. "라세미 혼합물(racemic mixture)" 및 "라세미체"란 용어는 광학 활성이 없는 2개의 거울상이성질체 종의 등몰 혼합물을 지칭한다.

[0033] "호변이체(tautomer)" 또는 "호변이체 형태"란 용어는 낮은 에너지 장벽을 통해 상호 호환 가능한 상이한 에너지를 갖는 구조 이성질체를 지칭한다. 예를 들어, 양성자 호변이체(양성자 이동 호변이체로도 알려짐)는 양성자의 이동을 통한 상호전환, 예컨대 케토-엔올 및 이민-에나민 이성화를 포함한다. 원자가 호변이체는 결합 전자들의 일부의 재구성에 의한 상호전환을 포함한다.

[0034] 본원에서 사용된 바와 같은 "약학적으로 허용 가능한 염(pharmaceutically acceptable salt)"이란 문구는 본 발명의 화합물의 약학적으로 허용 가능한 유기 또는 무기 염을 지칭한다. 예시적인 염으로는 설페이트, 시트레이트, 아세테이트, 옥살레이트, 클로라이드, 브로마이드, 요오드, 니트레이트, 바이설페이트, 포스페이트, 산 포스페이트, 이소니코티네이트, 락테이트, 살리실레이트, 산 시트레이트, 타르트레이트, 올리에이트, 타네이트, 판토테네이트, 바이타르트레이트, 아스코르베이트, 숙시네이트, 말레이트, 겐티시네이트, 푸마레이트, 글루코네이트, 글루크로네이트, 사카레이트, 포르메이트, 벤조에이트, 글루타메이트, 메탄설포네이트 "메실레이트", 에탄설포네이트, 벤젠설포네이트, *p*-톨루엔설포네이트, 및 파모에이트 (즉, 1,1'-메틸렌-비스-(2-하이드록시-3-나프토네이트)) 염을 들 수 있지만, 이에 제한되지 않는다. 약학적으로 허용 가능한 염은 아세테이트 이온, 숙시네이트 이온 또는 기타 반대 이온과 같은 다른 분자의 포함을 수반할 수 있다. 상기 반대 이온은 모 화합물 상의 전하를 안정화시키는 임의의 유기 또는 무기 모이어티일 수 있다. 더욱이, 약제학적으로 허용 가능한 염은 이의 구조 내에 하나 이상의 하전된 원자를 가질 수 있다. 다중 하전된 원자가 약제학적으로 허용 가능한 염의 일부인 경우 다중 반대 이온을 가질 수 있다. 따라서, 약학적으로 허용 가능한 염은 하나 이상의 하전된 원자 및/또는 하나 이상의 반대 이온을 가질 수 있다.

[0035] 본 발명의 화합물이 염기인 경우, 상기 목적하는 약학적으로 허용 가능한 염은 당해 기술분야에서 이용 가능한 임의의 적합한 방법, 예를 들어 염산, 브롬화수소산, 황산, 질산, 메탄설포산, 인산 등과 같은 무기산 또는 아세트산, 말레산, 숙신산, 만델산, 푸마르산, 말론산, 피루브산, 옥살산, 글리콜산, 살리실산과 같은 유기산, 글루쿠론산 또는 갈락투론산과 같은 피라노시딜산, 시트르산 또는 타르타르산과 같은 알파 하이드록시산, 아스파르트산 또는 글루탐산과 같은 아미노산, 벤조산 또는 신남산과 같은 방향족산, *p*-톨루엔설포산 또는 에탄설포산과 같은 설포산 등에 의한 유리 염기의 처리에 의해 제조될 수 있다.

[0036] 본 발명의 화합물이 산인 경우, 상기 목적하는 약학적으로 허용 가능한 염은 임의의 적합한 방법, 예를 들어 아민(1차, 2차 또는 3차), 알칼리 금속 수산화물 또는 알칼리 토금속 수산화물 등과 같은 무기 또는 유기 염기에 의한 유리산의 처리에 의해 제조될 수 있다. 적합한 염의 대표적인 예로는 글리신 및 아르기닌과 같은 아미노산, 1차, 2차 및 3차 아민, 및 피페리딘, 모르폴린 및 피페라진과 같은 고리형 아민으로부터 유래한 유기 염, 및 나트륨, 칼슘, 포타슘, 마그네슘, 망간, 철, 구리, 아연, 알루미늄 및 리튬으로부터 유래한 무기 염을 들 수 있지만, 이에 제한되지 않는다.

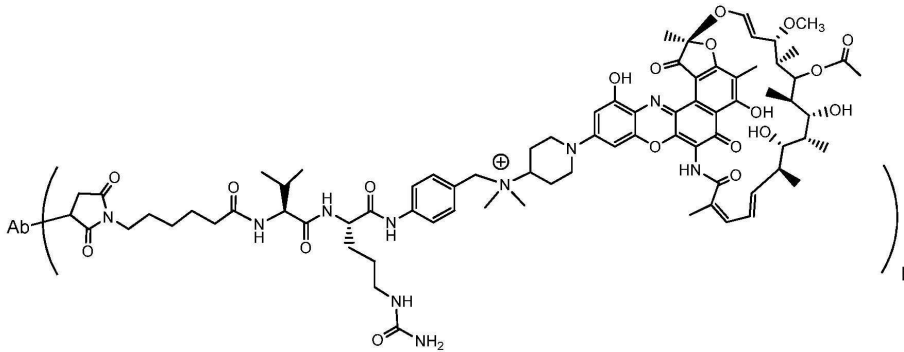
[0037] "용매화물(solvate)"은 하나 이상의 용매 분자와 본 발명의 화합물의 연합 또는 복합체를 지칭한다. 용매화물을 형성하는 용매의 예로는 물, 이소프로판올, 에탄올, 메탄올, DMSO, 에틸 아세테이트, 아세트산 및 에탄올아민을 들 수 있지만, 이에 제한되지 않는다. "수화물(hydrate)"이란 용어는 용매 분자가 물인 복합체를 지칭한다.

[0038] 본원에서 사용된 바와 같은 "약학적으로 허용 가능한 염"이란 문구는 본 발명의 화합물의 약학적으로 허용 가능한 유기 또는 무기 염을 지칭한다. 예시적인 염으로는 설페이트, 시트레이트, 아세테이트, 옥살레이트, 클로라이드, 브로마이드, 요오드, 니트레이트, 바이설페이트, 포스페이트, 산 포스페이트, 이소니코티네이트, 락테이트, 살리실레이트, 산 시트레이트, 타르트레이트, 올리에이트, 타네이트, 판토테네이트, 바이타르트레이트, 아스코르베이트, 숙시네이트, 말레이트, 겐티시네이트, 푸마레이트, 글루코네이트, 글루크로네이트, 사카레이트, 포르메이트, 벤조에이트, 글루타메이트, 메탄설포네이트 "메실레이트", 에탄설포네이트, 벤젠설포네이트, *p*-톨루엔설포네이트, 및 파모에이트 (즉, 1,1'-메틸렌-비스-(2-하이드록시-3-나프토네이트)) 염을 들 수 있지만, 이에 제한되지 않는다. 약학적으로 허용 가능한 염은 아세테이트 이온, 숙시네이트 이온 또는 기타 반대 이온과 같은 다른 분자의 포함을 수반할 수 있다. 상기 반대 이온은 모 화합물 상의 전하를 안정화시키는 임의의 유기

또는 무기 모이어티일 수 있다. 더욱이, 약제학적으로 허용 가능한 염은 이의 구조 내에 하나 이상의 하전된 원자를 가질 수 있다. 다중 하전된 원자가 약제학적으로 허용 가능한 염의 일부인 경우 다중 반대 이온을 가질 수 있다. 따라서, 약학적으로 허용 가능한 염은 하나 이상의 하전된 원자 및/또는 하나 이상의 반대 이온(counter ion)을 가질 수 있다.

[0039] 항체-리파마이신 접합체의 제조

[0040] 본 발명은 하기와 같이 나타낸 항체-리파마이신 접합체 화합물의 합성을 위한 공정, 방법, 시약 및 중간체를 포함하는데,

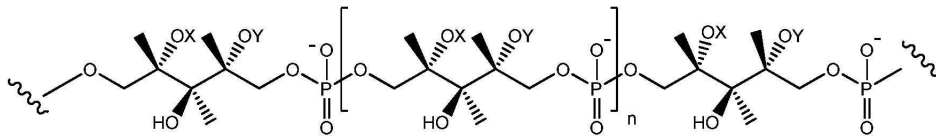


[0041]

[0042] 상기 Ab는 항-WTA (벽 테이코산) 항체이고, p는 1 내지 약 4의 정수이다 [Lehar, S. et al (2015) "Novel antibody-antibiotic conjugate eliminates intracellular *S. aureus*" 527(7578) 323-328; WO 2014/194247; WO 2014/193722, 상기 각각의 내용은 본 명세서 참고로서 포함됨]. 상기 항체는 생리학적으로 개열된 디펩티드 (발린-시트룰린) 및 p-아미노벤질 스페이서를 포함하는 링커를 통해 리파마이신 항생제 모이어티에 공유적으로 부착된다[문헌 참고: Carl, P.L. et al (1981) J. Med. Chem.24(5):479-480; Dubowchik, G.M. et al (1998) Chem. Lett.8:3341-3346; Dubowchik, G.M. et al (2002) Bioconjugate Chem. 13:855-869]. 상기 리파마이신 모이어티의 3차 아민 말단은 항체-리파마이신 접합체 화합물에서 4차 암모늄염을 형성하여, 이는 개열 (cleavage)되는 경우에 활성 활성제를 방출한다. 4차 암모늄기는 또한 개열을 조절하고, 용해도를 최적화하고, 상기 접합체 화합물의 응집을 최소화하는 작용을 할 수 있다.

[0043] 그람-양성 박테리아의 두꺼운 펩티도글리칸층은 벽 테이코산(wall teichoic acid, WTA)로 지칭되는 병원체-특이적 다중 음이온성 당중합체에 연결되어 있다. 구체적으로는, *S. 아우레우스*는 포스포-리비톨 반복 유닛으로 구성된 WTA를 생성하며, 여기서 상기 포스포-리비톨 반복 유닛은 TarM 또는 TarS 글리코실트랜스퍼라아제 (glycosyltransferase)에 의해 각각 매개되는 α(알파)- 또는 β(베타)-O-연결된 N-아세틸글루코사민(GlcNAc) 당 개질에 의해 추가로 개질된다(Winstel, V., et al (2014) Int J Med Microbiol 304, 215-221). 테이코산(TA)은 SA를 포함한 그람-양성 박테리아의 세포벽 내에서 발견되는 박테리아 다당류이다. 벽 테이코산(WTA)은 세포벽의 펩티도글리칸(PDG) 층에 공유적으로 연결된 산인 반면, 리포테이코산(LTA)은 세포질막의 지질에 공유적으로 연결된 산이다(Xia et al.(2010) Intl. J. Med. Microbiol. 300:148-54). 이들 당중합체는 불리한 조건 하에 그리고 기타 기본적인 세포 과정에서 박테리아 생존에 결정적인 역할을 한다. 상기 공지된 WTA 구조는 박테리아 종들마다 매우 다양하다. *S. 아우레우스* TA는 리비톨 포스페이트 또는 글리세롤 포스페이트와 같은 반복적인 폴리올 포스페이트 서브유닛으로 구성되어 있다.

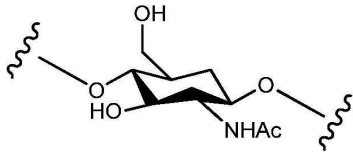
[0044] "벽 테이코산"(WTA)이란 용어는 N-아세틸 무람산 당의 C6 하이드록실로 포스포디에스테르 연결을 통해 펩티도글리칸에 공유적으로 부착된 음이온 당중합체를 의미한다. 정확한 화학 구조는 유기체 마다 다양할 수 있지만, 하나의 구현예에서, WTA는 2번 위치 상에 D-리비톨 및 D-알라닌 및 4번 위치 상에 글리코실 치환체의 1.5-포스포디에스테르 연결체의 반복 유닛을 갖는 리비톨 테이코산이다. 글리코실기는 *S. 아우레우스*에 존재하는 바와 같은 N-아세틸글루코사미닐 α(알파) 또는 β(베타)일 수 있다. 알디톨/당 알코올 포스페이트 반복체 상의 하이드록실은 양이온성 D-알라닌 에스테르 및 N-아세틸글루코사민과 같은 단당류로 치환된다. 하나의 양태에서, 하이드록실 치환체는 D-알라닌 및 알파(α) 또는 베타(β) GlcNHAc을 포함한다. 하나의 특정 양태에서, WTA는 하기 화학식의 화합물을 포함한다:



[0045]

[0046]

여기서, 상기 물결선은 폴리알디톨-P 또는 펩티도글리칸의 반복 연결 유닛 또는 접착 부위를 지적하고, 여기서, X는 D-알라닌 또는 -H이고; Y는 α (알파)-GlcNHAc 또는 β (베타)-GlcNHAc.



GlcNHAc

[0047]

[0048]

S. 아우레우스에서, WTA는 N-아세틸글루코사민(GlcNHAc)-1-P 및 N-아세틸만노오스아민(ManNAc)으로 구성된 이당류에 이어서 2개 또는 3개의 글리세롤-포스페이트 유닛을 통해 N-아세틸 무람산(MurNAc)의 6-OH에 공유적으로 연결된다. 이어, 실제 WTA 중합체는 11 내지 40개의 리비톨-포스페이트(Rbo-P) 반복 유닛으로 구성된다. WTA의 단계적 합성은 처음에 TagO로 지칭되는 효소에 의해 개시되고, (유전자의 인위적 결실에 의해) TagO 유전자가 존재하지 않은 S. 아우레우스 균주는 어떠한 WTA를 생성하지 않는다. 상기 반복 유닛은 α-(알파) 또는 β-(베타) 글리코시드 연결을 통해 C<sub>2</sub>-OH에서 D-알라닌(D-Ala) 및/또는 C<sub>4</sub>-OH 위치에서 N-아세틸글루코사민(GlcNHAc)에 의해 추가로 재단될 수 있다. S. 아우레우스 균주에 의존하거나 박테리아의 성장 단계에 의존하여, 글리코시드 연결은 α-, β- 또는 2개의 아노머(anomer)의 혼합물일 수 있다.

[0049]

항-β(베타)-GlcNAc WTA mAb 및 항-α(알파)-GlcNAc WTA mAb에 대한 인간 IgG 항체는, 항체 중쇄 및 경쇄의 동족 페어링(cognate pairing)을 보존하는 단클론성 항체 탐색 기술을 이용하여 S. 아우레우스 감염 후 환자 유래 말초 B 세포로부터 클로닝되었다(문헌 참고: Meijer, P.J., et al.(2006) Journal of molecular biology 358:764-772). 개별 항체 클론은 포유동물 세포의 형질 감염에 의해 발현되었다(Meijer, P.J., et al (2009) Methods Mol Biol 525:261-277, xIV). 전장 IgG1 항체를 함유하는 상등액은 7일 후 수확하고, 이는 ELISA를 이용하여 항원 결합을 스크리닝하기 위해 사용된다. 이들 항체는 USA300으로부터의 세포벽 제제에 대한 결합에 있어 양성이다. 항체는 200ml의 일시적 형질감염체에서 후속적으로 생성되고, 단백질 A 크로마토그래피에 의해 정제된다(MabSelect SuRe™, GE Life Sciences, Piscataway, NJ)

[0050]

항체 결합의 최고 수준은 WTA 상의 β (베타)-O-결합 GlcNAc 당 개질을 인식하는 인간 IgG<sub>1</sub>에서 발견되었다(Lehar, S. et al (2015) 527(7578) 323-328). 보다 낮은 결합은 α(알파)-O-연결된 GlcNAc를 인식하는 단클론성 항체에 의해 구현되었으며; 사이토메갈로바이러스(CMV) gD 단백질에 대한 이소타입 대조군 항체는 생체 내 유래 S. 아우레우스 상에 발현된 단백질 A로 인해 일부 최소 반응성을 나타냈다. 상기 항체의 항원 특이성은 유전 수단에 의해 결정되어, WTA 상에서의 α(알파)- 또는 β(베타)-GlcNAc 당 개질에 대한 항체는 이들 개개의 글리코실트랜스퍼라아제가 없는 S. 아우레우스 균주에는 결합하지 못하였다.

[0051]

항-WTA 항체는 하기 문헌에 교시된 방법 및 하기 실시예에 의해 선택되고 제조될 수 있다: US 8283294; Meijer PJ et al (2006) J Mol Biol. 358(3):764-72; Lantto J, et al (2011) J Virol. 85(4):1820-33.

[0052]

시스테인 아미노산은 항체 내 반응성 부위에서 가공될 수 있으며, 이는 쇠내 또는 분자간 디설파이드 연결을 형성하지 않는다(문헌 참고: Junutula, et al.,2008b Nature Biotech.,26(8):925-932; Dornan et al (2009) Blood 114(13):2721-2729; US 7521541; US 7723485; W02009/052249, Shen et al (2012) Nature Biotech.,30(2):184-191; Junutula et al (2008) Jour of Immun.Methods 332:41-52). 상기 가공된 시스테인 티올은 링커 시약과 반응하거나, 말레이미드 또는 알파-할로 아미드와 같은 티올-반응성 친전자기(electrophilic group)를 갖는 본 발명의 링커-항생제 중간체와 반응하여 시스테인-가공된 항체(ThioMab) 및 항생제 모이어티와 함께 AAC를 형성할 수 있다. 따라서, 항생제 모이어티의 위치는 디자인되고, 제어될 수 있고 공지된 것일 수 있다. 항생제 로딩은 가공된 시스테인 티올기는 전형적으로 고수율로 티올-반응성 링커 시약 또는 링커-항생제 중간체와 반응할 수 있기 때문에 제어될 수 있다. 중쇄 또는 경쇄 상의 단일 부위에서 치환에 의해 시스테인 아미노산을 도입하기 위해 항-WTA 항체를 가공하는 것은 대칭적인 4량체 항체 상에 2개의 새로운 시스테인을 부여한다. 약 2회의 항생제 로딩이 성취될 수 있고, 접합 생성물인 AAC를 거의 균일하게 할 수

있다.

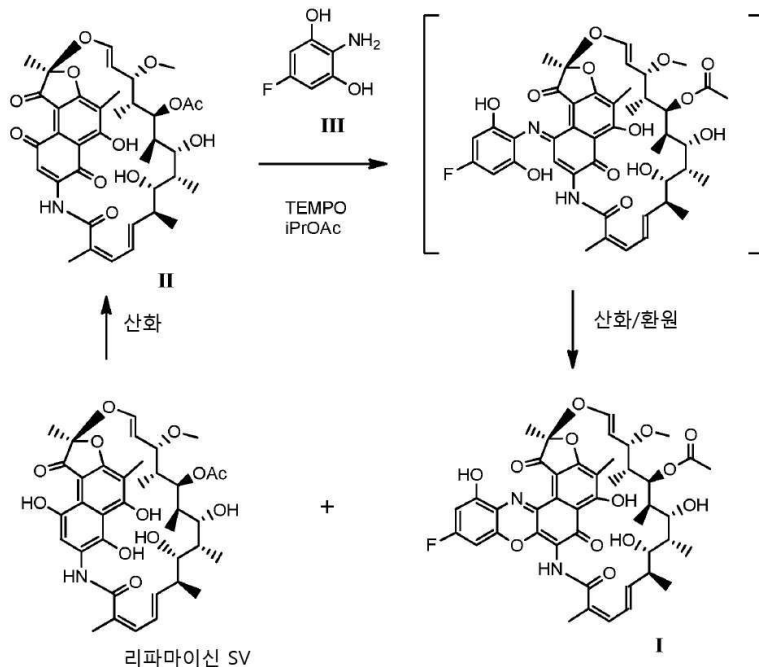
- [0053] 특정 구현예에서, 시스템인-가공된 항-WTA 항체를 생성시키는 것이 바람직할 수 있고, 이는, 예를 들어 항체의 하나 이상의 잔기가 시스템 잔기로 치환되는 "ThioMab"를 제조하는 것이 바람직할 수 있다. 특정 구현예에서, 치환된 잔기는 항체의 접근 가능한 부위에서 발생한다. 상기 잔기를 시스템으로 치환함으로써 반응성 티올기는 항체의 접근 가능한 부위에 위치하고 항체를 다른 모이어티, 예를 들어 항생제 모이어티 또는 링커-항생제 모이어티에 접합시켜 본원에 추가로 기재된 바와 같은 면역접합체를 생성하기 위해 사용될 수 있다. 특정 구현예에서, 하기의 잔기들 중 임의의 하나 이상은 시스템으로 치환될 수 있고, 이는 경쇄의 V205(캐뻏 넘버링(Kabat numbering)); 중쇄의 A118(EU 넘버링); 및 중쇄 Fc 영역의 S400(EU 넘버링)을 포함한다. 비제한적이고 예시적인 시스템인-가공된 항체는 항-WTA 항체의 중쇄 A118C 및 경쇄 V205C 돌연변이이다. 시스템인-가공된 항-WTA 항체는 하기 문헌에 기재된 바와 같이 생성될 수 있다: Junutula, et al., 2008b Nature Biotech., 26(8):925-932; US 7521541; US-2011/0301334.
- [0054] 본 발명의 항체-항생제 접합체(AAC)의 리파마이신형 항생제 모이어티는 세포독성 또는 세포 정지 효과를 갖는다. 리파마이신은 박테리움, *노카디아 메디테라네이(Nocardia mediterranei)*, *아미콜라토프시스 메디테라네이(Amycolatopsis mediterranei)*에 의해 천연적으로 또는 인위적으로 수득된 항생제 그룹이다. 이들은 박테리아 RNA 폴리머라제를 억제하는 더 큰 안사마이신(Ansamycin) 계열의 서브클래스이고(문헌 참고: Fujii et al (1995) Antimicrob.Agents Chemother. 39:1489-1492; Feklistov, et al (2008) Proc Natl Acad Sci USA, 105(39):14820-5), 그람-양성 및 선택적 그람-음성 박테리아에 대해 효능을 갖는다. 리파마이신은 특히 마이코 박테리아에 대해 효과적이고, 따라서 결핵, 한센병 및 마이코박테리움 아비움 복합체(MAC) 감염을 치료하기 위해 사용된다. 리파마이신형 그룹은 "전형적인" 리파마이신 약물을 포함할 뿐만 아니라, 리파마이신 유도체인 리팜피신[리팜핀(rifampin), CA 등록 번호: 13292-46-1], 리파부틴(rifabutin) (CA 등록번호: 72559-06-9; US2011/0178001), 리파펜틴(rifapentine) 및 리파라질(rifalazil)(문헌 참고: Rothstein et al (2003) Expert Opin. Investig. Drugs 12(2):255-271; Fujii et al (1994) Antimicrob. Agents Chemother.38:1118-1122; Yamane, T.; et al (1992) Chem. Pharm. Bull.,40:2707; (b) Yamane, T.; et al (1993) Chem. Pharm. Bull., 41:148-155)을 포함한다. 많은 리파마이신형 항생제는 해로운 내성 발달 특성을 공유한다(문헌 참고: Wichelhaus et al (2001) J. Antimicrob. Chemother. 47:153-156). 리파마이신은 스트렙토마이세스 메디테라네이(*Streptomyces mediterranei*)의 발효 배양액으로부터 1957년에 최초로 단리되었다. 약 7개의 리파마이신이 발견되었으며, 각각은 리파마이신 A, B, C, D, E, S 및 SV로 명명되었다(US 3150046). 리파마이신 B가 1960년에 최초로 상업적으로 도입되었으며, 약물 내성 결핵을 치료하는데 유용하였다. 다수의 이용 가능한 유사체 및 유도체로 인해, 리파마이신은 일반적으로 사용되는 항생제에 대해 내성을 갖고 있는 병원성 박테리아의 제거에 광범위하게 사용되고 있다.
- [0055] 벤족사지노리파마이신은 리파마이신의 유도체이다. 리파라질(KRM-1648, CA 등록번호: 129791-92-0)은 결핵 및 기타 세포내 병원체를 치료하기 위해 개발된 리파마이신형 항생제인 안사마이신의 부류 내의 벤족사지노리파마이신의 일레이다(문헌 참고: Rothstein, D.M. et al (2003) Expert Opinion Investig.Drugs 12(2):255-271; Rothstein, D.M. et al (2006) Expert Opinion Investig.Drugs 15(6):603-623; US 4983602; US 7342011; US 7678791). 리파마이신의 벤족사지노리파마이신 유도체는 이들의 항박테리아 특성으로 인해 알려져 있고(US 4690919; EP 0190709; US 4983602), 리파마이신 S에 의한 아미노레조르시놀 화합물의 산화적 고리화에 의해 제조될 수 있다(문헌 참고: Yamane, T.; et al (1992) Chem. Pharm. Bull.,40:2707; (b) Yamane, T.; et al (1993) Chem. Pharm. Bull.,41:148-155).
- [0056] 벤족사지노리파마이신 유사체 IV는 이의 높은 효능, 낮은 pH의 과고라이소솜에서의 변하지 않는 살균 활성, 세포내 공격을 견뎌내는 이의 능력 및 항체에 접합할 수 있는 이의 용이성으로 인해 선택되었다.
- [0057] 본 발명의 화합물은 물, 에탄올 등과 같은 약학적으로 허용 가능한 용매와 용매화된 형태뿐만 아니라 용매화되지 않은 형태로 존재할 수 있으며, 본 발명은 용매화된 형태 및 용매화되지 않은 형태 둘 모두를 포함하는 것으로 의도된다.
- [0058] 본 발명의 화합물은 또한 상이한 호변이체 형태로 존재할 수 있으며, 이 같은 모든 형태는 본 발명의 범주 내에 포함된다. "호변이체" 또는 "호변이체 형태"란 용어는 낮은 에너지 장벽을 통해 상호 호환 가능한 상이한 에너지를 갖는 구조 이성질체를 지칭한다. 예를 들어, 양성자 호변이체(양성자 이전 호변이체로도 알려짐)는 양성자의 이동을 통한 상호전환, 예컨대 케토-엔올 및 이민-에나민 이성화를 포함한다. 원자가 호변이체는 결합 전자들의 일부의 재구성에 의한 상호전환을 포함한다.

[0059] 본 발명의 화합물은 또한 본원에서 인용된 화합물과 동일한 동위원소로 표지된 화합물을 포함하지만, 자연에서 일반적으로 발견되는 원자 질량 또는 질량수와는 상이한 원자 질량 또는 질량수를 갖는 원자에 의해 하나 이상의 원자가 대체된다는 사실로 인해 알려졌다. 특정된 바와 같은 임의의 특정 원자 또는 원소의 모든 동위원소는 본 발명의 화합물 및 이의 용도의 범위 내로 상정된다. 본 발명의 화합물 내로 혼입될 수 있는 예시적인 동위원소로는  $^2\text{H}$ ,  $^3\text{H}$ ,  $^{11}\text{C}$ ,  $^{13}\text{C}$ ,  $^{14}\text{C}$ ,  $^{13}\text{N}$ ,  $^{15}\text{N}$ ,  $^{15}\text{O}$ ,  $^{17}\text{O}$ ,  $^{18}\text{O}$ ,  $^{32}\text{P}$ ,  $^{33}\text{P}$ ,  $^{35}\text{S}$ ,  $^{18}\text{F}$ ,  $^{36}\text{Cl}$ ,  $^{123}\text{I}$  및  $^{125}\text{I}$ 와 같은 수소, 탄소, 질소, 산소, 인, 황, 불소, 염소 및 요오드의 동위원소를 들 수 있다. 본 발명의 동위원소로 표지된 특정 화합물 (예를 들어,  $^3\text{H}$  및  $^{14}\text{C}$ 로 표지된 화합물)은 화합물 및/또는 기질 조직 분포 검정에 유용하다. 삼중 수소화( $^3\text{H}$ ) 및 탄소-14( $^{14}\text{C}$ ) 동위원소는 이들의 제조 용이성 및 검출성으로 인해 유용하다. 게다가, 중수소(즉,  $^2\text{H}$ )와 같은 더 무거운 동위원소에 의한 치환은 더 큰 대사 안정성으로부터 유래하는 특정 치료학적 이점(예를 들어, 생체 내 반감기의 증가 또는 투약 요건의 감소)을 제공할 수 있으며, 따라서 일부 상황에서는 바람직할 수 있다.  $^{15}\text{O}$ ,  $^{13}\text{N}$ ,  $^{11}\text{C}$  및  $^{18}\text{F}$ 와 같은 양전자 방사 동위원소는 기질 수용체 점유를 조사하기 위한 양전자 방사 단층촬영(PET) 연구에 유용하다. 본 발명의 동위원소로 표지된 화합물은 비-동위원소로 표지된 시약에 대해 동위원소로 표지된 시약을 치환함으로써 본원에 개시된 하기 실시예에 개시된 과정과 유사한 하기 과정에 의해 일반적으로 제조될 수 있다.

[0060] 항체-리파마이신 접합체에 대한 중간체의 제조를 위한 출발 물질 및 시약은 일반적으로 상업적 공급원으로부터 이용 가능하거나, 당해 기술분야의 숙련자에게 널리 공지된 방법을 이용하여 용이하게 제조된다(예를 들어, 하기 문헌에 일반적으로 개시된 방법에 의해 제조됨: Louis F.Fieser and Mary Fieser, *Reagents for Organic Synthesis*, v.1-27, Wiley, N.Y.(1967-2013 ed.), 또는 *Beilsteins Handbuch der organischen Chemie*, 4, Aufl. ed. Springer-Verlag, Berlin, 보충판 (supplements) 포함 [바일슈타인 온라인 데이터베이스(Beilstein online database)를 통해 또한 이용 가능함].

[0061] 하기 반응식 1 내지 3에는 화학식 I의 합성을 위한 화학 반응, 공정 및 방법, 특정 중간체 및 시약이 예시되어 있으며, 이들 모두는 본 발명의 구현예를 형성한다.

[0062] [반응식 1]



[0063] 반응식 1은 화학식 I의 F-벤젠사지노리파마이신을 제공하기 위해, 화학식 III의 2-아미노-5-플루오로벤젠-1,3-디올에 의해 화학식 II의 리파마이신 S를 산화적 고리화하는 것을 나타낸다. 상기 공정의 임의의 기작에 의해 제한되지 않도록 추정된 이민 축합 중간체 또는 이의 호변이체는 화학식 I 및 리파마이신 SV로 이어진다(문헌 참고: Kump, W. et al (1973) *Helv. Chim. Acta* 56:2348-2377). TEMPO를 제외한 기타 산화제(Kaizer et al (2002) *Jour. Mol. Cat.*180:91-96)는 화학식 II의 리파마이신 S를 화학식 I의 F-벤젠사지노리파마이신으로 전환

시켰으며, 이는 주위 공기, 산소 기체, 벤조퀴논, 산화망간(MnO<sub>2</sub>), (PhI(OTs)OH), 과요오드산 나트륨(NaIO<sub>4</sub>), 클로라닐, 하이포아염소산 나트륨(NaOCl), 과산화수소(H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub>, Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>8</sub>, Co(acac)<sub>3</sub>, Mn(acac)<sub>2</sub>, Cu(OAc)<sub>2</sub>, CuO, CuBr<sub>2</sub>, ZnCl<sub>2</sub>, InCl<sub>3</sub>, Ag(OTf)<sub>2</sub>, Sc(OTf)<sub>3</sub> 및 Yb(OTf)<sub>3</sub>을 HPLC(실시예 3)로 산정할 때 16% 내지 81%의 수율로 포함한다. TEMPO 유사체는 또한 화학식 II의 화학식 I로의 전환에 효과적이며, 이는 4-아미노, 4-벤질옥시, 4-아세트아미도 및 4-하이드록실 TEMPO, 2-아자아다만탄-N-옥실(아자도, 시그마-알드리히(Sigma-Aldrich)) 및 실리카겔 상의 TEMPO(시그마-알드리히)를 포함한다. 에틸 아세테이트, 톨루엔, 메탄올 및 테트라하이드로푸란을 포함한, 이소프로필 아세테이트(iPrOAc)를 제외한 기타 용매가 사용될 수 있다.

[0065] 도 1은 반연속 루프 공정에 의해 화학식 I의 F-벤족사지노리파마이신(반응식 1)을 제공하기 위해, 화학식 III의 2-아미노-5-플루오로벤젠-1,3-디올에 의한 화학식 II의 리파마이신 S의 산화적 고리화를 위한 일반 공정에 대한 개략도를 나타낸다. 하나의 구현예에서는, 산소 유동 및 산화제로서 TEMPO가 사용된다(실시예 3.3). 하나의 구현예에서, 상기 산소 기체는 반응 기체상에 대해 약 1% 내지 약 100%를 포함한다. 하나의 구현예에서, 산소가 상기 기체에 대해 5 내지 100 v/v%를 포함하는 산소와 질소의 혼합물은 산화제로서 사용된다. 다른 구현예에서는, 산화제로서 벤조퀴논이 사용된다(실시예 3.1). 반연속 시스템에 따르면, 화학식 III의 비생산적인 산화를 피하기 위해 상기 산화제 및 화학식 III의 레조르시놀을 분리된 상태로 유지되는 것이 보장된다. HCl 염처럼 안정할지라도, 유리 염기로서 2-아미노벤젠-1,3-디올은 산소에 대해, 특히 용액 중에서는 안정하지 않다(문헌 참고: Yamane, T.; et al (1992) Chem. Pharm. Bull., 40:2707; (b) Yamane, T.; et al (1993) Chem. Pharm. Bull., 41:148-155). 화학식 III과 같이 5번 위치에서의 2-아미노벤젠-1,3-디올의 플루오르화(fluorination)는 더 큰 안정성을 부여한다. 상기 루프 시스템에 따르면 산화 도중에 생성된 리파마이신 S가 재생되어 화학식 III의 부가적인 레조르시놀과 추가로 반응한다는 것이 보장된다. 화학식 II의 리파마이신 S 및 화학식 III의 레조르시놀은(추정되는 이민 중간체를 제공하기 위해) 배치 반응기 내에서 20 내지 60°C에서 이소프로필 아세테이트와 같은 용매 중에서 예비-혼합되며, 이는 부분적으로는 화학식 I의 F-벤족사지노리파마이신 및 리파마이신 SV를 형성한다(도 1). 리파마이신 SV는 화학식 II의 환원된 형태이다. 이어 상기 혼합물에는 0 내지 60°C에서 산화 루프가 적용되며, 이는(리파마이신 SV로부터) 화학식 II를 개질한다. 이어 부분 전환 혼합물은 추가의 화학식 III으로 처리되며, 이는 더욱 많은 화학식 II의 재형성된 리파마이신 S를 소비하여 화학식 I 및 리파마이신 SV를 제공한다. 상기 혼합물에는 산화 루프가 적용되며, 상기 반응이 완료된 것으로 간주될 때까지 레조르시놀을 첨가한다. 화학식 III의 레조르시놀은 단계적 모드 또는 연속 모드로 첨가될 수 있다. 상기 반응이 끝날 무렵에 상기 혼합물은 아스코르브산의 물 용액으로 추출한 후, 물로 추출한다. 유기상은 완전 건조 시까지 증발하고, 잔류물은 DCM/MeOH 중에 용해하며, 실리카겔 상에서 크로마토그래피한다. 이어, 생성물은 MeOH/물로부터 재결정화한다.

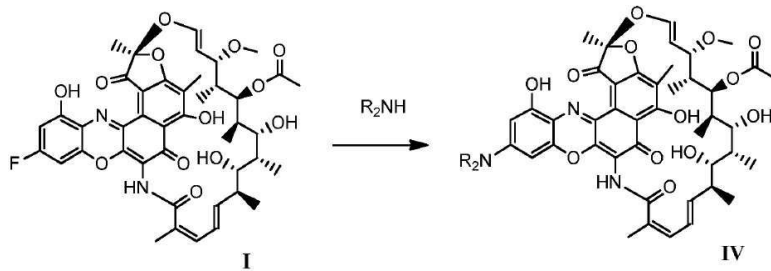
[0066] 2개의 반응 절편의 분리는 (a) 연속 교반 탱크에서 화학식 II 및 화학식 III의 중간체로의 효율적인 전환 후, 화학식 I 및 리파마이신 SV의 형성을 포함하는 산화/환원 단계를 가능케 하고, (b) 화학식 III의 산화적 소비를 피하기 위해 플러그 유동 칼럼에서 리파마이신 SV의 화학식 II로의 산화를 가능케 한다. 상기 반응은 화학식 II의 화학식 I로의 전환을 완성하기 위해 다중 주기로 진행된다.

[0067] 하나의 구현예에서, 이중 재킷 유리 반응기는 T형 분지관(T-junction)을 경유하여 정적 혼합 요소가 구비된 유동 반응기에 연결된다(실시예 3.4). 상기 T형 분지관의 제 3 단부는 산화제 용액을 투여하는 펌프에 연결된다. 상기 유동 반응기의 유출구는 이중 재킷 유리 반응기와 연결된다. 화학식 II 및 화학식 III의 시약은 유리 반응기 내에서 약 20 내지 60°C에서 iPrOAc와 하룻밤 동안 혼합한다. 상기 용액은 산화제 용액과 함께 유동 반응기 상으로 펌핑된다. 상기 유동 반응기는 약 -5 내지 5°C의 유출 온도로 유지된다. 유출 용액은 이중 재킷 유리 반응기로 다시 펌핑된다(루프 공정). 상기 루프는 약 8시간의 기간 동안 운행한다. 이어, 레조르시놀은 유리 반응기 내로 첨가되고, 하룻밤 동안 반응시킨다(주기 1). 상기 루프 공정을 다시 시작한다. 상기 주기를 총 3회 실시한다.

[0068] 다른 구현예에서, 재킷 유리 용기는 배치-연속 루프 공정 반응에서 T형 분지관을 경유하여 유동 반응기 및 산화제 공급장치에 연결된다(실시예 3.3). 상기 유동 반응기는 냉각 코일을 경유하여 기체/액체 분리 플라스크에 연결된다. 상기 분리 플라스크는 재킷 유리 용기에 연결된다. 필터는 상기 분리 플라스크와 재킷 용기 사이에 배치된다. 상기 산화 루프의 액체 부분은 연동 펌프의 원조 하에 냉각 용기에 다시 펌핑된다. 샘플링 밸브는 이러한 펌프 바로 다음에 배치된다. 레조르시놀 용액은 재킷 유리 반응기 내로 공급된다. 산소 유동은 기체 질량 유동 제어기에 의해 제어된다. 상기 재킷 유리 반응기에서, 화학식 II의 리파마이신 S 및 TEMPO는 이소프로필아세테이트(iPrOAc)에 용해되고, 용기 온도는 약 50°C로 설정된다. 이소프로필 아세테이트 중의 화학식 III의 레조르시놀 용액은 60분 동안 혼합하면서 용기 내로 공급된다. 이어, 상기 혼합물은 60°C에서 산소와 함께 유동 반응

기를 통해 펌핑되고, 루프 공정은 레조르시놀 공급을 일정하게 유지하면서 시작된다. 상기 루프는 6 내지 8시간 동안 운행한다.

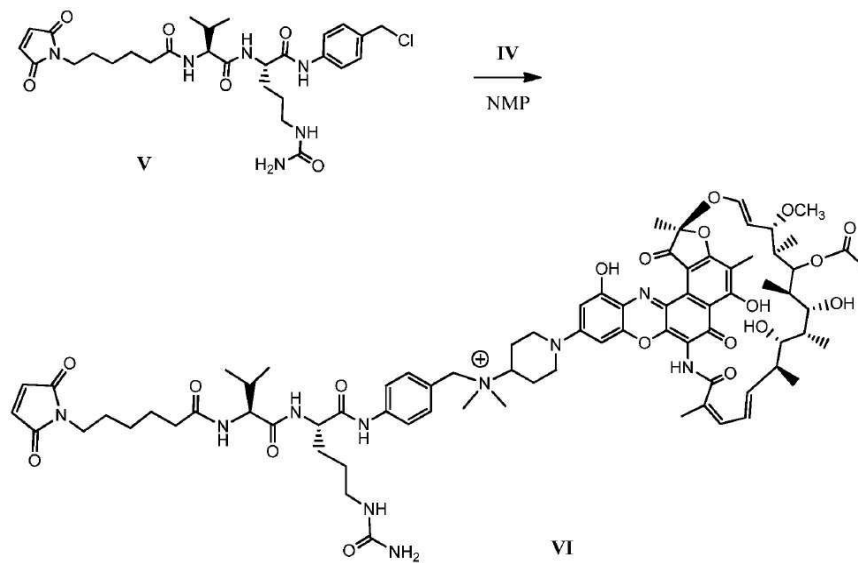
[0069] [반응식 2]



[0070]

[0071] 반응식 2는 화학식 IV의 아미노-벤족사지노리파마이신 유사체를 제공하기 위해, 2차 아민인 R<sub>2</sub>NH (여기서, R은 다양한 알킬 및 환형 치환기로부터 독립적으로 선택됨)에 의해 화학식 I의 F-벤족사지노리파마이신으로부터 불소 치환기를 친핵성 치환하는 것을 나타낸다. 2차 아민인 R<sub>2</sub>NH로는 디메틸아민, 디에틸아민, 디-n-프로필아민, 1-메틸피페라진, N1-이소부틸피페라진 및 N,N-디메틸피페리딘-4-아민을 들 수 있지만, 이에 제한되지 않는다. 화학식 IV의 벤족사지노리파마이신 유사체는 (US 7547692의 칼럼 13에 있는 관례를 따른) 5' 위치에서 리파라질의 N-이소부틸피페라진기를 N,N-디메틸피페리딘-4-아민이 포함한 3차 아민으로 치환되어 있다 (US 7265107; US 7271165; US 7884099).

[0072] [반응식 3]

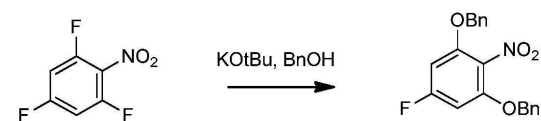


[0073]

[0074] 반응식 3은 화학식 VI의 링커-항생제를 생성하기 위한, 화학식 IV의 3차 아민 리파라질 유사체에 의한 화학식 V의 링커 클로라이드의 알킬화를 나타낸다.

[0075] 실시예

[0076] 실시예 1: (((5-플루오로-2-니트로-1,3-페닐렌)비스(옥시)비스(메틸렌))디벤젠

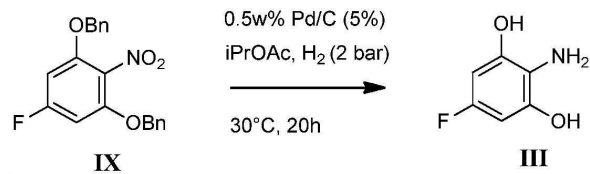


[0077]

[0078] THF(300ml) 중의 포타슘 터트-부톡시드(66.5g, 593mmol) 현탁액에 THF(60ml) 중의 페닐메탄올(벤질 알코올, 66.3g, 613mmol) 용액을 20분의 기간 동안 적가하여 황색 용액을 얻었다. 소듐 터트-부톡시드, 포타슘 이소프로폭시드, 소듐 이소프로폭시드, 포타슘 에톡시드, 소듐 에톡시드, 포타슘 메톡시드 및 소듐 메톡시드와 같은 기타 알콕시드 시약을 사용할 수 있다. 대안적으로는, 2-메틸테트라하이드로푸란 또는 디이소프로필에테르와 같은

기타 에테르 용매를 사용할 수 있다. 대안적으로는, 1 내지 4℃의 내부 온도에서 2h(두 시간)의 기간에 걸쳐 THF 중의 1M 리튬 헥사메틸디실라잔(LiHMDS) 용액에 페닐메탄올을 첨가할 수 있다. 2-Me-THF(400ml) 중의 1,3,5-트리플루오로-2-니트로 벤젠(CAS 등록번호: 315-14-0)(50.0g, 282mmol)의 투명 용액에 0 내지 10℃의 내부 온도에서 1시간의 기간에 걸쳐 테플론 캐눌라 (teflon cannula)를 경유하여 이러한 황색 용액을 적가하고, 상기 얻어진 다황색 용액을 0 내지 5℃에서 1시간 동안 교반하였다. 대안적으로는, 1,3,5-트리플루오로-2-니트로 벤젠을 THF 중에 용해할 수 있다. 이어, 물(500ml) 및 NaCl 용액 (30ml, 포화됨)을 첨가하고, 상을 분리하였다. 2-Me-THF(250ml)로 수상을 추출한 반면, 염수(600ml)로 유기상을 세척하였다. 대안적으로는, 디클로로메탄으로 상기 수상을 추출할 수 있다. 상기 유기상을 합쳐 Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 상에서 건조시키고, 생성물의 결정화가 시작할 때까지 황색의 투명 용액을 진공 하에서 농축하였다. 이어, 2-Me-THF(150ml) 및 EtOH(500ml)을 첨가하고, 현탁액을 빙욕(ice bath)에서 3시간 동안 교반하였다. 결정을 여과하고, 냉각된 *n*-헵탄(200ml)으로 세척하고, 중량 향상에 도달할 때까지 진공 하에 건조시켜, 연황색 고체로서 (((5-플루오로-2-니트로-1,3-페닐렌)비스(옥시))비스(메틸렌))-디벤젠(CAS 등록번호: 1639352-18-3; 91.6g, 1,3,5-트리플루오로-2-니트로 벤젠에 대해 89.9%)을 수득하였다. 용점: 117.8-119.4 °C. <sup>1</sup>H-NMR (CDCl<sub>3</sub>): δ 7.44-7.27 (, 10H), 6.37 (d, J= 10.2 Hz, 2H), 5.18-5.06 (m, 4H). MS(ESI):352.1 [M-H]<sup>-</sup>. C<sub>20</sub>H<sub>16</sub>FNO<sub>4</sub>에 대한 분석 산정치: C 67.98, H 4.56, N 3.96; 실측치 C 67.89, H 4.50, N 3.94.

[0079] 실시예 2: 2-아미노-5-플루오로-벤젠-1,3-디올 (화학식 III)

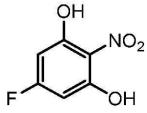


[0080]

[0081] 50리터 오토클레이브(autoclave)에 화학식 IX의 (((5-플루오로-2-니트로-1,3-페닐렌)비스(옥시))비스(메틸렌))-디벤젠(CAS 등록번호: 1639352-18-3)(3.0kg, 8.49mol), Pd/C E101 N/D, 5% Pd 촉매 (15g) 및 iPrOAc (829kg)을 연속적으로 로딩하고, 상기 오토클레이브를 Ar으로 퍼징(purging)한 후, 수소 기체(H<sub>2</sub>)로 퍼징하였다. 상기 Pd/C 촉매는 매트릭스 활성 탄소, 습식 지지체, 대구사(Degussa)형 E101 NE/W, E101 N/D, E105R/W(에보니크 인터스트리스(Evonik Industries), 존슨 매튜(Johnson Matthey)), 타입 128M(에보니크 인터스트리스), 5207 Escat 162(바스프(BASF)), Noblyst® P1070 또는 Noblyst® P1090(에보니크 인터스트리스)일 수 있다. 기타 이종 금속 촉매는 탄소 또는 알루미늄 지지체 상의 팔라듐, 백금, 또는 루테튬과 같은 벤질 및 니트로기의 환원을 위해 사용될 수 있다. 이어, 수소 압력을 2 bar로 조절하고, 반응 혼합물을 28 내지 32℃까지 교반 하에 가열한 후, 이러한 온도에서 21시간 동안 수소화하였다. 상기 반응 혼합물을 주위 온도까지 냉각시키고, 압력을 조심스럽게 해소하였다. 상기 반응은 5-플루오로-2-니트로벤젠-1,3-디올과 같이 부분적으로 환원된 니트로 또는 벤질 중간체를 단리하고, 수소 기체 및 이종 금속 촉매를 이용한 추가적인 처리를 수행하여, 화학식 III을 수득하는 2 개 이상의 단계로 수행될 수 있다.

[0082] 상기 반응 혼합물을 Ar 하에 여과하고, 상기 오토클레이브 및 필터를 iPrOAc로 세척한 후, 조절의 수소화 용액을 2개의 유사한 수소화 운행의 생성물 용액과 통합하였다. 이어, 상기 용매를 진공 하에서 부분적으로 제거하였으며, 그 결과 상기 생성물이 침전하기 시작하였다. 이어, *n*-헵탄(40 l)을 첨가하고, 현탁액을 0 내지 5℃까지 냉각한 후, 이러한 온도에서 18시간 동안 교반하였다. 상기 현탁액을 예비-냉각된 (0 내지 5℃) 필터 건조기 내로 전달하고, 결정을 *n*-헵탄(15 l, 냉각됨)으로 세척하고, 진공 하에 건조시켜 베이지색 고체로서 화학식 III의 2-아미노-5-플루오로-벤젠-1,3-디올(CAS 등록번호: 16393406-55-5)(3.0kg, 출발 물질에 대해 81.9%)을 수득하였다. <sup>1</sup>H-NMR (d<sub>6</sub>-DMSO): δ 10.18-7.54 (m, 1H), 6.05 (d, J= 7.0 Hz, 2H), 3.96 (br d, J= 10.4 Hz, 1H). <sup>13</sup>C-NMR (d<sub>6</sub>-DMSO): δ 154.6 (d, J = 230.3 Hz, <sup>1</sup>C), 145.4, 145.3, 120.3, 99.6, 99.1. MS (EI<sup>+</sup>): m/z 143.0 (M<sup>+</sup>, 100%). C<sub>6</sub>H<sub>6</sub>FNO<sub>2</sub>에 대한 분석 산정치: C 50.35, H 4.23, N 9.79; C 50.36, H 4.33, 실측치 N 9.72.

[0083] 대안적으로는, GC 분석에 의해 근접 정량적 수율 및 >95% 순도로 오렌지색 고체로서 탈벤질화된 니트로 디올 중간체인 이하의 화학식의 5-플루오로-2-니트로벤젠-1,3-디올을 단리하기 위해 화학식 IX의 환원을 중단할 수 있다:



[0084]

[0085] <sup>1</sup>H-NMR (d<sub>6</sub>-DMSO) δ 11.20 (s, 2 H), 6.24 (d, 2 H). C<sub>6</sub>H<sub>4</sub>FNO<sub>4</sub>에 대한 분석 산정치: C 46.63, H 2.33, N 8.09; 실측치 C 41.58, H 2.52, N 8.04. 광범위한 탄소 분산형 팔라듐, 백금, 백금-바나듐 및 니켈 이중 금속 촉매(Pt/C, Pt.V/C, Ra-Ni (레이니 니켈) 및 Ra-Co를 포함함)에 의한 이중 수소화에 의해 5-플루오로-2-니트로벤젠-1,3-디올을 화학식 III으로 환원하였다.

[0086] 실시예 3: F-벤족사지노리파마이신 (화학식 I)

[0087] 3.1 벤조퀴논을 이용한 완전 배치 공정(full batch process)

[0088] 500ml 유리 반응기 내에서 화학식 II의 리파마이신 S (ChemShuttle Inc., Fremont, CA, US 7342011; US 7271165; US 7547692로부터 상업적으로 이용 가능함)(13.92g, 20mmol), 화학식 III의 2-아미노-5-플루오로벤젠-1,3-디올 (4.9g, 34mol, 1.6 당량) 및 벤조퀴논(2.38g, 24mmol, 1.2 당량)을 iPrOAc(185mL) 중에 용해한다. 상기 용액을 25°C에서 40시간 동안 교반한다. 상기 용액을 연마 여과한 후, 여액을 건조 시까지 증발시켜 25.3g의 화학식 I의 조질의 F-벤족사지노리파마이신을 수득하였다(29.2%의 수율, 18.93%의 순도). MS (EI<sup>+</sup>): m/z 817.6 (M<sup>+</sup>, 15%). HPLC/MS(방법 A): 5.32분

[0089] HPLC (방법 A):

[0090] 샘플 제조: 100ml의 아세토니트릴 중의 50mg의 물질

[0091] 시스템: 아질린트 1200, 2성분

[0092] 용출물 A: ACN/H<sub>2</sub>O 9:1 +0.25% TFA

[0093] 용출물 B: ACN/H<sub>2</sub>O 1:9 +0.25% TFA

[0094] 칼럼: x-브릿지 C18 4.6×50mm, 2.5μm

[0095] 유동: 1.5mL/분

[0096] 주입 10μl

[0097] λ: 220nm.

[0098] 칼럼 온도:40°C

[0099] 구배:

표 1

[0100]

시간(분)	A[%]	B[%]
0.00	17.5	82.5
6.00	95	5
7.00	95	5

[0101] 사후 시간: 3분

[0102] 3.2 벤조퀴논을 이용한 배치 공정

[0103] 500ml 유리 반응기 내에서 화학식 II의 리파마이신 S (20.0g, 29mmol), 화학식 III의 2-아미노-5-플루오로벤젠-1,3-디올 (4.9g, 35mmol, 1.2 당량)을 iPrOAc (300mL) 중에 용해한다. 상기 용액을 25°C에서 하룻밤 동안 교반한다. 이어, 상기 용액을 -5.0°C까지 냉각시키고, 벤조퀴논의 iPrOAc 용액(1.86g, 17mmol, 45mL 용매 중 0.6 당량)을 8시간에 걸쳐 첨가한다. 이어, 부가적인 레조르시놀(2.5g, 17mmol, 1.2 당량)을 25°C에서 첨가하고, 혼합물을 하룻밤 동안 반응시켰다. 이 시간 이후에 벤조퀴논(0.93g, 9mmol, 22.5mL 중 0.3 당량)의 iPrOAc 용액을

4시간에 걸쳐 첨가하였다. 레조르시놀 및 벤조퀴논의 후속적인 첨가는 하기의 표 2에 따라서 총 3회의 주기로 반복한다:

표 2

주기(n회)	화학식 III의 양	벤조퀴논의 양	투여 시간
1	2.5g	1.86g	8시간
2	1.2g	0.93g	4시간
3	0.6g	0.93g	4시간

[0105] 일단 상기 주기가 완료되면, 아스코르브산(100ml, 10% w/w) 수용액으로 상기 반응 혼합물을 추출한 후, 물(100ml)로 3회 추출한다. 유기상을 건조 시까지 증발시켜 흑색 포말로서 33.7g의 화학식 I의 조질의 F-벤족사지노리파마이신(73.1%의 수율, 51.0%의 순도)을 수득하였다. MS (EI<sup>+</sup>): m/z 817.6 (M<sup>+</sup>, 89%). HPLC/MS(방법 A): 5.34 분.

[0106] 3.3 산소 기체 및 TEMPO를 이용한 배치 공정

[0107] 1.5L 유리 반응기 내에서 화학식 II의 리파마이신 S(40.0g, 58mmol), 화학식 III의 2-아미노-5-플루오로벤젠-1,3-디올 (20.6g, 144mmol, 2.5 당량)을 iPrOAc (600mL) 중에 용해한다. 상기 혼합물을 아르곤 하에 60°C에서 2시간 동안 교반한다. 이 시간 이후에 2,2,6,6-테트라메틸-1-피페리딘옥시, 유리 라디칼, TEMPO (Kaizer et al (2002) Jour. Mol. Cat. 180:91-96)(0.90g, 5.8mmol, 0.1 당량)을 첨가하고, 아르곤을 산소 기체 O<sub>2</sub> (N<sub>2</sub> 중의 5 v/v %) 유속(400 mL/분)로 교체한다. 반응 혼합물을 60°C에서 22시간 동안 교반한다. 상기 혼합물이 실온까지 냉각되도록 방치하며, 따라서 종이 필터 상에서 여과된다. 상기 필터를 에틸 아세테이트(300mL)로 세척한다. 여액을 수집하고, Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>3</sub> 수용액(10% w/w, 100mL) 및 염수(100mL)로 추출한다. 상기 유기상을 수집하고, 건조 시까지 증발시킨다. 상기 잔류물은 2% v/v MeOH(150mL)를 포함하는 DCM 중에 용해하고, 실리카겔(250g, 용출물: 2% v/v MeOH를 포함하는 DCM) 상에서 크로마토그래피한다. 상기 생성물을 함유하는 분획을 건조 시까지 증발시켜, 암적색 고체로서 22.3g의 화학식 I의 F-벤족사지노리파마이신(45%의 수율, 95%의 순도)을 수득하였다. <sup>1</sup>H NMR (600 MHz, CHCl<sub>3</sub>): δ 14.42-14.33 (m, 1H), 10.29-10.00 (m, 1H), 6.77-6.62 (m, 1H), 6.58-6.48 (m, 1H), 6.39-6.35 (m, 1H), 6.10-4.60 (m, 4H), 4.04-3.90 (m, 1H), 3.61 (s, 1H), 3.50 (s, 1H), 3.35 (s, 1H), 3.11 (s, 1H), 2.33 (s, 1H), 2.29 (s, 1H), 2.23 (s, 2H), 2.16-2.11 (m, 6H), 2.05 (d, J = 18Hz, 2H), 1.78 (d, J = 12 Hz, 2H), 1.58-1.54 (m, 6H), 1.37-0.51 (m, 13H). HRMS: m/z 818.3061 (산정된 질량:818.3062). HPLC(방법 B): 5.86분

[0108] HPLC 방법 B:

[0109] 샘플 제조: 1ml의 아세토니트릴 중의 2mg의 물질

[0110] 시스템: 아질런트 1200, 2성분

[0111] 용출물 A: H<sub>2</sub>O

[0112] 용출물 B: ACN

[0113] 용출물 C:H<sub>2</sub>O 중의 0.1% TFA

[0114] 칼럼: x-브릿지 C18 4.6×50mm, 2.5 μm

[0115] 유동: 1.5 mL/분

[0116] 주입 2 μl

[0117] λ: 220nm.

[0118] 칼럼 온도: 40°C

[0119] 구배:

표 3

[0120]

시간(분)	A[%]	B[%]	C[%]
0.00	75	20	5
6.00	10	85	5
9.00	10	85	5

[0121]

3.4 벤조퀴논을 이용한 루프 공정

[0122]

이중 재킷 유리 반응기는 T형 분지관을 경유하여 정적 혼합 요소가 구비된 유동 반응기에 연결된다. 상기 T형 분지관의 제 3 단부는 산화제 용액을 투여하는 펌프에 연결된다. 상기 유동 반응기의 유출구는 이중 재킷 유리 반응기와 연결된다. 18L 유리 반응기 내에서, 화학식 II의 리파마이신 S(200.4g, 288mmol) 및 화학식 III의 2-아미노-5-플루오로벤젠-1,3-디올 (49.5g, 347mmol, 1.2 당량)을 *i*PrOAc (3.0L) 중에 용해한다. 상기 용액을 25℃에서 하룻밤 동안 교반한다. 대안적으로는, 화학식 II 및 화학식 III을 유리 반응기 내에서 *i*PrOAc와 함께 20 내지 60℃에서 하룻밤 동안 혼합한다. 이어, 상기 용액을 구조형 혼합기-유동 반응기 (V = 130ml) 내의 *i*PrOAc 중의 벤조퀴논 용액(세부사항을 위해 표 참조)과 함께 유동 반응기 상에 -5.0 내지 5.0℃에서 펌핑한다(5.2 L/h). 이어, 상기 얻어진 용액을 25℃로 유지되는 배치 반응기로 다시 펌핑한다. 상기 루프 공정은 벤조퀴논 투여 시간 동안에 운행한다(표 참조). 그 이후, 부가적인 레조르시놀(24.7g, 173mmol, 0.6 당량)을 25℃에서 첨가하고, 혼합물을 하룻밤 동안 반응시킨다. 벤조퀴논 및 레조르시놀의 후속적인 첨가는 하기 표 4에 따라서 총 3회 반복한다.

표 4

[0123]

주기(n회)	화학식 III의 양	벤조퀴논의 양	투여 시간
1	24.7g	18.7g	10시간
2	12.4g	9.3g	8시간
3	6.2g	9.3g	8시간

[0124]

일단 상기 주기가 완료되면, 아스코르브산(1.0L, 10% w/w) 수용액으로 상기 반응 혼합물을 추출한 후, 물(1.0 L)로 3회 추출한다. 유기상을 건조 시까지 증발시킨다. 잔류물을 2% v/v MeOH(2.0L)를 포함하는 DCM 중에 용해하고, 실리카겔(3.0kg, 용출물: 2% v/v MeOH를 포함하는 DCM, 32L) 상에서 크로마토그래피한다. 상기 생성물을 함유하는 분획을 건조 시까지 증발시킨다. 186.4g의 생성물(81.5%의 수율, 85.5%의 순도)은 흑색 포말로 수득된다. 상기 포말을 40℃에서 메탄올(8.0L) 중에 용해한 후, 물(4.8L)를 4시간에 걸쳐 첨가한다. 현탁액을 40℃에서 2시간 동안 방치한 후, 이를 8시간 동안 0℃까지 냉각시키고, 이러한 온도에서 2시간 동안 방치한다. 상기 현탁액을 여과하고, 물(0.5L)과 메탄올(0.3L)의 용액으로 세척한 후, 물(0.8L)로 세척한다. 흑색 결정을 진공 구획 건조기 내에서 10mbar에서 40시간 동안 건조시킨다. 암적색 결정으로서 148.8g의 화학식 I의 F-벤족사지노 리파마이신이 수득된다(63.4%의 수율, 97.4%의 순도). <sup>1</sup>H NMR (600 MHz, CHCl<sub>3</sub>): δ 14.42-14.33 (m, 1H), 10.29-10.00 (m, 1H), 6.77-6.62 (m, 1H), 6.58-6.48 (m, 1H), 6.39-6.35 (m, 1H), 6.10-4.60 (m, 4H), 4.04-3.90 (m, 1H), 3.61 (s, 1H), 3.50 (s, 1H), 3.35 (s, 1H), 3.11 (s, 1H), 2.33 (s, 1H), 2.29 (s, 1H), 2.23 (s, 2H), 2.16-2.11 (m, 6H), 2.05 (d, J = 18Hz, 2H), 1.78 (d, J = 12 Hz, 2H), 1.58-1.54 (m, 6H), 1.37-0.51 (m, 13H). HRMS: m/z 818.3069 (산정된 질량: 818.3062). HPLC/MS(방법 A): 5.35분

[0125]

3.5 TEMPO를 이용한 배치 공정

[0126]

질소 기체 하에 반응기에 *i*-PrOAc(355g), 화학식 II의 리파마이신 S(40.0g, 57.5mmol) 및 2,2,6,6-테트라메틸-1-피페리디닐옥시 유리 라디칼(TEMPO)(9.0g, 57.6mmol)을 충전하였다. 상기 반응기 내용물을 1시간 동안 60℃까지 가온한 후, 1시간에 걸쳐 *i*-PrOAc(266g) 중에 용액으로서 화학식 III의 2-아미노-5-플루오로-벤젠-1,3-디올 (8.0g, 55.9mmol)을 충전하였다. 추가의 TEMPO(9.0g, 57.6mmol)를 첨가하고, 혼합물을 60℃에서 1시간 동안 교반하였다. 화학식 III의 부가적인 2-아미노-5-플루오로-벤젠-1,3-디올(8.0g, 55.9mmol)을 1시간에 걸쳐 *i*-PrOAc(266g) 중에 용액으로 충전한 후, 이러한 온도에서 2시간 동안 교반하였다. *i*-PrOAc(10g) 중의 추가의 TEMPO(1.8g, 11.5mmol)를 첨가하고, 혼합물을 60℃에서 1시간 동안 교반하였다. 화학식 III의 부가적인 2-아미노-5-플루오로-벤젠-1,3-디올(1.6g, 11.2mmol)을 1시간에 걸쳐 *i*-PrOAc(60g) 중에 용액으로서 충전한 후, 2시간 동안 혼합하였다. 화학식 III의 2-아미노-5-플루오로-벤젠-1,3-디올(1.6g, 11.2mmol)의 최종 충전물을 1시간에

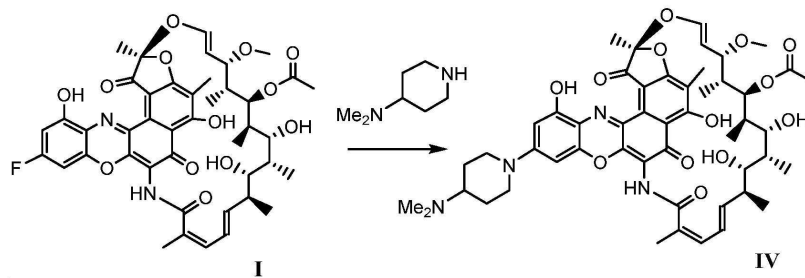
걸쳐 *i*-PrOAc(60g) 중에 용액으로서 첨가한 후, 60℃에서 2시간 동안 혼합하였다.

[0127]

배치는 진공 증류 하에 50% 용적까지 농축하였다. 20 내지 25℃까지 냉각시킨 후, 헵탄(410g)을 충전하고, 혼합물을 실리카(160g)의 패드를 통해 여과하고, 셀라이트®(Celite®; 40g) 패드로 덮었다. 상기 패드를 1:1의 헵탄/*i*-PrOAc(943g)로 세척하고, 모은 여액을 5% 용적까지 농축하였다. 일단 20 내지 25℃까지 냉각되면, *i*-PrOAc(71g)를 충전한 후, 1시간에 걸쳐 헵탄(129g)을 충전한다. 슬러리를 여과하기 전에 상기 내용물을 20 내지 25℃에서 3시간 동안 교반하였다. 케이크(cake)를 새로운 반응기로 전달하기 전에, 3:1의 헵탄/*i*-PrOAc(39g)로 세척하였다. 습식 재료를 *i*-PrOAc(73g) 중에 용해하고, 헵탄(129g)을 첨가하기 전에 1시간에 걸쳐 20 내지 25℃에서 교반하였다. 슬러리를 여과하고 케이크를 3:1의 헵탄/*i*-PrOAc(39g)로 세척하기 전에, 상기 내용물을 20 내지 25℃에서 3시간 동안 교반하였다. 상기 최종 습식 케이크를 진공 하에 건조시켜 화학식 I의 F-벤족사지노리파마이신(23.5g, 50.0%의 수율)을 생성하였다. <sup>1</sup>H NMR (600 MHz, 벤젠-*d*<sub>6</sub>:클로로포름-*d*<sub>1</sub> 3:1, 60℃) δ 14.59 (s, 1H), 10.41 (s, 1H), 7.76 (s, 1H), 7.18 (p, *J* = 1.1 Hz, 1H), 6.46 (dd, *J* = 10.3, 2.5 Hz, 2H), 6.29 (dd, *J* = 9.0, 2.4 Hz, 1H), 6.22 - 6.13 (m, 1H), 5.94 (d, *J* = 10.7 Hz, 1H), 5.59 (s), 5.16 (d, *J* = 7.0 Hz, 1H), 5.11 (dd, *J* = 12.3, 7.7 Hz, 1H), 3.76 - 3.60 (m, 1H), 3.44 (d, *J* = 9.0 Hz, 1H), 3.13 (dd, *J* = 7.7, 5.6 Hz, 1H), 3.03 - 2.94 (m, 1H), 2.89 (s, 4H), 2.34 (s, 3H), 2.15 - 2.06 (m, 1H), 2.04 (d, *J* = 1.4 Hz, 3H), 1.65 (s, 3H), 1.57 (dddd, *J* = 14.1, 12.0, 6.9, 3.2 Hz, 3H), 0.94 (d, *J* = 7.0 Hz, 3H), 0.65 (d, *J* = 6.8 Hz, 3H), 0.43 (s, 5H), 0.43 - 0.32 (m, 4H). <sup>13</sup>C NMR (151 MHz, C<sub>6</sub>D<sub>6</sub>:CDCl<sub>3</sub> 3:1, 60℃) δ 193.8, 184.4, 174.3, 171.8, 168.9, 168.3, 166.6, 158.1, 158.0, 144.9, 144.8, 143.4, 141.8, 140.6, 133.3, 131.6, 126.4, 120.1, 115.6, 114.8, 113.2, 112.7, 108.1, 107.8, 99.7, 99.5, 94.9, 94.7, 79.1, 78.4, 73.8, 73.4, 56.3, 41.3, 40.2, 37.3, 33.2, 22.2, 20.8, 20.4, 16.9, 11.2, 11.0, 7.7.

[0128]

실시예 4: 디메틸아미노피페리딘 rifa (화학식 IVa)



[0129]

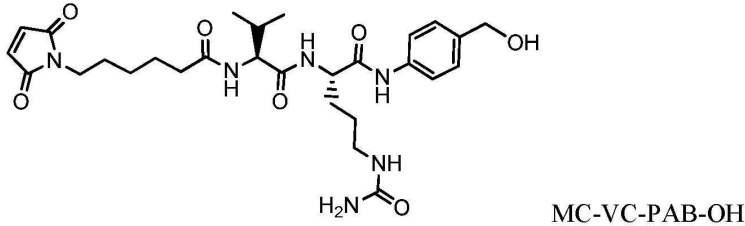
[0130]

건식 THF(135g) 및 화학식 I의 F-rifa(10.0g, 12.2mmol)를 N<sub>2</sub> 하에 반응기에 충전하였다. ≤5℃의 내부 온도를 유지하면서 N,N-디메틸피페리딘-4-아민(2.3g, 17.9mmol)을 0.5시간에 걸쳐 충전하기 전에, 상기 반응기 내용물을 0 내지 5℃까지 냉각시켰다. 첨가 이후, 상기 반응기 내용물을 20 내지 25℃까지 가온하고, 2시간 동안 방치하였다. EtOAc(135g)를 충전하고, 혼합물을 0.5시간 동안 교반하였다. 상기 내용물을 여과하고, EtOAc(25g)로 세척하였다. 모은 여액을 진공 하에 25mL의 용적까지 증류하였다. 20 내지 25℃까지 냉각시킨 후, EtOAc(185g)를 충전한 후, 7% aq. NaHCO<sub>3</sub> 수용액(45g), 25% aq. NaCl 수용액(45g) 및 정제수(45g)로 처리하였다. 상분리 후, 상기 수성층을 제거하고, 25% aq. NaCl 수용액(45g) 및 정제수(45g)를 상기 유기상에 첨가하였다. 수성층을 제거하고, 유기층은 7% aq. NaHCO<sub>3</sub> 수용액(45g), 25% aq. NaCl 수용액(45g) 및 정제수(45g)로 처리하였다. 상분리 후, 상기 수성층을 제거하고, 25% NaCl 수용액(45g) 및 정제수(45g)를 상기 유기상에 첨가하였다. 상기 유기상을 여과하고, 여액을 헵탄(90g)으로 희석하기 전에 25mL의 용적까지 농축하였다. 25mL의 용적까지 추가의 농축 이후에 헵탄(90g)으로 희석하고, 25mL의 용적까지 최종 농축하였다. 현탁액의 여과 및 헵탄(2×20g)에 의한 케이크의 세척에 의해 고체가 수득되었으며, 상기 고체를 진공 하에 1회 건조시켜 화학식 IVa의 디메틸아미노피페리딘 rifa (10.6g, 93.5%의 수율)를 생성하였다. <sup>1</sup>H NMR (600 MHz, 톨루엔-*d*<sub>8</sub>) δ 16.53 (s, 1H), 11.59 (s, 1H), 9.86 (s, 1H), 7.35 (s, 1H), 6.47 - 6.32 (m, 1H), 6.21 (d, *J* = 11.9 Hz, 1H), 5.87 (s, 1H), 5.62 (s, 1H), 5.44 (d, *J* = 11.4 Hz, 1H), 5.30 - 5.18 (m, 1H), 4.87 (dd, *J* = 14.6, 10.0 Hz, 1H), 3.58 (d, *J* = 7.7 Hz, 1H), 3.26 - 3.11 (m, 2H), 3.03 (d, *J* = 10.9 Hz, 1H), 2.91 (d, *J* = 12.1 Hz, 1H), 2.73 (s, 3H), 2.64 (s, 3H), 2.28 (s, 2H), 2.24 (s, 3H), 2.15 (s, 3H), 2.04 (s, 6H), 2.00 (s, 1H), 1.97 - 1.89 (m, 1H), 1.79 (d, *J* = 28.4 Hz, 2H), 1.66 (s, 3H), 1.64 (s, 5H), 1.17 (d, *J* = 6.9 Hz, 6H), 0.78 (d, *J* =

6.3 Hz, 3H), 0.49 (d,  $J = 6.5$  Hz, 5H).  $^{13}\text{C}$  NMR (151 MHz, Tol)  $\delta$  193.0, 182.6, 175.7, 175.1, 171.5, 171.2, 158.0, 157.2, 146.4, 145.2, 144.5, 142.2, 131.5, 131.0, 130.9, 128.9, 128.0, 119.6, 114.0, 112.6, 111.5, 109.4, 107.7, 106.3, 95.0, 92.9, 79.9, 79.0, 74.8, 73.8, 61.5, 55.2, 47.0, 46.4, 44.1, 42.4, 42.3, 37.3, 33.1, 29.2, 29.0, 23.6, 23.1, 21.4, 16.4, 13.2, 13.0, 11.7, 8.5.

[0131] 실시예 5: N-((S)-1-(((S)-1-((4-(클로로메틸)페닐)아미노)-1-옥소-5-우레이도펜탄-2-일)아미노)-3-메틸-1-옥소부탄-2-일)-6-(2,5-디옥소-2,5-디하이드로-1H-피롤-1-일)헥산아미드(화학식 V)

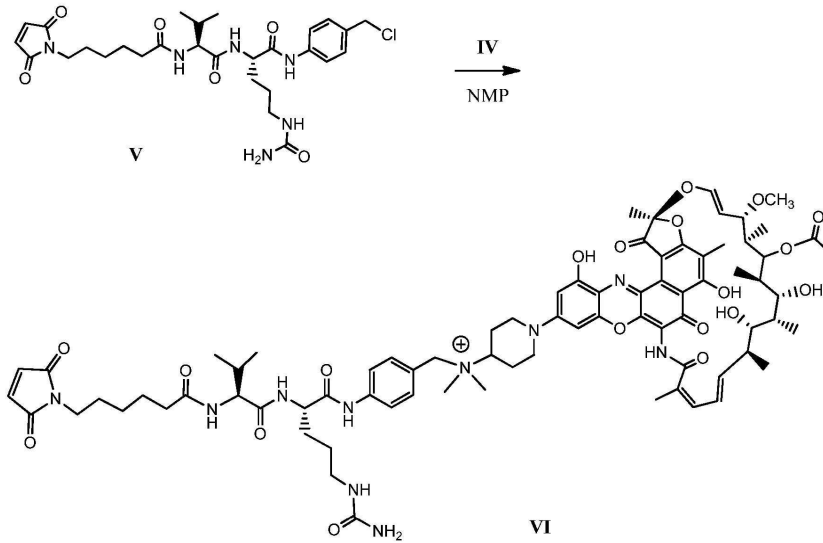
[0132] 건식 N-메틸피롤리돈(NMP; 55g) 및 6-(2,5-디옥소-2,5-디하이드로-1H-피롤-1-일)-N-((S)-1-(((S)-1-((4-(하이드록시메틸)페닐)아미노)-1-옥소-5-우레이도펜탄-2-일)아미노)-3-메틸-1-옥소부탄-2-일)헥산아미드 (MC-VC-PAB-OH; 10.0g, 17.5 mmol)을  $\text{N}_2$  하에 반응기에 충전하였다.



[0133]

[0134] 상기 함유물을 0 내지 5°C까지 냉각시키기 전에, 1시간 동안 50 내지 55°C까지 가온하였다. 반응기에 염화티오닐(2.6g, 21.9mmol)을  $\leq 5^\circ\text{C}$ 의 온도로 1시간에 걸쳐 충전하였다. 상기 첨가 이후, 반응기 함유물을 20 내지 25°C까지 가온하고, 1시간 동안 방치하였다. LC에 따르면 출발 물질이 잔존하는 것으로 나타났기 때문에 상기 배치를 0 내지 5°C까지 냉각시키고, 상기 반응기에 추가의 염화티오닐(0.2g, 1.7mmol)을 1시간에 걸쳐 충전하였다. 첨가 이후, 상기 함유물을 20 내지 25°C까지 가온하고, 1시간 동안 방치하였다. 상기 배치를 0 내지 5°C까지 냉각시키고,  $\leq 5^\circ\text{C}$ 의 온도를 유지하면서 물(170g)을 첨가하였다. 상기 얻어진 슬러리를 여과하고, 필터 케이크를 물(2×30g)로 세척하였다. 이어, 상기 케이크를 EtOAc(30g),  $\text{CH}_3\text{CN}$ (2×30g) 및 MTBE(1×30g)로 세척하였다. 상기 습식 케이크를 20 내지 25°C에서 진공 하에 건조시켜 얻은 색을 갖는 고체(8.3g, 80%의 수율)를 얻었다.  $^1\text{H}$  NMR (600 MHz,  $\text{DMSO-d}_6$ , 28 °C)  $\delta$  10.02 (s, 1H), 8.06 (d, 7.5, 1H), 7.78 (d 8.7, 1H), 7.60 (d, 8.6, 2H), 7.36 (d, 8.6, 2H), 6.99 (s, 2H), 5.98 (bs, 1H), 5.40 (vbs, 1H), 4.71 (s, 2H), 4.38 (m, 1H), 4.19 (dd, 5, 6.9, 1H), 3.37 (t, 7.1, 2H), 3.03 (m, 1H), 2.94 (m, 1H), 2.18 (m, 1H), 2.12 (m, 1H), 1.97 (m, 1H), 1.70 (m, 1H), 1.60 (m, 1H), 1.48 (m, 5H), 1.37 (m, 1H), 1.19 (pen, 7.7, 2H), 0.85 (d, 6.8, 3H), 0.82 (d, 6.8, 3H).  $^{13}\text{C}$  NMR (151 MHz,  $\text{DMSO-d}_6$ , 28 deg C)  $\delta$  172.2, 171.2, 170.9, 170.6, 158.8, 138.9, 134.3, 132.2, 129.4, 119.0, 57.5, 53.0, 46.1, 38.5, 36.9, 34.8, 30.3, 29.2, 27.7, 26.7, 25.7, 24.8, 19.1, 18.1.

[0135] 실시예 6: 링커-항생제 (화학식 VI)



[0136]

[0137] 반응기에 NMP(495g), 화학식 IVa의 디메틸아미노피페리딜 rifa (90.0g, 97.1mmol) 및 화학식 V의 N-((S)-1-(((S)-1-((4-(클로로메틸)페닐)아미노)-1-옥소-5-우레이도펜탄-2-일)아미노)-3-메틸-1-옥소부탄-2-일)-6-(2,5-디옥소-2,5-디하이드로-1H-피롤-1-일)핵산아미드(60.0g, 101.5mmol)를 N<sub>2</sub> 하에 충전하였다. 상기 함유물을 12시간 동안 55 내지 60℃까지 가열하였다. 냉각 이후, EtOAc(1.2kg)을 충전하고, 상기 함유물을 4시간 동안 에이징(aging)하였다. 슬러리를 여과하고, 케이크를 EtOAc(158g)로 세척하였다. 상기 필터 케이크를 20 내지 25℃에서 진공 하에 건조시켜 남색 고체(137.1g, 93%의 수율)로서 화학식 VI의 조질의 링커-항생제를 얻었다.

[0138] 정제: 화학식 VI의 조질의 링커-항생제(113.3g)를 0.05% 포름산(FA)(8.5L)를 포함하는 1:1의 아세토니트릴(ACN)/물에 용해하였다. 상기 용액을 셀라이트®(200g)를 통해 여과하고, 여액을 물(34.0L) 중의 0.05% FA로 처리하였다. 예비 평형화(pre-equilibration)된 칼럼에 상기 희석된 용액을 충전한 후, 하기 이동상 조성으로 용출하였다:

표 5

[0139]

용출물	조성(ACN/물/FA)(%)	유속 (L/분)	시간(분)	수집된 분획(개수×L)
1	10 / 90 / 0.05	4.0	79	--
2	30 / 70 / 0.05	3.9	128	19×25
3	40 / 60 / 0.05	3.9	83	47×5
4	90 / 10 / 0.05	3.9	53	--
5	50 / 50 / 0.05	3.9	58	--
6	10 / 90 / 0.05	3.9	73	--

[0140] 상기 칼럼을 고도로 가교 결합되고 수화된 폴리스티렌으로 구성된 HP20 SS 수지(DIAION™ HP20SS, 미쓰비시 케미칼(Mitsubishi Chemical)); 30 내지 70% 벤젠, 디에틸렌-, 에테닐벤젠과 에테닐에틸벤젠의 중합체로 채웠다. 농축 단계는 먼저 화학식 VI의 조질의 링커-항생제 용액을 물(165L) 중의 0.05% FA로 희석하여 10/90/0.05의 ACN/H<sub>2</sub>O/FA의 조성을 구현함으로써 개시되었다. 이어, 상기 희석된 용액을 예비 평형화된 수지(10/90/0.05)에 0.8L/분의 속도로 충전하였다. 용출은 0.8L/분으로 10/90/0.05로 37분 동안 계속하였다. 청색 밴드가 칼럼에서 용출하기 시작하면 생성물을 수집하고, 모든 청색 물질을 하나의 분획에 수집하였다. 포획 분획(capture fraction)의 순도 94.4%였다 (~ 약 10L). 상기 칼럼은 60:40 MeOH/물(22.4L)로 세정하였다.

[0141] 더이상 용매(ACN)가 농축되는 것이 관측되지 않을 때까지, 화학식 VI의 생성물인 링커-항생제를 함유하는 분획을 25℃의 최대 온도에서 진공 하에 농축하였다. 상기 농축물을 전달하고, 증류 플라스크를 주사용 물(WFI, 0.5L)로 세정하였다. 상기 희석된 농축물을 연마 여과하고, 여액을 동결 건조하여 남색 고체로서 화학식 VI (45.6g, 40.2%의 수율)의 정제된 링커-항생제를 얻었다. <sup>1</sup>H NMR (600 MHz, CD<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>: d<sub>4</sub>-MeOH 9:1, 4 deg C) δ 7.80 (d, 8.4, 2H), 7.42 (d, 8.3, 2H), 6.74 (dd, 15.9, 11.2, 1H), 6.69 (s, 2H), 6.52 (s, 1H), 6.39 (s,

1H), 6.34 (d, 10.6, 1H), 6.17 (d, 12.8, 1H), 6.15 (dd, 15.9, 7.5, 1H), 4.96 (dd, 12.7, 7.5, 1H), 4.86 (d, 10.8, 1H), 4.49 (dd, 9.6, 4.0, 1H), 4.46 (s, 2H), 4.23 (m, 4H), 4.08 (d, 7.2, 1H), 3.79 (m, 1H), 3.61 (d, 10.4, 1H), 3.45 (t, 7.2, 2H), 3.25 (d, 7.3, 1H), 3.18 (m, 5H), 3.07 (m, 1H), 2.93 (s, 9H), 2.09 (m, 1H), 2.41 (m, 2H), 2.33 (m, 1H), 2.27 (s, 3H), 2.24 (m, 2H), 2.10 (s, 3H), 2.02 (m, 4H), 1.94 (s, 3H), 1.86 (m, 1H), 1.80 (s, 3H), 1.69 (m, 1H), 1.60 (m, 2H), 1.54 (m, 3H), 1.27 (m, 2H), 1.22 (m, 1H), 0.92 (m, 9H), 0.81 (d, 6.6, 3H), 0.79 (m, 1H), 0.02 (d, 6.8, 3H), -0.40 (d, 6.6, 3H). <sup>13</sup>C NMR (600 MHz, CD<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>:d4-MeOH 9:1, 4 deg C) δ 193.9, 183.2, 175.3, 174.7, 173.1, 172.0, 171.9, 171.8, 169.8, 161.2, 158.0, 156.1, 147.0, 145.4, 143.9, 141.6, 140.1, 134.6, 134.1, 133.6, 132.4, 132.0, 126.5, 121.7, 120.7, 119.3, 118.9, 112.5, 112.1, 110.6, 108.8, 108.1, 96.0, 91.5, 77.0, 76.8, 74.7, 74.1, 71.2, 65.9, 59.8, 57.0, 47.4, 46.6, 46.5, 40.3, 38.2, 38.0, 37.4, 36.2, 33.3, 31.0, 29.4, 28.8, 26.9, 26.1, 25.7, 22.5, 21.1, 20.5, 19.5, 18.6, 18.5, 10.6, 9.4, 8.3, 7.8.

[0142] 실시예 7: 항-WTA 항체-항생제 접합체의 제조 시 화학식 VI의 링커-항생제와 항체의 접합

[0143] 항-WTA 항체의 시스테인-가공된 (ThioMab<sup>TM</sup>, 제네테크(Genentech)) 변이체의 구성 및 생산은 기타 항체에 대해 이전에 보고된 바와 같이 수행하였다(문헌 참고: WO 2014/194247, incorporated by reference; Junutula, et al., 2008b Nature Biotech., 26(8):925-932). 간단히 말해, 항-WTA 중쇄의 118번째 A1a 위치에서 시스테인 잔기를 가공하여 이의 cys 118 ThioMab<sup>TM</sup> 변이체(HC A118C)를 생산하였다. 항-WTA 항체-항생제 접합체는 화학식 VI의 링커-항생제 중간체에 시스테인-가공된 항-WTA 항체를 접합함으로써 제조하였다. 접합 이전에, 이를 위해 그 교시가 참고로 인용된 WO 2004/010957에 개시된 방법론에 따른 표준 방법을 이용하여 시스테인-가공된 항-WTA 항체를 TCEP로 부분적으로 환원시켰다. 예를 들어, 하기 문헌에 개시된 방법론에 따른 표준 방법을 이용하여 상기 부분적으로 환원된 항체를 화학식 VI의 링커-항생제 중간체에 접합하였다: Doronina et al.(2003) *Nat. Biotechnol.* 21:778-784 및 US2005/0238649. 간단히 말해, 상기 항체의 환원된 시스테인 잔기에 대한 링커-항생제 중간체의 접합을 가능케 하기 위해 상기 부분적으로 환원된 항체를 화학식 VI와 조합하였다. 상기 접합 반응을 켄칭(quenching)하고, AAC를 정제하였다. 각 AAC에 대한 항생제 로딩량(항체 당 항생제 모이어티의 평균 개수)을 결정하였으며, 단일 시스테인 돌연변이 부위로 가공된 항-벽 테이코산 항체의 경우에 약 1 내지 약 2의 범위였다.

[0144] 접합용 ThioMab의 환원/산화:

[0145] 전장의 시스테인-가공된 단클론성 항체 [문헌 참고: ThioMabs - Junutula, et al., 2008b Nature Biotech., 26(8):925-932; Dornan et al (2009) *Blood* 114(13):2721-2729; US 7521541; US 7723485; WO2009/052249, Shen et al (2012) *Nature Biotech.*, 30(2):184-191; Junutula et al (2008) *Jour of Immun. Methods* 332:41-52]는 CHO 세포에서 발현되고, 37°C에서 3시간 동안 또는 실온에서 하룻밤 동안 2mM EDTA를 포함하는 50mM 트리스(pH 7.5) 중에 약 20 내지 40배 과량의 TCEP(트리스(2-카복시에틸)포스핀 하이드로클로라이드 또는 DTT(디티오프레이톨)로 환원시켰다(문헌 참고: Getz et al (1999) *Anal.Biochem.* Vol 273:73-80; Soltec Ventures, Beverly, MA). 상기 환원된 ThioMab을 희석시키고, 10 mM 소듐 아세테이트 (pH 5)의 HiTrap S 칼럼으로 로딩하고, 0.3M 염화나트륨을 함유하는 PBS로 용출시켰다. 대안적으로, 상기 항체는 10% 아세트산을 1/20<sup>th</sup>의 용적으로 첨가하여 산성화시키고, 10mM 숙시네이트(pH 5)로 희석하고, 상기 칼럼으로 로딩하고 이어서 숙시네이트 완충액의 10배의 칼럼 용적으로 세척하였다. 상기 칼럼을 50mM 트리스 (pH7.5) 및 2mM EDTA로 용출하였다.

[0146] 상기 용출된 환원된 ThioMab는 15배 물 과량의 DHAA(데하이드로아스코르브산) 또는 200nM 수성 황산구리(CuSO<sub>4</sub>)로 처리하였다. 쇄간 디설파이드 결합의 산화는 약 3시간 이상의 시간 이내에 완료되었다. 주위 공기 산화가 또한 효과적이었다. 상기 재산화된 항체는 20mM 숙신산나트륨(pH 5), 150mM NaCl, 2mM EDTA로 투석하고, -20°C에서 동결 저장하였다.

[0147] 화학식 VI의 링커-항생제 중간체와 티오-Mab 항체의 접합:

[0148] 상기 반응 혼합물에 대한 LC-MS 분석에 의해 결정된 바와 같이, 상기 반응이 완료될 때(16 내지 24시간)까지, 수성 혼합물 중의 50mM 트리스(pH 8)에서 벽 테이코산(항-WTA)을 표적화하는 탈블로킹화되고 재산화된 티오-항체(ThioMab)를 과량, 예를 들어 6 내지 8배 물 과량의 화학식 VI의 링커-항생제 중간체(약 20mM 농도의 DMSO 저장액(stock))와 반응시켰다. 상기 접합 반응의 수성 혼합물은 프로필렌 글리콜, N-메틸피롤리돈(NMP), 디메틸포름아미드(DMF), 디메틸아세트아미드(DMA) 및 디메틸설폭사이드(DMSO)로부터 선택된 용매를 포함할 수 있다.

- [0149] 이어, 조질의 항체-항생제 접합체(AAC)는 20mM 숙신산나트륨(pH 5)으로 희석한 후 양이온 교환 칼럼에 적용하였다. 상기 칼럼을 적어도 10 칼럼 용적의 20mM 숙신산나트륨(pH 5)으로 세척하고, 항체를 PBS로 용출하였다. AAC는 겔 여과 칼럼을 사용하여 240mM 슈크로스를 포함하는 20mM His/아세트레이트(pH 5)로 제형화하였다. AAC는 라이신-C 엔도펩티다제를 사용한 처리 전후에 단백질 농도를 결정하기 위해 UV 분광측정법을 실시하고, 응집 분석을 위해 분석용 SEC(크기 배제 크로마토그래피) 및 LC-MS에 의해 특성 분석하였다.
- [0150] 크기 배제 크로마토그래피는 0.75ml/분의 유속으로 0.25mM 염화포타슘 및 15% IPA를 포함하는 0.2M 인산포타슘(pH 6.2) 중에서 Shodex KW802.5 칼럼을 사용하여 수행하였다. AAC의 응집 상태는 280nm에서 흡광도의 용출된 피크 면적의 적분에 의해 결정하였다.
- [0151] LC-MS 분석은 아질런트 QTOF 6520 ESI 기구를 사용하여 수행하였다. 일례로서, 상기 화학 방법을 사용하여 생성된 AAC는 37°C에서 30분 동안 트리스(pH 7.5) 중에서 1:500w/w 엔도프로테이나제 Lys-C(Promega)로 처리하였다. 수득한 절단 단편은 80°C로 가열된 1000A, 8 um PLRP-S 칼럼 상으로 로딩하고, 5분 내에 30% B 내지 40% B의 농도 구배로 용출시켰다. 이동상 A: 0.05% TFA를 포함하는 H<sub>2</sub>O. 이동상 B: 0.04% TFA를 포함하는 아세토니트릴. 유속: 0.5ml/분. 단백질 용출은 전기분무 이온화 및 MS 분석 전에 280nm에서 UV 흡광도 검출에 의해 모니터링하였다. 비접합된 Fc 단편, 잔류의 비접합된 Fab 및 항생제-Fab의 크로마토그래피 분리능이 일반적으로 성취되었다. 상기 수득된 m/z 스펙트럼은 Mass Hunter™ 소프트웨어 (Agilent Technologies)를 사용하여 디컨볼루션(deconvolution)하여, 질량 단편의 질량을 계산하였다.
- [0152] 전술된 발명은 이해의 명료성을 위해 예시 및 예에 의해 일부 상세하게 설명되었지만, 설명 및 실시예는 본 발명의 범주를 제한하는 것으로 해석되지 않아야 한다. 따라서, 모든 적절한 변경 및 등가물은 하기 특허청구범위에 의해 한정된 바와 같이 본 발명의 범주 내에 있는 것으로 고려될 수 있다. 본원에서 인용된 모든 특허 및 과학적 문헌의 개시 내용은 명확히 그 전체가 참고로 인용된다.

