(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2009-0018103
(43) 공개일자 2009년02월19일

(51) Int. Cl.
C07D 309/16 (2006.01) *A61K 31/366* (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)
(21) 출원번호 10-2008-7029913
(22) 출원일자 2008년12월08일
심사청구일자 없음
번역문제출일자 2008년12월08일
(86) 국제출원번호 PCT/IB2007/001328
국제출원일자 2007년05월23일
(87) 국제공개번호 WO 2007/144709
국제공개일자 2007년12월21일
(30) 우선권주장
06290948.6 2006년06월09일
유럽특허청(EPO)(EP)

(71) 출원인
사노피-아벤티스
프랑스 파리 (우편번호:75013) 에비뉴 드 프랑스 174
(72) 발명자
부샤르, 에르베
프랑스 에프-75013 파리 애비뉴 드 프랑스 174 패턴트 디파트먼트사노피-아벤티스 내
꼬메르꽁, 알랭
프랑스 에프-75013 파리 애비뉴 드 프랑스 174 패턴트 디파트먼트사노피-아벤티스 내
챠리, 라비 브이.제이.
미국 02139 매사추세츠주 캠브릿지 시드니 스트리트 128
(74) 대리인
심미성, 양영준, 양영환

전체 청구항 수 : 총 25 항

(54) 렙토마이신 유도체

(57) 요 약

예로서, 항체와 같은 세포 결합 물질에 접합될 수 있는, 예를 들어, 설파이드 또는 디설파이드와 같은 부분을 갖는 렙토마이신 유도체를 개시한다. 상기 렙토마이신 유도체 접합체의 치료학적 용도 또한 기술한다; 그러한 접합체는 표적화된 양식으로 특이적인 세포 군집에 세포독성의 렙토마이신 유도체를 전달할 수 있기 때문에 치료학적 용도를 갖는다.

특허청구의 범위

청구항 1

렙토마이신 유도체를 세포 결합 물질에 접합시킬 수 있는 연결기를 포함하는 렙토마이신 유도체.

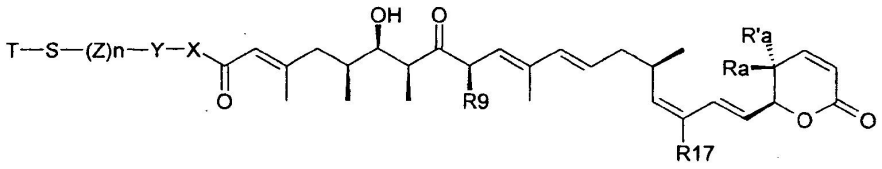
청구항 2

제1항에 있어서, 연결기가 티올, 설파이드 또는 디설파이드 결합을 포함하는 것인 렙토마이신 유도체.

청구항 3

제1항 또는 제2항에 있어서, 유도체가 하기 화학식(I), 또는 그의 약제학적으로 허용가능한 염, 수화물 또는 수화된 염, 또는 이들 화합물의 다형성 결정 구조, 또는 그의 광학이성질체, 라세미체, 부분입체이성질체 또는 거울상이성질체인 렙토마이신 유도체:

<화학식 I>



상기 식에서,

Ra 및 Ra'는 H 또는 -Alk이고;

R17은 OR, CN, NRR', 퍼플루오로알킬에 의해 임의로 치환된 알킬이고;

R9는 OR, CN, NRR', 퍼플루오로알킬에 의해 임의로 치환된 알킬이고;

X는 -O- 또는 -NR-이고;

Y는 -U-, -NR-U-, -O-U-, -NR-CO-U-, -U-NR-CO-, -U-CO-, -CO-U-이고;

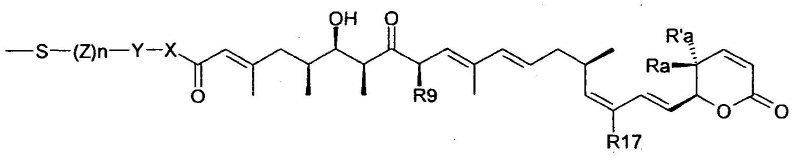
여기서, U는 -Alk-, $-Alk(OCH_2CH_2)_m-$, $-(OCH_2CH_2)_m-Alk-$, $-Alk(OCH_2CH_2)_m-Alk-$, $-(OCH_2CH_2)_m-$, -사이클로알킬-, -헤테로사이클릭-, -사이클로알킬-Alk-, -Alk-사이클로알킬-, -헤테로사이클릭-Alk-, -Alk-헤테로사이클릭-으로부터 선택되고;

여기서, m은 1 내지 2000으로부터 선택되는 정수이고;

Z는 -Alk-이고;

n은 0 또는 1이고;

T는 H, 티올 보호기, 예로서, Ac, R_1 또는 SR_1을 나타내며, 여기서, R_1은 H, 메틸, Alk, 사이클로알킬, 임의로 치환된 아릴 또는 헤테로사이클릭을 나타내거나, T는



을 나타내고,

여기서, Ra, Ra', R17, R9, X, Y, Z, n은 상기 정의되어 있고;

R, R'은 동일하거나, 상이하며, H 또는 알킬이고;

Alk는 선형 또는 분지형 알킬을 나타낸다.

청구항 4

제3항에 있어서, Ra가 -Alk이고, Ra'가 H인 렙토마이신 유도체.

청구항 5

제3항 또는 제4항에 있어서, R17이 알킬인 렙토마이신 유도체.

청구항 6

제3항 내지 제5항 중 어느 한 항에 있어서, R9가 알킬인 렙토마이신 유도체.

청구항 7

제3항 내지 제6항 중 어느 한 항에 있어서, X가 -NR인 렙토마이신 유도체.

청구항 8

제3항 내지 제7항 중 어느 한 항에 있어서, Y가 -U인 렙토마이신 유도체.

청구항 9

제3항 내지 제8항 중 어느 한 항에 있어서, U가 -Alk인 렙토마이신 유도체.

청구항 10

제3항 내지 제9항 중 어느 한 항에 있어서, -Alk-가 선형 또는 분지형 C_1-C_{20} 알킬인 렙토마이신 유도체.

청구항 11

제3항 내지 제10항 중 어느 한 항에 있어서, T가 H 또는 SR_1이고, 여기서, R_1이 Alk를 나타내는 것인 렙토마이신 유도체.

청구항 12

제1항 내지 제11항 중 어느 한 항에 있어서,

(2E,10E,12E,16Z,18E)-(R)-6-하이드록시-3,5,7,9,11,15,17-헵타메틸-19-((2S,3S)-3-메틸-6-옥소-3,6-디하이드로-2H-피란-2-일)-8-옥소-노나데카-2, 10,12,16,18-펜타에노산의 (2-메틸설파닐-에틸)-아미드

비스-[(2E,10E,12E,16Z,18E)-(R)-6-하이드록시-3,5,7,9,11,15,17-헵타메틸-19-((2S,3S)-3-메틸-6-옥소-3,6-디하이드로-2H-피란-2-일)-8-옥소-노나데카-2,10,12,16,18-펜타에노산의 (2-머캅토에틸)-아미드]

(2E,10E,12E,16Z,18E)-(R)-6-하이드록시-3,5,7,9,11,15,17-헵타메틸-19-((2S,3S)-3-메틸-6-옥소-3,6-디하이드로-2H-피란-2-일)-8-옥소-노나데카-2,10,12,16,18-펜타에노산의 (2-머캅토-에틸)-아미드

(2E,10E,12E,16Z,18E)-(R)-6-하이드록시-3,5,7,9,11,15,17-헵타메틸-19-((2S,3S)-3-메틸-6-옥소-3,6-디하이드로-2H-피란-2-일)-8-옥소-노나데카-2,10,12,16,18-펜타에노산의 (2-메틸디설파닐-에틸)-아미드

(2E,10E,12E,16Z,18E)-(R)-6-하이드록시-3,5,7,9,11,15,17-헵타메틸-19-((2S,3S)-3-메틸-6-옥소-3,6-디하이드로-2H-피란-2-일)-8-옥소-노나데카-2,10,12,16,18-펜타에노산의 (2-메틸-2-메틸디설파닐-프로필)-아미드

(2E,10E,12E,16Z,18E)-(R)-6-하이드록시-3,5,7,9,11,15,17-헵타메틸-19-((2S,3S)-3-메틸-6-옥소-3,6-디하이드로-2H-피란-2-일)-8-옥소-노나데카-2,10,12,16,18-펜타에노산의 (2-머캅토-2-메틸-프로필)-아미드,

또는 그의 약제학적으로 허용가능한 염, 수화물 또는 수화된 염, 또는 이들 화합물의 다형성 결정 구조, 또는 그의 광학이성질체, 라세미체, 부분입체이성질체 또는 거울상이성질체로부터 선택되는 것인 렙토마이신 유도체.

청구항 13

제1항 내지 제12항 중 어느 한 항에 따른 하나 이상의 렙토마이신 유도체에 상기 연결기를 포함하는 링커를 통해 연결된 세포 결합 물질을 포함하는 렙토마이신 유도체 접합체.

청구항 14

제13항에 있어서, 세포 결합 물질이 항체 또는 그의 단편인 렙토마이신 유도체 접합체.

청구항 15

제13항 또는 제14항에 있어서, 링커가 -S- 또는 -S-S- 기를 포함하는 것인 렙토마이신 유도체 접합체.

청구항 16

제13항 내지 제15항 중 어느 한 항에 있어서, 링커가, 티올, 설파이드 또는 디설파이드에 대하여 반응성인 관능기에 연결된 상기 연결기를 포함하는 것인 렙토마이신 유도체 접합체.

청구항 17

제1항 내지 제12항 중 어느 한 항에 따른 렙토마이신 유도체 및 약제학적으로 허용가능한 담체를 포함하는 약제학적 조성물.

청구항 18

제13항 내지 제16항 중 어느 한 항에 따른 접합체 및 약제학적으로 허용가능한 담체를 포함하는 약제학적 조성물.

청구항 19

암 치료용 약제의 제조를 위한 제1항 내지 제12항 중 어느 한 항에 따른 렙토마이신 유도체의 용도.

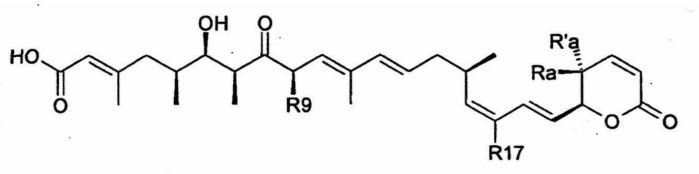
청구항 20

암 치료용 약제의 제조를 위한 제13항 내지 제16항 중 어느 한 항에 따른 접합체의 용도.

청구항 21

하기의 상응하는 화학식(II)의 화합물 및 화학식(III)의 화합물을 반응시키는 단계를 포함하는, 제3항 내지 제12항 중 어느 한 항에 따른 화합물을 제조하는 방법:

<화학식 II>



<화학식 III>

T- S-(Z)n-Y-XH

상기 식에서,

Ra, Ra', R17, R9, X, Y, Z, T, n은 화학식(I)에서 정의된 바와 같다.

청구항 22

디설파이드 결합의 환원제의 존재하에 T가 S-R1인 상응하는 화학식(I)의 화합물을 반응시키는 것을 포함하는, 화학식(I)에서 T가 H인, 제3항 내지 제12항 중 어느 한 항에 따른 화합물을 제조하는 방법.

청구항 23

상응하는 화학식(II)의 화합물을 하기의 상응하는 화학식(IV)의 화합물과 반응시키는 단계를 포함하는, 제3항 내지 제12항 중 어느 한 항에 따른 이량체 화합물을 제조하는 방법:

<화학식 IV>

HX-Y-(Z)n-S-S-(Z)n-Y-XH

청구항 24

제1항 내지 제12항 중 어느 한 항에서 정의된 렙토마이신 유도체를 유도체의 상기 연결기에 대하여 반응성인 관능기를 포함하는 변형된 세포 결합 물질과 반응시켜, 상기 유도체 및 세포 결합 물질이 상기 연결기를 포함하는 상기 링커를 통해 함께 연결될 수 있도록 하는 단계를 포함하는, 제13항 내지 제16항 중 어느 한 항에 따른 접합체를 제조하는 방법.

청구항 25

제24항에 있어서, 유도체의 상기 연결기에 대하여 반응성인 관능기를 포함하는 변형된 세포 결합 물질이 상기 세포 결합 물질을 SMCC, SSNPB, LC-SMCC, SIAB, SIA, SBA, SBAP로부터 선택되는 시약과 반응시킴으로써 수득되는 것인 방법.

명 세 서

기 술 분 야

<1> 본 발명은 신규한 렙토마이신 유도체 및 그의 치료학적 용도에 관한 것이다. 더욱 특히, 본 발명은 세포 결합 물질에 공유결합할 수 있는 부분 (연결기)을 함유하는 신규한 렙토마이신 유도체와, 링커를 통한 상기 세포 결합 물질과의 상기 렙토마이신 유도체 결합을 포함하는 상응하는 접합체에 관한 것이다. 상기 접합체는 생체내에서 활성화될 수 있고 유리될 수 있으며, 표적화된 방식으로 특정 세포 군집으로 전달될 수 있는 치료제를 제공한다.

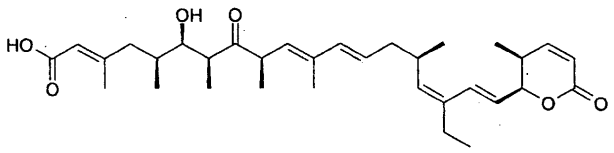
배 경 기 술

<2> 모노클로날 항체-약물 접합체를 사용하여 종양 세포를 표적하는 것에 관하여 많이 보고된 바 있다 {[Sela et al, in Immunoconjugates, pp. 189-216 (C. Vogel, ed. 1987)]; [Ghose et al, in Targeted Drugs, pp. 1-22 (E. Goldberg, ed. 1983)]; [Diener et al, in Antibody Mediated Delivery Systems, pp. 1-23 (J. Rodwell, ed. 1988)]; [Pietersz et al, in Antibody Mediated Delivery Systems, pp. 25-53 (J. Rodwell, ed. 1988)]; [Bumol et al, in Antibody Mediated Delivery Systems, pp. 55-79 (J. Rodwell, ed. 1988)]; [G.A. Pietersz & K.Krauer, 2 J. Drug Targeting, 183-215 (1994)]; [R. V. J. Chari, 31 Adv. Drug Delivery Revs., 89-104 (1998)]; [W.A. Blattler & R.V.J. Chari, in Anticancer Agents, Frontiers in Cancer Chemotherapy, 317-338, ACS Symposium Series 796]; 및 [I. Ojima et al eds, American Chemical Society 2001]}. 예로서, 메토트렉세이트, 다우노루비신, 독소루비신, 빈크리스틴, 빈블라스틴, 멜팔란, 미토마이신 C, 클로람부실, 칼리케아미신 및 메이탄시노이드와 같은 세포독성 약물이 다양한 뮤린 모노클로날 항체에 접합되었다. 몇몇의 경우에서, 상기 약물 분자들은 예로서, 혈청 알부민 {[Garnett et al, 46 Cancer Res. 2407-2412 (1986)]; [Ohkawa et al, 23 Cancer Immunol. Immunother. 81-86 (1986)]; [Endo et al, 47 Cancer Res. 1076-1080 (1980)}, 덱스트란 {[Hurwitz et al, 2 Appl. Biochem. 25-35 (1980)]; [Manabi et al, 34 Biochem. Pharmacol. 289-291 (1985)]; [Dillman et al, 46 Cancer Res. 4886-4891 (1986)]; 및 [Shoval et al, 85 Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 8276-8280 (1988)]}, 또는 폴리글루탐산 {[Tsukada et al, 73 J. Natl. Cane. Inst. 721-729 (1984)]; [Kato et al, 27 J. Med. Chem. 1602-1607 (1984)]; [Tsukada et al, 52 Br. J. Cancer 111-116 (1985)]}과 같은 중간 운반체 분자를 통해 항체 분자에 연결되었다.

<3> 절단가능한 링커 및 절단불가능한 링커, 둘 모두를 비롯한 광범위한 링커가 현재 상기 면역접합체의 제조에 이용가능하다. 그러나, 시험관내 세포독성 시험에서는 항체-약물 접합체가 유리 비접합 약물과 동일한 세포독성 효능을 좀처럼 발휘하지 않는다는 것이 밝혀졌다. 이는 약물 분자가 접합된 항체로부터 유리되는 기전이 매우 비효율적이라는 것을 시사하였다. 면역독소 분야의 초기 연구에서는 모노클로날 항체와 촉매적으로 활성인 단백질 독소 사이의 디설파이드 브릿지를 통해 형성된 접합체가 다른 링커를 함유하는 접합체보다 더욱 세포독성이 크다는 것이 나타났다 {[Lambert et al, 260 *J. Biol. Chem.* 12035-12041 (1985)]; [Lambert et al, in Immunotoxins 175-209 (A. Frankel, ed. 1988)]; [Ghetie et al, 48 *Cancer Res.* 2610-2617 (1988)]}. 이러한 세포독성의 개선은 항체 분자와 독소 사이의 디설파이드 결합의 효율적인 절단으로 인하여 환원된 글루타티온의 세포내 농도가 높았기 때문이다. 메이탄시노이드 및 칼리케아미신은 디설파이드 결합을 통해 모노클로날 항체에 연결된 것으로서 세포독성이 고도로 높은 약물들 중 최초의 일례가 되었다. 이들 약물들의 항체 접합체

는 시험관내의 높은 효능과 마우스내 인간 종양 이종이식 모델에서 뛰어난 항종양 활성을 갖는 것으로 나타났다 {[R. V. J. Chari et al., 52 *Cancer Res.*, 127-131 (1992)]; [C. Liu et al., 93, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 8618-8623 (1996)]; [L.M. Hinman et al., 53, *Cancer Res.*, 3536-3542 (1993)]; 및 [P.R. Hamann et al, 13, *BioConjugate Chem.*, 40-46 (2002)}.

<4> 렙토마이신 B:



<5>

<6> 는 US 4,771,070 및 US 4,792,522에서 보고된 바와 같이, 원래 스트렙토마이세스 종(*Steptomyces spp.*)으로부터 단리된 천연물이다. 이는 원래 항미생물 활성에 관한 스크리닝 결과로서 동정되었고, 이어서, 항종양제로서 동정되었다 ([Komiyama et al., J.Antibiotics 1985, 38(3), 427-429] 및 US 2003/0162740). 분자 수준에서 렙토마이신 B는 핵 외수송 수용체 CRM1의 저해제로서 작용을 하는데, "적하 단백질"에 결합하고 그의 핵 전위에 영향을 준다. 세포 수준에서 렙토마이신 B는 세포 주기에서 G1기 및 G2기의 끝에 세포를 정지시킴으로써 작용을 한다 [Kalesse et al., Synthesis 2002, 8, 981-1003]. 그러나, 포유동물 세포에 대한 그의 극단적인 독성으로 인하여 [Hamamoto et al., J. Antibiotics 1983, 36(6), 639-645] 그를 임상적으로 사용하는 것은 불가능하였다. 따라서, 표적화되지 않는 세포에 대한 렙토마이신 유도체의 독성을 감소시키는 것이 매우 바람직할 수 있다.

<7> 렙토마이신 유도체의 치료학적 효능은 종양 부위로의 표적화된 전달을 통해 생체내 분포를 변화시켜 표적화되지 않은 조직에 대한 독성을 저하시키고, 이로써 전신 독성을 저하시킴으로써 현저히 개선시킬 수 있다. 이러한 목표 달성을 위해서 본 발명자들은 고도의 표적-특이 세포독성을 나타낼 목적으로 특이적으로 종양 세포를 표적하는 세포 결합 물질과 렙토마이신 B 유도체의 접합체 제조에 관해 고려하였다.

<8> **본 발명의 요약**

<9> 본 발명의 목적은 세포 결합 물질에 공유결합할 수 있는 연결기를 함유하는 신규한 렙토마이신 유도체와, 링커를 통한 상기 세포 결합 물질과의 상기 렙토마이신 유도체 결합을 포함하는 상응하는 접합체를 제공하는 것이다. 상기 접합체는 생체내에서 활성화될 수 있고 유리될 수 있으며, 표적화된 방식으로 특정 세포 군집으로 전달될 수 있는 치료제를 제공한다. 추가로 수 용해성을 증진시키기 위하여 임의의 폴리에틸렌 글리콜 스페이서를 연결기내로 도입시킬 수 있다.

<10> 본 발명의 화합물은 세포 결합 물질이 하나 이상의 본 발명의 화합물에 연결되어 있는 세포독성 접합체에 사용될 수 있다. 세포 결합 물질로는 항체 및 그의 단편, 인터페론, 림포카인, 비타민, 호르몬 및 성장 인자를 포함한다. 그러한 접합체를 함유하는 약제학적 조성물 또한 제공한다.

<11> 세포독성 접합체는 유효량의 상기 약제학적 조성물을 투여함으로써 대상자를 치료하는 방법에 사용될 수 있다. 선택된 세포 결합 물질이 결합하는 세포 유형에 따라 많은 질환이 생체내, 생체외 또는 시험관내에서 치료될 수 있다. 그러한 질환으로는 예를 들면, 림프종, 백혈병, 폐암, 유방암, 결장암, 전립선암, 신장암, 췌장암 등을 비롯한 많은 종류의 암 치료를 포함한다.

<12> 따라서, 특정 세포 결합 물질에 대한 접합을 통해 특이적인 세포 유형을 표적하는데 유용한 렙토마이신 유도체를 제공한다.

발명의 상세한 설명

<14> 본 발명자들은 세포 결합 물질과의 결합에 의해 렙토마이신 유도체의 치료학적 효능이 유도체의 종양 부위로의 표적화된 전달을 통해 생체내 분포를 변화시켜 표적화되지 않은 조직에 대한 독성을 저하시키고, 이로써 전신 독성을 저하시킴으로써 개선되는 것인, 세포 결합 물질과 결합할 수 있는 렙토마이신 유도체를 발견하게 되었다.

<15> 이러한 목표 달성을 위해 본 발명자들은 렙토마이신 유도체를 세포 결합 물질에 접합시키기 위한 연결기를 포함하는 대표적인 렙토마이신 유도체를 합성하였다. 이러한 연결기는 폴리에틸렌 글리콜 스페이서를 함유할 수 있다. 연결기는 세포 결합 물질과의 접합에 사용되며, 바람직하게는 디설파이드 결합 또는 설파이드 (또는 본원

에서 티오에테르로 명명됨) 결합을 포함한다.

<16> 예로서, 디설파이드 결합과 같이 절단가능한 결합을 사용함으로써 고도로 세포독성인 약물을 항체에 연결시켜 확실하게 세포내에서 전체적으로 활성인 약물을 유리시킬 수 있고, 그러한 접합체는 항원 특이 방식으로 세포독성이라는 것이 앞서 제시된 바 있다 {[R. V. J. Chari et al, 52 Cancer Res. 127-131 (1992)]; [R.V.J. Chari et al., 55 Cancer Res. 4079-4084 (1995)]; 및 미국 특허 번호 제5,208,020호 및 제5,475,092호}. 본 발명에서 본 발명자들은 렙토마이신 유도체 합성, 그를 모노클로날 항체와 접합시키는 방법, 및 상기 접합체의 시험관내 세포독성 및 특이성을 측정하는 방법을 기술한다. 따라서, 본 발명은 최소한의 부작용을 보이면서, 예로서 종양 세포, 바이러스 감염된 세포, 미생물 감염된 세포, 기생충 감염된 세포, 자가면역 세포 (자가항체를 생산하는 세포), 활성화된 세포 (이식편 거부 또는 이식편대숙주병에 관여하는 것)와 같이 사멸되거나 용해되어야 하는 이환된 세포 또는 비정상적인 세포, 또는 임의의 다른 유형의 이환된 세포 또는 비정상적인 세포의 제거를 지시하는 치료제 제조에 유용한 화합물을 제공한다.

<17> 따라서, 본 발명은 세포 결합 물질에 화학적으로 연결될 수 있고, 보호기가 유리되었을 때 모체 렙토마이신 유도체의 고도한 세포독성을 유지할 수 있는 렙토마이신 유도체의 합성을 교시한다. 이러한 화합물은 세포 결합 물질에 연결되었을 때에 세포 결합 물질이 결합한 세포에 대하여 세포독성이며, 표적화되지 않는 세포에는 훨씬 더 적은 독성을 띤다.

<18> **본 발명의 렙토마이신 유도체**

<19> 본 발명에 따른 렙토마이신 유도체는 상기 유도체를 세포 결합 물질에 접합시킬 수 있는 연결기를 포함한다.

<20> 본 발명에 따라 "렙토마이신 유도체"는 [Kalesse et al in Synthesis 2002, 8, 981-1003]에 정의되어 있는 바와 같은 렙토마이신 계열의 구성원들을 지칭하며, 렙토마이신, 예로서, 렙토마이신 A 및 렙토마이신 B, 칼리스타틴, 라차돈, 예로서, 라차돈 A 및 라차돈 B, 안구이노마이신, 예로서, 안구이노마이신 A, B, C, D, 카수사마이신, 렙톨스타틴, 렙토푸라닌, 예로서, 렙토푸라닌 A, B, C, D를 포함한다. 렙토마이신 A 및 B 유도체가 바람직하다.

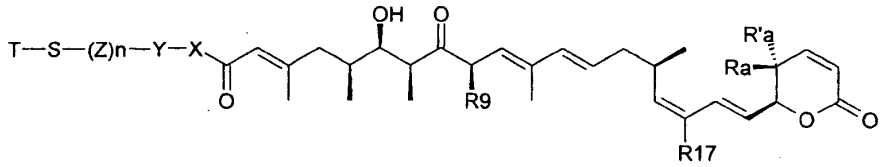
<21> 유도체를 세포 결합 물질에 연결시키기 위해서 유도체는 예로서, 디설파이드 결합, 설파이드 (또는 본원에서 티오에테르로 명명됨) 결합, 산-불안정성 기, 광-불안정성 기, 펩티다제-불안정성 기, 또는 에스터라제-불안정성 기를 통해 유도체가 세포 결합 물질에 연결될 수 있도록 하는 부분 (연결기)을 포함하여야 한다. 유도체는 유도체가 예를 들면, 디설파이드 결합, 티오에테르 결합, 산-불안정성 기, 광-불안정성 기, 펩티다제-불안정성 기, 또는 에스터라제-불안정성 기를 통해 렙토마이신 유도체를 세포 결합 물질에 연결시키는데 필요한 부분을 함유하도록 제조된다. 추가로 수용액내에서의 가용성을 증진시키기 위하여 연결기는 폴리에틸렌 글리콜 스페이서를 함유할 수 있다.

<22> 바람직하게, 표적화된 세포의 환원 환경하에 설파이드 또는 디설파이드가 절단되고, 세포독성 증가와 관련된 유도체가 유리되기 때문에 설파이드 또는 디설파이드 결합이 사용된다.

<23> 바람직한 측면에 따라 본 발명은 말단 카보닐 관능기가 유도체를 세포 결합 물질에 연결시킬 수 있는 부분을 나타내는 것인 렙토마이신 유도체를 제공한다. 연결 부분은 폴리에틸렌 글리콜 스페이서를 함유할 수 있다. 예로는 디설파이드 결합, 티오에테르 결합, 산-불안정성 기, 광-불안정성 기, 펩티다제-불안정성 기, 또는 에스터라제-불안정성 기를 통해 연결할 수 있는 부분을 포함하며, 당업계에 잘 알려져 있다 {예로서, 미국 특허 5,846,545 (본원에서 참고로 인용됨) 참조}. 바람직한 부분은 디설파이드 결합을 통해 연결시킬 수 있는 것, 예를 들면, 티올 또는 디설파이드이다. 임의의 말단 이탈기를 함유하는 혼합형 디설파이드, 예로서, 글루타티온, 알킬 티오, 예로서, 메틸티오, 피리딜티오, 아릴티오, 니트로피리딜티오, 하이드록시카보닐피리딜티오, (니트로)하이드록시카보닐피리딜티오 등이 사용될 수 있되, 단, 그러한 디설파이드는 유도체와 세포 결합 물질의 커플링을 위해 디설파이드-교환 반응을 겪을 수 있다.

<24> 더욱 특히, 본 발명의 유도체는 하기 화학식(I), 또는 그의 약제학적으로 허용가능한 염, 수화물 또는 수화된 염, 또는 이들 화합물의 다형성 결정 구조, 또는 그의 광학이성질체, 라세미체, 부분입체이성질체 또는 거울상이성질체이다:

화학식 I



<25>

<26> 상기 식에서,

<27> Ra 및 Ra'는 H 또는 -Alk이고; 바람직하게 Ra는 -Alk, 바람직하게는, 메틸이고, Ra'는 H이며;

<28> R17은 OR, CN, NRR', 퍼플루오로알킬에 의해 임의로 치환된 알킬이고; 바람직하게, R17은 알킬, 더욱 바람직하게는, 메틸 또는 에틸이며;

<29> R9는 OR, CN, NRR', 퍼플루오로알킬에 의해 임의로 치환된 알킬이고; 바람직하게, R9는 알킬, 더욱 바람직하게는, 메틸이며;

<30> X는 -O- 또는 -NR-이고; 바람직하게, X는 -NR-이며;

<31> Y는 -U-, -NR-U-, -O-U-, -NR-CO-U-, -U-NR-CO-, -U-CO-, -CO-U-이고;

<32> 바람직하게, X가 -O-일 때, Y는 -U-, -NR-U-, -U-NR-CO-이고;

<33> 여기서, U는 선형 또는 분지형 -Alk-, $-Alk(OCH_2CH_2)_m-$, $-(OCH_2CH_2)_m-Alk-$, $-Alk(OCH_2CH_2)_m-Alk-$, $-(OCH_2CH_2)_m-$, -사이클로알킬-, -헤테로사이클릭-, -사이클로알킬-Alk-, -Alk-사이클로알킬-, -헤테로사이클릭-Alk-, -Alk-헤테로사이클릭-으로부터 선택되고;

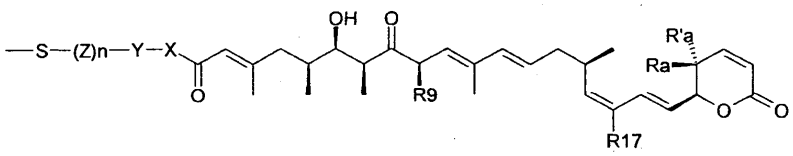
<34> 여기서, m은 1 내지 2000으로부터 선택되는 정수이며;

<35> 바람직하게, U는 선형 또는 분지형 -Alk-이고,

<36> Z는 -Alk-이며;

<37> n은 0 또는 1이고; 바람직하게, n은 0이며;

<38> T는 H, 티올 보호기, 예로서, Ac, R_1 또는 SR_1을 나타내며, 여기서, R_1은 H, 메틸, Alk, 사이클로알킬, 임의로 치환된 아릴 또는 헤테로사이클릭을 나타내거나, T는



<39>

<40> 을 나타내고,

<41> 여기서, Ra, Ra', R17, R9, X, Y, Z, n은 상기 정의되어 있고;

<42> 바람직하게, T는 H 또는 SR_1이며, 여기서, R_1은 Alk, 더욱 바람직하게는, 메틸을 나타내며;

<43> R, R'은 동일하거나, 상이하며, H 또는 알킬이고;

<44> Alk는 선형 또는 분지형 알킬을 나타내고; 바람직하게, Alk는 $(-(CH_{2-q}\ (CH_3)_q)_p-$를 나타내며, 여기서, p는 1 내지 10의 정수를 나타내고; q는 0 내지 2의 정수를 나타내며; 바람직하게는, Alk는 $-(CH_2)-$ 또는 $-C(CH_3)_2-$를 나타낸다.

<45> 바람직한 화합물은

<46> (2E,10E,12E,16Z,18E)-(R)-6-하이드록시-3,5,7,9,11,15,17-헵타메틸-19-((2S,3S)-3-메틸-6-옥소-3,6-디하이드로-2H-피란-2-일)-8-옥소-노나데카-2, 10,12,16,18-펜타에노산의 (2-메틸설파닐-에틸)-아미드

<47> 비스-[(2E,10E,12E,16Z,18E)-(R)-6-하이드록시-3,5,7,9,11,15,17-헵타메틸-19-((2S,3S)-3-메틸-6-옥소-3,6-디

하이드로-2H-피란-2-일)-8-옥소-노나데카-2,10,12,16,18-펜타에노산의 (2-머캅토에틸)-아미드]

<48> (2E,10E,12E,16Z,18E)-(R)-6-하이드록시-3,5,7,9,11,15,17-헵타메틸-19-((2S,3S)-3-메틸-6-옥소-3,6-디하이드로-2H-피란-2-일)-8-옥소-노나데카-2,10,12,16,18-펜타에노산의 (2-머캅토-에틸)-아미드

<49> (2E,10E,12E,16Z,18E)-(R)-6-하이드록시-3,5,7,9,11,15,17-헵타메틸-19-((2S,3S)-3-메틸-6-옥소-3,6-디하이드로-2H-피란-2-일)-8-옥소-노나데카-2,10,12,16,18-펜타에노산의 (2-메틸디설파닐-에틸)-아미드

<50> (2E,10E,12E,16Z,18E)-(R)-6-하이드록시-3,5,7,9,11,15,17-헵타메틸-19-((2S,3S)-3-메틸-6-옥소-3,6-디하이드로-2H-피란-2-일)-8-옥소-노나데카-2,10,12,16,18-펜타에노산의 (2-메틸-2-메틸디설파닐-프로필)-아미드

<51> (2E,10E,12E,16Z,18E)-(R)-6-하이드록시-3,5,7,9,11,15,17-헵타메틸-19-((2S,3S)-3-메틸-6-옥소-3,6-디하이드로-2H-피란-2-일)-8-옥소-노나데카-2,10,12,16,18-펜타에노산의 (2-머캅토-2-메틸-프로필)-아미드,

<52> 또는 그의 약제학적으로 허용가능한 염, 수화물 또는 수화된 염, 또는 이들 화합물의 다형성 결정 구조, 또는 그의 광학이성질체, 라세미체, 부분입체이성질체 또는 거울상이성질체로부터 선택될 수 있다.

<53> 본원에서 사용되는 바, 알킬은 선형 또는 분지형 C_1-C_{20} 알킬을 포함한다. 선형 알킬의 예로는 메틸, 에틸, 프로필, 부틸, 펜틸, 및 헥실을 포함한다. 분지형 알킬의 예로는 이소프로필, 이소부틸, sec-부틸, t-부틸, 이소펜틸 및 1-에틸-프로필을 포함한다. 사이클로알킬, 즉, 사이클릭 알킬의 예로는 사이클로프로필, 사이클로부틸, 사이클로펜틸 및 사이클로헥실을 포함한다. 아릴의 예로는 페닐 및 나프틸을 포함한다. 치환된 아릴의 예로는 알킬기로, 할로겐, 예로서, Cl, Br, F, 니트로기, 아미노기, 설폰산기, 카복실산기, 하이드록시기 및 알콕시기로 치환된 아릴, 예로서, 페닐 또는 나프틸을 포함한다. 헤테로사이클릭은 O, N, 및 S로부터 선택되는 하나 이상의 헤테로원자를 포함하는 임의의 방향족 환을 지칭하며, 예로는 푸릴, 피롤릴, 피리딜, (예컨대, 2-치환된 피리미딘기) 및 티오펜을 포함한다.

<54> 본 발명의 설파이드 또는 디설파이드-함유 및 머캅토-함유 유도체는 인큐베이션 조건하에 시험관내의 다양한 원치않는 세포주의 증식을 억제시킬 수 있는 그의 능력에 대하여 평가받을 수 있다. 세포주, 예를 들면, 라모스 (Ramos) 세포주 및 HL60이 용이하게 이들 화합물의 세포독성 평가를 하는데 사용될 수 있다. 평가하고자 하는 세포를 24시간 동안 상기 화합물에 노출시키고, 공지 방법에 의해 직접적인 분석법으로 세포 중 살아있는 분획을 측정할 수 있다. 이어서, IC_{50} 값을 상기 분석법의 결과로부터 계산할 수 있다.

<55> 본원에서 사용되는 바, "세포 결합 물질에 연결가능한"이라는 표현은 렙토마이신 유도체를 세포 결합 물질에 결합시키는데 적합한, 적어도 하나의 연결기, 또는 그의 전구체를 포함하는 렙토마이신 유도체를 지칭하며; 바람직한 연결기는 티올, 설파이드 또는 디설파이드 결합, 또는 그의 전구체이다.

<56> 본원에서 사용되는 바, "세포 결합 물질에 연결된"이라는 표현은 적합한 연결기, 또는 그의 전구체를 통해 세포 결합 물질에 결합된 적어도 하나의 렙토마이신 유도체를 포함하는 접합체 분자를 지칭하며; 바람직한 연결기는 티올, 설파이드 또는 디설파이드 결합, 또는 그의 전구체이다.

<57> 본원에서 사용되는 바, "환자"라는 용어는 동물, 예로서, 사육용, 반려용 또는 보존용의 매우 유용한 동물, 또는 바람직하게, 본원에 기술된 하나 이상의 질환 및 용태를 앓고 있거나, 앓을 가능성을 가진 인간 또는 인간 아이를 지칭한다.

<58> 본원에서 사용되는 바, "치료학적 유효량"은 본원에 기술된 질환 및 용태의 증상을 예방, 감소, 제거, 치료 또는 제어하는데 효과적인 본 발명의 화합물의 양을 지칭한다. "제어한다"라는 용어는 본원에 기술된 질환 및 용태의 진행이 저속화, 저지, 정지, 또는 중단될 수 있도록 하는 모든 과정을 지칭하고자 하나, 반드시 모든 질환 및 용태 증상이 완전히 제거되는 것을 의도하는 것은 아니며, 예방학적 치료법도 포함시키고자 한다.

<59> 본원에서 사용되는 바, "약제학적으로 허용가능한"이라는 용어는 타당한 의학적 판단 범주내에서 적당한 이익/위험 비율과 조화된, 과도한 독성, 자극, 알레르기 반응 또는 기타 문제가 많은 합병증없이 인간 및 동물의 조직과 접촉하는데 적합한 화합물, 물질, 부형제, 조성물 또는 제형을 지칭한다.

<60> 본원에서 사용되는 바, "약제학적으로 허용가능한 염"은 모체 화합물이 그의 산 또는 염기 염 제조에 의해 변형된, 개시된 화합물의 유도체를 지칭한다. 약제학적으로 허용가능한 염은 예를 들면, 비독성 무기 또는 유기산으로부터 형성된 모체 화합물의 통상적인 비독성 염 또는 4급 암모늄 염을 지칭한다. 예를 들면, 그러한 통상적인 비독성 염으로는 무기산, 예로서, 염산, 브롬화수소산, 황산, 설팜산, 인산, 질산 등으로부터 유도된 것; 및 유기산, 예로서, 아세트산, 프로피온산, 숙신산, 타르타르산, 시트르산, 메탄설폰산, 벤젠설폰산, 글루코론

산, 글루탐산, 벤조산, 살리실산, 톨루엔설폰산, 옥살산, 푸마르산, 말레산, 락트산 등으로부터 제조된 염을 포함한다. 추가로 부가염으로는 암모늄 염, 예로서, 트로메타민, 메글루민, 에포라민 등, 금속 염, 예로서, 나트륨, 칼륨, 칼슘, 아연 또는 마그네슘 염을 포함한다.

<61> 본 발명의 약제학적으로 허용가능한 염은 종래 화학 방법에 의해 염기성 또는 산성 부분을 함유하는 모체 화합물로부터 합성될 수 있다. 일반적으로, 그러한 염은 이들 화합물의 유리 산 또는 염기 형태를 물 또는 유기 용매 중, 또는 그 둘의 혼합물 중에서 화학량론적 양의 적절한 염기 또는 산과 함께 반응시킴으로써 제조할 수 있다. 일반적으로, 에테르, 에틸 아세테이트, 에탄올, 이소프로판올, 또는 아세토니트릴과 같은 비수성 매질이 바람직하다. 적합한 염에 관한 목록은 문헌 [*Remington's Pharmaceutical Sciences*, 17th ed., Mack Publishing Company, Easton, PA, 1985, p. 1418] (그의 개시 내용은 본원에서 참고로 인용된다)에서 찾아볼 수 있다.

<62> 추가의 다른 목적에 따라, 본 발명은 또한 본 발명의 화합물의 제조 방법에 관한 것이다.

<63> 본 발명의 화합물 및 방법은 당업자에게 잘 알려져 있는 다수의 방법에 의해 제조될 수 있다. 화합물은 예를 들면, 하기 기술하는 방법을 적용시키거나 개조시킴으로써, 또는 당업자가 이해하고 있는 바와 같이 그를 변형시킴으로써 합성할 수 있다. 당업자에게는 적절한 변형 및 치환이 분명 자명할 것이며, 과학 문헌으로부터 잘 알려져 있는 것이거나 쉽게 수득할 수 있는 것일 것이다.

<64> 특히, 그러한 방법은 문헌 [R.C. Larock, *Comprehensive Organic Transformations*, Wiley-VCH Publishers, 1999]에서 찾아볼 수 있다.

<65> 본 발명의 화합물은 비대칭적으로 치환된 하나 이상의 탄소 원자를 함유할 수 있고, 이는 광학적으로 활성인 형태 또는 라세미 형태로 단리될 수 있음을 이해할 것이다. 따라서, 달리 특정 입체화학 또는 이성질체 형태가 구체적으로 명시되지 않는 한, 모든 키랄, 부분입체이성질체, 라세미 형태 및 모든 기하 이성질체 형태 구조를 의도한다. 당업계에는 그러한 광학적으로 활성인 형태를 제조 및 단리시키는 방법이 잘 알려져 있다. 예를 들면, 입체이성질체 혼합물은 라세미 형태의 분할, 정상, 역상, 및 키랄 크로마토그래피, 선택적 염 형성, 재결정 등을 포함하나, 이에 한정되지 않는 표준 기법에 의해, 또는 키랄 출발 물질로부터의 키랄 합성 또는 표적 키랄 중심의 의도적인 합성에 의해 분리될 수 있다.

<66> 본 발명의 화합물은 다양한 합성 경로에 의해 제조될 수 있다. 시약 및 출발 물질은 상업적으로 이용가능하거나, 당업계의 숙련인들 중 한명에 의해 잘 알려져 있는 기법을 통해 쉽게 합성된다. 달리 명시하지 않는 한, 모든 치환기는 앞서 정의된 바와 같다.

<67> 하기 기술하는 반응에서, 반응성 관능기, 예를 들면, 하이드록시기, 아미노기, 이미노기, 티오기 또는 카복시기가 최종 생성물에서 바람직할 경우, 반응에서 그의 원치않는 참여를 막기 위해서는 이들을 보호하는 것이 필요할 수 있다. 표준 실시법에 따라 통상적인 보호기가 사용될 수 있으며, 예를 들면, {[T. W. Greene and P. G. M. Wuts in *Protective Groups in Organic Chemistry*, 3rd ed., John Wiley and Sons, 1999]; [J. F. W. McOmie in *Protective Groups in Organic Synthesis*, Plenum Press, 1973]}을 참조할 수 있다.

<68> 몇몇 반응은 염기 존재하에서 수행될 수 있다. 이러한 반응에 사용되는 염기의 성질에 관한 특별한 제한은 없으며, 이러한 유형의 반응에서 통상적으로 사용되는 임의의 염기가 본원에서 동등하게 사용될 수 있되, 단, 분자의 다른 부분에 대해 어떤 불리한 영향도 미치지 않아야 한다. 적합한 염기의 예로는 수산화나트륨, 탄산칼륨, 트리에틸아민, 알칼리 금속 수소화물, 예로서, 수소화나트륨 및 수소화칼륨; 알킬리튬 화합물, 예로서, 메틸리튬 및 부틸리튬; 및 알칼리 금속 알콕시드, 예로서, 메톡시드나트륨 및 에톡시드나트륨을 포함한다.

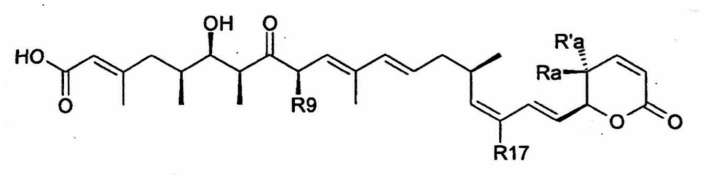
<69> 보통, 반응은 적합한 용매 중에서 수행된다. 다양한 용매가 사용될 수 있되, 단, 반응, 또는 포함된 시약에 어떤 불리한 영향도 미치지 않아야 한다. 적합한 용매의 예로는 방향족, 지방족, 또는 사이클로지방족 탄화수소일 수 있는 탄화수소, 예로서, 헥산, 사이클로헥산, 벤젠, 톨루엔 및 크실렌; 아미드, 예로서, 디메틸포름아미드; 알코올, 예로서, 에탄올 및 메탄올 및 에테르, 예로서, 디에틸에테르 및 테트라하이드로푸란을 포함한다.

<70> 반응은 광범위한 온도 범위에서 일어날 수 있다. 일반적으로, 본 발명자들은 0℃ 내지 150℃ (더욱 바람직하게는, 약 실온 내지 100℃)의 온도에서 반응을 수행하는 것이 용이하다는 것을 발견하였다. 반응에 필요한 시간은 또한 다수의 인자, 특히 반응 온도 및 시약의 성질에 따라 광범위하게 달라질 수 있다. 그러나, 반응이 상기 개략된 바람직한 조건 하에서 수행된다면, 3시간 내지 20시간의 기간이 통상적으로 충분할 것이다.

<71> 그렇게 제조된 화합물은 통상적인 수단에 의해 반응 혼합물로부터 회수될 수 있다. 예를 들면, 화합물은, 반응 혼합물로부터 용매를 증류시키거나, 필요하다면, 반응 혼합물로부터 용매를 증류시킨 후, 잔류물을 물에 붓고, 이어서 수-불혼화성 유기 용매로 추출하고, 추출물로부터 용매를 증류시킴으로써 회수할 수 있다. 추가로, 생성물은, 원한다면 잘 알려져 있는 다양한 기법, 예로서, 재결정, 재침전, 또는 다양한 크로마토그래피 기법, 특히, 칼럼 크로마토그래피 또는 분취용 박층 크로마토그래피에 의해 추가로 정제될 수 있다.

<72> 화학식(I)의 화합물의 제조 방법은 하기의 상응하는 화학식(II)의 화합물 및 화학식(III)의 화합물을 반응시키는 단계를 포함한다:

화학식 II

<73> 

화학식 III

<74> T- S-(Z)n-Y-XH

<75> 상기 식에서,

<76> Ra, Ra', R17, R9, X, Y, Z, T, n는 화학식(I)에서 정의된 바와 같다.

<77> 일반적으로, 이러한 반응은 라세미화를 억제시키는 시약, 예로서, HOBT, 및/또는 아미드 또는 에스테르 형성에 대하여 카복실산을 활성화시키는데 사용되는 탈수화제, 예로서, DIC, DCC를 비롯한 일반 커플링 시약의 존재하에서 수행될 수 있다.

<78> 전형적으로, 이러한 반응은 적합한 유기 용매, 예로서, 디클로로메탄 중에서 수행될 수 있다.

<79> 화학식(I)에서, T가 H인 경우, 반응은 별법으로 유기 염기, 예로서, 트리에틸아민을 비롯한 염기의 존재하에 N-아실화제, 예로서, 염화피발로일을 사용함으로써 수행될 수 있다.

<80> 별법으로, 화학식(I)에서, T가 H인 경우, 화학식(I)의 화합물은 또한 디설파이드 결합의 환원제, 예로서, 트리알킬포스핀 및 더욱 특히 TCEP의 존재하에서 T가 S-R1인 상응하는 화학식(I)의 화합물로부터 수득될 수 있다. 이러한 반응은 일반적으로 수성 매질, 예로서, 유기 용매 및 물, 예를 들어, THF/물의 혼합물에서 수행될 수 있다.

<81> 화학식(I)의 이량체 화합물은 라세미화를 억제시키는 시약, 예로서, HOBT, 및/또는 아미드 또는 에스테르 형성에 대하여 카복실산을 활성화시키는데 사용되는 탈수화제, 예로서, DIC, DCC를 비롯한 일반 커플링 시약의 존재하에서 상응하는 화학식(II)의 화합물을 하기의 상응하는 화학식(IV)의 화합물과 반응시킴으로써 제조될 수 있다:

화학식 IV

<82> HX-Y-(Z)n-S-S-(Z)n-Y-XH

<83> 전형적으로, 이러한 반응은 적합한 유기 용매 예로서, 디클로로메탄 중에서 수행될 수 있다.

<84> 본 공정은 또한 수득한 생성물을 단리시키는 추가 단계를 포함할 수 있다.

<85> 본 발명은 또한 상기 연결기를 포함하는 링커를 통해 본 발명에 따른 하나 이상의 렙토마이신 유도체에 연결된 세포 결합 물질을 포함하는 렙토마이신 유도체 접합체에 관한 것이다.

<86> 바람직하게, 세포 결합 물질은 항체 또는 그의 단편이다.

<87> 바람직하게, 링커는 -S- 또는 -S-S- 기를 포함한다.

<88> **세포 결합 물질의 제조**

<89> 세포 결합 물질은 현재 공지되어 있거나, 공지된 임의 종류의 것일 수 있고, 펩티드 및 비-펩티드를 포함한다.

일반적으로, 이들은 항체 (특히, 모노클로날 항체) 또는 적어도 하나의 결합 부위를 함유하는 항체의 단편, 림포카인, 호르몬, 성장 인자, 영양소-수송 분자 (예로서, 트랜스페린), 또는 임의의 기타 세포 결합 분자 또는 물질일 수 있다.

<90> 사용될 수 있는 세포 결합 물질의 보다 구체적인 예로는 하기를 포함한다:

<91> - 모노클로날 항체;

<92> - 단일 쇄 항체;

<93> - 항체의 단편, 예로서, Fab, Fab', $F(ab')_2$ 및 Fv {[Parham, 131 J. Immunol. 2895-2902 (1983)]; [Spring et al, 113 J. Immunol. 470-478 (1974)]; [Nisonoff et al, 89 Arch. Biochem. Biophys. 230-244 (1960)]};

<94> - 인터페론;

<95> - 펩티드;

<96> - 림포카인, 예로서, IL-2, IL-3, IL-4, IL-6;

<97> - 호르몬 예로서, 인슐린, TRH (갑상선자극호르몬 방출 호르몬), MSH (멜라닌세포-자극 호르몬), 스테로이드 호르몬, 예로서, 안드로겐 및 에스트로겐;

<98> - 성장 인자 및 집락-자극 인자, 예로서, EGF, TGFα, 인슐린 유사 성장 인자 (IGF-I, IGF-II) G-CSF, M-CSF 및 GM-CSF {Burgess, 5 Immunology Today 155-158 (1984)}; 비타민, 예로서, 엽산 및

<99> - 트랜스페린 {O'Keefe et al, 260 J. Biol. Chem. 932-937 (1985)}.

<100> 모노클로날 항체 기술을 통해 특이적인 모노클로날 항체 형태로 극도로 선택적인 세포 결합 물질을 생산할 수 있다. 마우스, 래트, 햄스터 또는 임의의 다른 포유동물을 관심의 대상이 되는 항원, 예로서, 무손상 표적 세포, 표적 세포로부터 단리된 항원, 전체 바이러스, 약독화된 전체 바이러스, 및 바이러스 단백질, 예로서, 바이러스 외피 단백질로 면역화시킴으로써 생산된 모노클로날 항체를 생성하는 기법은 특히 당업계에 잘 알려져 있다.

<101> 적절한 세포 결합 물질을 선택하는 것은 표적화시키고자 하는 특정 세포 군집에 따라 다른 선택의 문제이지만, 일반적으로는 적절한 것이 이용가능하다면 모노클로날 항체가 바람직하다.

<102> 예를 들면, 모노클로날 항체 MY9는 CD33 항원에 특이적으로 결합하는 뮤린 IgG_1 항체이며 {J. D. Griffin et al 8 Leukemia Res., 521 (1984)}, 표적 세포가 급성 골수성 백혈병 (AML) 질병에서와 같이 CD33을 발현하는 경우에 사용될 수 있다. 유사하게, 모노클로날 항체 항-B4는 B 세포상의 CD19 항원에 결합하는 뮤린 IgG_1이며 {Nadler et al, 131 J. Immunol. 244-250 (1983)}, 표적 세포가 예로서, 비-호지킨 림프종 또는 만성 림프모구 백혈병에서 이러한 항원을 발현시키는 B 세포 또는 이환된 세포인 경우 사용될 수 있다.

<103> 추가로, 골수성 세포에 결합하는 GM-CSF가 급성 골수성 백혈병으로부터의 이환된 세포에 대한 세포 결합 물질로서 사용될 수 있다. 활성화된 T-세포에 결합하는 IL-2는 이식 이식편 거부 예방을 위해, 이식편대숙주병의 요법 및 예방을 위해, 및 급성 T-세포 백혈병의 치료를 위해 사용될 수 있다. 멜라닌세포에 결합하는 MSH는 흑색종 치료를 위해 사용될 수 있다.

<104> **접합체 제조**

<105> 유도체와 세포 결합 물질의 접합체는 현재 알려져 있거나, 추후 개발되는 임의의 기법을 사용함으로써 형성될 수 있다. 일반적으로, 본 발명의 접합체를 제조하는 방법은 유도체와 세포 결합 물질의 연결기에 대하여 반응성인 관능기를 포함하는 시약의 존재하에 본 발명의 렙토마이신 유도체를 세포 결합 물질과 반응시켜 이로써 유도체와 세포 결합 물질이 상기 연결기를 포함하는 링커를 통해 함께 연결될 수 있도록 하는 단계를 포함한다. 바람직하게, 상기 링커는 설파이드 또는 디설파이드 결합을 포함한다.

<106> 유도체는 유리 아미노기를 함유하도록 제조된 후, 이어서, 산-불안정성 링커를 통해, 또는 광-불안정성 링커에 의해 항체 또는 기타 세포 결합 물질에 연결될 수 있다. 유도체는 적합한 서열을 갖는 펩티드와 축합된 후, 이어서, 세포 결합 물질에 연결되어 펩티다제-불안정성 링커를 생산할 수 있다. 세포독성 화합물은 1차 하이드록실기를 함유하도록 제조될 수 있고, 이는 숙시닐화되고 세포 결합 물질에 연결되어, 세포내 에스터라제에 의한 절단에 의해 유리 렙토마이신 유도체를 유리시킬 수 있는 접합체를 생산할 수 있다. 바람직하게, 유도체는

PEG-함유 스페이서를 포함하거나 포함하지 않으면서 유리 또는 보호된 티올기를 함유하도록 합성되고, 이어서, 하나 이상의 설파이드, 디설파이드 또는 티올-함유 유도체는 각각 디설파이드 결합 또는 티오에테르 결합을 통해 세포 결합 물질에 공유적으로 연결된다.

<107> 본 발명의 대표적인 접합체는 렙토마이신 유도체와 항체, 항체 단편, 표피 성장 인자 (EGF), 멜라닌세포 자극 호르몬 (MSH), 갑상선 자극 호르몬 (TSH), 에스트로겐, 에스트로겐 유사체, 안드로겐, 및 안드로겐 유사체의 접합체이다.

<108> 렙토마이신 유도체와 세포 결합 물질의 다양한 접합체의 제조에 관한 대표적인 예는 하기에 기술한다.

<109> **디설파이드 링커**: 항체 huMy-9-6은 대다수의 급성 골수성 백혈병 (AML) 사례를 비롯한 인간 골수성 세포의 표면상에서 발견되는 CD33 항원에 대해 유발된 뮤린 모노클로날 항체 My-9-6의 유전적으로 인간화된 형태이다 ([EJ. Favaloro, K.F. Bradstock, A. Kabral, P. Grimsley & M. C. Berndt, Disease Markers, 5(4):215 (1987)]; [M.G. Hoffee, D. Tavares, R.J. Lutz, Robert J., PCT Int. Appl. (2004) WO 2004043344]). My-9-6은 접합체 제조에 사용될 수 있다. 항체는 앞서 기술된 바와 같이 {J. Carlsson, H. Drevin & R. Axen, Biochem. J., 173:723 (1978)} N-숙신이미딜-3-피리딜디티오 프로피오네이트를 사용하여 변형되어 평균적으로 항체 분자 1개당 4개의 피리딜디티오기를 도입한다. 변형된 항체는 티올-함유 렙토마이신 유도체와 반응함으로써 디설파이드-연결된 접합체를 생산하게 된다.

<110> **티오에테르 링커**: 본 발명의 티올-함유 유도체는 앞서 기술된 바와 같이 (미국 특허 번호 제5,208,020호) 티오에테르 결합을 통해 항체 및 기타 세포 결합 물질에 연결될 수 있다. 항체 또는 기타 세포 결합 물질은 공지되어 있거나, 상업적으로 이용가능한 화합물 예로서, N-설포숙신이미딜-4-(5-니트로-2-피리딜-디티오)부타노에이트 (SSNPB), N-숙신이미딜 4-(말레이미도메틸)사이클로헥산-카복실레이트 (SMCC), N-숙신이미딜-4-(N-말레이미도메틸)-사이클로헥산-1-카복시-(6-아미도카프로에이트) (이는 SMCC의 "장쇄" 유사체이다 (LC-SMCC))로 변형될 수 있다. 이러한 가교결합 시약은 말레이미도계 부분으로부터 유도된 절단불가능한 링커를 형성한다.

<111> 할로아세틸계 부분을 포함하는 가교결합 시약은 N-숙신이미딜-4-(요오도아세틸)-아미노벤조에이트 (SIAB), N-숙신이미딜 요오도아세테이트 (SIA), N-숙신이미딜 브로모아세테이트 (SBA) 및 N-숙신이미딜 3-(브로모-아세트아미도)프로피오네이트 (SBAP)를 포함한다. 이러한 가교결합 시약은 할로아세틸계 부분으로부터 유도된 절단불가능한 링커를 형성한다. 변형된 세포 결합 물질은 티올-함유 약물과 반응하여 티오에테르-연결된 접합체를 제공할 수 있다.

<112> **산-불안정성 링커**: 본 발명의 아미노기-함유 렙토마이신 유도체는 앞서 기술된 바와 같이 {[W. A. Blattler et al, Biochemistry 24, 1517-1524 (1985)]; 미국 특허 번호 제4,542,225호, 제4,569,789호, 제4,618,492호, 제4,764,368호} 산-불안정성 링커를 통해 항체 및 기타 세포 결합 물질에 연결될 수 있다.

<113> 유사하게, 본 발명의 하이드라지도기-함유 렙토마이신 유도체는 산-불안정성 하이드라존 링커 {하이드라존 링커의 예에 관해서는 ([B. C. Laguzza et al, J. Med. Chem., 32, 548-555 (1989)]; [R. S. Greenfield et al, Cancer Res., 50, 6600-6607 (1990)]) 참조}를 통해 항체 및 기타 세포 결합 물질의 당질 부위에 연결될 수 있다.

<114> **광-불안정성 링커**: 본 발명의 아민기 함유 렙토마이신 유도체는 앞서 기술된 바와 같이 {[P. Senter et al, Photochemistry and Photobiology, 42, 231-237 (1985)]; 미국 특허 번호 제4,625,014호} 광-불안정성 링커를 통해 항체 및 기타 세포 결합 물질에 연결될 수 있다.

<115> **펩티다제-불안정성 링커**: 본 발명의 아민기 함유 렙토마이신 유도체는 또한 펩티드 스페이서를 통해 세포 결합 물질에 연결될 수 있다. 약물 및 거대분자 단백질 운반체 사이의 짧은 펩티드 스페이서는 혈청에서는 안정적이지만, 세포내 펩티다제에 의해서는 쉽게 가수분해되는 것으로 앞서 제시된 바 있다 {A. Trouet et al, Proc. Natl. Acad. Sci., 79, 626-629 (1982)}. 아미노기 함유 렙토마이신 유도체는 축합제, 예로서, 1-에틸-3-(3-디메틸아미노프로필)카보디이미드-HCl (EDC-HCl)의 사용으로 펩티드와 축합시킴으로써 세포 결합 물질에 연결될 수 있는 펩티드 유도체를 수득할 수 있다.

<116> **에스터라제-불안정성 링커**: 하이드록시 알킬기를 포함하는 본 발명의 렙토마이신 유도체는 숙신산 무수물로 숙시닐화된 후, 세포 결합 물질에 연결됨으로써 세포내 에스터라제에 의한 절단에 의해 유리 약물을 유리시킬 수 있는 접합체를 생산할 수 있다 {예를 들면, [E. Aboud-Pirak et al., Biochem Pharmacol., 38, 641-648 (1989)] 참조}.

<117> 항체, 항체 단편, 단백질 또는 펩티드 호르몬, 단백질 또는 펩티드 성장 인자 및 기타 단백질의 접합체는 공지된 방법에 의해 동일한 방식으로 제조된다. 예를 들면, 펩티드 및 항체는 공지된 방법에 의해 가교결합 시약, 예로서, N-숙신이미딜 3-(2-피리딜디티오)프로피오네이트, N-숙신이미딜 4-(2-피리딜디티오) 펜타노에이트 (SPP), 4-숙신이미딜-옥시카보닐-α-메틸-α-(2-피리딜디티오)-톨루엔 (SMPT), N-숙신이미딜-3-(2-피리딜디티오)부티레이트 (SDPB), 숙신이미딜 피리딜-디티오프로피오네이트 (SPDP), 4-(2-피리딜디티오)부타노산 N-하이드로숙신이미드 에스테르 (SPDB), 숙신이미딜 4-[N-말레이미도메틸]사이클로헥산-1-카복실레이트 (SMCC), N-설포숙신이미딜-3-(2-(5-니트로-피리딜디티오)부티레이트 (SSNPB), 2-이미노티올란, 또는 S-아세틸숙신산 무수물로 변형될 수 있다. ([Carlsson et al., 173, Biochem. J. 723-737 (1978)]; [Blattler et al., 24, Biochem. 1517-1524 (1985)]; [Lambert et al., 22, Biochem. 3913-3920 (1983)]; [Klotz et al., 96, Arch. Biochem. Biophys., 605 (1962)]; 및 [Liu et al., 18, Biochem., 690 (1979)], [Blakey and Thorpe, 1 Antibody, Immunoconjugates & Radiopharmaceuticals, 1-16 (1988)], [Worrell et al. 1 Anti-Cancer Drug Design 179-184 (1986)]) 참조. 그렇게 유도된 유리 또는 보호된 티올-함유 세포 결합 물질은 디설파이드- 또는 티올-함유 렙토마이신 유도체와 반응하여 접합체를 생산한다.

<118> 상기 방법에 의해 제조된 접합체는 표준 칼럼 크로마토그래피에 의해 또는 HPLC에 의해 정제될 수 있다.

<119> 바람직하게, 모노클로날 항체 또는 세포 결합 물질과 본 발명의 렙토마이신 유도체 사이의 접합체는 상기 논의된 바와 같이 디설파이드 결합, 또는 티오에테르 결합을 통해 연결된 것이다. 그러한 세포 결합 접합체는 공지된 방법에 의해, 예로서, 모노클로날 항체를 숙신이미딜 피리딜-디티오프로피오네이트 (SPDP)로 변형시켜 제조된다 {[Carlsson et al, 173, Biochem. J., 723-737 (1978)]}. 생성된 티오피리딜기는 이어서 티올 함유 렙토마이신 유도체를 사용한 처리에 의해 대체됨으로써 디설파이드 연결된 접합체를 생산하게 된다. 디설파이드 브릿지를 통해 연결된 1 내지 10개의 렙토마이신 유도체를 함유하는 접합체는 이러한 방법으로 용이하게 제조된다. 이러한 방법에 의한 접합은 미국 특허 5,585,499 (본원에서 참고로 인용된다)에 전체적으로 기술되어 있다

<120> **세포 결합 물질과 본 발명의 렙토마이신 유도체 사이의 접합체의 시험관내 독성**

<121> 본 발명의 렙토마이신 유도체 및 세포 결합 물질과 그의 접합체의 세포독성은 보호기를 절단하고, 활성 약물로 전환시킨 후에 측정할 수 있다. 비-부착성 세포주, 예로서, 나말와(Namalwa) 및 HL60에 대한 세포독성은 [Goldmacher et al, 135, J. Immunol., 3648-3651 (1985)]에 기재되어 있는 바와 같이 세포 증식 곡선의 역-외삽법(back-extrapolation)에 의해 측정될 수 있다. 부착성 세포주, 예로서, A-375 및 SCaBER에 대한 이들 화합물의 세포독성은 [Goldmacher et al., 102 J. Cell Biol. 1312-1319 (1986)]에 기재되어 있는 바와 같은 클론원성 분석법으로 측정될 수 있다.

<122> **선택된 세포 군집의 성장을 저해하는 치료제 및 저해 방법**

<123> 본 발명은 또한

<124> (a) 세포 독성량의, 세포 결합 물질에 연결된, 하나 이상의 상기-기술된 렙토마이신 유도체, 및

<125> (b) 약제학적으로 허용가능한 담체, 희석제 또는 부형제를 포함하는, 선택된 세포 군집의 성장을 저해하기 위한 치료제를 제공한다.

<126> 유사하게, 본 발명은 세포 군집 또는 상기 선택된 세포 군집으로부터의 세포를 함유하는 것으로 의심되는 조직을 세포 결합 물질에 연결된, 하나 이상의 상기-기술된 렙토마이신 유도체를 포함하는, 세포 독성량의 세포독성제를 접촉시키는 것을 포함하는, 선택된 세포 군집의 성장을 저해하는 방법을 제공한다.

<127> 세포독성제는 상기 기술된 바와 같이 제조된다.

<128> 적합한 약제학적으로 허용가능한 담체, 희석제 또는 부형제는 잘 알려져 있고, 임상 상황이 보증하는 바에 따라 당업자는 결정할 수 있다.

<129> 적합한 담체, 희석제 및/또는 부형제의 예로는 (1) 둘베코스(Dulbecco's) 인산염 완충처리된 염수, pH 약 7.4, 약 1 mg/ml 내지 25 mg/ml의 인간 혈청 알부민 함유, (2) 0.9% 염수 (0.9% w/v NaCl), 및 (3) 5% (w/v) 덱스트로스를 포함한다.

<130> 선택된 세포 군집의 성장을 저해하는 방법은 시험관내, 생체내, 또는 생체외에서 실시될 수 있다.

<131> 시험관내 용도에 관한 예로는 표적 항원을 발현하지 않는 원하는 변이체를 제외한 모든 세포를 사멸시키기

위해; 또는 원치않는 항원을 발현하는 변이체를 사멸시키기 위해 세포 배양물을 처리하는 것을 포함한다.

<132> 비-임상적인 시험관내 용도에 관한 조건은 당업자에 의해 용이하게 결정된다.

<133> 생체외 용도에 관한 예로는 이환된 세포 또는 악성 세포를 사멸시키기 위하여 동일 환자에 그를 이식하기 이전의 자가 골수 이식 치료; 적격 T 세포를 사멸시키고, 이식편대숙주병 (GVHD)을 예방하기 위해 그를 이식하기 이전의 골수 치료를 포함한다.

<134> 암 치료 또는 자가면역 질환의 치료에서 자가 이식 이전에 골수로부터 종양 세포 또는 림프계 세포를 제거하거나, GVHD를 예방하기 위해 이식 이전에 동종 골수 또는 조직으로부터 T 세포 및 기타 림프계 세포를 제거하는 임상적인 생체외 치료법은 하기와 같이 수행될 수 있다. 골수를 환자 또는 다른 개체로부터 수거한 후, 본 발명의 세포독성제가 함유되어 있는 혈청을 함유하며 농도 범위는 약 10 μM 내지 1 pM 범위인 배지에서 약 30분 내지 약 48시간 동안 약 37℃에서 인큐베이션시킨다. 정확한 농도 조건 및 인큐베이션 시간 (=용량)은 당업자에 의해 용이하게 결정된다. 인큐베이션 후, 골수 세포를, 혈청을 함유하는 배지로 세척하고, 공지된 방법에 따라 i.v. 주입에 의해 상기 환자에게로 복귀시킨다. 환자가 골수 수거 시간과 치료된 세포 재주입 시간 사이에 예로서, 절제 화학요법 또는 전신 방사선 조사 과정과 같은 다른 치료법을 받을 경우에는 치료된 골수 세포를 표준 의료 장치를 사용하여 액체 질소에서 냉동 보관한다.

<135> 임상적인 생체내 용도의 경우, 본 발명의 세포독성제는 멸균성에 대해, 및 내독소 수준에 대해 시험되는 액제로서, 또는 주사용 멸균수로 재용해될 수 있는 동결건조된 고체로서 공급될 것이다. 접합체 투여에 적합한 프로토콜의 예는 하기와 같다. 접합체는 i.v. 볼루스로서 6주 동안 매주 투여된다. 볼루스 용량은 인간 혈청 알부민 (예를 들어, 진한 인간 혈청 알부민 용액 0.5 내지 1 mL, 100 mg/mL)이 첨가될 수 있는 50 내지 400 ml의 생리식염수에 제공된다. 투여량은 i.v.로 1주당 약 50 ㎍ 내지 10 mg/kg (체중)일 것이다 (주사 1회당 10 ㎍ 내지 100 mg/kg 범위). 치료후 6주째 환자는 2차 치료 과정을 받을 수 있다. 투여 경로, 부형제, 희석제, 투여량, 시간 등과 관련된 특정의 임상 프로토콜은 임상 상황이 보증하는 바에 따라 당업자에 의해 결정될 수 있다.

<136> 선택된 세포 군집을 사멸시키는 생체내, 또는 생체외 방법에 따라 치료될 수 있는 의학적 용태의 예로는 예를 들면, 폐암, 유방암, 결장암, 전립선암, 신장암, 췌장암, 난소암, 및 림프 기관의 암을 비롯한 임의 유형의 악성 종양; 흑색종; 자가면역 질환, 예로서, 전신성 루프스, 류마티스 관절염, 및 다발 경화증; 이식편 거부, 예로서, 신장 이식 거부, 간 이식 거부, 폐 이식 거부, 심장 이식 거부, 및 골수 이식 거부; 이식편대숙주병; 바이러스 감염, 예로서, CMV 감염, HIV 감염, AIDS 등; 세균 감염; 및 기생충 감염, 예로서, 편모충증, 아메바증, 주혈흡충증, 및 당업자에 의해 결정된 기타의 것을 포함한다.

실 시 예

<137> 본 발명은 이제 비-제한적인 실시예를 참고로 하여 설명될 것이다. 달리 언급하지 않는 한, 모든 %, 비, 부 (parts) 등은 중량%, 중량비, 중량부이다.

<138> 재료 및 방법

<139> 융점은 전열 기기를 사용하여 측정하고, 보정하지는 않았다. NMR 스펙트럼은 브루커 아반스(Bruker AVANCE) 400 (400 MHz) 분광계상에서 기록하였다. 화학적 이동은 내부 표준으로서 TMS와 비교하여 ppm으로 기록하였다. 질량 스펙트럼은 브루커 에스콰이어(Bruker Esquire) 3000 시스템을 사용하여 수득하였다. 자외선 스펙트럼은 히다치(Hitachi) U1200 분광광도계상에서 기록하였다. 벡크만 쿨터(Beckman Coulter) 시스템 골드(GOLD) 168 가변 파장 검출기 및 워터스(Waters) 래디알팩(RADIALPAK), (역상 C-18 칼럼)이 장착된 벡크만 쿨터 골드 125 시스템을 사용하여 HPLC를 실시하였다. 아날테크(Analtech) GF 실리카겔 TLC 플레이트 상에서 박층 크로마토그래피를 실시하였다. 플래쉬 칼럼 크로마토그래피용 실리카겔은 베이커(Baker)로부터 입수하였다. 테트라하이드로푸란을 나트륨 금속 상에서 증류에 의해 건조시켰다. 디메틸아세트아미드 및 디메틸포름아미드는 감압하에 수소화칼슘 상에서 증류에 의해 건조시켰다. 사용된 모든 다른 용매는 시약 등급 또는 HPLC 등급이었다.

<140> 인간 암 세포주 HL60, 나말와, A-375, COLO205 및 라모스를 아메리칸 타이프 컬쳐 컬랙숀(American Type Culture Collection) (ATCC)으로부터 입수하였다. 카라(Kara)는 인간 CD33 항원으로 안정적으로 형질감염된 뮤린 종양 세포주이다.

<141> 실험부

<142> 질량 분광법 분석을 하기와 같이 수행하였다:

<143> EI-CI 분석: 직접 도입 (DCI= 필라멘트상의 샘플 침전) 질량 분광계 핀니건(Finnigan) SSQ7000; 질량 범위 m/z=29-900; 전자 에너지 70eV; 공급원 온도 70℃; 반응물 gaz CI 암모니아; EI= 전자 충격을 통한 이온화; CI= 화학적 이온화.

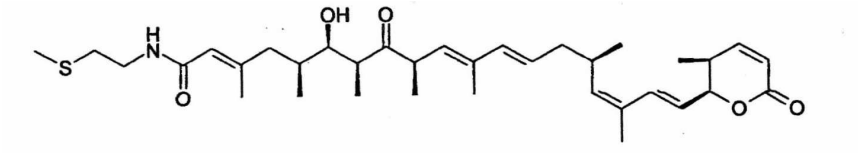
<144> 전자분무 분석법: (양성 전자분무: ES^+; 음성 전자분무: ES^-)

<145> LC-MS-DAD-ELSD:

<146> MS: 워터스-마이크로매스 ZQ; LC: 애질런트(Agilent) HP 1100; LC 칼럼 엑스브릿지(Xbridge) 워터스 C18, 3X50 mm, 2.5 ㎛; 용리제: 구배 물 (0.1% 포름산 포함) + 아세토니트릴; UV: DAD (λ=200-400 nm).

<147> 실시예 1:

<148> (2E,10E,12E,16Z,18E)-(R)-6-하이드록시-3,5,7,9,11,15,17-헵타메틸-19-((2S,3S)-3-메틸-6-옥소-3,6-디하이드로-2H-피란-2-일)-8-옥소-노나데카-2,10,12,16,18-펜타에노산의 (2-메틸설파닐-에틸)-아미드

<149> 

<150> 약 20℃의 온도에서 0.3 ml의 디클로로메탄중 20 mg의 (2E,10E,12E,16Z,18E)-(R)-6-하이드록시-3,5,7,9,11,15,17-헵타메틸-19-((2S,3S)-3-메틸-6-옥소-3,6-디하이드로-2H-피란-2-일)-8-옥소-노나데카-2,10,12,16,18-펜타에노산 및 5.6 mg의 HOBT (1-하이드록시벤조트리아졸)의 용액에 7.65 ㎕의 DIC (N,N'-디이소프로필카보디이미드), 이어서, 5.2 mg의 2-(티오메틸)에틸아민을 도입하였다. 반응 혼합물을 약 20℃의 온도에서 20.5시간 동안 교반한 후, 2개의 분취용 실리카겔 TLC 플레이트 (두께 0.5 mm, 20x20 cm) 상에서 직접 침전에 의해 정제하였다. 분취용 TLC 플레이트를 메탄올/디클로로메탄 (부피로 5/95) 혼합물로 용리시킨 후, 원하는 생성물을 메탄올/디클로로메탄 (부피로 15/85) 혼합물로 실리카겔로부터 추출하였다. 1.4 mg의 (2E,10E,12E,16Z,18E)-(R)-6-하이드록시-3,5,7,9,11,15,17-헵타메틸-19-((2S,3S)-3-메틸-6-옥소-3,6-디하이드로-2H-피란-2-일)-8-옥소-노나데카-2,10,12,16,18-펜타에노산의 (2-메틸설파닐-에틸)-아미드를 황색 고체로서 수득하였으며, 그의 특징은 하기와 같았다:

<151> 질량 스펙트럼:

<152> ● CI: m/z=617: $[M+NH_4]+$; m/z=600: $[M+H]^+$

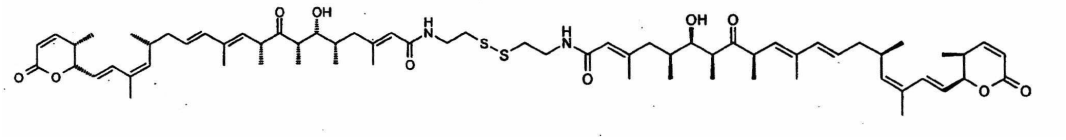
<153> 303K의 온도에서 7,27인 용매로서 클로로포름-d1 (CDCl3-d1)을 기준으로 하여 하기 화학적 이동 (δ는 ppm 표시)에 따라 분광계 브루커 아반스 DMX-600 상에서 수득된 600 MHz에서의 1H NMR 스펙트럼:

0,79 (d, J = 6,5 Hz, 3H) ; 0,97 (d, J = 7.0 Hz, 3H) ; 1,07 (d, J = 7,0 Hz, 3H) ; 1,12 (d, J = 7,0 Hz, 3H) ; 1,15 (d, J = 7,5 Hz, 3H) ; 1,71 (m, 1H) ; 1,81 (s, 3H) ; 1,82 (m 부분적으로 차폐됨 , 1H) ; 1,83 (s, 3H) ; 2,08 (m, 2H) ; 2,11 (s, 3H) ; 2,13 (s, 3H) ; 2,15 (dd, J = 6,5 및 13,5 Hz, 1H) ; 2,45 (m broad, 1H) ; 2,53 (m, 1H) ; 2,66 (t, J = 6,5 Hz, 2H) ; 2,70 (m, 1H) ; 2,82 (m, 1H) ; 3,50 (q, J = 6,5 Hz, 2H) ; 3,61 (m, 1H) ; 3,65 (m, 1H) ; 5,01 (dd, J = 4,5 및 7,5 Hz, 1H) ; 5,09 (d, J = 10,0 Hz, 1H) ; 5,26 (d, J = 10,0 Hz, 1H) ; 5,55 내지 5,66 (m, 2H) ; 5, 69 (dd, J = 7,5 및 16,0 Hz, 1H) ; 5,97 (t broad, J = 6,5 Hz, 1H) ; 6,00 (d, J = 10,0 Hz, 1H) ; 6,02 (d, J = 15,5 Hz, 1H) ; 6,75 (d, J = 16,0 Hz, 1H) ; 6,95 (dd, J = 6,0 및 10,0 Hz, 1H)

<154>

<155> 실시예 2:

<156> 비스-[(2E,10E,12E,16Z,18E)-(R)-6-하이드록시-3,5,7,9,11,15,17-헵타메틸-19-((2S,3S)-3-메틸-6-옥소-3,6-디하이드로-2H-피란-2-일)-8-옥소-노나데카-2,10,12,16,18-펜타에노산의 (2-머캅토에틸)-아미드]



<157>

<158> 약 20℃의 온도에서 0.3 ml의 디클로로메탄중 20 mg의 (2E,10E,12E,16Z,18E)-(R)-6-하이드록시-3,5,7,9,11,15,17-헵타메틸-19-((2S,3S)-3-메틸-6-옥소-3,6-디하이드로-2H-피란-2-일)-8-옥소-노나데카-2,10,12,16,18-펜타에노산 및 5.6 mg의 HOBT (1-하이드록시벤조트리아졸) 용액에 12.8 mg의 시스타민의 디클로르하이드레이트, 7.65 ㎕의 DIC (N,N'-디이소프로필카보디이미드)에 이어, 11.6 ㎕의 트리에틸아민을 도입시켰다. 반응 혼합물을 약 20℃의 온도에서 22시간 동안 교반한 후, 2개의 분취용 실리카겔 TLC 플레이트 (두께 0.5 mm, 20x20 cm) 상에서 직접 침전에 의해 정제하였다. 분취용 TLC 플레이트를 메탄올/디클로로메탄 (부피로 5/95) 혼합물로 용리시킨 후, 원하는 생성물을 메탄올/디클로로메탄 (부피로 15/85) 혼합물로 실리카겔로부터 추출하였다. 4.6 mg의 비스-[(2E,10E,12E,16Z,18E)-(R)-6-하이드록시-3,5,7,9,11,15,17-헵타-메틸-19-((2S,3S)-3-메틸-6-옥소-3,6-디하이드로-2H-피란-2-일)-8-옥소-노나데카-2,10,12,16,18-펜타에노산의 (2-티오에틸)-아미드]를 백색 고체 블랑으로서 수득하였으며, 그의 특징은 하기와 같았다:

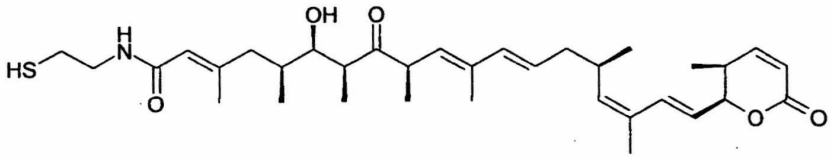
<159> 질량 스펙트럼:

<160> ● ES^+: m/z=1167: $[M+H]^+$

<161> ● ES^-: m/z=1211: $[M-H+HCOOH]^-$

<162> 실시예 3:

<163> (2E,10E,12E,16Z,18E)-(R)-6-하이드록시-3,5,7,9,11,15,17-헵타메틸-19-((2S,3S)-3-메틸-6-옥소-3,6-디하이드로-2H-피란-2-일)-8-옥소-노나데카-2,10,12,16,18-펜타에노산의 (2-머캅토-에틸)-아미드



<164>

<165> 약 0℃의 온도에서 0.15 ml의 디클로로메탄중 20 mg의 (2E,10E,12E,16Z,18E)-(R)-6-하이드록시-3,5,7,9,11,15,17-헵타메틸-19-((2S,3S)-3-메틸-6-옥소-3,6-디하이드로-2H-피란-2-일)-8-옥소-노나데카-2,10,12,16,18-펜타에노산 및 8 ㎕의 트리에틸아민 용액에 6.1 ㎕의 염화피발로일을 도입시켰다. 약 0℃의 온도에서 15분 후에 0.15 ml의 디클로로메탄 및 0.05 ml의 에탄올중 4.4 mg의 2-아미노에탄티올 용액을 가하였다. 반응 혼합물을 약 20℃의 온도에서 1시간 동안 교반한 후, 2개의 분취용 실리카겔 TLC 플레이트 (두께 0.5 mm, 20x20 cm) 상에서 직접 침전에 의해 정제하였다. 분취용 TLC 플레이트를 메탄올/디클로로메탄 (부피로 8/92) 혼합물로 용리시킨 후, 원하는 생성물을 메탄올/디클로로메탄 (부피로 15/85) 혼합물로 실리카겔로부터 추출하였다. 2.3 mg의 (2E,10E,12E,16Z,18E)-(R)-6-하이드록시-3,5,7,9,11,15,17-헵타메틸-19-((2S,3S)-3-메틸-6-옥소-3,6-디하이드로-2H-피란-2-일)-8-옥소-노나데카-2,10,12,16,18-펜타에노산의 (2-머캅토-에틸)-아미드를 무색 유리로서 수득하였으며, 그의 특징은 하기와 같았다:

<166> 질량 스펙트럼:

<167> ● ES^+: m/z=586: $[M+H]^+$

<168> ● ES^-: m/z=630: $[M-H+HCOOH]^-$

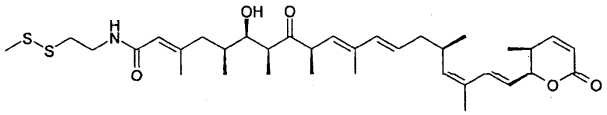
<169> 303K의 온도에서 7,27인 용매로서 클로로포름-d1 (CDCl3-d1)을 기준으로 하여 하기 화학적 이동 (δ는 ppm 표시)에 따라 분광계 브루커 아반스 DMX-400 상에서 수득된 400 MHz에서의 1H NMR 스펙트럼:

0,80 (d, J = 6,5 Hz, 3H) ; 0,98 (d, J = 6,5 Hz, 3H) ; 1,08 (d, J = 7,5 Hz, 3H) ; 1,14 (d, J = 6,5 Hz, 3H) ; 1,16 (d, J = 7,0 Hz, 3H) ; 1,72 (m, 1H) ; 1,80 내지 1,87 (m 차폐됨, 1H) ; 1,82 (s, 3H) ; 1,84 (s, 3H) ; 2,09 (m, 2H) ; 2,11 (s, 3H) ; 2,16 (dd, J = 6,5 및 13,5 Hz, 1H) ; 2,54 (m, 1H) ; 2,65 내지 2,74 (m, 3H) ; 2,83 (m, 1H) ; 3,48 (q, J = 6,5 Hz, 2H) ; 3,60 내지 3,70 (m, 2H) ; 5,00 (dd, J = 4,0 및 7,0 Hz, 1H) ; 5,10 (d, J = 10,5 Hz, 1H) ; 5,27 (d, J = 10,5 Hz, 1H) ; 5,58 (s, 1H) ; 5,60 (td 부분적으로 차폐됨, J = 7,5 및 15,5 Hz, 1H) ; 5,70 (dd, J = 7,0 및 15,5 Hz, 1H) ; 5,96 내지 6,06 (m, 3H) ; 6,75 (d broad, J = 15,5 Hz, 1H) ; 6,97 (dd, J = 6,0 및 10,0 Hz, 1H) .

<170>

<171> 실시예 4:

<172> (2E,10E,12E,16Z,18E)-(R)-6-하이드록시-3,5,7,9,11,15,17-헵타메틸-19-((2S,3S)-3-메틸-6-옥소-3,6-디하이드로-2H-피란-2-일)-8-옥소-노나데카-2,10,12,16,18-펜타에노산의 (2-메틸디설파닐-에틸)-아미드



<173>

<174> 약 20℃의 온도에서 0.15 ml의 디클로로메탄중 20 mg의 (2E,10E,12E,16Z,18E)-(R)-6-하이드록시-3,5,7,9,11,15,17-헵타메틸-19-((2S,3S)-3-메틸-6-옥소-3,6-디하이드로-2H-피란-2-일)-8-옥소-노나데카-2,10,12,16,18-펜타에노산 및 5.6 mg의 HOBT (1-하이드록시벤조트리아졸) 용액에 7.65 ㎕의 DIC (N,N'-디이소프로필카보디이미드)에 이어, 0.15 ml의 디클로로메탄중 8 mg의 2-메틸디티오-에틸아민 용액을 도입시켰다. 반응 혼합물을 약 20℃의 온도에서 2시간 동안 교반한 후, 2개의 분취용 실리카겔 TLC 플레이트 (두께 0.5 mm, 20x20 cm) 상에서 직접 침전에 의해 정제하였다. 분취용 TLC 플레이트를 메탄올/디클로로메탄 (부피로 7/93) 혼합물로 용리시킨 후, 원하는 생성물을 메탄올/디클로로메탄 (부피로 15/85) 혼합물로 실리카겔로부터 추출하였다. 3.4 mg의 (2E,10E,12E,16Z,18E)-(R)-6-하이드록시-3,5,7,9,11,15,17-헵타메틸-19-((2S,3S)-3-메틸-6-옥소-3,6-디하이드로-2H-피란-2-일)-8-옥소-노나데카-2,10,12,16,18-펜타에노산의 (2-메틸디설파닐-에틸)-아미드를 옅은 황색 오일로서 수득하였으며, 그의 특징은 하기와 같았다:

<175> 질량 스펙트럼:

<176> ● ES^+: m/z=632: $[M+H]^+$

<177> ● ES^-: m/z=630: $[M-H]^-$; m/z=676: $[M-H+HCOOH]^-$

<178> 303K의 온도에서 7,27인 용매로서 클로로포름-d1 (CDCl3-d1)을 기준으로 하여 하기 화학적 이동 (δ는 ppm 표시)에 따라 분광계 브루커 아반스 DMX-400 상에서 수득된 400 MHz에서의 1H NMR 스펙트럼:

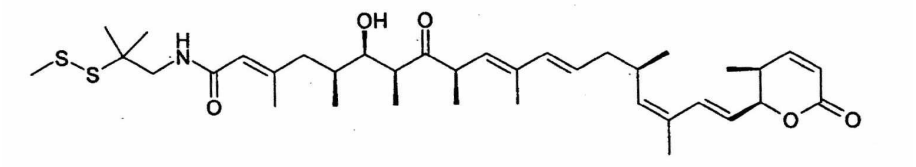
0,81 (d, J = 6,5 Hz, 3H) ; 0,98 (d, J = 6,5 Hz, 3H) ; 1,08 (d, J = 7,5 Hz, 3H) ; 1,14 (d, J = 6,5 Hz, 3H) ; 1,16 (d, J = 7,0 Hz, 3H) ; 1,72 (m, 1H) ; 1,79 내지 1,86 (m, 1H) ; 1,82 (s, 3H) ; 1,84 (s, 3H) ; 2,09 (m, 2H) ; 2,11 (s broad, 3H) ; 2,15 (dd, J = 5,5 및 13,5 Hz, 1H) ; 2,35 (s broad, 1H) ; 2,43 (m, 3H) ; 2,54 (m, 1H) ; 2,70 (m, 1H) ; 2,83 (m, 1H) ; 2,86 (t, J = 6,5 Hz, 2H) ; 3,59 내지 3,70 (m, 4H) ; 5,01 (dd, J = 4,0 및 7,0 Hz, 1H) ; 5,11 (d, J = 10,0 Hz, 1H) ; 5,27 (d, J = 10,0 Hz, 1H) ; 5,56 (s, 1H) ; 5,60 (td 부분적으로 차폐됨, J = 7,5 및 15,5 Hz, 1H) ; 5,70 (dd, J = 7,0 및 15,5 Hz, 1H) ; 5,93 (t, J = 6,0 Hz, 1H) ; 6,00 (d, J = 10,0 Hz, 1H) ; 6,02 (d, J = 15,5 Hz, 1H) ; 6,75 (d, J = 15,5 Hz, 1H) ; 6,96 (dd, J = 6,0 및 10,0 Hz, 1H).

<179>

<180> 실시예 5:

<181> (2E,10E,12E,16Z,18E)-(R)-6-하이드록시-3,5,7,9,11,15,17-헵타메틸-19-((2S,3S)-3-메틸-6-옥소-3,6-디하이드

로-2H-피란-2-일)-8-옥소-노나데카-2,10,12,16,18-펜타에노산의 (2-메틸-2-메틸디설파닐-프로필)-아미드



<182>

<183> 약 0℃의 온도에서 1.5 ml의 디클로로메탄중 225.4 mg의 (2E,10E,12E,16Z,18E)-(R)-6-하이드록시-3,5,7,9,11,15,17-헵타메틸-19-((2S,3S)-3-메틸-6-옥소-3,6-디하이드로-2H-피란-2-일)-8-옥소-노나데카-2,10,12,16,18-펜타에노산 용액에 1.5 ml의 디클로로메탄중 63.6 mg의 HOBT (1-하이드록시벤조트리아졸) 및 110 mg의 2-메틸-2-메틸디설파닐-프로필아민 용액에 이어, 86.2 ㎕의 DIC (N,N'-디이소프로필카보디이미드)를 도입시켰다. 반응 혼합물을 약 0℃의 온도에서 15시간 동안 교반한 후, 30 ml의 디클로로메탄으로 희석하였다. 유기상을 10 ml의 물로 2회에 걸쳐 세척하고, 황산나트륨 상에서 건조시키고, 소결 유리상에서 여과한 후, 약 40℃의 온도에서 감압하에 농축시켰다. 그렇게 수득한 잔류물을 실리카겔 (20 g SiO_2 15-35 ㎛, 용리 구배 메탄올/디클로로메탄 0/100 내지 10/90 (부피로)) 상에서 칼럼 크로마토그래피에 의해 정제하였다. 원하는 생성물을 함유하는 분획을 약 40℃의 온도에서 감압하에 농축시켰다. 212.1 mg의 (2E,10E,12E,16Z,18E)-(R)-6-하이드록시-3,5,7,9,11,15,17-헵타메틸-19-((2S,3S)-3-메틸-6-옥소-3,6-디하이드로-2H-피란-2-일)-8-옥소-노나데카-2,10,12,16,18-펜타에노산의 (2-메틸-2-메틸디설파닐-프로필)-아미드를 황색 유리로서 수득하였으며, 그의 특징은 하기와 같았다:

<184> 질량 스펙트럼:

<185> ● ES^+: m/z=660: $[M+H]^+$

<186> ● ES^-: m/z=658: $[M-H]^-$; m/z=704: $[M-H+HCOOH]^-$

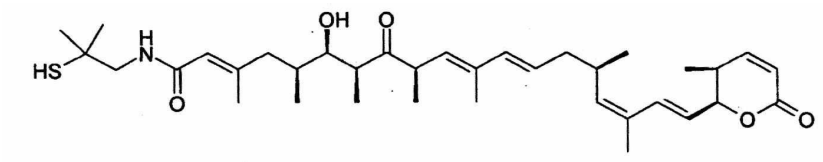
<187> 303K의 온도에서 7,27인 용매로서 클로로포름-d1 (CDCl3-d1)을 기준으로 하여 하기 화학적 이동 (δ는 ppm 표시)에 따라 분광계 브루커 아반스 DMX-400 상에서 수득된 400 MHz에서의 1H NMR 스펙트럼:

0,80 (d, J = 6,5 Hz, 3H) ; 0,97 (d, J = 6,5 Hz, 3H) ; 1,08 (d, J = 7,5 Hz, 3H) ; 1,14 (d, J = 6,5 Hz, 3H) ; 1,16 (d, J = 7,0 Hz, 3H) ; 1,32 (s, 6H) ; 1,72 (m, 1H) ; 1,82 (s, 3H) ; 1,83 (m 차폐됨, 1H) ; 1,84 (s, 3H) ; 2,08 (m, 2H) ; 2,11 (s broad, 3H) ; 2,15 (dd, J = 6,5 및 13,5 Hz, 1H) ; 2,43 (s, 3H) ; 2,54 (m, 1H) ; 2,70 (m, 1H) ; 2,83 (m, 1H) ; 3,45 (d, J = 6,0 Hz, 2H) ; 3,59 내지 3,69 (m, 2H) ; 5,00 (dd, J = 4,0 및 7,0 Hz, 1H) ; 5,10 (d, J = 10,5 Hz, 1H) ; 5,26 (d, J = 10,0 Hz, 1H) ; 5,54 내지 5,64 (m, 2H) ; 5,70 (dd, J = 7,0 및 15,5 Hz, 1H) ; 5,83 (t, J = 6,0 Hz, 1H) ; 6,00 (d, J = 10,5 Hz, 1H) ; 6,02 (d, J = 15,5 Hz, 1H) ; 6,75 (d, J = 15,5 Hz, 1H) ; 6,96 (dd, J = 6,5 및 10,5 Hz, 1H) .

<188>

<189> 실시예 6:

<190> (2E,10E,12E,16Z,18E)-(R)-6-하이드록시-3,5,7,9,11,15,17-헵타메틸-19-((2S,3S)-3-메틸-6-옥소-3,6-디하이드로-2H-피란-2-일)-8-옥소-노나데카-2,10,12,16,18-펜타에노산의 (2-머캅토-2-메틸-프로필)-아미드



<191>

<192> 약 20℃의 온도에서 7.7 ml의 테트라하이드로푸란 및 3.85 ml의 물중 200 mg의 (2E,10E,12E,16Z,18E)-(R)-6-하이드록시-3,5,7,9,11,15,17-헵타메틸-19-((2S,3S)-3-메틸-6-옥소-3,6-디하이드로-2H-피란-2-일)-8-옥소-노나데카-2,10,12,16,18-펜타에노산의 (2-메틸-2-메틸디설파닐-프로필)-아미드 용액에 217.2 mg의 TCEP (트리스(2-카복시에틸)포스핀의 클로르하이드레이트)를 가하였다. 약 20℃의 온도에서 16시간 후에, 반응 혼합물을 30 ml

의 에틸 아세테이트로 희석시키고, 15 ml의 물, 15 ml의 염수로 2회에 걸쳐 세척하고, 황산마그네슘상에서 건조시키고, 소결 유리상에서 여과하고, 약 40℃의 온도에서 감압하에 농축시켰다. 그렇게 수득한 황색 오일을 실리카겔 (25 g SiO_2 15-35 ㎛, 용리 구배 메탄올/디클로로메탄 1/99 내지 10/90 (부피로)) 상에서 칼럼 크로마토그래피에 의해 정제하였다. 원하는 생성물을 함유하는 분획을 약 40℃의 온도에서 감압하에 농축시켰다. 122.6 mg의 (2E,10E,12E,16Z,18E)-(R)-6-하이드록시-3,5,7,9,11,15,17-헵타메틸-19-((2S,3S)-3-메틸-6-옥소-3,6-디하이드로-2H-피란-2-일)-8-옥소-노나데카-2,10,12,16,18-펜타에노산의 (2-머캅토-2-메틸-프로필)-아미드를 황색 유리로서 수득하였으며, 그의 특징은 하기와 같았다:

<193> 질량 스펙트럼:

<194> ● ES^+: m/z=614: $[M+H]^+$

<195> ● ES^-: m/z=612: $[M-H]^-$; m/z=658: $[M-H+HCOOH]^-$

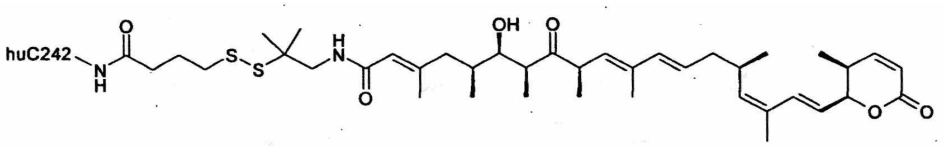
<196> 303K의 온도에서 7,27인 용매로서 클로로포름-d1 (CDCl3-d1)을 기준으로 하여 하기 화학적 이동 (δ는 ppm 표시)에 따라 분광계 브루커 아반스 DMX-500 상에서 수득된 500 MHz에서의 1H NMR 스펙트럼:

0,80 (d, J = 6,5 Hz, 3H) ; 0,97 (d, J = 6,5 Hz, 3H) ; 1,07 (d, J = 7,5 Hz, 3H) ; 1,13 (d, J = 6,5 Hz, 3H) ; 1,16 (d, J = 6,5 Hz, 3H) ; 1,38 (s, 6H) ; 1,72 (m, 1H) ; 1,82 (s, 3H) ; 1,84 (s, 3H) ; 1,85 (m 부분적으로 차폐됨, 1H) ; 2,09 (m, 2H) ; 2,11 (s, 3H) ; 2,17 (dd, J = 6,5 및 13,5 Hz, 1H) ; 2,54 (m, 1H) ; 2,70 (m, 1H) ; 2,83 (m, 1H) ; 3,38 (d, J = 6,5 Hz, 2H) ; 3,61 내지 3,70 (m, 2H) ; 5,01 (dd, J = 4,0 및 7,0 Hz, 1H) ; 5,09 (d, J = 10,0 Hz, 1H) ; 5,26 (d, J = 10,0 Hz, 1H) ; 5,59 (dt 부분적으로 차폐됨, J = 7,5 및 15,5 Hz, 1H) ; 5,63 (s, 1H) ; 5,69 (dd, J = 7,0 및 15,5 Hz, 1H) ; 6,00 (d, J = 10,0 Hz, 1H) ; 6,02 (d, J = 15,5 Hz, 1H) ; 6,04 (t 부분적으로 차폐됨, J = 6,5 Hz, 1H) ; 6,75 (d, J = 15,5 Hz, 1H) ; 6,97 (dd, J = 6,0 및 10,0 Hz, 1H).

<197>

<198> **렙토마이신 유도체와 항체의 접합**:

<199> **렙토마이신 유도체와 항-결장암 항체 huC242의 접합**:



<200>

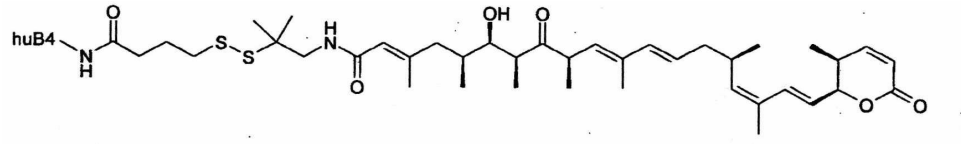
<201> 실시예 6의 화합물과 인간화된 항-결장 종양 항체 (huC242)의 디설파이드-연결된 접합체를 제조하였다 (본원에서 huC242-SSNPB-실시예 6의 렙토마이신으로서 지칭함). 90분 동안 주변 온도에서 50 mM 인산칼륨 완충액 (pH 6.5, 50 mM NaCl, 2 mM EDTA, 5% 디메틸아세트아미드 함유) 중 9 mg/ml의 항체 농도에서 huC242 항체를 6-배 몰 과량의 항체 변형제 SSNPB (N-설포숙신이미딜 4-(5-니트로-2-피리딜디티오)부타노에이트)와 반응시켰다. 50 mM NaCl 및 2 mM EDTA를 함유하는 50 mM 인산칼륨 완충액 pH 6.5에서 평형화된 세파덱스(Sephadex) G-25 크기-배제 크로마토그래피에 의해 반응 혼합물을 정제하였다. β-머캅토에탄올을 첨가 및 첨가하지 않고 변형된 항체 샘플을 분석하고, 항체당 ~6개의 니트로피리딜디티오기가 혼입되었는지를 측정하였다. 링커기당 2-배 몰 과량의 렙토마이신-SH 약물을 50 mM 인산칼륨 완충액 (pH 6.5, 50 mM NaCl, 2 mM EDTA, 10% 디메틸아세트아미드 함유) 중 2 mg/ml로 변형된 항체에 가하였다. 이어서 분광광도적으로 (394 nm) 반응시키고, 5-니트로피리딘-2-티온의 유리에 대하여 HPLC에 의해 반응시켰다. 주변 온도에서 약 90분 동안 반응을 시킨 후, 혼합물을 50 mM 인산칼륨 완충액 (pH 6.5, 50 mM NaCl, 2 mM EDTA 함유) 중 세파덱스 G-25 크기-배제 크로마토그래피에 의해 정제하였다. 접합체의 경우 0.78 대 변형되지 않은 항체의 경우 0.37인 250 nm/280 nm의 흡광도비가 접합체내 렙토마이신기의 혼입을 입증하였다 (250 nm에서의 흡광도를 증가시킨다).

<202> 탈당화된 huC242-렙토마이신 접합체의 질량 분광법 분석을 통해 147492, 148212, 148936, 및 149660 달톤에서 접합체 피크가 나타났는데, 이는 항체 분자당 1, 2, 3, 및 4개의 렙토마이신 분자가 혼입된 것에 상응하는 것이다.

<203> **렙토마이신 유도체와 항-CD19 (huB4) 항체의 접합**:

<204> 디설파이드 및 절단불가능한 티오에테르 링커로 렙토마이신과 항-CD19 항체 (인간화된 B4 항체)의 접합체를 제조하였다. 제1 샘플 (-S-S-링커)은 디설파이드 링커 SSNPB (N-설포숙신이미딜 4-(5-니트로-2-피리딜-디티오)부타노에이트)를 통해 실시예 6의 화합물에 연결된 항-CD19 (huB4) 항체로 구성되었다. 제2 샘플은 말레이미드 링커 SMCC (N-숙신이미딜 4-(말레이미도-메틸)사이클로헥산카복실레이트)를 통해 실시예 6의 화합물에 연결된 huB4 항체로 구성되었다.

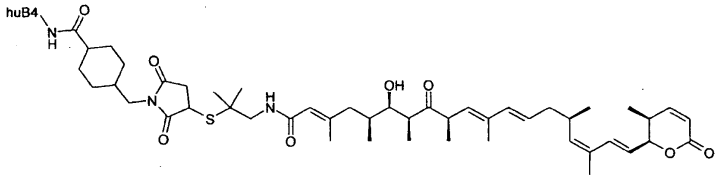
<205> HuB4-SSNPB-렙토마이신 접합체 (huB4-SSNPB-실시예 6의 렙토마이신):



<206>

<207> 4 mg의 huB4 항체를 주변 온도에서 90분 동안 50 mM 인산칼륨 완충액 (pH 6.5, 50 mM NaCl, 2 mM EDTA, 5% 디메틸아세트아미드 함유) 중 항체 농도 8 mg/ml로 7.5-배 몰 과량의 SSNPB 링커와 반응시켰다. 반응 혼합물을 50 mM 인산칼륨 완충액 (pH 6.5, 50 mM NaCl, 2 mM EDTA 함유) 중에서 세파덱스 G-25 크기-배제 크로마토그래피에 의해 정제하였다. β-머캅토에탄올을 첨가 및 첨가하지 않고 변형된 항체 샘플을 분석하고, 항체당 5.3개의 니트로피리딜디티오기가 혼입되었는지를 측정하였다. 링커기당 3-배 몰 과량의 실시예 6의 약물을 50 mM 인산칼륨 완충액 (pH 6.5, 50 mM NaCl, 2 mM EDTA, 10% 디메틸아세트아미드 함유) 중 1 mg/ml로 변형된 항체 샘플에 가하였다. 이어서 분광광도적으로 (394 nm) 반응시키고, 5-니트로피리딘-2-티온의 유리에 대하여 HPLC에 의해 반응시켰다. 주변 온도에서 밤새도록 반응시킨 후, 혼합물을 10 mM 시트르산염 완충액 (pH 5.5, 135 mM NaCl 함유) 중 세파덱스 G-25 크기-배제 크로마토그래피에 의해 정제하였다. β-머캅토에탄올을 첨가 및 첨가하지 않고 샘플을 분석하고, 항체당 4.3개의 반응 링커를 갖는 것으로 측정되었다. 크기-배제 크로마토그래피 (SEC) 분석을 통해 95% 단량체 항체가 나타났다.

<208> HuB4-SMCC-렙토마이신 접합체:



<209>

<210> 4 mg의 huB4 항체를 주변 온도에서 90분 동안 50 mM 인산칼륨 완충액 (pH 6.5, 50 mM NaCl, 2 mM EDTA, 5% 디메틸아세트아미드 함유) 중 항체 농도 8 mg/ml로 7.5-배 몰 과량의 SSNPB 링커와 반응시켰다. 반응 혼합물을 50 mM 인산칼륨 완충액 (pH 6.5, 50 mM NaCl, 2 mM EDTA 함유) 중에서 세파덱스 G-25 크기-배제 크로마토그래피에 의해 정제하였다. 샘플에 혼입된 말레이미드기의 갯수는 과량의 티올 (시스테인)을 가하여 분석하고, 항체당 3.3개의 링커기를 갖는 것으로 측정되었다. 말레이미드기당 3-배 몰 과량의 실시예 6의 약물을 50 mM 인산칼륨 완충액 (pH 6.5, 50 mM NaCl, 2 mM EDTA, 10% 디메틸아세트아미드 함유) 중 1 mg/ml로 변형된 항체 샘플에 가하였다. 주변 온도에서 밤새도록 반응시킨 후, 혼합물을 10 mM 시트르산염 완충액 (pH 5.5, 135 mM NaCl 함유) 중 세파덱스 G-25 크기-배제 크로마토그래피에 의해 정제하였다. SEC 분석을 통해 95% 단량체 항체가 나타났다.

<211> 탈당화된 huB4-SMCC-렙토마이신 접합체의 질량 분광법 분석을 통해 145138, 145860 및 146566 달톤에서 접합체 피크가 나타났는데, 이는 항체 분자당 1, 2, 및 3개의 렙토마이신 분자가 혼입된 것에 상응하는 것이다.

<212> **생물학적 결과**:

<213> WST-생육성 분석법에 의해 이루어진 라모스 (CD19 항원-양성) 및 HL60 (항원 음성) 암 세포에 대한 huB4-SSNPB-실시예 6의 렙토마이신의 접합체의 세포독성 평가를 통해 IC_{50} 값이 각각 1.4×10^{-9} M 및 4.2×10^{-9} M인 것으로 나타났으며, 이로써 렙토마이신-항체 접합체의 항원-특이 세포독성 활성이 입증되었다.

<214> COLO 205 (CanAg 항원-양성) 암 세포 및 A375 세포에 대한 huC242-SSNPB-실시예 6의 렙토마이신의 접합체의 세

포독성 평가를 통해 IC_{50} 값이 각각 1.3 x 10^{-10} M 및 >5.0 x 10^{-9} M인 것으로 나타났다 (도 1).

<215> 특정 특허 및 인쇄된 공개문헌이 본 개시에서 참고되며, 상기의 교시는 그의 각각의 전문이 참고로 본원에서 인용된다.

<216> 본 발명이 상세히 그리고 그의 특정 실시태양을 참고로 하여 기술되었지만, 그의 정신 및 범주를 벗어나지 않으면서 그에 대한 다양한 변형 및 수정이 이루어질 수 있다는 것은 당업자에게 자명할 것이다.

도면의 간단한 설명

<13> 도 1은 접합체 huC242-SSNPB-실시예 6의 렙토마이신 유도체의 시험관내 세포독성과 특이성을 나타낸다.

도면

도면1

