(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2020-0140939
(43) 공개일자 2020년12월16일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 47/54 (2017.01) *A61K 31/5517* (2006.01)
A61K 39/00 (2006.01) *A61K 47/64* (2017.01)
A61K 47/68 (2017.01) *A61P 35/00* (2006.01)
C07D 487/04 (2006.01) *C07D 519/00* (2006.01)
C07K 16/30 (2006.01)
(52) CPC특허분류
A61K 47/545 (2017.08)
A61K 31/5517 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2020-7035369(분할)
(22) 출원일자(국제) 2012년02월15일
심사청구일자 없음
(62) 원출원 특허 10-2019-7018885
원출원일자(국제) 2012년02월15일
심사청구일자 2019년07월23일
(85) 번역문제출일자 2020년12월08일
(86) 국제출원번호 PCT/US2012/025257
(87) 국제공개번호 WO 2012/112687
국제공개일자 2012년08월23일
(30) 우선권주장
61/443,062 2011년02월15일 미국(US)
(뒷면에 계속)

(71) 출원인
이뮤노젠 아이엔씨
미국 02451-1477 메사추세츠주 월섬 윈터 스트리트 830
(72) 발명자
피시킨, 네이든
미국 메사추세츠 02170 웨이머스 톨 옥스 드라이브 179 이.
밀러, 미셸
미국 메사추세츠 01701 프레이밍햄 메이마운트 드라이브 4
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
양영준, 이상남

전체 청구항 수 : 총 20 항

(54) 발명의 명칭 **컨쥬게이트의 제조방법**

(57) 요 약

본 발명은 세포 결합제와 약물(세포독성 화합물 등)의 컨쥬게이트를 제조하는 방법에 관한 것이다. 이 방법은 세포독성 화합물의 세포 결합제와의 효과적인 컨쥬게이션을 가능하게 하는 이민 반응성 화합물의 용도를 포함한다.

(52) CPC특허분류
A61K 47/64 (2017.08)
A61K 47/6803 (2017.08)
A61K 47/6849 (2017.08)
A61K 47/6851 (2017.08)
A61K 47/6867 (2017.08)
A61P 35/00 (2018.01)
A61K 2039/505 (2013.01)
C07K 2317/24 (2013.01)
C07K 2317/94 (2013.01)

(72) 발명자
리, 웨이
미국 메사추세츠 01720 액턴 놀튼 드라이브 6
싱, 라지바
미국 메사추세츠 01701 프레이밍햄 레인우드 에비뉴 40

(30) 우선권주장
61/443,092 2011년02월15일 미국(US)
61/483,499 2011년05월06일 미국(US)

명 세 서

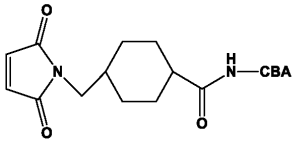
청구범위

청구항 1

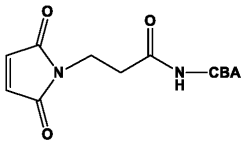
항체-세포독성제 컨쥬게이트의 제조방법에 있어서,

4 내지 9의 pH에서 변형된 세포독성 화합물을 변형된 세포결합제(CBA)와 반응시키는 단계를 포함하며,

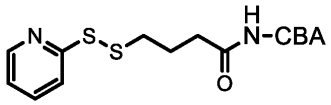
a) 상기 변형된 세포결합제는



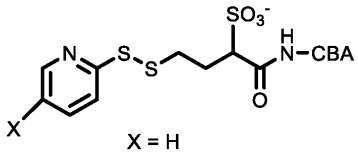
,



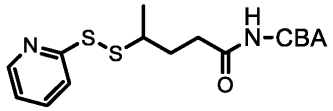
,



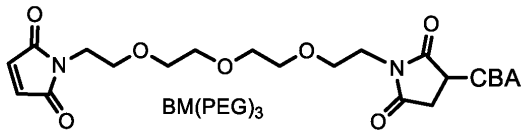
,



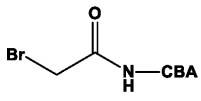
,



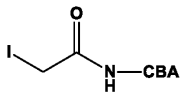
,



,

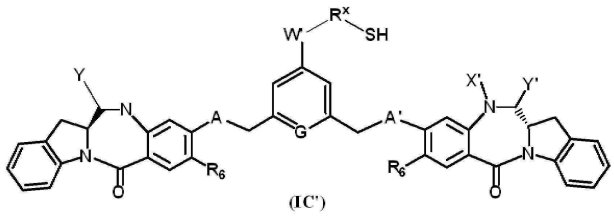


, 또는



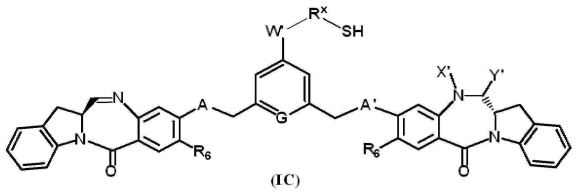
이고, 여기서 상기 세포결합제는 암 세포에 결합할 수 있는 항체이고; 및

b) 상기 변형된 세포독성 화합물은 다음 식으로 표시되며,



상기 세포독성 화합물은 이민-함유 세포독성 화합물을 아황산염(sulphite) 및 메타중아황산염(metabisulfite)으로 이루어진 군에서 선택되는 이민 반응성 시약과 반응시켜 얻어지며, 여기서 상기 이민-함유 세포독성 화합물

은 다음 식으로 표시되거나 이의 약제학적으로 허용가능한 염이며,



(IC)

여기서,

X'는 -H;

Y는 $-SO_3M$;

M은 -H 또는 약제학적으로 허용가능한 양이온이며;

Y'는 -H;

A 및 A'는 모두 -O-;

R_6는 -OMe;

G는 -CH-;

W'는 $-N(R^e)-$ 또는 $-N(R^e)-C(=O)-$;

R^x는 1 내지 6개의 탄소원자를 지니는 직쇄 알킬 또는 3 내지 6개의 탄소원자를 지니는 분지쇄 알킬이며;

R^e는 $-(CH_2-CH_2-O)_n-R^k$이며, 여기서 R^k는 -H, 1 내지 6개의 탄소원자를 지니는 직쇄 알킬 또는 3 내지 6개의 탄소원자를 지니는 분지쇄 또는 환식 알킬이며; 및

n은 1 내지 24의 정수이다.

청구항 2

제1항에 있어서,

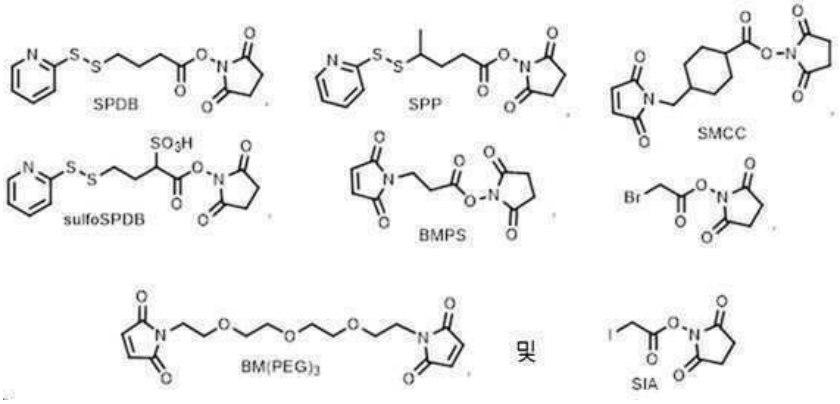
상기 변형된 세포결합제와 반응하기 전에 상기 변형된 세포독성 화합물을 정제하는 단계를 더 포함하는 항체-세포독성제 컨쥬게이트의 제조방법.

청구항 3

제1항에 있어서,

상기 변형된 세포결합제는 상기 세포결합제를 이작용성 가교제와 반응시켜 얻어지며,

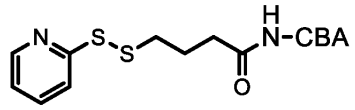
상기 이작용성 가교제는 다음으로부터 선택되는 항체-세포독성제 컨쥬게이트의 제조방법.



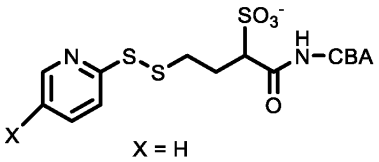
청구항 4

제1항에 있어서,

상기 변형된 세포결합제는



, 또는



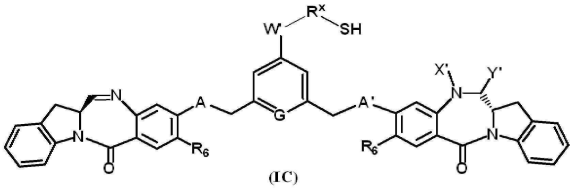
인 항체-세포독성제 컨쥬게이트의 제조방법.

청구항 5

항체-세포독성제 컨쥬게이트의 제조방법에 있어서,

항체를 이민-함유 세포독성 화합물, 이민 반응성 시약 및 연결기를 포함하는 이작용성 가교제와 반응시켜 상기 컨쥬게이트를 제조하는 단계를 포함하며,

상기 항체는 암 세포에 결합할 수 있고; 상기 이민-함유 세포독성 화합물은 다음 식으로 표시되거나 이의 약제학적으로 허용가능한 염이며,



(IC)

여기서,

X'는 -H;

Y'는 -H;

A 및 A'는 모두 -O-;

G는 -CH-;

W'는 $-N(R^e)-$ 또는 $-N(R^e)-C(=O)-$;

R^x는 1 내지 6개의 탄소원자를 지니는 직쇄 알킬 또는 3 내지 6개의 탄소원자를 지니는 분지쇄 알킬;

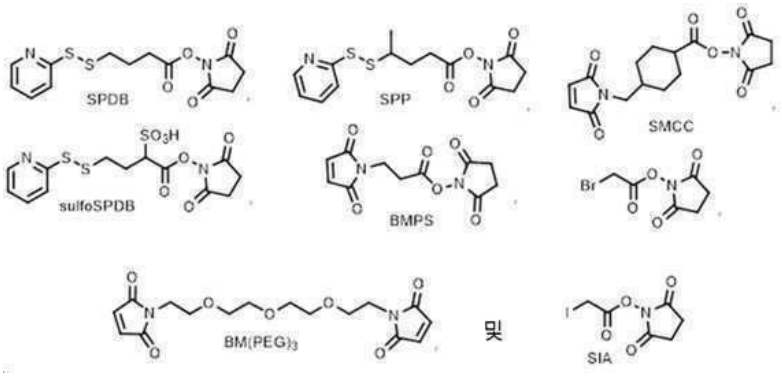
R^e는 $-(CH_2-CH_2-O)_n-R^k$이며, 여기서 R^k는 -H, 1 내지 6개의 탄소원자를 가지는 직쇄 알킬 또는 3 내지 6개의 탄소원자를 지니는 분지쇄 또는 환식 알킬이며;

R_6는 -OMe;

n은 1 내지 24의 정수;

상기 이민 반응성 시약은 아황산염 및 메타중아황산염으로 이루어진 군에서 선택되며; 및

상기 이작용성 가교제는 다음으로부터 선택된다.



청구항 6

제5항에 있어서,

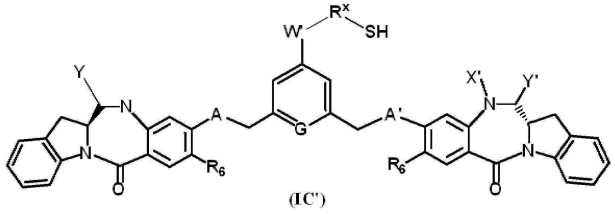
상기 세포결합제는 상기 이민-함유 세포독성 화합물 및 상기 이민 반응성 시약과 접촉하여 제1 혼합물을 형성하며,

상기 제1 혼합물은 상기 이작용성 가교제와 접촉하여 상기 컨쥬게이트를 형성하는 항체-세포독성제 컨쥬게이트의 제조방법.

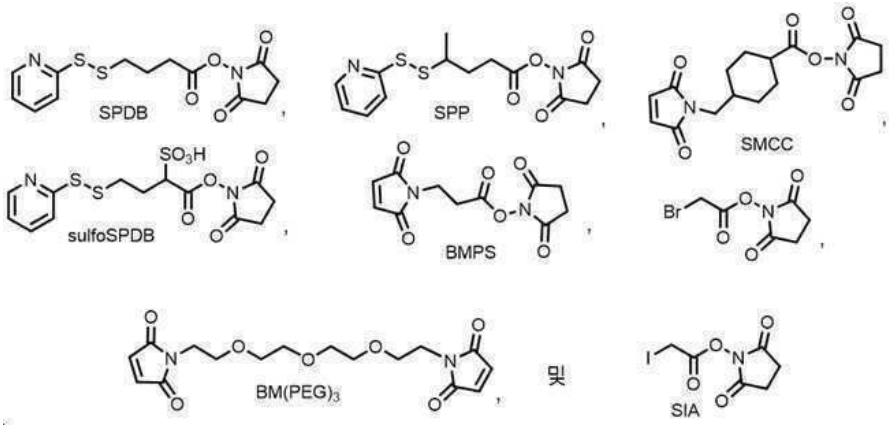
청구항 7

항체-세포독성제 컨쥬게이트의 제조방법에 있어서,

a) 다음 식으로 표시되거나 이의 약제학적으로 허용가능한 염인 변형된 세포독성 화합물을 이작용성 결합제와 반응시켜 제2 변형된 세포독성 화합물을 형성하는 단계;

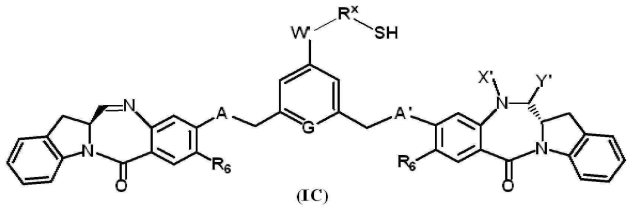


여기서, 상기 이작용성 가교제는 다음으로부터 선택되며,



여기서,

상기 변형된 세포독성 화합물은 이민-함유 세포독성 화합물을 이민 반응성 시약과 반응시켜 얻어지며, 여기서 상기 이민-함유 세포독성 화합물은 다음 식으로 표시되거나 이의 약제학적으로 허용가능한 염이며;



(IC)

여기서,

X'는 -H;

Y는 $-SO_3M$;

M은 -H 또는 약제학적으로 허용가능한 양이온이고;

Y'는 -H;

A 및 A'는 모두 -O-;

G는 -CH-;

W'는 $-N(R^e)-$ 또는 $-N(R^e)-C(=O)-$;

R^x는 1 내지 6개의 탄소원자를 지니는 직쇄 알킬 또는 3 내지 6개의 탄소원자를 지니는 분지쇄 알킬;

R^e는 $-(CH_2-CH_2-O)_n-R^k$, 여기서 R^k는 -H, 또는 1 내지 6개의 탄소원자를 지니는 직쇄 알킬 또는 3 내지 6개의 탄소원자를 지니는 분지쇄 또는 환식알킬;

R_6는 -OMe;

n은 1 내지 24의 정수;

상기 이민 반응성 시약은 아황산염 및 메타중아황산염으로 이루어진 군에서 선택되며; 및

b) 상기 제2 변형된 세포독성 화합물을 4 내지 9의 pH에서 상기 세포결합제에 반응성인 상기 그룹을 통해 상기 세포결합제와 반응시켜 상기 컨쥬게이트를 형성하는 단계를 포함하며, 여기서 상기 세포결합제는 암 세포에 결합할 수 있는 항체인 항체-세포독성제 컨쥬게이트의 제조방법.

청구항 8

제7항에 있어서,

상기 a) 단계 전에 상기 변형된 세포독성 화합물을 정제하는 단계를 더 포함하는 항체-세포독성제 컨쥬게이트의 제조방법.

청구항 9

제7항에 있어서,

상기 b) 단계 전에 상기 제2 변형된 세포독성 화합물을 정제하는 단계를 더 포함하는 항체-세포독성제 컨쥬게이트의 제조방법.

청구항 10

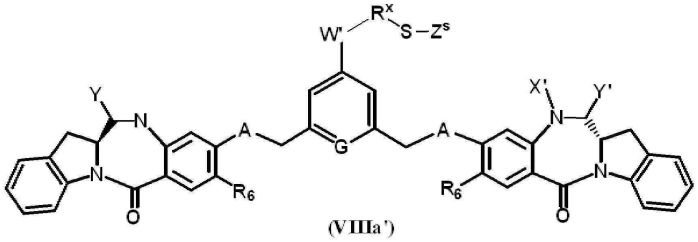
제7항에 있어서,

상기 이작용성 가교제는 *N*-숙신이미딜-4-(2-피리딜다이티오)뷰타노에이트(SPDB) 및 *N*-숙신이미딜-4-(2-피리딜다이티오)2-설포 뷰타노에이트(설포-SPDB)에서 선택되는 항체-세포독성제 컨쥬게이트의 제조방법.

청구항 11

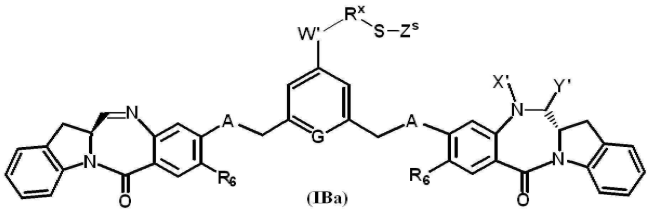
항체-세포독성제 컨쥬게이트의 제조방법에 있어서,

다음 식으로 표시되는 제2 변형된 세포독성 화합물을 4 내지 9의 pH에서 세포결합제와 반응시키는 단계를 포함하며,



(VIIIa')

여기서, 상기 세포결합제는 암 세포에 결합할 수 있는 항체이며 상기 제2 변형된 세포독성 화합물은 이민 반응성 시약을 다음 식으로 표시되는 이민-함유 세포독성 화합물과 반응시켜 얻어지며,



(IBa)

여기서,

X'는 -H;

Y는 $-SO_3M$;

M은 -H 또는 약제학적으로 허용가능한 양이온이고;

Y'는 -H;

A 및 A'는 모두 -O-;

G는 -CH-;

W'는 $-N(R^e)-$or $-N(R^e)-C(=O)-$;

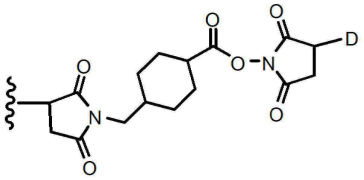
R^x은 1 내지 6개의 탄소원자를 지니는 직쇄 알킬 또는 3 내지 6개의 탄소원자를 지니는 분지쇄 알킬이고;

R^e는 $-(CH_2-CH_2-O)_n-R^k$이고, 여기서 R^k는 -H, 1 내지 6개의 탄소원자를 지니는 직쇄 알킬 또는 3 내지 6개의 탄소원자를 가지는 분지쇄 또는 환식알킬이며;

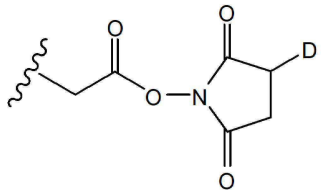
R_6는 -OMe;

n은 1 내지 24의 정수;

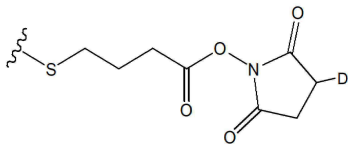
Z^s는 다음식에서 선택되는 어느 하나이며:



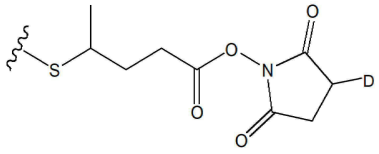
(a1);



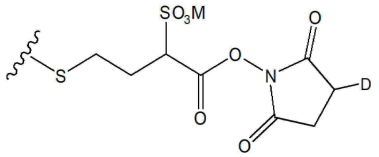
(a5');



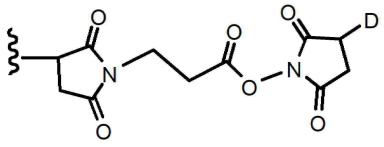
(a7);



(a8);



(a9), 및,



(a12)

여기서,

D는 -H이고, 상기 이민 반응성 시약은 아황산염 및 메타중아황산염으로 이루어진 군에서 선택되는 항체-세포독성제 컨쥬게이트의 제조방법.

청구항 12

제1항 내지 제11항 중 어느 한 항에 있어서,

W'는 -N(R^e)-인 항체-세포독성제 컨쥬게이트의 제조방법.

청구항 13

제12항에 있어서,

R^e는 -$(CH_2-CH_2-O)_n$-Me이고;

n은 2 내지 6의 정수인 항체-세포독성제 컨쥬게이트의 제조방법.

청구항 14

제13항에 있어서,

R^x는 -$(CH_2)_p$-(CR^fR^g)-이고,

여기서 R^f 및 R^g은 각각 독립적으로 -H, 1 내지 4개의 탄소원자를 지니는 직쇄 알킬 또는 3 내지 4개의 탄소원자를 지니는 분지쇄 알킬이며,

p는 0, 1, 2 또는 3인 항체-세포독성제 컨쥬게이트의 제조방법.

청구항 15

제14항에 있어서,

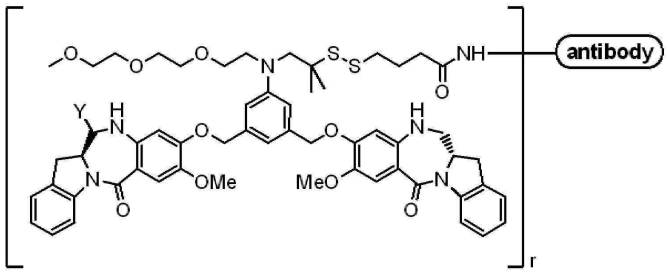
R^f 및 R^g는 동일하거나 상이하며 -H 및 -Me로부터 선택되며;

p는 1인 항체-세포독성제 컨쥬게이트의 제조방법.

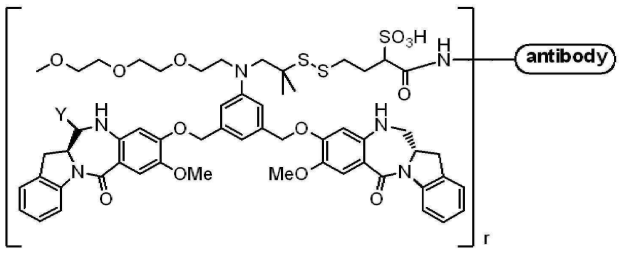
청구항 16

제1항, 제5항, 제7항 및 제11항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 컨쥬게이트는



, 또는



이며

여기서, r은 1 내지 10의 정수, Y는 $-SO_3M$, 및 M은 -H 또는 약제학적으로 허용가능한 양이온인 항체-세포독성제 컨쥬게이트의 제조방법.

청구항 17

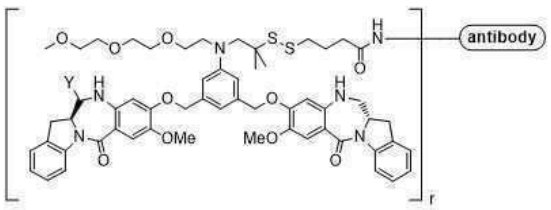
제1항, 제5항, 제7항 및 제11항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 이민 반응성 시약은 $NaHSO_3$ 또는 $KHSO_3$인 항체-세포독성제 컨쥬게이트의 제조방법.

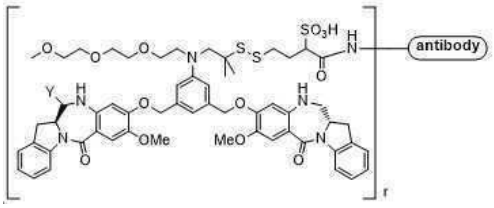
청구항 18

제1항에 있어서,

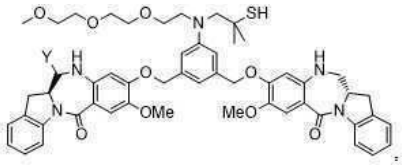
상기 방법은 다음 식의 컨쥬게이트를 제조하기 위한 것이며,



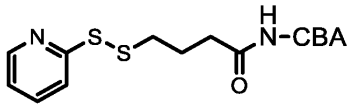
, 또는



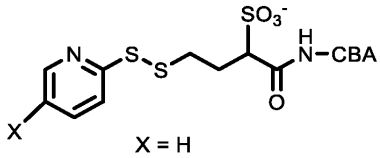
상기 방법은 다음 식의 변형된 세포독성 화합물을 4 내지 9의 pH에서 변형된 세포결합제와 반응시키는 단계를 포함하며,



상기 변형된 세포결합제는 각각 다음 식으로 표시되며,



, 또는



여기서,

r은 1 내지 10의 정수;

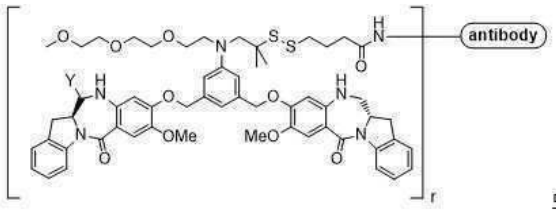
Y는 $-SO_3M$; 및

M은 -H 또는 약제학적으로 허용가능한 양이온인 항체-세포독성제 컨쥬게이트의 제조방법.

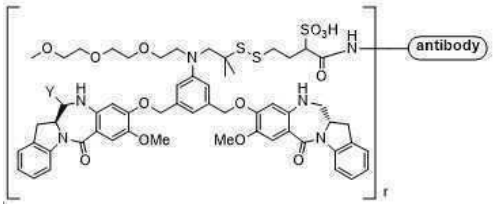
청구항 19

제5항에 있어서,

상기 방법은 다음 식의 컨쥬게이트를 제조하기 위한 것이며,



또는

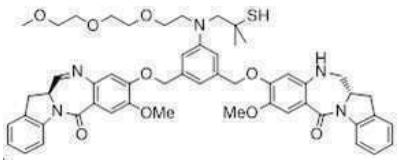


상기 방법은 상기 항체를 이민-함유 세포독성 화합물, 이민 반응성 시약 및 연결기를 포함하는 이작용성 가교제와 반응시켜 상기 컨쥬게이트를 형성하는 단계를 포함하며,

여기서,

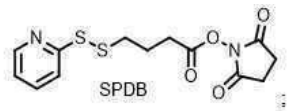
r은 1 내지 10의 정수이고;

상기 이민-함유 세포독성 화합물은

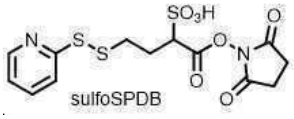


이고;

상기 이작용성 가교제는 각각



; 또는



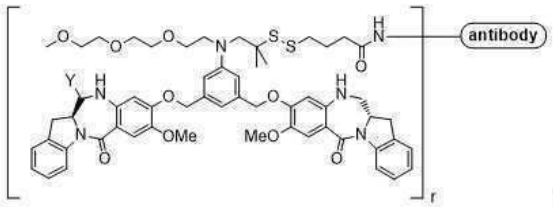
이고,

상기 이민 반응성 시약은 $NaHSO_3$ 또는 $KHSO_3$인 항체-세포독성제 컨쥬게이트의 제조방법.

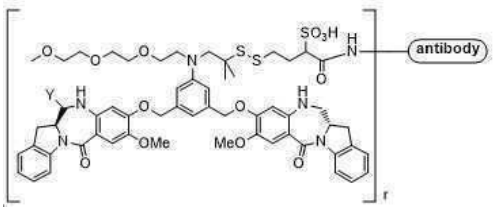
청구항 20

제7항에 있어서,

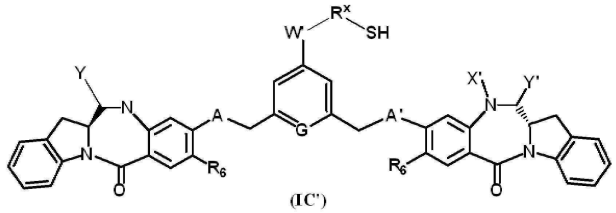
상기 컨쥬게이트는 다음 식으로 표시되거나 이의 약제학적으로 허용가능한 염이며,



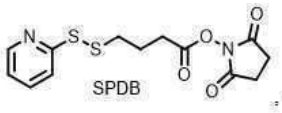
또는



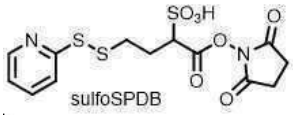
상기 변형된 세포독성 화합물은 다음 식으로 표시되며,



여기서, Y는 $-SO_3M$이고 M은 H, Na^+ 또는 K^+ 이며; r은 1 내지 10의 정수이고; 상기 이작용성 가교제는 각각 다음 식으로 표시되는 항체-세포독성제 컨쥬게이트의 제조방법.



, 또는



발명의 설명

기 술 분 야

[0001] **관련 출원에 대한 참조**

[0002] 본 출원은 미국 가출원 제61/443,062호(출원일: 2011년 2월 15일), 미국 가출원 제61/483,499호(출원일: 2011년 5월 6일) 및 미국 가출원 제61/443,092호(출원일: 2011년 2월 15일)의 35 U.S.C. §119(e) 하에 출원인의 이득을 주장하며, 이들 기초 출원의 모든 도면, 화학식, 명세서 및 특허청구범위를 포함하는 전체 내용은 본 명세서에 참조로 병합된다.

[0003] **발명의 기술분야**

[0004] 본 발명은 1개 이상의 이민 작용기를 포함하는 DNA-결합 세포독성 약물과 세포 결합제의 컨쥬게이트의 제조를 위한 이민 반응성 시약의 용도를 기재하고 있다.

배 경 기 술

[0005] 단클론성 항체는 암에 대한 치료제로서 점증적으로 이용되고 있다. 비호지킨 림프종용의 리툭시맙, 유방암용의 트라스투주맙, 두경부 및 결장암용의 세툭시맙, 결장암용의 세툭시맙, 파니티무맙 및 베바시주맙, 및 만성 림프성 백혈병용의 알렘투주맙 등과 같은, 암 세포-표면 항원에 대한 수개의 단클론성 항체가 이미 암 치료를 위하여 승인되어 있다(Strome, S. E., Sausville, E. A., and Mann, D., 2007, *The Oncologist*, 12, 1084-1095). 그러나, "네이키드"(naked) 항체의 세포독성 활성은 수용체 기능 저해, 보체-의존적 세포독성(complement-dependent cytotoxicity: CDC) 및 항체-의존적 세포-매개 세포독성(antibody-dependent cell-mediatedcytotoxicity: ADCC)의 기전으로 제한될 수 있다.

[0006] 표적 암 세포를 향한 항체의 세포독성 활성을 증진시키는 접근법은 항체를 세포독성 효과기에 연결(linking)시키는 것에 의하고 있다(A. D. Ricart, and A. W. Tolcher, 2007, *Nat. Clin. Pract. Oncol.* 4, 245-255; Lambert, J., 2010, *Drugs of the Future* 35, 471-480). 항체-세포독성 약물 컨쥬게이트(antibody-cytotoxic drug conjugate: ADC)는 암 세포에 대해 특이적으로 결합되고 나서 컨쥬게이트 내재화 및 분해를 수반하며, 이는 독성 약물의 세포내 방출을 초래하고 궁극적으로는 암 세포의 사멸을 초래한다. 항체와의 연결에 이용되는 세포독성 약물은 메이탄시노이드 및 오리스타틴 등과 같은 항튜불린 약물, 서열 특이적 이중 가닥 DNA 절단을 일으키는 칼리케아미신 등과 같은 DNA-결합 약물을 포함한다. 다른 부류의 DNA-결합 세포독성 약물은 이민-함유 피롤로벤조다이아제핀(PBD), 예컨대, N-2-이미다졸릴 알킬 치환 1,2,5-벤조티아다이아제핀-1,1-다이옥사이드(미국 특허 제6,156,746호), 벤조-피리도 또는 다이피리도 티아다이아제핀(WO 2004/069843), 피롤로[1,2-b][1,2,5]벤조티아다이아제핀 및 피롤[1,2-b][1,2,5]벤조다이아제핀 유도체(WO2007/015280), 토메이마이신 유도체(예컨대, 피롤로[1,4]벤조다이아제핀)(예컨대, WO 00/12508, WO2005/085260, WO2007/085930, EP 2019104 및 미국 특허 제6,156,746호에 기재된 것들)를 포함한다. 기타 DNA-결합 벤조다이아제핀 약물은 미국 특허 공개 제2010/0203007A1호에 기재되어 있다. 이민 결합을 포함하는 이들 벤조다이아제핀 약물은 DNA의 미소 홈(minor groove)에 결합하여 DNA 기능을 간섭하고, 그 결과 세포 사멸을 초래한다.

발명의 내용

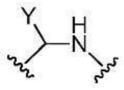
해결하려는 과제

[0007] 세포 결합제와 이민기를 보유하는 세포독성 약물의 컨쥬게이트를 제조하는 신규한 방법이 요구되고 있다.

과제의 해결 수단

[0008] 일 실시형태에 있어서, 본 발명은 연결기에 의해 세포독성 화합물에 컨쥬케이트된 세포 결합제(CBA)를 포함하는 컨쥬게이트를 제조하는 방법에 관한 것으로, 해당 방법은 세포독성 화합물을 수식된, 즉, 변형된(modified) CBA와 약 4 내지 약 9의 pH에서 반응시키는 단계를 포함하되,

[0009] a) 상기 변형된 CBA는 상기 CBA에 결합된 이작용성 가교제의 잔기를 포함하고, 상기 잔기는 상기 연결기 및 티올-반응성 기를 포함하며;

[0010] b) 상기 변형된 세포독성 화합물은 티올기, 및  로 표시된 기를 포함하고,

[0011] 상기 표시된 기 중,

[0012] Y는 이탈기이고, 아황산염(HSO_3, HSO_2 또는 양이온과 함께 형성된 HSO_3^-, SO_3^{2-} 혹은 HSO_2^-의 염), 메타중아황산염($H_2S_2O_5$ 또는 양이온과 함께 형성된 $S_2O_5^{2-}$의 염), 모노-, 다이-, 트라이- 및 테트라-티오포스페이트(PO_3SH_3, $PO_2S_2H_2$, POS_3H_2, PS_4H_2 또는 양이온과 함께 형성된 PO_3S^{3-}, $PO_2S_2^{3-}$, POS_3^{3-} 혹은 PS_4^{3-}의 염), 티오포스페이트 에스터 $(R^iO)_2PS(OR^i)$, R^iS-, R^iSO, R^iSO_2, R^iSO_3, 티오설페이트(HS_2O_3 또는 양이온과 함께 형성된 $S_2O_3^{2-}$의 염), 다이티오나이트($H_2S_2O_4$ 또는 양이온과 함께 형성된 $S_2O_4^{2-}$의 염), 포스포로다이티오에이트($P(=S)(OR^{k'})(S)(OH)$ 또는 양이온과 함께 형성된 그의 염), 하이드록삼산($R^{k'}C(=O)NOH$ 또는 양이온과 함께 형성된 염), 포름알데하이드 설폭실레이트($HOCH_2SO_2^-$ 또는 $HOCH_2SO_2^-Na^+$ 등과 같은, 양이온과 함께 형성된 $HOCH_2SO_2^-$의 염) 또는 이들의 혼합물이며, 이때, R^i는 1 내지 10개의 탄소 원자를 지닌 직쇄 혹은 분지쇄 알킬이고 $-N(R^j)_2$, $-CO_2H$, $-SO_3H$ 및 $-PO_3H$로부터 선택된 적어도 하나의 치환기로 치환되며; R^i는 여기에 기재된 알킬기에 대해서 치환기로 더욱 선택적으로 치환될 수 있고; R^j는 1 내지 6개의 탄소 원자를 지니는 직쇄 혹은 분지쇄 알킬이며; $R^{k'}$는 1 내지 10개의 탄소 원자를 지니는 직쇄, 분지쇄 혹은 환식 알킬, 알케닐 혹은 알키닐, 아릴, 헤테로사이클릴 또는 헤테로아릴이다.

[0013] 소정의 실시형태에 있어서, 상기 세포독성 화합물은 티올기를 보유하는 이민-함유 세포독성 화합물을 이민 반응성 시약과 반응시킴으로써 생성된다.

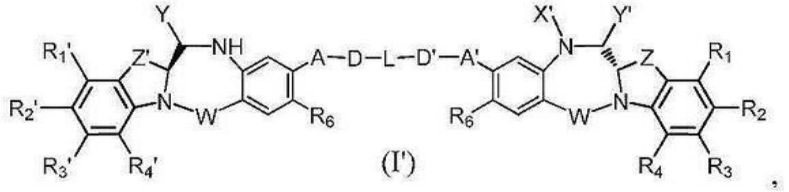
[0014] 다른 실시형태에 있어서, 본 발명은 연결기에 의해 세포독성 화합물에 컨쥬케이트된 세포 결합제(CBA)를 포함하는 컨쥬게이트를 제조하는 방법에 관한 것으로, 해당 방법은 상기 CBA를 이민-함유 세포독성 화합물, 이민 반응성 시약, 및 상기 연결기를 포함하는 이작용성 가교제와 반응시켜 상기 컨쥬게이트를 형성하는 단계를 포함한다.

[0015] 다른 실시형태에 있어서, 본 발명은 연결기에 의해 세포독성 화합물에 컨쥬케이트된 세포 결합제(CBA)를 포함하는 컨쥬게이트를 제조하는 방법에 관한 것으로, 해당 방법은

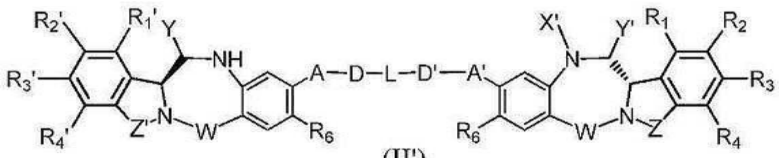
[0016] a) 세포독성 화합물을 상기 연결기를 포함하는 이작용성 가교제, 상기 CBA와 반응성인 기(티올기, 말레이미드기, 할로아세트아마이드기 또는 아민기 등), 및 상기 세포독성 화합물과 반응성인 기와 반응시켜, 상기 이작용성 가교제의 잔기에 공유 결합된 변형된 세포독성 화합물을 형성하는 단계(이때 상기 잔기는 상기 연결기 및 상기 CBA와 반응성인 기를 포함함); 및

[0017] b) 상기 변형된 세포독성 화합물을, 약 4 내지 약 9의 pH에서, 상기 CBA와 반응성인 기를 통해서 상기 CBA와 반응시켜, 상기 컨쥬게이트를 형성하는 단계를 포함하되;

[0018] 상기 세포독성 화합물은 이하의 화학식들 또는 그의 약제학적으로 허용가능한 염 중 하나로 표시된다:



(I')



(II')

[0019]

[0020] 식 중,

[0021] Y는 이탈기이고, 아황산염(HSO_3, HSO_2 또는 양이온과 함께 형성된 HSO_3^-, SO_3^{2-} 혹은 HSO_2^-의 염), 메타중아황산염($H_2S_2O_5$ 또는 양이온과 함께 형성된 $S_2O_5^{2-}$의 염), 모노-, 다이-, 트라이- 및 테트라-티오포스페이트(PO_3SH_3, $PO_2S_2H_2$, POS_3H_2, PS_4H_2 또는 양이온과 함께 형성된 PO_3S^{3-}, $PO_2S_2^{3-}$, POS_3^{3-} 혹은 PS_4^{3-}의 염), 티오포스페이트 에스터 $(R^iO)_2PS(OR^i)$, R^iS-, R^iSO, R^iSO_2, R^iSO_3, 티오설페이트(HS_2O_3 또는 양이온과 함께 형성된 $S_2O_3^{2-}$의 염), 다이티오나이트($H_2S_2O_4$ 또는 양이온과 함께 형성된 $S_2O_4^{2-}$의 염), 포스포로다이티오에이트($P(=S)(OR^{k'})(S)(OH)$ 또는 양이온과 함께 형성된 그의 염), 하이드록삼산($R^{k'}C(=O)NOH$ 또는 양이온과 함께 형성된 염), 포름알데하이드 설폭실레이트($HOCH_2SO_2^-$ 또는 $HOCH_2SO_2^-Na^+$ 등과 같은, 양이온과 함께 형성된 $HOCH_2SO_2^-$의 염) 또는 이들의 혼합물이며, 이때, R^i는 1 내지 10개의 탄소 원자를 지닌 직쇄 혹은 분지쇄 알킬이고 $-N(R^j)_2$, $-CO_2H$, $-SO_3H$ 및 $-PO_3H$로부터 선택된 적어도 하나의 치환기로 치환되며; R^i는 여기에 기재된 알킬기에 대해서 치환기로 더욱 선택적으로 치환될 수 있고; R^j는 1 내지 6개의 탄소 원자를 지니는 직쇄 혹은 분지쇄 알킬이며; $R^{k'}$는 1 내지 10개의 탄소 원자를 지니는 직쇄, 분지쇄 혹은 환식 알킬, 알케닐 혹은 알키닐, 아릴, 헤테로사이클릴 또는 헤테로아릴이고;

[0022] X'는 -H, 아민-보호기, 1 내지 10개의 탄소 원자를 지니는 선택적으로 치환된 직쇄, 분지쇄 혹은 환식 알킬, 알케닐 혹은 알키닐, 폴리에틸렌 글라이콜 단위 $-(CH_2CH_2O)_n-R^c$, 6 내지 18개의 탄소 원자를 지니는 선택적으로 치환된 아릴, 질소, 산소 및 황으로부터 독립적으로 선택된 1개 이상의 헤테로원자를 함유하는 선택적으로 치환된 5- 내지 18-원(membered) 헤테로아릴 고리, 및 O, S, N 및 P로부터 독립적으로 선택된 1 내지 6개의 헤테로원자를 함유하는 선택적으로 치환된 3- 내지 18-원 헤테로사이클릭 고리로부터 선택되며;

[0023] Y'는 -H, 옥소기, 1 내지 10개의 탄소 원자를 지니는 선택적으로 치환된 직쇄, 분지쇄 혹은 환식 알킬, 알케닐 혹은 알키닐, 선택적으로 치환된 6- 내지 18-원 아릴, 질소, 산소 및 황으로부터 독립적으로 선택된 1개 이상의 헤테로원자를 함유하는 선택적으로 치환된 5- 내지 18-원 헤테로아릴 고리, 1 내지 6개의 헤테로원자를 지니는 선택적으로 치환된 3 내지 18-원 헤테로사이클릭 고리로부터 선택되고;

[0024] R^c는 -H 또는 1 내지 4개의 탄소 원자를 지니는 치환 혹은 비치환된 직쇄 혹은 분지쇄 알킬이고;

[0025] R_1, R_2, R_3, R_4, R_1', R_2', R_3' 및 R_4'는 각각 독립적으로 -H, 1 내지 10개의 탄소 원자를 지니는 선택적으로 치환된 직쇄, 분지쇄 혹은 환식 알킬, 알케닐 혹은 알키닐, 폴리에틸렌 글라이콜 단위 $-(OCH_2CH_2)_n-R^c$, 할로겐, 구아니디늄[$-NH(C=NH)NH_2$], -OR, -NR'R'', $-NO_2$, -NCO, -NR'COR'', -SR, -SOR'로 표시되는 설폭사이드, $-SO_2R'$로 표시되는 설폰, 설포네이트 $-SO_3^-M^+$, 설페이트 $-OSO_3^-M^+$, $-SO_2NR'R''$로 표시되는 설폰아마이드, 사이아노, 아자이도, -COR', -OCOR', -OCONR'R''로 이루어진 군으로부터 선택되며;

[0026] R은, 각 경우에, 독립적으로 -H, 1 내지 10개의 탄소 원자를 지니는 선택적으로 치환된 직쇄, 분지쇄 혹은 환식 알킬, 알케닐 혹은 알키닐, 폴리에틸렌 글라이콜 단위 $-(CH_2CH_2O)_n-R^c$, 6 내지 18개의 탄소 원자를 지니는 선택적으로 치환된 아릴, 질소, 산소 및 황으로부터 독립적으로 선택된 1개 이상의 헤테로원자를 함유하는 선택적으로 치환된 5- 내지 18-원 헤테로아릴 고리, 또는 O, S, N 및 P로부터 독립적으로 선택된 1 내지 6개의 헤테로원자를 함유하는 선택적으로 치환된 3- 내지 18-원 헤테로사이클릭 고리로 이루어진 군으로부터 선택되고;

[0027] R' 및 R''는 각각 독립적으로 -H, -OH, -OR, -NHR, $-NR_2$, -COR, 1 내지 10개의 탄소 원자를 지니는 선택적으로 치환된 직쇄, 분지쇄 혹은 환식 알킬, 알케닐 혹은 알키닐, 폴리에틸렌 글라이콜 단위 $-(CH_2CH_2O)_n-R^c$, 및 O, S, N 및 P로부터 독립적으로 선택된 1 내지 6개의 헤테로원자를 지니는 선택적으로 치환된 3- 내지 18-원 헤테로사이클릭 고리로부터 선택되며;

[0028] n은 1 내지 24의 정수이고;

[0029] W는 C=O, C=S, CH_2, BH, SO 및 SO_2로부터 선택되며;

[0030] R_6은 -H, -R, -OR, -SR, -NR'R'', $-NO_2$ 또는 할로겐이고;

[0031] Z 및 Z'는 독립적으로 $-(CH_2)_{n'}-$, $-(CH_2)_{n'}-CR_7R_8-(CH_2)_{na'}-$, $-(CH_2)_{n'}-NR_9-(CH_2)_{na'}-$, $-(CH_2)_{n'}-O-(CH_2)_{na'}-$ 및 $-(CH_2)_{n'}-S-(CH_2)_{na'}-$로부터 선택되며;

[0032] n' 및 na'는 동일 또는 상이하고, 또한 0, 1, 2 및 3으로부터 선택되고;

[0033] R_7 및 R_8은 동일 또는 상이하고, 또한 각각 독립적으로 -H, -OH, -SH, -COOH, -NHR', 폴리에틸렌 글라이콜 단위 $-(OCH_2CH_2)_n-$, 아미노산, 2 내지 6개의 아미노산을 보유하는 펩타이드 단위, 1 내지 10개의 탄소 원자를 지니는 선택적으로 치환된 직쇄, 분지쇄 혹은 환식 알킬로부터 선택되며;

[0034] R_9는 독립적으로 -H, 1 내지 10개의 탄소 원자를 지니는 선택적으로 치환된 직쇄, 분지쇄 혹은 환식 알킬, 폴리에틸렌 글라이콜 단위 $-(OCH_2CH_2)_n-$으로부터 선택되고;

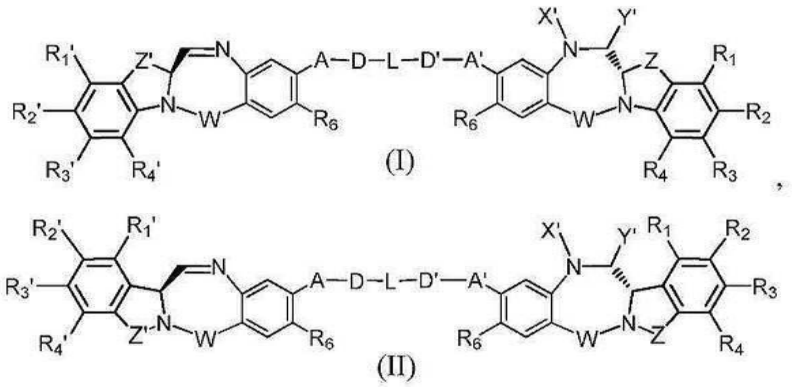
[0035] A 및 A'는 동일 또는 상이하고, 또한 독립적으로 -O-, 옥소(-C(=O)-), -CRR'O-, -CRR'-, -S-, -CRR'S-, $-N(R_5)-$ 및 $-CRR'N(R_5)-$로부터 선택되며;

[0036] R_5는 각 경우에 독립적으로 -H 또는 1 내지 10개의 탄소 원자를 지니는 선택적으로 치환된 직쇄 혹은 분지쇄 알킬이고;

[0037] D 및 D'는 동일 또는 상이하고, 또한 독립적으로 존재하지 않거나 또는 1 내지 10개의 탄소 원자를 지니는 선택적으로 치환된 직쇄, 분지쇄 혹은 환식 알킬, 알케닐 혹은 알키닐, 아미노산, 2 내지 6개의 아미노산을 보유하는 펩타이드 및 폴리에틸렌 글라이콜 단위 $(-OCH_2CH_2)_n-$으로 이루어진 군으로부터 선택되며;

[0038] L은 존재하지 않거나, 또는 존재할 경우에는, 티올기를 포함하거나, 또는 폴리에틸렌 글라이콜 단위 $(-OCH_2CH_2)_n-$, 1 내지 10개의 탄소 원자를 지니는 직쇄, 분지쇄 혹은 환식 알킬 혹은 알케닐, 페닐기, O, S, N 및 P로부터 독립적으로 선택된 1 내지 6개의 헤테로원자를 지니는 3- 내지 18-원 헤테로사이클릭 고리 또는 5- 내지 18-원 헤테로아릴 고리이고, 이때, 상기 알킬, 알케닐, 페닐, 또는 헤테로사이클릭 혹은 헤테로아릴 고리는 선택적으로 치환된다.

[0039] 상기 실시형태들 중 어느 하나에 있어서, 상기 이민-함유 세포독성 화합물은 이하의 화학식들, 또는 그의 약제학적으로 허용가능한 염 중 하나로 표시될 수 있다:



[0040]

[0041] 식 중,

[0042] X'는 -H, 아민-보호기, 1 내지 10개의 탄소 원자를 지니는 선택적으로 치환된 직쇄, 분지쇄 혹은 환식 알킬, 알케닐 혹은 알키닐, 폴리에틸렌 글라이콜 단위 $-(CH_2CH_2O)_n-R^c$, 6 내지 18개의 탄소 원자를 지니는 선택적으로 치환된 아릴, 질소, 산소 및 황으로부터 독립적으로 선택된 1개 이상의 헤테로원자를 함유하는 선택적으로 치환된 5- 내지 18-원 헤테로아릴 고리, 및 O, S, N 및 P로부터 독립적으로 선택된 1 내지 6개의 헤테로원자를 함유하는 선택적으로 치환된 3- 내지 18-원 헤테로사이클릭 고리로부터 선택되고;

[0043] Y'는 -H, 옥소기, 1 내지 10개의 탄소 원자를 지니는 선택적으로 치환된 직쇄, 분지쇄 혹은 환식 알킬, 알케닐 혹은 알키닐, 선택적으로 치환된 6- 내지 18-원 아릴, 질소, 산소 및 황으로부터 독립적으로 선택된 1개 이상의 헤테로원자를 함유하는 선택적으로 치환된 5- 내지 18-원 헤테로아릴 고리, 1 내지 6개의 헤테로원자를 지니는 선택적으로 치환된 3 내지 18-원 헤테로사이클릭 고리로부터 선택되며;

[0044] R^c는 -H 또는 1 내지 4개의 탄소 원자를 지니는 치환 혹은 비치환된 직쇄 혹은 분지쇄 알킬이고;

[0045] R_1, R_2, R_3, R_4, R_1', R_2', R_3' 및 R_4'는 각각 독립적으로 -H, 1 내지 10개의 탄소 원자를 지니는 선택적으로 치환된 직쇄, 분지쇄 혹은 환식 알킬, 알케닐 혹은 알키닐, 폴리에틸렌 글라이콜 단위 $-(OCH_2CH_2)_n-R^c$, 할로겐, 구아니디늄[$-NH(C=NH)NH_2$], -OR, -NR'R'', $-NO_2$, -NCO, -NR'COR'', -SR, -SOR'로 표시되는 설폭사이드, $-SO_2R'$로 표시되는 설폰, 설포네이트 $-SO_3^-M^+$, 설페이트 $-OSO_3^-M^+$, $-SO_2NR'R''$로 표시되는 설폰아마이드, 사이아노, 아자이도, -COR', -OCOR', -OCONR'R'' 및 상기 연결기로 이루어진 군으로부터 선택되며;

[0046] R은, 각 경우에, 독립적으로 -H, 1 내지 10개의 탄소 원자를 지니는 선택적으로 치환된 직쇄, 분지쇄 혹은 환식 알킬, 알케닐 혹은 알키닐, 폴리에틸렌 글라이콜 단위 $-(CH_2CH_2O)_n-R^c$, 6 내지 18개의 탄소 원자를 지니는 선택적으로 치환된 아릴, 질소, 산소 및 황으로부터 독립적으로 선택된 1개 이상의 헤테로원자를 함유하는 선택적으로 치환된 5- 내지 18-원 헤테로아릴 고리, 또는 O, S, N 및 P로부터 독립적으로 선택된 1 내지 6개의 헤테로원자를 함유하는 선택적으로 치환된 3- 내지 18-원 헤테로사이클릭 고리로 이루어진 군으로부터 선택되고;

[0047] R' 및 R''는 각각 독립적으로 -H, -OH, -OR, -NHR, $-NR_2$, -COR, 1 내지 10개의 탄소 원자를 지니는 선택적으로 치환된 직쇄, 분지쇄 혹은 환식 알킬, 알케닐 혹은 알키닐, 폴리에틸렌 글라이콜 단위 $-(CH_2CH_2O)_n-R^c$, 및 O, S, N 및 P로부터 독립적으로 선택된 1 내지 6개의 헤테로원자를 지니는 선택적으로 치환된 3- 내지 18-원 헤테로사이클릭 고리로부터 선택되며;

[0048] n은 1 내지 24의 정수이고;

[0049] W는 C=O, C=S, CH_2, BH, SO 및 SO_2로부터 선택되며;

[0050] R_6은 -H, -R, -OR, -SR, -NR'R'', $-NO_2$ 또는 할로겐이고;

[0051] Z 및 Z'는 독립적으로 $-(CH_2)_{n'}-$, $-(CH_2)_{n'}-CR_7R_8-(CH_2)_{na'}-$, $-(CH_2)_{n'}-NR_9-(CH_2)_{na'}-$, $-(CH_2)_{n'}-O-(CH_2)_{na'}-$ 및

$-(CH_2)_{n'}-S-(CH_2)_{na'}-$로부터 선택되며;

[0052] n' 및 na'는 동일 또는 상이하고, 또한 0, 1, 2 및 3으로부터 선택되고;

[0053] R_7 및 R_8은 동일 또는 상이하고, 또한 각각 독립적으로 -H, -OH, -SH, -COOH, -NHR', 폴리에틸렌 글라이콜 단위 $-(OCH_2CH_2)_n-$, 아미노산, 2 내지 6개의 아미노산을 보유하는 펩타이드 단위, 1 내지 10개의 탄소 원자를 지니는 선택적으로 치환된 직쇄, 분지쇄 혹은 환식 알킬로부터 선택되며;

[0054] R_9는 독립적으로 -H, 1 내지 10개의 탄소 원자를 지니는 선택적으로 치환된 직쇄, 분지쇄 혹은 환식 알킬, 폴리에틸렌 글라이콜 단위 $-(OCH_2CH_2)_n-$으로부터 선택되고;

[0055] A 및 A'는 동일 또는 상이하고, 또한 독립적으로 -O-, 옥소(-C(=O)-), -CRR'O-, -CRR'-, -S-, -CRR'S-, $-N(R_5)-$ 및 $-CRR'N(R_5)-$로부터 선택되며;

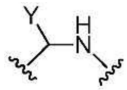
[0056] R_5는 각 경우에 독립적으로 -H 또는 1 내지 10개의 탄소 원자를 지니는 선택적으로 치환된 직쇄 혹은 분지쇄 알킬이고;

[0057] D 및 D'는 동일 또는 상이하고, 또한 독립적으로 존재하지 않거나, 또는 1 내지 10개의 탄소 원자를 지니는 선택적으로 치환된 직쇄, 분지쇄 혹은 환식 알킬, 알케닐 혹은 알키닐, 아미노산, 2 내지 6개의 아미노산을 보유하는 펩타이드 및 폴리에틸렌 글라이콜 단위 $(-OCH_2CH_2)_n-$으로 이루어진 군으로부터 선택되며;

[0058] L은 존재하지 않거나, 또는 존재할 경우에는, 상기 티올기를 포함하고, 또한 폴리에틸렌 글라이콜 단위 $(-OCH_2CH_2)_n-$, 1 내지 10개의 탄소 원자를 지니는 직쇄, 분지쇄 혹은 환식 알킬 혹은 알케닐, 페닐기, O, S, N 및 P로부터 독립적으로 선택된 1 내지 6개의 헤테로원자를 지니는 3- 내지 18-원 헤테로사이클릭 고리 또는 5- 내지 18-원 헤테로아릴 고리이되, 상기 알킬, 알케닐, 페닐, 또는 헤테로사이클릭 혹은 헤테로아릴 고리는 선택적으로 치환된다.

[0059] 또 다른 실시형태에 있어서, 본 발명은 연결기에 의해 세포독성 화합물에 컨쥬케이트된 세포 결합제(CBA)를 포함하는 컨쥬게이트를 제조하는 방법에 관한 것으로, 해당 방법은 변형된 세포독성 화합물을 상기 CBA와 약 4 내지 약 9의 pH에서 반응시키는 단계를 포함하되, 상기 변형된 세포독성 화합물은

[0060] a) 상기 세포독성 화합물에 결합된 이작용성 가교제의 잔기로서, 해당 잔기는 상기 연결기 및 반응성 에스터와 티올-반응성 기로부터 선택된 반응성 기를 포함하는 것인, 상기 이작용성 가교제의 잔기, 및

[0061] b)  로 표시된 기를 포함하는 것인 컨쥬게이트의 제조 방법:

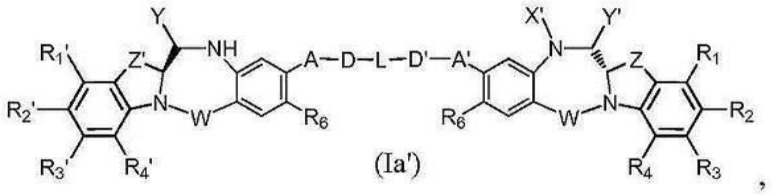
[0062] 상기 표시된 기 중,

[0063] Y는 이탈기이고, 아황산염(HSO_3, HSO_2 또는 양이온과 함께 형성된 HSO_3^-, SO_3^{2-} 혹은 HSO_2^-의 염), 메타중아황산염($H_2S_2O_5$ 또는 양이온과 함께 형성된 $S_2O_5^{2-}$의 염), 모노-, 다이-, 트라이- 및 테트라-티오포스페이트(PO_3SH_3, $PO_2S_2H_2$, POS_3H_2, PS_4H_2 또는 양이온과 함께 형성된 PO_3S^{3-}, $PO_2S_2^{3-}$, POS_3^{3-} 혹은 PS_4^{3-}의 염), 티오포스페이트 에스터 $(R^iO)_2PS(OR^i)$, R^iS-, R^iSO, R^iSO_2, R^iSO_3, 티오설페이트(HS_2O_3 또는 양이온과 함께 형성된 $S_2O_3^{2-}$의 염), 다이티오나이트($H_2S_2O_4$ 또는 양이온과 함께 형성된 $S_2O_4^{2-}$의 염), 포스포로다이티오에이트($P(=S)(OR^{k'})(S)(OH)$ 또는 양이온과 함께 형성된 그의 염), 하이드록삼산($R^{k'}C(=O)NOH$ 또는 양이온과 함께 형성된 염), 포름알데하이드 설폭실레이트($HOCH_2SO_2^-$ 또는 $HOCH_2SO_2^-Na^+$ 등과 같은, 양이온과 함께 형성된 $HOCH_2SO_2^-$의 염) 또는 이들의 혼합물이며, 이때, R^i는 1 내지 10개의 탄소 원자를 지닌 직쇄 혹은 분지쇄 알킬이고 $-N(R^j)_2$, $-CO_2H$, $-SO_3H$ 및 $-PO_3H$로부터 선택된 적어도 하나의 치환기로 치환되며; R^i는 여기에 기재된 알킬기에 대해서 치환기로 더욱 선택적으로 치환될 수 있고; R^j는 1 내지 6개의 탄소 원자를 지닌 직쇄 혹은 분지쇄 알킬이며; $R^{k'}$는 1 내지 10개의 탄소 원자를

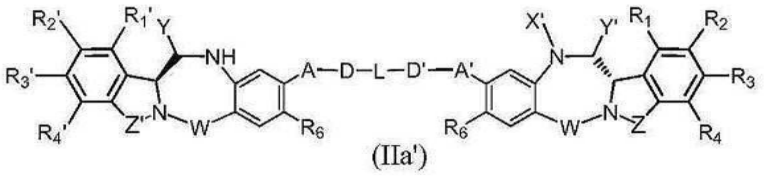
지니는 직쇄, 분지쇄 혹은 환식 알킬, 알케닐 혹은 알키닐, 아릴, 헤테로사이클릴 또는 헤테로아릴이다.

[0064] 소정의 실시형태에 있어서, 상기 변형된 세포독성 화합물은, 이민 반응성 시약을, 상기 연결기 및 상기 반응성 기를 보유하는 이민-함유 세포독성 화합물과 반응시킴으로써 생성된다.

[0065] 상기 실시형태들 중 어느 것에 있어서도, 상기 변형된 세포독성 화합물은 이하의 화학식들 또는 그의 약제학적으로 허용가능한 염 중 어느 하나로 표시된다:



,



[0066]

[0067] 식 중,

[0068] Y는 아황산염(HSO_3, HSO_2 또는 양이온과 함께 형성된 HSO_3^-, SO_3^{2-} 혹은 HSO_2^-의 염), 메타중아황산염($H_2S_2O_5$ 또는 양이온과 함께 형성된 $S_2O_5^{2-}$의 염), 모노-, 다이-, 트라이- 및 테트라-티오포스페이트(PO_3SH_3, $PO_2S_2H_2$, POS_3H_2, PS_4H_2 또는 양이온과 함께 형성된 PO_3S^{3-}, $PO_2S_2^{3-}$, POS_3^{3-} 혹은 PS_4^{3-}의 염), 티오포스페이트 에스터 $(R^iO)_2PS(OR^i)$, R^iS-, R^iSO, R^iSO_2, R^iSO_3, 티오설페이트(HS_2O_3 또는 양이온과 함께 형성된 $S_2O_3^{2-}$의 염), 다이티오나이트($H_2S_2O_4$ 또는 양이온과 함께 형성된 $S_2O_4^{2-}$의 염), 포스포로다이티오에이트($P(=S)(OR^{k'})(S)(OH)$ 또는 양이온과 함께 형성된 그의 염), 하이드록삼산($R^{k'}C(=O)NOH$ 또는 양이온과 함께 형성된 염), 포름알데하이드 설폭실레이트($HOCH_2SO_2^-$ 또는 $HOCH_2SO_2^-Na^+$ 등과 같은, 양이온과 함께 형성된 $HOCH_2SO_2^-$의 염) 또는 이들의 혼합물이며, 이때, R^i는 1 내지 10개의 탄소 원자를 지닌 직쇄 혹은 분지쇄 알킬이고 $-N(R^j)_2$, $-CO_2H$, $-SO_3H$ 및 $-PO_3H$로부터 선택된 적어도 하나의 치환기로 치환되며; R^i는 여기에 기재된 알킬기에 대해서 치환기로 더욱 선택적으로 치환될 수 있고; R^j는 1 내지 6개의 탄소 원자를 지니는 직쇄 혹은 분지쇄 알킬이며; $R^{k'}$는 1 내지 10개의 탄소 원자를 지니는 직쇄, 분지쇄 혹은 환식 알킬, 알케닐 혹은 알키닐, 아릴, 헤테로사이클릴 또는 헤테로아릴이며;

[0069] X'는 -H, 아민-보호기, 상기 반응성 기가 결합된 상기 연결기, 1 내지 10개의 탄소 원자를 지니는 선택적으로 치환된 직쇄, 분지쇄 혹은 환식 알킬, 알케닐 혹은 알키닐, 폴리에틸렌 글라이콜 단위 $-(CH_2CH_2O)_n-R^c$, 6 내지 18개의 탄소 원자를 지니는 선택적으로 치환된 아릴, 질소, 산소 및 황으로부터 독립적으로 선택된 1개 이상의 헤테로원자를 함유하는 선택적으로 치환된 5- 내지 18-원 헤테로아릴 고리, 및 O, S, N 및 P로부터 독립적으로 선택된 1 내지 6개의 헤테로원자를 함유하는 선택적으로 치환된 3- 내지 18-원 헤테로사이클릭 고리로부터 선택되고;

[0070] Y'는 -H, 옥소기, 상기 반응성 기가 결합된 상기 연결기, 1 내지 10개의 탄소 원자를 지니는 선택적으로 치환된 직쇄, 분지쇄 혹은 환식 알킬, 알케닐 혹은 알키닐, 선택적으로 치환된 6- 내지 18-원 아릴, 질소, 산소 및 황으로부터 독립적으로 선택된 1개 이상의 헤테로원자를 함유하는 선택적으로 치환된 5- 내지 18-원 헤테로아릴 고리, 1 내지 6개의 헤테로원자를 지니는 선택적으로 치환된 3- 내지 18-원 헤테로사이클릭 고리로부터 선택되며;

[0071] R^c는 -H 또는 1 내지 4개의 탄소 원자를 지니는 치환 혹은 비치환된 직쇄 혹은 분지쇄 알킬 또는 상기 반응성

기가 결합된 상기 연결기이고;

[0072] R_1, R_2, R_3, R_4, R_1', R_2', R_3' 및 R_4'는 각각 독립적으로 -H, 1 내지 10개의 탄소 원자를 지니는 선택적으로 치환된 직쇄, 분지쇄 혹은 환식 알킬, 알케닐 혹은 알키닐, 폴리에틸렌 글라이콜 단위 $-(OCH_2CH_2)_n-R^c$, 할로겐, 구아니디늄[$-NH(C=NH)NH_2$], -OR, -NR'R'', $-NO_2$, -NCO, -NR'COR'', -SR, -SOR'로 표시되는 설폭사이드, $-SO_2R'$로 표시되는 설폰, 설포네이트 $-SO_3^-M^+$, 설페이트 $-OSO_3^-M^+$, $-SO_2NR'R''$로 표시되는 설폰아마이드, 사이아노, 아자이도, -COR', -OCOR', -OCONR'R'', 및 상기 반응성 기가 결합된 상기 연결기로 이루어진 군으로부터 선택되며;

[0073] R은, 각 경우에, 독립적으로 -H, 1 내지 10개의 탄소 원자를 지니는 선택적으로 치환된 직쇄, 분지쇄 혹은 환식 알킬, 알케닐 혹은 알키닐, 폴리에틸렌 글라이콜 단위 $-(CH_2CH_2O)_n-R^c$, 6 내지 18개의 탄소 원자를 지니는 선택적으로 치환된 아릴, 질소, 산소 및 황으로부터 독립적으로 선택된 1개 이상의 헤테로원자를 함유하는 선택적으로 치환된 5- 내지 18-원 헤테로아릴 고리, 또는 O, S, N 및 P로부터 독립적으로 선택된 1 내지 6개의 헤테로원자를 함유하는 선택적으로 치환된 3- 내지 18-원 헤테로사이클릭 고리로 이루어진 군으로부터 선택되고;

[0074] R' 및 R''는 각각 독립적으로 -H, -OH, -OR, -NHR, - NR_2, -COR, 1 내지 10개의 탄소 원자를 지니는 선택적으로 치환된 직쇄, 분지쇄 혹은 환식 알킬, 알케닐 혹은 알키닐, 폴리에틸렌 글라이콜 단위 $-(CH_2CH_2O)_n-R^c$, 및 O, S, N 및 P로부터 독립적으로 선택된 1 내지 6개의 헤테로원자를 지니는 선택적으로 치환된 3- 내지 18-원 헤테로사이클릭 고리로부터 선택되며;

[0075] n은 1 내지 24의 정수이고;

[0076] W는 C=O, C=S, CH_2, BH, SO 및 SO_2로부터 선택되며;

[0077] R_6은 -H, -R, -OR, -SR, -NR'R'', $-NO_2$, 할로겐 또는 상기 반응성 기가 결합된 상기 연결기이고;

[0078] Z 및 Z'는 독립적으로 $-(CH_2)_{n'}-$, $-(CH_2)_{n'}-CR_7R_8-(CH_2)_{na'}-$, $-(CH_2)_{n'}-NR_9-(CH_2)_{na'}-$, $-(CH_2)_{n'}-O-(CH_2)_{na'}-$ 및 $-(CH_2)_{n'}-S-(CH_2)_{na'}-$로부터 선택되며;

[0079] n' 및 na'는 동일 또는 상이하고, 또한 0, 1, 2 및 3으로부터 선택되고;

[0080] R_7 및 R_8은 동일 또는 상이하고, 또한 각각 독립적으로 -H, -OH, -SH, -COOH, -NHR', 폴리에틸렌 글라이콜 단위 $-(OCH_2CH_2)_n-$, 아미노산, 2 내지 6개의 아미노산을 보유하는 펩타이드 단위, 1 내지 10개의 탄소 원자를 지니는 선택적으로 치환된 직쇄, 분지쇄 혹은 환식 알킬로부터 선택되며;

[0081] R_9는 독립적으로 -H, 1 내지 10개의 탄소 원자를 지니는 선택적으로 치환된 직쇄, 분지쇄 혹은 환식 알킬, 폴리에틸렌 글라이콜 단위 $-(OCH_2CH_2)_n-$으로부터 선택되고;

[0082] A 및 A'는 동일 또는 상이하고, 또한 독립적으로 -O-, 옥소(-C(=O)-), -CRR'O-, -CRR'-, -S-, -CRR'S-, $-N(R_5)-$ 및 $-CRR'N(R_5)-$로부터 선택되며;

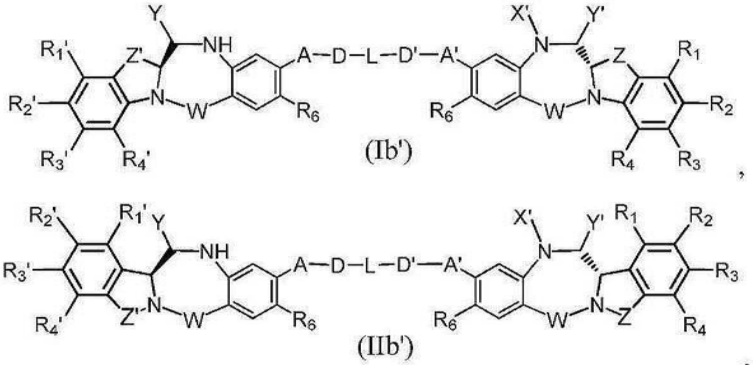
[0083] R_5는 각 경우에 독립적으로 -H 또는 1 내지 10개의 탄소 원자를 지니는 선택적으로 치환된 직쇄 혹은 분지쇄 알킬이고;

[0084] D 및 D'는 동일 또는 상이하고, 또한 독립적으로 존재하지 않거나 또는 1 내지 10개의 탄소 원자를 지니는 선택적으로 치환된 직쇄, 분지쇄 혹은 환식 알킬, 알케닐 혹은 알키닐, 아미노산, 2 내지 6개의 아미노산을 보유하는 펩타이드 및 폴리에틸렌 글라이콜 단위 $(-OCH_2CH_2)_n-$으로 이루어진 군으로부터 선택되며;

[0085] L은 존재하지 않거나, 상기 반응성 기가 결합된 상기 연결기, 폴리에틸렌 글라이콜 단위 $(-OCH_2CH_2)_n-$, 1 내지 10개의 탄소 원자를 지니는 직쇄, 분지쇄 혹은 환식 알킬 혹은 알케닐, 페닐기, O, S, N 및 P로부터 독립적으로 선택된 1 내지 6개의 헤테로원자를 지니는 3 내지 18-원 헤테로사이클릭 고리 또는 5- 내지 18-원 헤테로아릴 고리이되, 이때, 상기 알킬 또는 알케닐은 상기 반응성 기가 결합된 상기 연결기에 의해 선택적으로 치환되고; 페닐 또는 헤테로사이클릭 또는 헤테로아릴 고리는 선택적으로 치환될 수 있으며, 여기서 상기 치환기는 상기

반응성 기가 결합된 상기 연결기일 수 있다.

[0086] 상기 실시형태들 중 어느 하나에 있어서, 상기 컨쥬게이트의 상기 세포독성 화합물 및 상기 연결기는 이하의 화학식 또는 그의 약제학적으로 허용가능한 염으로 표시된다:



[0087]

[0088] 식 중,

[0089] Y는 이탈기이고, 아황산염(HSO_3, HSO_2 또는 양이온과 함께 형성된 HSO_3^-, SO_3^{2-} 혹은 HSO_2^-의 염), 메타중아황산염($H_2S_2O_5$ 또는 양이온과 함께 형성된 $S_2O_5^{2-}$의 염), 모노-, 다이-, 트라이- 및 테트라-티오포스페이트(PO_3SH_3, $PO_2S_2H_2$, POS_3H_2, PS_4H_2 또는 양이온과 함께 형성된 PO_3S^{3-}, $PO_2S_2^{3-}$, POS_3^{3-} 혹은 PS_4^{3-}의 염), 티오포스페이트 에스터 $(R^iO)_2PS(OR^i)$, R^iS-, R^iSO, R^iSO_2, R^iSO_3, 티오설페이트(HS_2O_3 또는 양이온과 함께 형성된 $S_2O_3^{2-}$의 염), 다이티오나이트($H_2S_2O_4$ 또는 양이온과 함께 형성된 $S_2O_4^{2-}$의 염), 포스포로다이티오에이트($P(=S)(OR^{k'})(S)(OH)$ 또는 양이온과 함께 형성된 그의 염), 하이드록삼산($R^{k'}C(=O)NOH$ 또는 양이온과 함께 형성된 염), 포름알데하이드 설폭실레이트($HOCH_2SO_2^-$ 또는 $HOCH_2SO_2^-Na^+$ 등과 같은, 양이온과 함께 형성된 $HOCH_2SO_2^-$의 염) 또는 이들의 혼합물이며, 이때, R^i는 1 내지 10개의 탄소 원자를 지닌 직쇄 혹은 분지쇄 알킬이고 $-N(R^j)_2$, $-CO_2H$, $-SO_3H$ 및 $-PO_3H$로부터 선택된 적어도 하나의 치환기로 치환되며; R^i는 여기에 기재된 알킬기에 대해서 치환기로 더욱 선택적으로 치환될 수 있고; R^j는 1 내지 6개의 탄소 원자를 지니는 직쇄 혹은 분지쇄 알킬이며; $R^{k'}$는 1 내지 10개의 탄소 원자를 지니는 직쇄, 분지쇄 혹은 환식 알킬, 알케닐 혹은 알키닐, 아릴, 헤테로사이클릴 또는 헤테로아릴이고;

[0090] X'는 -H, 아민-보호기, 상기 연결기, 1 내지 10개의 탄소 원자를 지니는 선택적으로 치환된 직쇄, 분지쇄 혹은 환식 알킬, 알케닐 혹은 알키닐, 폴리에틸렌 글라이콜 단위 $-(CH_2CH_2O)_n-R^c$, 6 내지 18개의 탄소 원자를 지니는 선택적으로 치환된 아릴, 질소, 산소 및 황으로부터 독립적으로 선택된 1개 이상의 헤테로원자를 함유하는 선택적으로 치환된 5- 내지 18-원 헤테로아릴 고리, 및 O, S, N 및 P로부터 독립적으로 선택된 1 내지 6개의 헤테로원자를 함유하는 선택적으로 치환된 3- 내지 18-원 헤테로사이클릭 고리로부터 선택되며;

[0091] Y'는 -H, 옥소기, 상기 연결기, 1 내지 10개의 탄소 원자를 지니는 선택적으로 치환된 직쇄, 분지쇄 혹은 환식 알킬, 알케닐 혹은 알키닐, 선택적으로 치환된 6- 내지 18-원 아릴, 질소, 산소 및 황으로부터 독립적으로 선택된 1개 이상의 헤테로원자를 함유하는 선택적으로 치환된 5- 내지 18-원 헤테로아릴 고리, 1 내지 6개의 헤테로원자를 지니는 선택적으로 치환된 3- 내지 18-원 헤테로사이클릭 고리로부터 선택되고;

[0092] R^c는 -H 또는 1 내지 4개의 탄소 원자를 지니는 치환 혹은 비치환된 직쇄 혹은 분지쇄 알킬 또는 상기 연결기이며;

[0093] R_1, R_2, R_3, R_4, R_1', R_2', R_3' 및 R_4'는 각각 독립적으로 -H, 1 내지 10개의 탄소 원자를 지니는 선택적으로 치환된 직쇄, 분지쇄 혹은 환식 알킬, 알케닐 혹은 알키닐, 폴리에틸렌 글라이콜 단위 $-(OCH_2CH_2)_n-R^c$, 할로겐, 구아니디늄[$-NH(C=NH)NH_2$], -OR, -NR'R'', $-NO_2$, -NCO, -NR'COR'', -SR, -SOR'로 표시되는 설폭사이드, $-SO_2R'$로

표시되는 설폰, 설포네이트 $-SO_3^-M^+$, 설페이트 $-OSO_3^-M^+$, $-SO_2NR'R''$로 표시되는 설폰아마이드, 사이아노, 아자이도, -COR', -OCOR', -OCONR'R'' 및 상기 연결기로 이루어진 군으로부터 선택되고;

[0094] M은 -H 또는 약제학적으로 허용가능한 양이온, 예컨대, Na^+이며;

[0095] R은, 각 경우에, 독립적으로 -H, 1 내지 10개의 탄소 원자를 지니는 선택적으로 치환된 직쇄, 분지쇄 혹은 환식 알킬, 알케닐 혹은 알키닐, 폴리에틸렌 글라이콜 단위 $-(CH_2CH_2O)_n-R^c$, 6 내지 18개의 탄소 원자를 지니는 선택적으로 치환된 아릴, 질소, 산소 및 황으로부터 독립적으로 선택된 1개 이상의 헤테로원자를 함유하는 선택적으로 치환된 5- 내지 18-원 헤테로아릴 고리, 또는 O, S, N 및 P로부터 독립적으로 선택된 1 내지 6개의 헤테로원자를 함유하는 선택적으로 치환된 3- 내지 18-원 헤테로사이클릭 고리로 이루어진 군으로부터 선택되고;

[0096] R' 및 R''는 각각 독립적으로 -H, -OH, -OR, -NHR, $-NR_2$, -COR, 1 내지 10개의 탄소 원자를 지니는 선택적으로 치환된 직쇄, 분지쇄 혹은 환식 알킬, 알케닐 혹은 알키닐, 폴리에틸렌 글라이콜 단위 $-(CH_2CH_2O)_n-R^c$, 및 O, S, N 및 P로부터 독립적으로 선택된 1 내지 6개의 헤테로원자를 지니는 선택적으로 치환된 3- 내지 18-원 헤테로사이클릭 고리로부터 선택되고;

[0097] n은 1 내지 24의 정수이며;

[0098] W는 C=O, C=S, CH_2, BH, SO 및 SO_2로부터 선택되며;

[0099] R_6은 -H, -R, -OR, -SR, -NR'R'', $-NO_2$, 할로겐 또는 상기 연결기이고;

[0100] Z 및 Z'는 독립적으로 $-(CH_2)_{n'}-$, $-(CH_2)_{n'}-CR_7R_8-(CH_2)_{na'}-$, $-(CH_2)_{n'}-NR_9-(CH_2)_{na'}-$, $-(CH_2)_{n'}-O-(CH_2)_{na'}-$ 및 $-(CH_2)_{n'}-S-(CH_2)_{na'}-$로부터 선택되고;

[0101] n' 및 na'는 동일 또는 상이하고, 또한 0, 1, 2 및 3으로부터 선택되며;

[0102] R_7 및 R_8은 동일 또는 상이하고, 또한 각각 독립적으로 -H, -OH, -SH, -COOH, -NHR', 폴리에틸렌 글라이콜 단위 $-(OCH_2CH_2)_n-$, 아미노산, 2 내지 6개의 아미노산을 보유하는 펩타이드 단위, 1 내지 10개의 탄소 원자를 지니는 선택적으로 치환된 직쇄, 분지쇄 혹은 환식 알킬로부터 선택되며;

[0103] R_9는 독립적으로 -H, 1 내지 10개의 탄소 원자를 지니는 선택적으로 치환된 직쇄, 분지쇄 혹은 환식 알킬, 폴리에틸렌 글라이콜 단위 $-(OCH_2CH_2)_n-$으로부터 선택되고;

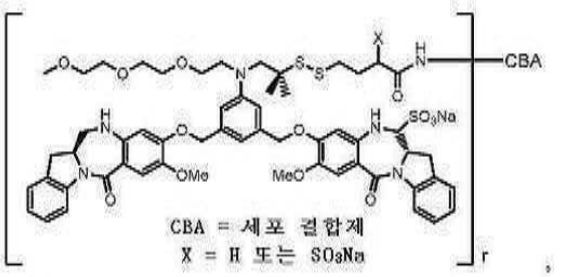
[0104] A 및 A'는 동일 또는 상이하고, 또한 독립적으로 -O-, 옥소(-C(=O)-), -CRR'O-, -CRR'-, -S-, -CRR'S-, $-N(R_5)-$ 및 $-CRR'N(R_5)-$로부터 선택되며;

[0105] R_5는 각 경우에 독립적으로 -H 또는 1 내지 10개의 탄소 원자를 지니는 선택적으로 치환된 직쇄 혹은 분지쇄 알킬이고;

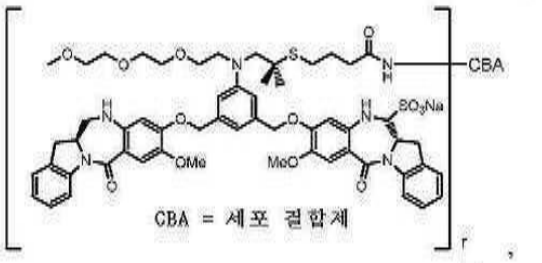
[0106] D 및 D'는 동일 또는 상이하고, 또한 독립적으로 존재하지 않거나 또는 1 내지 10개의 탄소 원자를 지니는 선택적으로 치환된 직쇄, 분지쇄 혹은 환식 알킬, 알케닐 혹은 알키닐, 아미노산, 2 내지 6개의 아미노산을 보유하는 펩타이드 및 폴리에틸렌 글라이콜 단위 $(-OCH_2CH_2)_n-$으로 이루어진 군으로부터 선택되며;

[0107] L은 존재하지 않거나, 상기 연결기, 폴리에틸렌 글라이콜 단위 $(-OCH_2CH_2)_n-$, 선택적으로 치환된 1 내지 10개의 탄소 원자를 지니는 직쇄, 분지쇄 혹은 환식 알킬 혹은 알케닐, 페닐기, O, S, N 및 P로부터 독립적으로 선택된 1 내지 6개의 헤테로원자를 지니는 3- 내지 18-원 헤테로사이클릭 고리 또는 5- 내지 18-원 헤테로아릴 고리이되, 이때, 상기 알킬 또는 알케닐은 상기 연결기로 선택적으로 치환되고; 페닐 또는 헤테로사이클릭 또는 헤테로아릴 고리는 선택적으로 치환될 수 있으며, 여기서 상기 치환기는 상기 연결기를 포함할 수 있다.

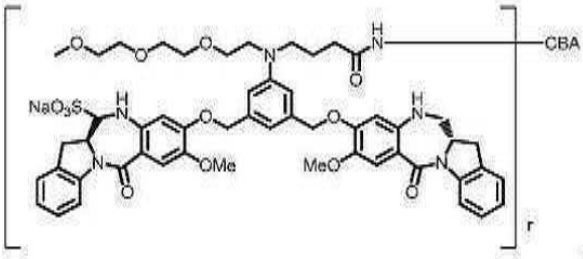
[0108] 본 발명의 방법들 중 어느 하나에 따라 생성될 수 있는 수 개의 바람직한 컨쥬게이트는 이하를 포함한다:



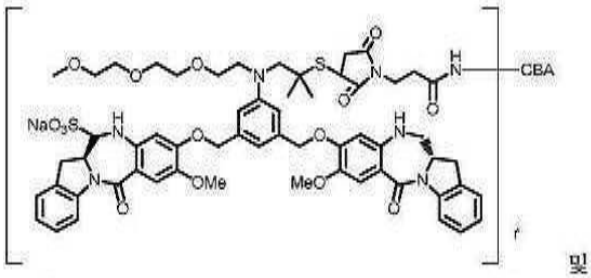
,



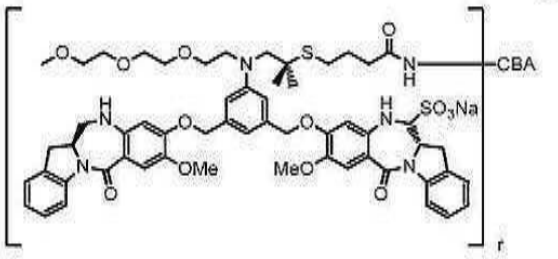
,



,



및



[0109]

[0110] 여기서 CBA는 세포 결합제, 예컨대, 항체이고, r은 1 내지 20, 바람직하게는 1 내지 10 또는 1 내지 5의 정수이다.

[0111] 본 명세서에서 이용되는 바와 같이, 기(예컨대, R^c, L, X' 등)가 연결기 또는 반응성 기에 결합되는 연결기인(또는 연결기가 아닌) 것을 지칭할 경우, 해당 기는 연결기 또는 반응성 기에 결합되는 연결기를 포함하는(또는 포함하지 않는) 것을 의미한다.

발명의 효과

[0112] 본 발명은, 항체 등과 같은 세포 결합제(cell binding agent: CBA)와의 컨쥬게이션 반응에서의 예기치 않은 개선을 초래하는, 이민-함유 약물을 처리하기 위한 이민-반응성 시약의 용도를 기술하고 있다. 상기 시약은 약물의 세포 사멸 특성이 감소되지 않고 CBA(항체)의 무결성(integrity)이 완전히 유지되도록 되어 있다.

도면의 간단한 설명

[0113] 도 1은, 1.4 DAR(A) 및 3.1 DAR(B)를 각각 함유하는, 중아황산염 없이 그리고 이것을 이용해서 제조된 탈글라이코실화 huMy9-6-**2** 컨쥬게이트의 질량 스펙트럼을 도시한 도면. DAR: 약물 항체비(drug antibody ratio);

도 2는 중아황산나트륨 없이 그리고 이것과 함께 제조된 HuMy9-6-약물 **2** 컨쥬게이트의 CD33-항원 발현 HL60 세포에 대한 유사한 시험관내 세포독성을 도시한 도면;

도 3은 중아황산나트륨 없이 그리고 이것과 함께 제조된 항-CD22 Ab-약물 **2** 컨쥬게이트의 CD22-항원 발현 BJAB 세포에 대한 유사한 시험관내 세포독성을 도시한 도면;

도 4는 약물 **2** 및 중아황산나트륨-처리된 약물 2의 역상 HPLC 분석을 도시한 도면;

도 5는 항체 당 7몰 당량의 **1**을 이용해서 중아황산나트륨과 함께 그리고 이것 없이 제조된 탈글라이코실화 huMy9-6-SPDB-약물 **1**의 MS 분석을 도시한 도면. A) 평균 1.4 약물 **1**/Ab 및 3개까지 연결된 약물 **1** 분자를 지니는 항체 종을 이용해서 중아황산나트륨 없이 제조된 컨쥬게이트. B) 평균 2.5 **1**/Ab 및 7개까지 연결된 약물 **1** 분자를 지니는 항체 종을 이용해서 중아황산나트륨과 함께 제조된 컨쥬게이트;

도 6은 약물 **1**의 중아황산나트륨 컨쥬게이션 반응의 첨가가 항체의 단편화를 초래하지 않은 것을 도시한 도면(비환원(non-reducing) SDS-PAGE; 겔 칩 분석);

도 7 내지 도 11은 세포 결합-약물 컨쥬게이트를 제조하기 위한 본 발명의 예시적인 방법을 도시한 도면;

도 12는 항체 라이신에 직접 NHS 에스터 함유 화합물 **1**을 컨쥬케이션함으로써(1-단계 시약 방법) 또는 다이티오피리딘 변형된 항체에 화합물 **1d**를 컨쥬게이션함으로써(2 단계 방법) 제조된 탈글라이코실화 My9-6-SPDB-**1**의 질량 분광(MS) 분석을 도시한 도면;

도 13은 상이한 pH 조건 하에서 2-단계 방법을 이용해서 제조한 My9-6-설포-SPDB-**1**에 대한 MS 데이터를 도시한 도면. 증가된 반응 시간은 1 μM 비컨쥬게이트 huMy9-6으로 전처리된 HL60-QC 세포 상에서 측정된 증가된 CD33-항원-독립적 시험관내 세포독성과 상관 관계가 있는 것으로 보인다. 모든 컨쥬게이트에 대한 항원-의존적 사멸은 유사하게 높았다(~4 pM IC_{50}). 짧은 반응 시간(1 내지 3시간)이 My9-6-설포-SPDB-1에 대한 항체 단편화 및 시험관내 비특이적 세포 사멸을 최소화하기 위하여 선호된다.

도 14는 상이한 화합물 **1d**/링커 비로 2-단계 방법을 이용해서 제조된 chKTI-설포-SPDB-**1**에 대한 MS 데이터를 도시한 도면;

도 15는 공유결합 이민 반응물의 사용으로 Ab-약물 컨쥬게이트 사양(단량체 % 및 약물 부하)을 개선시키는 것을 도시한 도면;

도 16은 대표적인 항체-약물 컨쥬게이트의 2-단계 합성을 위한 반응식을 도시한 도면;

도 17은 각종 세포주에 대한 huMy9-6-SPDB-**1f** 컨쥬게이트의 시험관내 세포독성 및 특이성을 도시한 도면. 단, 중아황산나트륨은 컨쥬게이트를 제조하기 위하여 컨쥬게이션 반응에 첨가되었다.

도 18은 이량체의 컨쥬게이션이 항체의 결합 친화도를 저감시키지 않은 것을 나타낸다. 단, 중아황산나트륨은 컨쥬게이트를 제조하기 위하여 컨쥬게이션 반응에 첨가되었다.

도 19는 huMy9-6 컨쥬게이트의 생체내 항종양 활성을 도시한 도면. 단, 중아황산나트륨은 컨쥬게이트를 제조하기 위하여 컨쥬게이션 반응에 첨가되었다.

도 20은 항원 양성 세포에 대한 huMy9-6-SPDB-**1f** 컨쥬게이트의 시험관내 세포독성을 도시한 도면. 단, 중아황산나트륨은 컨쥬게이트를 제조하기 위하여 컨쥬게이션 반응에 첨가되었다.

도 21은 항원 결합 부위의 차단과 함께 그리고 차단 없이 HL60/QC (Ag^+) 세포에 대한 huMy9-6-SPDB-**1f**(A), huMy9-6-설포SPDB-**1f**(B) 및 huMy9-6-BMPS-**1f**(C)의 시험관내 세포독성을 도시한 도면. 단, 3가지 실험 모두에 있어서(34A, 34B 및 34C), 중아황산나트륨은 컨쥬게이트를 제조하기 위하여 컨쥬게이션 반응에 첨가되었다.

도 22는 COLO205 (Ag^+) 세포에 대한 chB38.1-SPDB-**1f**(A) 및 chB38.1-설포SPDB-**1f**(B)의 시험관내 세포독성을 도시한 도면. 단, 두 실험에 있어서, 중아황산나트륨은 컨쥬게이트를 제조하기 위하여 컨쥬게이션 반응에 첨가되

었다.

도 23은 HL60/QC 보유 마우스에서의 huMy9-6-SPDB-**1f**의 생체내 효능을 도시한 도면. 단, 중아황산나트륨은 컨쥬게이션 반응에 첨가되었다.

도 24는 항원 결합 부위의 차단과 함께 그리고 차단없이 OCI-AML3 (Ag^+) 세포에 대해서 (A) huMy9-6-SPDB-**1f**, (B) huMy9-6-설포SPDB-**1f** 및 (C) huMy9-6-BMPS-**1f**를 비교해서 항증식 활성을 도시한 도면. 단, 3가지 실험 모두에 있어서, 중아황산나트륨은 컨쥬게이트를 제조하기 위하여 컨쥬게이션 반응에 첨가되었다.

도 25는 MOLM-13 종양 보유 마우스에서의 huMy9-6-BMPS-**1f**의 생체내 효능을 도시한 도면. 단, 중아황산나트륨은 컨쥬게이트를 제조하기 위하여 컨쥬게이션 반응에 첨가되었다.

도 26은 설폰화 폴레이트/세포독성 화합물 컨쥬게이트에 대한 대표적인 합성 반응식을 도시한 도면. 단, 중아황산나트륨은 컨쥬게이트를 제조하기 위하여 컨쥬게이션 반응에 첨가되었다.

도 27은 MOLM-13 종양 보유 마우스에서의 huMy9-6-**약물 2**의 생체내 효능을 도시한 도면. 단, 중아황산나트륨은 컨쥬게이트를 제조하기 위하여 컨쥬게이션 반응에 첨가되었다.

도 28은 고도 반응성 4-나이트로Py-설포-SPDB 링커를 이용한 huMy9-6-설포-SPDB-**1d**의 제조를 도시한 도면.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0114] 이제 본 발명의 소정의 실시형태에 대해서 상세히 설명할 것이며, 그 예는 첨부 구조 및 화학식들에 예시되어 있다. 본 발명은 열거된 실시형태와 관련하여 설명될 것이지만, 본 발명을 이들 실시형태로 제한하고자 의도된 것이 아님을 이해해야 할 것이다. 이에 대해서, 본 발명은 모든 대안물, 변형 및 등가물을 커버하도록 의도되고, 이들은 특허청구범위에 정의된 바와 같이 본 발명의 범위 내에 포함될 수 있다. 당업자라면 본 발명의 실행에 이용될 수 있었던 본 명세서에 기재된 것과 유사하거나 등가의 많은 방법 및 재료를 인식할 것이다.

[0115] 본 발명의 상이한 양상들(예컨대, 화합물, 화합물-링커 분자, 컨쥬게이트, 조성물, 제조방법 및 이용 방법) 및 명세서의 다른 부분(단지 실시예에 기재된 실시형태를 포함함) 하에 기재된 것들을 포함하여 본 명세서에 기재된 실시형태의 어느 것이라도, 명백히 부인되거나 부적절하지 않는 한, 본 발명의 하나 이상의 다른 실시형태와 조합될 수 있음을 이해해야 한다. 실시형태들의 조합은 다수의 종속 청구항을 통해서 청구된 특정 조합으로 제한되는 것은 아니다.

[0116] **정의**

[0117] 본 명세서에서 이용되는 바와 같은 "**직쇄** 혹은 **분지쇄 알킬**"이란 1 내지 20개의 탄소 원자의 포화 직쇄 혹은 분지쇄 1가 탄화수소 라디칼을 지칭한다. 알킬의 예는, 메틸, 에틸, 1-프로필, 2-프로필, 1-뷰틸, 2-메틸-1-프로필, $-CH_2CH(CH_3)_2$), 2-뷰틸, 2-메틸-2-프로필, 1-펜틸, 2-펜틸 3-펜틸, 2-메틸-2-뷰틸, 3-메틸-2-뷰틸, 3-메틸-1-뷰틸, 2-메틸-1-뷰틸, 1-헥실), 2-헥실, 3-헥실, 2-메틸-2-펜틸, 3-메틸-2-펜틸, 4-메틸-2-펜틸, 3-메틸-3-펜틸, 2-메틸-3-펜틸, 2,3-다이메틸-2-뷰틸, 3,3-다이메틸-2-뷰틸, 1-헵틸, 1-옥틸 등을 포함하지만, 이들로 제한되는 것은 아니다. 바람직하게는, 알킬은 1 내지 10개의 탄소 원자를 지닌다. 더 바람직하게는, 알킬은 1 내지 4개의 탄소 원자를 지닌다.

[0118] "**직쇄** 혹은 **분지쇄 알케닐**"이란 적어도 하나의 부위의 불포화, 즉, 탄소-탄소 이중 결합을 지니는 2 내지 20개의 탄소 원자의 직쇄 혹은 분지쇄 1가 탄화수소 라디칼을 지칭하며, 이때 알케닐 라디칼은 "시스" 및 "트랜스" 배향, 또는 대안적으로 "E" 및 "Z" 배향을 지니는 라디칼을 포함한다. 그 예는 에틸레닐 또는 비닐($-CH=CH_2$), 알릴($-CH_2CH=CH_2$) 등을 포함하지만 이들로 제한되는 것은 아니다. 바람직하게는, 알케닐은 2 내지 10개의 탄소 원자를 지닌다. 더 바람직하게는, 알킬은 2 내지 4개의 탄소 원자를 지닌다.

[0119] "**직쇄** 혹은 **분지쇄 알키닐**"이란 적어도 하나의 부위의 불포화, 즉, 탄소-탄소 삼중 결합을 지니는 2 내지 20개의 탄소 원자의 직쇄 혹은 분지쇄 1가 탄화수소 라디칼을 지칭한다. 그 예는 에티닐, 프로피닐, 1-뷰티릴, 2-뷰티릴, 1-펜티닐, 2-펜티닐, 3-펜티닐, 헥시닐 등을 포함하지만 이들로 제한되는 것은 아니다. 바람직하게는, 알키닐은 2 내지 10개의 탄소 원자를 지닌다. 더 바람직하게는, 알키닐은 2 내지 4개의 탄소 원자를 지닌다.

[0120] "**탄소환**", "**카보사이클릴**" 및 "**카보사이클릭 고리**"란 용어는 단환식 고리로서 3 내지 12개의 탄소 원자를, 또는 이환식 고리로서 7 내지 12개의 탄소 원자를 지니는 1가의 비방향족, 포화 혹은 부분 불포화 고리를 지칭한다.

7 내지 12개의 원자를 지니는 이환식 탄소환은, 예를 들어, 바이사이클로 [4,5], [5,5], [5,6] 혹은 [6,6] 시스템으로서 배열될 수 있고, 9 또는 10개의 고리 원자를 지니는 이환식 탄소환은 바이사이클로 [5,6] 또는 [6,6] 시스템으로서, 또는 바이사이클로[2.2.1]헵탄, 바이사이클로[2.2.2]옥탄 및 바이사이클로[3.2.2]노난 등과 같은 브리지 시스템으로서 배열될 수 있다. 단환식 탄소환의 예는 사이클로프로필, 사이클로뷰틸, 사이클로펜틸, 1-사이클로펜트-1-에닐, 1-사이클로펜트-2-에닐, 1-사이클로펜트-3-에닐, 사이클로헥실, 1-사이클로헥스-1-에닐, 1-사이클로헥스-2-에닐, 1-사이클로헥스-3-에닐, 사이클로헥사다이에닐, 사이클로헵틸, 사이클로옥틸, 사이클로노닐, 사이클로데실, 사이클로운데실, 사이클로도데실 등을 포함하지만 이들로 제한되는 것은 아니다.

[0121] "**사이클릭 알킬**"(혹은 환식 알킬) 및 "**사이클로알킬**"이란 용어는 호환가능하게 이용될 수 있다. 이들은 1가 포화 탄소환 고리 라디칼을 지칭한다. 바람직하게는, 사이클릭 알킬은 3 내지 7원 탄환식 고리 라디칼이다. 더 바람직하게는, 사이클릭 알킬은 사이클로헥실이다.

[0122] "**사이클릭 알케닐**"(혹은 환식 알케닐)이란 용어는 고리 구조에 적어도 하나의 이중 결합을 지니는 카보사이클릭 고리 라디칼을 지칭한다.

[0123] "**사이클릭 알키닐**"(혹은 환식 알키닐)이란 용어는 고리 구조에 적어도 하나의 삼중 결합을 지니는 카보사이클릭 고리 라디칼을 지칭한다.

[0124] "**아릴**"은 페어런트(parent) 방향족 고리 시스템의 단일의 탄소 원자로부터 1개의 수소 원자를 제거함으로써 유도된 6 내지 18개의 탄소 원자의 1가 방향족 탄화수소 라디칼을 의미한다. 몇몇 아릴기는 "Ar"로서 예시적인 구조에 표시된다. 아릴은 포화, 부분 불포화 고리 혹은 방향족 탄소환 혹은 헤테로사이클릭 고리에 융합된 방향족 고리를 포함하는 이환식 라디칼을 포함한다. 전형적인 아릴기는 벤젠(페닐), 치환된 벤젠, 나프탈렌, 안트라센, 인데닐, 인다닐, 1,2-다이하이드로나프탈렌, 1,2,3,4-테트라하이드로나프틸 등으로부터 유래된 라디칼을 포함하지만 이들로 제한되는 것은 아니다. 바람직하게는, 아릴은 페닐기이다.

[0125] "**헤테로사이클**"(즉, 복소환), "**헤테로사이클릴**" 및 "**헤테로사이클릭 고리**"란 용어는 본 명세서에서 호환가능하게 이용되며, 적어도 하나의 고리 원자가 질소, 산소, 인 및 황으로부터 선택된 헤테로원자이고, 나머지 고리 원자가 C이며, 하나 이상의 고리 원자가 이하에 기재된 하나 이상의 치환기로 독립적으로 선택적으로 치환된 3 내지 18개의 고리 원자로 이루어진 포화 혹은 부분 불포화(즉, 고리 내에 하나 이상의 이중 및/또는 삼중 결합을 지님) 카보사이클릭 라디칼를 지칭한다. 헤테로사이클은 3 내지 7개의 고리원(ring member)(2 내지 6개의 탄소 원자와 N, O, P 및 S로부터 선택된 1 내지 4개의 헤테로원자)을 지니는 단환 또는 7 내지 10개의 고리원(4 내지 9개의 탄소 원자와 N, O, P 및 S로부터 선택된 1 내지 6개의 헤테로원자)을 지니는 이환일 수 있으며, 예를 들어: 바이사이클로 [4,5], [5,5], [5,6], 혹은 [6,6] 시스템일 수 있다. 헤테로사이클은 문헌들 [Paquette, Leo A.; "Principles of Modern Heterocyclic Chemistry" (W. A. Benjamin, New York, 1968), 특히 Chapters 1, 3, 4, 6, 7 및 9; "The Chemistry of Heterocyclic Compounds, A series of Monographs" (John Wiley & Sons, New York, 1950년에서 현재까지), 특히 Volumes 13, 14, 16, 19 및 28; 및 J. Am. Chem. Soc. (1960) 82:5566]에 기재되어 있다. "**헤테로사이클릴**"은 또한 헤테로사이클 라디칼이 포화, 부분 불포화 고리, 또는 방향족 카보사이클릭 혹은 헤테로사이클릭 고리와 융합되어 있는 라디칼을 포함한다. 헤테로사이클릭 고리의 예는 피롤리디닐, 테트라하이드로퓨라닐, 다이하이드로퓨라닐, 테트라하이드로티에닐, 테트라하이드로피라닐, 다이하이드로피라닐, 테트라하이드로티오피라닐, 피페리디노, 몰폴리노, 티오몰폴리노, 티옥사닐, 피페라지닐, 호모피페라지닐, 아제티디닐, 옥세타닐, 티에타닐, 호모피페리디닐, 옥세파닐, 티에파닐, 옥사제피닐, 다이아제피닐, 티아제피닐, 2-피롤리닐, 3-피롤리닐, 인돌리닐, 2H-피라닐, 4H-피라닐, 다이옥사닐, 1,3-다이옥솔라닐, 피라졸리닐, 다이티아닐, 다이티올라닐, 다이하이드로피라닐, 다이하이드로티에닐, 다이하이드로퓨라닐, 피라졸리디닐이미다졸리닐, 이미다졸리디닐, 3-아자바이사이클로[3.1.0]헥사닐, 3-아자바이사이클로[4.1.0]헵타닐 및 아자바이사이클로[2.2.2]헥사닐을 포함하지만 이들로 제한되는 것은 아니다. 스피로 모이어티도 또한 이 정의의 범위 내에 포함된다. 고리 원자가 옥소(=O) 모이어티로 치환된 헤테로사이클릭 기의 예는 피리미디노닐 및 1,1-다이옥소-티오몰폴리닐이다.

[0126] "**헤테로아릴**"이란 용어는 5- 혹은 6-원 고리(membered ring)의 1가 방향족 라디칼을 지칭하며, 질소, 산소 및 황으로부터 독립적으로 선택된 1개 이상의 헤테로원자를 함유하는 5 내지 18개의 원자의 융합된 고리 시스템(이 중 적어도 하나가 방향족임)을 포함한다. 헤테로아릴기의 예는 피리디닐(예를 들어, 2-하이드록시피리디닐을 포함함), 이미다졸릴, 이미다조피리디닐, 피리미디닐(예를 들어, 4-하이드록시피리미디닐을 포함함), 피라졸릴, 트라이아졸릴, 피라지닐, 테트라졸릴, 퓨릴, 티에닐, 아이소옥사졸릴, 티아졸릴, 옥사졸릴, 아이소티아졸릴, 피롤릴, 퀴놀리닐, 아이소퀴놀리닐, 인돌릴, 벤즈이미다졸릴, 벤조퓨라닐, 신놀리닐, 인다졸릴, 인돌리지닐, 프탈

라지닐, 피리다지닐, 트라이아지닐, 아이소인돌릴, 프테르디닐, 퓨리닐, 옥사다이아졸릴, 트라이아졸릴, 티아다이아졸릴, 퓨라자닐, 벤조퓨라자닐, 벤조티오페닐, 벤조티아졸릴, 벤조옥사졸릴, 퀴나졸리닐, 퀴녹살리닐, 나프티리디닐 및 퓨로피리디닐이다.

[0127] 헤테로사이클 혹은 헤테로아릴기는 가능한 경우 부착된 탄소(탄소-연결) 또는 질소(질소-연결)일 수 있다. 예로서 그리고 제한 없이, 탄소 결합된 헤테로사이클 혹은 헤테로아릴은 피리딘의 2, 3, 4, 5 혹은 6번 위치, 피리다진의 3, 4, 5 혹은 6번 위치, 피리미딘의 2, 4, 5 혹은 6번 위치, 피라진의 2, 3, 5 혹은 6번 위치, 퓨란, 테트라하이드로퓨란, 티오퓨란, 티오펜, 피롤 혹은 테트라하이드로피롤의 2, 3, 4 혹은 5번 위치, 옥사졸, 이미다졸 혹은 티아졸의 2, 4 혹은 5번 위치, 아이소옥사졸, 피라졸, 혹은 아이소티아졸의 3, 4 혹은 5번 위치, 아지리딘의 2 혹은 3번 위치, 아제티딘의 2, 3 혹은 4번 위치, 퀴놀린의 2, 3, 4, 5, 6, 7 혹은 8번 위치 또는 아이소퀴놀린의 1, 3, 4, 5, 6, 7 혹은 8번 위치에 결합된다.

[0128] 예로서 또한 제한 없이, 질소 결합된 헤테로사이클 혹은 헤테로아릴은 아지리딘, 아제티딘, 피롤, 피롤리딘, 2-피롤린, 3-피롤린, 이미다졸, 이미다졸리딘, 2-이미다졸린, 3-이미다졸린, 피라졸, 피라졸린, 2-피라졸린, 3-피라졸린, 피페리딘, 피페라진, 인돌, 인돌린, 1H-인다졸의 1번 위치, 아이소인돌 혹은 아이소인돌린의 2번 위치, 몰폴린의 4번 위치 및 카바졸 또는 O-카볼린의 9번 위치에 결합된다.

[0129] 헤테로아릴 혹은 헤테로사이클릴에 존재하는 헤테로원자는 NO, SO 및 SO_2 등의 산화된 형태를 포함한다.

[0130] "**할로**" 또는 "**할로겐**"이란 용어는 F, CI, Br 또는 I를 지칭한다.

[0131] 상기 기재된 알킬, 알케닐, 알키닐, 사이클릭 알킬, 사이클릭 알케닐, 사이클릭 알키닐, 카보사이클릴, 아릴, 헤테로사이클릴 및 헤테로아릴은 하나 이상(예컨대, 2, 3, 4, 5, 6 혹은 그 이상)의 치환기로 선택적으로 치환될 수 있다.

[0132] 치환기가 "**치환된**"으로서 기술된다면, 비수소(non-hydrogen) 치환기는 해당 치환기의 탄소, 산소, 황 혹은 질소 상에 수소 치환기 대신에 있다. 이와 같이 해서, 예를 들어, 치환된 알킬 치환기는 적어도 하나의 비수소 치환기가 알킬 치환기 상에 수소 치환기 대신에 있는 알킬 치환기이다. 예시하기 위하여, 모노플루오로알킬은 플루오로 치환기로 치환된 알킬이고, 다이플루오로알킬은 2개의 플루오로 치환기로 치환된 알킬이다. 치환기 상에 하나보다 많은 치환이 있다면, 각 비수소 치환기는 (달리 언급되어 있지 않는 한) 동일 혹은 상이할 수 있다는 것을 인지해야 한다.

[0133] 치환기가 "**선택적으로 치환된**"으로서 기재된다면, 치환기는 (1) 치환되지 않을 수 있거나 혹은 (2) 치환되어 있을 수 있다. 치환기의 탄소가 치환기들의 리스트의 하나 이상으로 선택적으로 치환된 것으로 기재된다면, 탄소 상의 수소들 중 하나 이상(어느 것이라도 있는 정도로)은 각각 독립적으로 선택된 선택적 치환기로 개별적으로 및/또는 함께 대체될 수 있다. 치환기의 질소가 치환기들의 리스트의 하나 이상으로 선택적으로 치환된 것으로 기재된다면, 질소 상의 수소들 중 하나 이상(어느 것이라도 있는 정도로)은 각각 독립적으로 선택된 선택적 치환기로 치환될 수 있다. 하나의 예시적인 치환기는 -NR'R''로서 표시될 수 있고, 이때 R' 및 R''는 이들이 부착되는 질소 원자와 함께, 헤테로사이클릭 고리를 형성할 수 있다. R' 및 R''로부터 이들이 부착되는 질소 원자와 함께 형성된 헤테로사이클릭 고리는 부분적으로 혹은 전체적으로 포화되어 있을 수 있다. 일 실시형태에 있어서, 헤테로사이클릭 고리는 3 내지 7개의 원자로 이루어진다. 다른 실시형태에 있어서, 상기 헤테로사이클릭 고리는 피롤릴, 이미다졸릴, 피라졸릴, 트라이아졸릴, 테트라졸릴, 아이소옥사졸릴, 피리딜 및 티아졸릴로 이루어진 군으로부터 선택된다.

[0134] 본 명세서는 "**치환기**", "**라디칼**" 및 "**기**"란 용어를 호환적으로 이용한다.

[0135] 치환기들의 군이 치환기들의 리스트의 하나 이상으로 선택적으로 치환된 것으로 기재된다면, 해당 군은 (1) 비치환가능한 치환기, (2) 선택적 치환기에 의해 치환되지 않은 치환가능한 치환기 및/또는 (3) 하나 이상의 선택적 치환기에 의해 치환된 치환가능한 치환기를 포함할 수 있다.

[0136] 치환기가 특정 개수까지의 비수소 치환기로 선택적으로 치환된 것으로 기재된다면, 그 치환기는 (1) 치환되지 않거나; 또는 (2) 그 특정 개수까지의 비수소 치환기에 의해 또는 치환기 상의 최대수까지의 치환가능한 위치에 의해(어느 쪽이든 적은 쪽으로) 치환될 수 있다. 이와 같이 해서, 예를 들어, 치환기가 3개까지의 비수소 치환기로 선택적으로 치환된 헤테로아릴로서 기재된다면, 3개 미만의 치환가능한 위치를 지니는 어떠한 헤테로아릴이라도 헤테로아릴이 치환가능한 위치를 지니는 많큼 많은 수까지의 비수소 치환기만으로 선택적으로 치환될 것이다. 이러한 치환기는, 비제한 예에 있어서, 1 내지 10개의 탄소 원자를 지니는 직쇄, 분지쇄 혹은 환식

알킬, 알케닐 혹은 알키닐, 아릴, 헤테로아릴, 헤테로사이클릴, 할로겐, 구아니디늄[-NH(C=NH)NH_2], $-OR^{100}$, $NR^{101}R^{102}$, $-NO_2$, $-NR^{101}COR^{102}$, $-SR^{100}$, $-SOR^{101}$로 표시되는 설폭사이드, $-SO_2R^{101}$로 표시되는 설폰, 설포네이트 $-SO_3M$, 설페이트 $-OSO_3M$, $-SO_2NR^{101}R^{102}$로 표시되는 설폰아마이드, 사이아노, 아자이도, $-COR^{101}$, $-OCOR^{101}$, $-OCONR^{101}R^{102}$ 및 폴리에틸렌 글라이콜 단위 $(-OCH_2CH_2)_nR^{101}$(이때, M은 H 또는 약제학적으로 허용가능한 양이온(Na^+ 또는 K^+ 등)임)로부터 선택될 수 있고; R^{101}, R^{102} 및 R^{103}은 각각 독립적으로 H, 1 내지 10개의 탄소 원자를 지니는 직쇄, 분지쇄 혹은 환식 알킬, 알케닐 혹은 알키닐, 폴리에틸렌 글라이콜 단위 $(-OCH_2CH_2)_n-R^{104}$(이때, n은 1 내지 24의 정수임), 6 내지 10개의 탄소 원자를 지니는 아릴, 3 내지 10개의 탄소 원자를 지니는 헤테로사이클릭 고리 및 5 내지 10개의 탄소 원자를 지니는 헤테로아릴로부터 선택되며; R^{104}는 H 또는 1 내지 4개의 탄소 원자를 지니는 직쇄 혹은 분지쇄 알킬이되, 이때 R^{100}, R^{101}, R^{102}, R^{103} 및 R^{104}로 표시되는 기 중에서 상기 알킬, 알케닐, 알키닐, 아릴, 헤테로아릴 및 헤테로사이클릴은 할로겐, -OH, -CN, $-NO_2$ 및 비치환 1 내지 4개의 탄소 원자를 지니는 직쇄 혹은 분지쇄 알킬로 이루어진 군으로부터 독립적으로 선택된 1개 이상(예컨대, 2, 3, 4, 5, 6 또는 그 이상)으로 선택적으로 치환된다. 바람직하게는, 위에 기재된 선택적으로 치환된 알킬, 알케닐, 알키닐, 사이클릭 알킬, 사이클릭 알케닐, 사이클릭 알키닐, 카보사이클릴, 아릴, 헤테로사이클릴 및 헤테로아릴에 대한 치환기는 할로겐, -CN, $-NR^{102}R^{103}$, $-CF_3$, $-OR^{101}$, 아릴, 헤테로아릴, 헤테로사이클릴, $-SR^{101}$, $-SOR^{101}$, $-SO_2R^{101}$ 및 $-SO_3M$을 포함한다.

[0137] "**화합물**" 또는 "**세포폭성 화합물**", "**세포독성 이량체**" 및 "**세포독성 이량체 화합물**"이란 용어는 호한가능하게 이용된다. 이들은 구조 혹은 화합물 혹은 그의 임의의 생물학적으로 활성인 유도체가 본 발명에 개시된 것인 화합물, 또는 참조로 병합되어 있는 구조 혹은 화학식 혹은 그의 임의의 유도체를 포함하도록 의도된다. 이 용어는 또한 본 발명에 개시된 모든 화학식의 화합물의 입체이성질체, 기하 이성질체, 호변이성질체, 용매화물, 대사산물, 염(예컨대, 약제학적으로 허용가능한 염) 및 프로드럭(prodrug) 및 프로드럭염도 포함한다. 이 용어는 또한 전술한 어느 하나의 임의의 용매화물, 수화물 및 다형체를 포함한다. 본 출원에 기재된 본 발명의 소정의 양상에 있어서 "입체이성질체", "기하 이성질체", "호변이성질체", "용매화물", "대사산물", 염", 프로드럭", "프로드럭염", "컨쥬게이트", "컨쥬게이트 염"의 구체적인 인용은 "화합물"이란 용어가 이들 다른 형태의 인용 없이도 이용되는 본 발명의 다른 양상에서 이들 형태의 의도된 생략으로서 해석되어서는 안 된다. 일 실시형태에 있어서, 세포독성 화합물은 연결기 또는 반응성 기가 결합된 연결기를 포함한다. 대안적으로, 세포독성 화합물은 연결기 혹은 반응성 기가 결합된 연결기를 포함하지 않는다.

[0138] 본 명세서에서 이용되는 바와 같은 "**컨쥬게이트**"란 용어는 세포 결합제에 연결된 본 명세서에 기재된 화합물 혹은 그의 유도체를 지칭한다.

[0139] 본 명세서에서 이용되는 바와 같은 "**세포 결합제에 연결가능한**"이란 용어는 이들 화합물 혹은 그의 유도체를 세포 결합제에 결합하는데 적합한 적어도 하나의 연결기 혹은 그의 전구체(precursor)를 포함하는 본 명세서에 기재된 화합물 혹은 그의 유도체를 지칭한다.

[0140] 주어진 기의 "**전구체**"란 용어는 탈보호, 화학적 변형 혹은 커플링 반응에 의해 그 기에 생길 수 있는 임의의 기를 지칭한다.

[0141] "**세포결합제에 연결된**"이란 용어는 본 명세서에 기재된 화합물들 중 적어도 하나 또는 적절한 연결기(본 명세서에 기재된 화합물 및 약물-링커 화합물) 혹은 그의 전구체를 통해서 세포 결합제에 결합된 그의 유도체를 포함하는 컨쥬게이트 분자를 지칭한다.

[0142] "**카이럴**"이란 용어는 거울상 상대방의 비중첩가능성의 특성을 지니는 분자를 지칭하는 한편, "아카이럴"(achiral)이란 용어는 그들의 거울상 상대방 상에 중첩가능한 분자를 지칭한다.

[0143] "**입체이성질체**"란 용어는 동일한 화학적 구성 및 연결을 지니지만 단일 결합에 대한 회전에 의해서 상호 전환될 수 없는 공간 내의 그들의 원자의 상이한 배향을 지니는 화합물을 지칭한다.

[0144] "**부분입체이성질체**"란 둘 이상의 키랄 중심을 지니고 분자가 서로 거울상이 아닌 입체이성질체를 지칭한다. 부분입체이성질체는 상이한 물성, 예컨대, 융점, 비점, 스펙트럼 특성 및 반응성을 지닌다. 부분입체이성질체들

의 혼합물은 결정화, 전기영동 및 크로마토그래피 등과 같은 고해상도 분석 절차 하에 분리될 수 있다.

[0145] "**거울상이성질체**"란 서로 비중첩가능한 거울상인 화합물의 두 입체이성질체를 지칭한다.

[0146] 일반적으로 본 명세서에서 이용되는 입체화학 정의 및 관례는 문헌들[S. P. Parker, Ed., McGraw-Hill *Dictionary of Chemical Terms* (1984) McGraw-Hill Book Company, New York; 및 Eliel, E. and Wilen, S., "Stereochemistry of Organic Compounds", John Wiley & Sons, Inc., New York, 1994]에 따른다. 본 발명의 화합물은 비대칭 혹은 카이럴 중심을 포함할 수 있으므로, 상이한 입체이성질체 형태로 존재할 수 있다. 본 발명의 화합물들의 모든 입체이성질체 형태(부분입체이성질체, 거울상이성질체 및 아트로프이성질체(atropisomer)뿐만 아니라 이들의 혼합물, 예컨대, 라세미 혼합물 등을 포함하지만 이들로 제한되는 것은 아님)는 본 발명의 일부를 형성하는 것으로 의도된다. 많은 유기 화합물은 광학 활성 형태를 형성하며, 즉, 이들은 평면-편광 광의 평면을 회전시키는 능력을 지닌다. 광학적으로 활성인 화합물을 기술할 때, 접두사 D 및 L, 또는 R 및 S는 그의 카이럴 중심(들)에 대한 분자의 절대 입체배치를 나타내는데 이용된다. 접두사 d 및 l 또는 (+) 및 (-)는 화합물에 의해 평면-편광 광의 회전의 부호를 지칭하는데 이용되며, (-) 또는 l은 화합물이 좌회전성인 것을 의미한다. (+) 또는 d의 접두사가 붙은 화합물은 우회전성이다. 주어진 화학 구조에 대해서, 이들 입체이성질체는 서로의 거울상인 것을 제외하고 동일하다. 구체적인 입체이성질체는 또한 거울상이성질체로서 지칭될 수 있고, 이러한 이성질체들의 혼합물은 종종 거울상 이성질체 혼합물이라 불린다. 거울상이성질체의 50:50 혼합물은 라세미 혼합물 혹은 라세미체로서 지칭되고, 이는 화학적 반응 혹은 프로세스에서 입체 선택 혹은 입체선택성을 지니지 않는 경우 일어날 수 있다. "라세미 혼합물" 및 "라세미체"란 용어는, 광학 활성이 없는, 두 거울상 이성질체 종의 등몰량의 혼합물을 지칭한다.

[0147] "**호변이성질체**" 또는 "**호변이성질체 형태**"란 용어는 낮은 에너지 장벽을 통해서 상호전환가능한 다른 에너지의 구조적 이성질체를 지칭한다. 예를 들어, 프로톤 호변이성질체(양성자성 호변이성질체)는 케토-에놀 및 이민-엔아민 이성질체화 등과 같은 프로톤의 이동을 통한 상호전환을 포함한다. 가전자 호변이성질체는 결합 전자들 중 일부의 재배열에 의한 상호전환을 포함한다.

[0148] 본 출원에서 이용되는 바와 같은 "**프로드럭**"이란 용어는 더욱 활성인 페어런트 형태로 효소적으로 혹은 가수분해적으로 활성화되거나 전환될 수 있는 본 발명의 화합물의 전구체 혹은 유도체 형태를 지칭한다. 이에 대해서는, 예컨대, 문헌들[Wilman, "Prodrugs in Cancer Chemotherapy" Biochemical Society Transactions, 14, pp. 375-382, 615th Meeting Belfast (1986) 및 Stella *et al.*, "Prodrugs: A Chemical Approach to Targeted Drug Delivery," Directed Drug Delivery, Borchardt *et al.*, (ed.), pp. 247-267, Humana Press (1985)]을 참조하면 된다. 본 발명의 프로드럭은 에스터-함유 프로드럭, 포스페이트-함유 프로드럭, 티오포스페이트-함유 프로드럭, 설페이트-함유 프로드럭, 펩타이드-함유 프로드럭, D-아미노산-변형된 프로드럭, 글라이코실화 프로드럭, β-락탐-함유 프로드럭, 선택적으로 치환된 페녹시아세트아마이드-함유 프로드럭, 선택적으로 치환된 페닐아세트아마이드-함유 프로드럭, 5-플루오로사이토신 및 더 활성인 세포독성 없는 약물로 전환될 수 있는 기타 5-플루오로유리딘 프로드럭을 포함하지만 이들로 제한되는 것은 아니다. 본 발명에서 이용하기 위한 프로드럭 형태로 유도체화될 수 있는 세포독성 약물의 예는, 위에서 기재된 바와 같은 본 발명의 화합물 및 화학요법제를 포함하지만 이들로 제한되는 것은 아니다.

[0149] "**프로드럭**"이란 용어는 또한 생물학적 조건(시험관내 혹은 생체내) 하에 가수분해, 산화 또는 다르게는 반응하여 본 발명의 화합물을 제공할 수 있는 화합물의 유도체를 포함하는 것을 의미한다. 프로드럭은 생물학적 조건 하에서 이러한 반응 시 단지 활성으로 될 수 있거나, 또는 이는 그의 미반응 형태에서 활성을 지닐 수 있다. 본 발명에서 상정되는 프로드럭의 예는, 생체가수분해가능한(biohydrolyzable) 아마이드, 생체가수분해가능한 에스터, 생체가수분해가능한 카바메이트, 생체가수분해가능한 카보네이트, 생체가수분해가능한 유레이드 및 생체가수분해가능한 포스페이트 유사체 등과 같은 생체가수분해가능한 모이어티를 포함하는 본 명세서에 개시된 화학식들 중 어느 하나의 화합물의 유사체 혹은 유도체를 포함하지만 이들로 제한되는 것은 아니다. 프로드럭의 기타 예는 -NO, $-NO_2$, -ONO 또는 $-ONO_2$ 모이어티를 포함하는 본 명세서에 개시된 화학식들 중 어느 하나의 화합물의 유도체를 포함한다. 프로드럭은 전형적으로 문헌[Burger's Medicinal Chemistry and Drug Discovery (1995) 172-178, 949-982 (Manfred E. Wolff ed., 5th ed); 또한 Goodman and Gilman's, The Pharmacological basis of Therapeutics, 8th ed., McGraw-Hill, Int. Ed. 1992, "Biotransformation of Drugs" 참조]에 기재된 것들과 같은 충분히 공지된 방법을 이용해서 제조될 수 있다.

[0150] 본 발명의 프로드럭의 하나의 바람직한 형태는 화합물/컨쥬게이트의 아민 결합과 이민 반응성 시약 사이에 형성된 부가물을 포함하는 본 발명의 화합물(임의의 링커기와 함께 혹은 없이) 및 컨쥬게이트를 포함한다.

[0151] "**이민 반응성 시약**"이란 용어는 이민기와 반응하는 것이 가능한 시약을 지칭한다. 이민 반응성 시약의 예는, 아황산염(H_2SO_3, H_2SO_2 또는 양이온과 함께 형성된 HSO_3^-, SO_3^{2-} 혹은 HSO_2^-의 염), 메타중아황산염($H_2S_2O_5$ 또는 양이온과 함께 형성된 $S_2O_5^{2-}$의 염), 모노, 다이, 트라이 및 테트라-티오포스페이트(PO_3SH_3, $PO_2S_2H_3$, POS_3H_3, PS_4H_3 또는 양이온과 함께 형성된 PO_3S^{3-}, $PO_2S_2^{3-}$, POS_3^{3-} 혹은 PS_4^{3-}의 염), 티오포스페이트 에스터($(R^iO)_2PS(OR^i)$, R^iSH, R^iSOH, R^iSO_2H, R^iSO_3H), 각종 아민류(하이드록실아민(예컨대, NH_2OH), 하이드라진(예컨대, NH_2NH_2), NH_2O-R^i, $R^{i'}NH-R^i$, NH_2-R^i), $NH_2-CO-NH_2$, $NH_2-C(=S)-NH_2$, 티오설페이트($H_2S_2O_3$ 또는 양이온과 함께 형성된 $S_2O_3^{2-}$의 염), 다이티오나이트($H_2S_2O_4$ 또는 양이온과 함께 형성된 $S_2O_4^{2-}$의 염), 포스포로다이티오에이트($P(=S)(OR^k)(SH)(OH)$ 또는 양이온과 함께 형성된 그의 염), 하이드록삼산($R^kC(=O)NHOH$ 또는 양이온과 함께 형성된 염), 하이드라자이드($R^kCONHNH_2$), 포름알데하이드 설폭실레이트($HOCH_2SO_2H$ 또는 $HOCH_2SO_2^-Na^+$ 등과 같은, 양이온과 함께 형성된 $HOCH_2SO_2^-$의 염), 당화 뉴클레오타이드(GDP-만노스 등), 플루다라빈 또는 이들의 혼합물을 포함하지만 이들로 제한되는 것은 아니고, 이때, R^i 및 $R^{i'}$는 각각 독립적으로 1 내지 10개의 탄소 원자를 지닌 직쇄 혹은 분지쇄 알킬이고 $-N(R^j)_2$, $-CO_2H$, $-SO_3H$ 및 $-PO_3H$로부터 선택된 적어도 하나의 치환기로 치환되며; R^i 및 $R^{i'}$는 여기에 기재된 알킬기에 대해서 치환기로 더욱 선택적으로 치환될 수 있고; R^j는 1 내지 6개의 탄소 원자를 지니는 직쇄 혹은 분지쇄 알킬이며; R^k는 1 내지 10개의 탄소 원자를 지니는 직쇄, 분지쇄 혹은 환식 알킬, 알케닐 혹은 알키닐, 아릴, 헤테로사이클릴 또는 헤테로아릴이다(바람직하게는, R^k는 1 내지 4개의 탄소 원자를 지니는 직쇄 혹은 분지쇄 알킬이고; 더 바람직하게는, R^k는 메틸, 에틸 또는 프로필이다). 바람직하게는, 상기 양이온은 1가 양이온, 예컨대, Na^+ 또는 K^+이다. 바람직하게는, 상기 이민 반응성 시약은 아황산염, 하이드록실아민, 유레아 및 하이드라진으로부터 선택된다. 더 바람직하게는, 상기 이민 반응성 시약은 $NaHSO_3$ 또는 $KHSO_3$이다.

[0152] 본 명세서에서 이용되는 바와 같이 그리고 달리 표시되어 있지 않는 한, "**생체가수분해가능한 아마이드**", "**생체가수분해가능한 에스터**", "**생체가수분해가능한 카바메이트**", "**생체가수분해가능한 카보네이트**", "**생체가수분해가능한 유레이드**" 및 "**생체가수분해가능한 포스페이트 유사체**"란 용어는, 1) 화합물의 생물학적 활성을 파괴하지 않고 그 화합물에 생체내 유리한 특성, 예컨대, 흡수, 작용 기간 혹은 작용의 개시 등을 부여하거나; 또는 2) 그 자체로 생물학적으로 비활성이지만 생체내에 생물학적으로 활성인 화합물로 전환되는, 아마이드, 에스터, 카바메이트, 카보네이트, 유레이드 혹은 포스페이트 유사체를 각각 의미한다. 생체가수분해가능한 아마이드의 예는, 저급 알킬 아마이드, α-아미노산 아마이드, 알콕시아실 아마이드 및 알킬아미노알킬카보닐 아마이드를 포함하지만 이들로 제한되는 것은 아니다. 생체가수분해가능한 에스터의 예는 저급 알킬 에스터, 알콕시아실옥시 에스터, 알킬 아실아미노 알킬 에스터 및 콜린 에스터를 포함하지만 이들로 제한되는 것은 아니다. 생체가수분해가능한 카바메이트의 예는 저급 알킬아민, 치환된 에틸렌다이아민, 아미노산, 하이드록시알킬아민, 헤테로사이클릭 및 헤테로방향족 아민 및 폴리에터 아민을 포함하지만 이들로 제한되는 것은 아니다. 특히 바람직한 프로드럭 및 프로드럭 염은 이러한 화합물이 포유동물에게 투여된 경우 본 발명의 화합물의 생물학적 이용가능성을 증가시키는 것들이다.

[0153] 본 명세서에서 이용되는 바와 같은 "**약제학적으로 허용가능한 염**"이란 어구는 본 발명의 화합물의 약제학적으로 허용가능한 유기 혹은 무기염을 지칭한다. 예시적인 염은, 설페이트, 시트레이트, 아세테이트, 옥살레이트, 클로라이드, 브로마이드, 아이오다이드, 나이트레이트, 바이설페이트, 포스페이트, 애시드 포스페이트, 아이소니코티네이트, 락테이트, 살리실레이트, 애시드 시트레이트, 타트레이트, 올레에이트, 탄네이트, 판토테네이트, 바이타트레이트, 아스코베이트, 숙시네이트, 말레에이트, 젠티시네이트, 퓨마레이트, 글루코네이트, 글루쿠로네이트, 사카레이트, 포르메이트, 벤조에이트, 글루타메이트, 메탄설포네이트 "메실레이트", 에탄설포네이트, 벤젠설포네이트, p-톨루엔설포네이트, 파모에이트(즉, 1,1'-메틸렌-비스-(2-하이드록시-3-나프토에이트)) 염, 알칼리 금속(예컨대, 나트륨 및 칼륨) 염, 알칼리 토금속(예컨대, 마그네슘) 염, 및 암모늄 염을 포함하지만 이들로 제한되는 것은 아니다. 약제학적으로 허용가능한 염은 아세테이트 이온, 숙시네이트 이온 혹은 기타 카운터 이온 등과 같은 다른 분자의 내포를 포함할 수 있다. 카운터 이온은 페어런트 화합물 상의 전하를 안정화시키

는 임의의 유기 혹은 무기 모이어티일 수 있다. 또한, 약제학적으로 허용가능한 염은 그의 구조에 하나보다 많은 하전된 원자를 지닐 수 있다. 다수의 하전된 원자가 약제학적으로 허용가능한 염의 일부인 경우에는 다수의 카운터 이온을 지닐 수 있다. 그러므로, 약제학적으로 허용가능한 염은 하나 이상의 하전된 원자 및/또는 하나 이상의 카운터 이온을 지닐 수 있다.

[0154] 본 발명의 화합물이 염기인 경우, 목적으로 하는 약제학적으로 허용가능한 염은 당업계에서 이용가능한 임의의 적절한 방법, 예를 들어, 유리 염기를 무기 산, 예컨대, 염산, 브롬화수소산, 황산, 질산, 메탄설폰산, 인산 등으로 처리하는 방법, 또는 유기산, 예를 들어, 아세트산, 말레산, 숙신산, 만델산, 푸마르산, 말론산, 피루브산, 옥살산, 글라이콜산, 살리실산, 피라노시딜산, 예컨대, 글루쿠론산 혹은 갈락투론산, 알파 하이드록시산, 예컨대, 시트르산 혹은 타르타르산, 아미노산, 예컨대, 아스파르트산 혹은 글루탐산, 방향족 산, 예컨대, 벤조산 혹은 신남산, 설폰산, 예컨대, p-톨루엔설폰산 혹은 에탄설폰산 등으로 처리하는 방법에 의해 제조될 수 있다.

[0155] 본 발명의 화합물이 산인 경우, 목적으로 하는 약제학적으로 허용가능한 염은 임의의 적절한 방법, 예를 들어, 유리 산을 무기 혹은 유기 염기, 예컨대, 아민(1차, 2차 혹은 3차), 알칼린 금속 수산화물 혹은 알카릴 토금속 수산화물 등으로 처리하는 방법에 의해 제조될 수 있다. 적절한 염의 예시적인 예는, 아미노산, 예컨대, 글라이신 및 아르기닌, 암모니아, 1차, 2차 및 3차 아민 및 환식 아민, 예컨대, 피페리딘, 몰폴린 및 피페라진으로부터 유래된 유기 염, 및 나트륨, 칼슘, 칼륨, 마그네슘, 망간, 철, 구리, 아연, 알루미늄 및 리튬으로부터 유래된 무기 염을 포함하지만 이들로 제한되는 것은 아니다.

[0156] 본 명세서에서 이용되는 바와 같이, "**용매화물**"이란 용어는 비공유 분자간력에 의해 결합된, 물, 아이소프로판올, 아세톤, 에탄올, 메탄올, DMSO, 에틸 아세테이트, 아세트산, 및 에탄올아민 다이클로로메탄, 2-프로판올 등과 같은 용매의 화학량론적 혹은 비화학량론적 양을 더 포함하는 화합물을 의미한다. 화합물의 용매화물 혹은 수화물은 이민 모이어티의 용매화 혹은 수화를 초래하도록 메탄올, 에탄올, 1-프로판올, 2-프로판올 혹은 물 등과 같은 수산기 용매의 적어도 1몰 당량의 첨가에 의해 용이하게 제조된다.

[0157] "**대사산물**"은 특정 화합물, 그의 유도체 혹은 그의 컨쥬게이트, 또는 그의 염의 바디에서 대사를 통해 생산된 생성물이다. 화합물, 그의 유도체 혹은 그의 컨쥬게이트의 대사산물은 당업계에 공지된 통상의 수법 및 본 명세서에 기재된 것들과 같은 테스트를 이용해서 결정된 활성을 이용해서 확인될 수 있다. 이러한 생성물은 예를 들어 투여된 화합물의 산화, 수산화, 환원, 가수분해, 아마이드화, 탈아마이드화, 에스터화, 탈에스터화, 효소절단 등으로부터 기인될 수 있다. 따라서, 본 발명은 본 발명의 화합물, 그의 유도체 혹은 그의 컨쥬게이트를 그의 대사산물 생성물을 수득하는데 충분한 시간 기간 동안 포유동물과 접촉시키는 것을 포함하는 방법에 의해 생성된, 화합물, 그의 유도체 혹은 그의 컨쥬게이트를 포함하는, 본 발명의 화합물, 그의 유도체 혹은 그의 컨쥬게이트의 대사산물을 포함한다.

[0158] "**약제학적으로 허용가능한**"이란 어구는, 물질 혹은 조성물이 제형을 포함하는 다른 성분 및/또는 치료 중인 포유동물과 화학적으로 및/또는 독성학적으로 적합해야만 하는 것을 나타낸다.

[0159] "**보호기**" 또는 "**보호 모이어티**"란 용어는 화합물, 그의 유도체 혹은 그의 컨쥬게이트 상의 특정 작용기를 차단 혹은 보호하는 한편 다른 작용기를 반응시키는데 통상 이용되는 치환기를 지칭한다. 예를 들어, "**아민-보호기**" 또는 "**아민-보호 모이어티**"는 화합물의 아미노 작용기를 차단 혹은 보호하는 아미노기에 부착된 치환기이다. 이러한 기는 당업계에 잘 알려져 있고(예를 들어 문헌[P. Wuts and T. Greene, 2007, Protective Groups in Organic Synthesis, Chapter 7, J. Wiley & Sons, NJ] 참조), 카바메이트, 예컨대 메틸 및 에틸 카바메이트, FMOC, 치환된 에틸 카바메이트, 1,6-β-제거에 의해 절단("**자기 희생**"(immolative)이라고도 불림)된 카바메이트, 유레아, 아마이드, 펩타이드, 알킬 및 아릴 유도체로 예시된다. 적절한 아미노-보호기는 아세틸, 트라이플루오로아세틸, t-뷰톡시카보닐(BOC), 벤질옥시카보닐(CBZ) 및 9-플루오레닐메틸렌옥시카보닐(Fmoc)을 포함한다. 보호기 및 그들의 용도에 대한 일반적인 설명에 대해서는, 문헌[P. G.M. Wuts & T. W. Greene, Protective Groups in Organic Synthesis, John Wiley & Sons, New York, 2007]을 참조하면 된다.

[0160] "**이탈기**"란 용어는 치환 또는 대체 동안 이탈되는 하전된 혹은 미하전된 모이어티의 그룹을 지칭한다. 이러한 이탈기는 당업계에 잘 알려져 있고, 할로겐, 에스터, 알콕시, 하이드록실, 토실레이트, 트라이플레이트, 메실레이트, 나이트릴, 아자이드, 카바메이트, 다이설파이드, 티오에스터, 티오에터 및 다이아조늄 화합물을 포함하지만 이들로 제한되는 것은 아니다.

[0161] "**이작용성 가교제**", "**이작용성 링커**" 또는 "**가교제**"란 용어는 "연결기"에 접속된 두 반응성 기를 지니는 변형제

를 지칭하며; 그 중 하나는 세포 결합제와 반응할 수 있는 한편, 다른 하나는 세포독성 화합물과 반응하여 두 모이어티를 함께 연결한다. 이러한 이작용성 가교제는 당업계에 잘 알려져 있다(예를 들어, 문헌[Isalm and Dent in *Bioconjugation* chapter 5, p218-363, Groves Dictionaries Inc. New York, 1999] 참조). 예를 들어, 티오에터 결합을 통해서 연결을 가능하게 하는 이작용성 가교제는 말레이미도기를 도입하는 *N*-숙신이미딜-4-(N-말레이미도메틸)-사이클로헥산-1-카복실레이트(SMCC), 또는 아이오도아세틸기를 도입하는 *N*-숙신이미딜-4-(아이오도아세틸)-아미노벤조에이트(SIAB)를 포함한다. 세포 결합제에 말레이미도기 또는 할로아세틸기를 도입하는 다른 이작용성 가교제는 당업계에 잘 알려져 있고(미국 특허 출원 제2008/0050310호, 제20050169933호, 미국 아일랜드주 61105 록랜드시 피오박스 117에 소재한 피어스 바이오테크놀로지사(Pierce Biotechnology Inc., P.O. Box 117)로부터 입수가능), 비스-말레이미도폴리에틸렌글라이콜(BMPEO), BM(PEO)$_2$, BM(PEO)$_3$, N-(β-말레이미도프로필옥시)숙신이미드 에스터(BMPS), γ-말레이미도뷰티르산 N-숙신이미딜 에스터(GMBS), ε-말레이미도카프로산 N-하이드록시숙신이미드 에스터(EMCS), 5-말레이미도발레르산 NHS, HBVS, SMCC의 장쇄 유사체(LC-SMCC)인 N-숙신이미딜-4-(N-말레이미도메틸)-사이클로헥산-1-카복시-(6-아마이도카프로에이트), m-말레이미도벤조일-N-하이드록시숙신이미드 에스터(MBS), 4-(4-N-말레이미도페닐)-뷰티르산 하이드라자이드 또는 HCl염(MPBH), N-숙신이미딜 3-(브로모아세트아마이도)프로피오네이트(SBAP), N-숙신이미딜 아이오도아세테이트(SIA), κ-말레이미도운데칸산 N-숙신이미딜 에스터(KMUA), N-숙신이미딜 4-(p-말레이미도페닐)-뷰티레이트(SMPB), 숙신이미딜-6-(β-말레이미도프로피온아마이도)헥사노에이트(SMPH), 숙신이미딜-(4-비닐설포닐)벤조에이트(SVSB), 다이티오비스-말레이미도에탄(DTME), 1,4-비스-말레이미도뷰탄(BMB), 1,4 비스말레이미딜-2,3-다이하이드록시뷰탄(BMDB), 비스-말레이미도헥산(BMH), 비스-말레이미도에탄(BMOE), 설포숙신이미딜 4-(N-말레이미도-메틸)사이클로헥산-1-카복실레이트(설포-SMCC), 설포숙신이미딜(4-아이오도-아세틸)아미노벤조에이트(설포-SIAB), m-말레이미도벤조일-N-하이드록시설포숙신이미드 에스터(설포-MBS), N-(γ-말레이미도뷰티릴옥시)설포숙신이미드 에스터(설포-GMBS), N-(ε-말레이미도카프로일옥시)설포숙신이미도 에스터(설포-EMCS), N-(κ-말레이미도운데카노일옥시)설포숙신이미드 에스터(설포-KMUS) 및 설포숙신이미딜 4-(p-말레이미도페닐)뷰티레이트(설포-SMPB)를 포함하지만 이들로 제한되는 것은 아니다.

[0162] 헤테로이작용성 가교제는 2개의 상이한 반응성 기를 지니는 이작용성 가교제이다. 아민-반응성 *N*-하이드록시숙신이미드기(NHS기)와 카보닐-반응성 하이드라진기의 둘 모두를 함유하는 헤테로이작용성 가교제는 또한 본 명세서에 기재된 세포독성 화합물을 세포 결합제(예컨대, 항체)에 연결하는데 이용될 수 있다. 이러한 상업적으로 입수가능한 헤테로이작용성 가교제의 예는 숙신이미딜 6-하이드라지노니코틴아마이드 아세톤 하이드라존(SANH), 숙신이미딜 4-하이드라지도테레프탈레이트 하이드로클로라이드(SHTH) 및 숙신이미딜 하이드라지늄 니코티네이트 하이드로클로라이드(SHNH)를 포함한다. 산-불안정성 연결을 보유하는 컨쥬게이트는 또한 본 발명의 하이드라진-보유 벤조다이아제핀 유도체를 이용해서 제조될 수 있다. 이용될 수 있는 이작용성 가교제의 예는 숙신이미딜-p-포르밀 벤조에이트(SFB) 및 숙신이미딜-p-포밀페녹시아세테이트(SFPA)를 포함한다.

[0163] 다이설파이드 결합을 통해서 세포 결합제와 세포독성 화합물의 연결을 가능하게 하는 이작용성 가교제는 다이티오피리딜기를 도입하기 위하여 *N*-숙신이미딜-4-(4-나이트로피리딜-2-다이티오)뷰타노에이트, 및 당업계에 공지된 기타 제제, 예컨대, *N*-숙신이미딜-3-(2-피리딜다이티오)프로피오네이트(SPDP), *N*-숙신이미딜-4-(2-피리딜다이티오)펜타노에이트 (SPP), *N*-숙신이미딜-4-(2-피리딜다이티오)뷰타노에이트(SPDB), *N*-숙신이미딜-4-(2-피리딜다이티오)2-설포 뷰타노에이트(설포-SPDB)를 포함한다. 다이설파이드 기를 도입하는데 이용될 수 있는 기타 이작용성 가교제는 당업계에 공지되어 있고, 미국 특허 제6,913,748호, 제6,716,821호 및 미국 특허 공개 제20090274713호 및 제20100129314호에 개시되어 있고, 이들 문헌은 모두 참조로 본 명세서에 병합된다. 대안적으로, 티올기를 도입하는 2-이미노티올란, 호모시스테인 티올아세톤 혹은 S-아세틸숙신산 무수물 등과 같은 가교제도 이용될 수 있다.

[0164] 본 명세서에서 이용되는 바와 같은 "**링커**", "**링커 모이어티**" 또는 "**연결기**"는 세포 결합제 및 세포독성 화합물 등과 같은 두 모이어티를 함께 연결하는 모이어티를 지칭한다. 이작용성 가교제는 링커 모이어티의 각 단부에 하나씩 두 반응성 기를 포함할 수 있으므로, 하나의 반응성 기는 우선 세포독성 화합물과 반응하여 링커 모이어티와 제2반응성 기를 보유하는 화합물을 제공하고, 이는 이어서 세포 결합제와 반응할 수 있다. 대안적으로, 이작용성 가교제의 일단부는 먼저 세포 결합제와 반응하여 링커 모이어티와 제2반응성 기를 보유하는 세포 결합제를 제공하며, 이는 이어서 세포독성 화합물과 반응할 수 있다. 연결 모이어티는 특정 부위에서 세포독성 모이어티의 방출을 허용하는 화학적 결합을 포함할 수 있다. 적절한 화학적 결합은 당업계에 잘 알려져 있고, 다이설파이드 결합, 티오에터 결합, 산 불안정성 결합, 광불안정성 결합, 펩티다제 불안정성 결합 및 에스터라제 불안정성 결합을 포함한다(예를 들어 미국 특허 제5,208,020호; 제5,475,092호; 제6,441,163호;

제6,716,821호; 제6,913,748호; 제7,276,497호; 제7,276,499호; 제7,368,565호; 제7,388,026호; 및 제7,414,073호 참조). 다이설파이드 결합, 티오에터 및 퀩티다제 불안정성 결합이 바람직하다. 본 발명에서 이용될 수 있는 다른 링커는 비절단성 링커, 예컨대, 미국 특허 공개 제20050169933호에 상세히 기재된 것들, 하전된 링커 혹은 친수성 링커이며 이들은 미국 특허 공개 제2009/0274713, 미국 특허 공개 제2010/01293140호 및 WO 2009/134976호에 기재되어 있으며, 이들 각각은 본 명세서에 참조로 명확하게 병합되며, 이들 각각은 참조로 명시적으로 본 명세서에 병합된다.

[0165] 일 실시형태에 있어서, 반응성 에스터 등과 같은, 일단부에 반응성 기가 부착된 상기 연결기는 이하의 "리스트 1"로부터 선택된다:

$-O(CR_{20}R_{21})_m(CR_{22}R_{23})_n(OCH_2CH_2)_p(CR_{40}R_{41})_{p''}Y''(CR_{24}R_{25})_q(CO)_tX''$,

$-O(CR_{20}R_{21})_m(CR_{26}=CR_{27})_{m'}(CR_{22}R_{23})_n(OCH_2CH_2)_p(CR_{40}R_{41})_{p''}Y''(CR_{24}R_{25})_q(CO)_tX''$,

$-O(CR_{20}R_{21})_m($알키닐$)_{n'}(CR_{22}R_{23})_n(OCH_2CH_2)_p(CR_{40}R_{41})_{p''}Y''(CR_{24}R_{25})_q(CO)_tX''$,

$-O(CR_{20}R_{21})_m($피페라지노$)_{t'}(CR_{22}R_{23})_n(OCH_2CH_2)_p(CR_{40}R_{41})_{p''}Y''(CR_{24}R_{25})_q(CO)_tX''$,

$-O(CR_{20}R_{21})_m($피롤로$)_{t'}(CR_{22}R_{23})_n(OCH_2CH_2)_p(CR_{40}R_{41})_{p''}Y''(CR_{24}R_{25})_q(CO)_tX''$,

$-O(CR_{20}R_{21})_mA''_{m''}(CR_{22}R_{23})_n(OCH_2CH_2)_p(CR_{40}R_{41})_{p''}Y''(CR_{24}R_{25})_q(CO)_tX''$,

$-S(CR_{20}R_{21})_m(CR_{22}R_{23})_n(OCH_2CH_2)_p(CR_{40}R_{41})_{p''}Y''(CR_{24}R_{25})_q(CO)_tX''$,

$-S(CR_{20}R_{21})_m(CR_{26}=CR_{27})_{m'}(CR_{22}R_{23})_n(OCH_2CH_2)_p(CR_{40}R_{41})_{p''}Y''(CR_{24}R_{25})_q(CO)_tX''$,

$-S(CR_{20}R_{21})_m($알키닐$)_{n'}(CR_{22}R_{23})_n(OCH_2CH_2)_p(CR_{40}R_{41})_{p''}Y''(CR_{24}R_{25})_q(CO)_tX''$,

$-S(CR_{20}R_{21})_m($피페라지노$)_{t'}(CR_{22}R_{23})_n(OCH_2CH_2)_p(CR_{40}R_{41})_{p''}Y''(CR_{24}R_{25})_q(CO)_tX''$,

$-S(CR_{20}R_{21})_m($피롤로$)_{t'}(CR_{22}R_{23})_n(OCH_2CH_2)_p(CR_{40}R_{41})_{p''}Y''(CR_{24}R_{25})_q(CO)_tX''$,

$-S(CR_{20}R_{21})_mA''_{m''}(CR_{22}R_{23})_n(OCH_2CH_2)_p(CR_{40}R_{41})_{p''}Y''(CR_{24}R_{25})_q(CO)_tX''$,

$-NR_{33}(C=O)_{p''}(CR_{20}R_{21})_m(CR_{22}R_{23})_n(OCH_2CH_2)_p(CR_{40}R_{41})_{p''}Y''(CR_{24}R_{25})_q(CO)_tX''$,

$-NR_{33}(C=O)_{p''}(CR_{20}R_{21})_m(CR_{26}=CR_{27})_{m'}(CR_{22}R_{23})_n(OCH_2CH_2)_p(CR_{40}R_{41})_{p''}Y''(CR_{24}R_{25})_q(CO)_tX''$,

$-NR_{33}(C=O)_{p''}(CR_{20}R_{21})_m($알키닐$)_{n'}(CR_{22}R_{23})_n(OCH_2CH_2)_p(CR_{40}R_{41})_{p''}Y''(CR_{24}R_{25})_q(CO)_tX''$,

$-NR_{33}(C=O)_{p''}(CR_{20}R_{21})_m($피페라지노$)_{t'}(CR_{22}R_{23})_n(OCH_2CH_2)_p(CR_{40}R_{41})_{p''}Y''(CR_{24}R_{25})_q(CO)_tX''$,

$-NR_{33}(C=O)_{p''}(CR_{20}R_{21})_m($피롤로$)_{t'}(CR_{22}R_{23})_n(OCH_2CH_2)_p(CR_{40}R_{41})_{p''}Y''(CR_{24}R_{25})_q(CO)_tX''$,

$-NR_{33}(C=O)_{p''}(CR_{20}R_{21})_mA''_{m''}(CR_{22}R_{23})_n(OCH_2CH_2)_p(CR_{40}R_{41})_{p''}Y''(CR_{24}R_{25})_q(CO)_tX''$,

$-(CR_{20}R_{21})_m(CR_{22}R_{23})_n(OCH_2CH_2)_p(CR_{40}R_{41})_{p''}Y''(CR_{24}R_{25})_q(CO)_tX''$,

$-(CR_{20}R_{21})_m(CR_{26}=CR_{27})_{m'}(CR_{22}R_{23})_n(OCH_2CH_2)_p(CR_{40}R_{41})_{p''}Y''(CR_{24}R_{25})_q(CO)_tX''$,

$-(CR_{20}R_{21})_m($알키닐$)_{n'}(CR_{22}R_{23})_n(OCH_2CH_2)_p(CR_{40}R_{41})_{p''}Y''(CR_{24}R_{25})_q(CO)_tX''$,

$-(CR_{20}R_{21})_m($피페라지노$)_{t'}(CR_{22}R_{23})_n(OCH_2CH_2)_p(CR_{40}R_{41})_{p''}Y''(CR_{24}R_{25})_q(CO)_tX''$,

$-(CR_{20}R_{21})_mA''_{m''}(CR_{22}R_{23})_n(OCH_2CH_2)_p(CR_{40}R_{41})_{p''}Y''(CR_{24}R_{25})_q(CO)_tX''$,

$-(CR_{20}R_{21})_m(CR_{29}=N\text{-}NR_{30})_{n''}(CR_{22}R_{23})_n(OCH_2CH_2)_p(CR_{40}R_{41})_{p''}Y''(CR_{24}R_{25})_q(CO)_tX''$,

$-(CR_{20}R_{21})_m(CR_{29}=N\text{-}NR_{30})_{n''}(CR_{26}=CR_{27})_{m'}(CR_{22}R_{23})_n(OCH_2CH_2)_p(CR_{40}R_{41})_{p''}Y''$
$(CR_{24}R_{25})_q(CO)_tX''$,

$-(CR_{20}R_{21})_m(CR_{29}=N\text{-}NR_{30})_{n''}($알키닐$)_{n'}(CR_{22}R_{23})_n(OCH_2CH_2)_p(CR_{40}R_{41})_{p''}Y''(CR_{24}R_{25})_q(CO)_tX''$,

[0166] $-(CR_{20}R_{21})_m(CR_{29}=N\text{-}NR_{30})_{n''}A''_{m'}(CR_{22}R_{23})_n(OCH_2CH_2)_p(CR_{40}R_{41})_{p''}Y''(CR_{24}R_{25})_q(CO)_tX''$,

[0167] 여기서,

[0168] m, n, p, q, m', n' 및 t'는 1 내지 10의 정수이거나 선택적으로 0이고;

[0169] t, m'', n'' 및 p''는 0 또는 1이며;

[0170] X''는 OR_{36}, SR_{37}, $NR_{38}R_{39}$(이때 R_{36}, R_{37}, R_{38}, R_{39}는 H, 또는 1 내지 20개의 탄소 원자를 지니는 직쇄, 분지쇄 혹은

환식 알킬, 알케닐 혹은 알키닐임), 또는 폴리에틸렌 글라이콜 단위 -$(OCH_2CH_2)_n$으로부터 선택되며, R_{37}은, 선택적으로, 티올 보호기이고, t = 1일 경우, COX''는 N-하이드록시숙신이미드 에스터, N-하이드록시프탈이미드 에스터, N-하이드록시 설포-숙신이미드 에스터, 파라-나이트로페닐 에스터, 다이나이트로페닐 에스터, 펜타플루오로페닐 에스터 및 그들의 유도체로부터 선택된 반응성 에스터를 형성하며, 이때 상기 유도체는 아마이드 결합 형성을 용이하게 하고;

[0171] Y''는 존재하지 않거나, 또는 O, S, S-S 또는 NR_{32}로부터 선택되되, 이때 R_{32}는 R에 대해서 위에서 부여된 것과 동일한 정의를 지니거나, 또는

[0172] Y''가 S-S가 아니고 t = 0인 경우, X''는 말레이미도기, 할로아세틸기 또는 SR_{37}로부터 선택되되, 이때 R_{37}은 위에서와 동일한 정의를 지니며;

[0173] A''는 글라이신, 알라닌, 류신, 발린, 라이신, 시트룰린 및 글루타메이트 또는 2 내지 20개의 아미노산 단위를 포함하는 폴리펩타이드로부터 선택된 아미노산이고;

[0174] R_{20}, R_{21}, R_{22}, R_{23}, R_{24}, R_{25}, R_{26} 및 R_{27}은 동일 혹은 상이하고, H 또는 1 내지 5개의 탄소 원자를 지니는 직쇄 혹은 분지쇄 알킬이며;

[0175] R_{29} 및 R_{30}은 동일 혹은 상이하고, H 또는 1 내지 5개의 탄소 원자를 지니는 알킬이며;

[0176] R_{33}은 H 또는 1 내지 12개의 탄소 원자를 지니는 직쇄, 분지쇄 혹은 환식 알킬, 알케닐 혹은 알키닐, 폴리에틸렌 글라이콜 단위 -$(OCH_2CH_2)_n$이거나, 또는 R_{33}은 -COR_{34}, -CSR_{34}, -SOR_{34} 또는 -SO_2R_{34}이고, 이때 R_{34}는 H 또는 1 내지 20개의 탄소 원자를 지니는 직쇄, 분지쇄 혹은 환식 알킬, 알케닐 또는 폴리에틸렌 글라이콜 단위 -$(OCH_2CH_2)_n$이며;

[0177] R_{40}과 R_{41} 중 한쪽은 선택적으로 음 혹은 양하전된 작용기이고 다른 쪽은 H 또는 1 내지 4개의 탄소 원자를 지니는 알킬, 알케닐, 알키닐이다.

[0178] "**아미노산**"이란 용어는 NH_2-C($R^{aa'}R^{aa}$)-C(=O)OH로 표시되는 천연형(naturally occurring) 아미노산 혹은 비천연형 아미노산을 지칭하며, 이때, R^{aa} 및 $R^{aa'}$는 각각 독립적으로 H, 1 내지 10개의 탄소 원자를 지니는 선택적으로 치환된 직쇄, 분지쇄 혹은 환식 알킬, 알케닐 혹은 알키닐, 아릴, 헤테로아릴 또는 헤테로사이클릴이다. "아미노산"이란 용어는 또한 1개의 수소 원자가 아미노산의 아민 및/또는 카복시 말단으로부터 제거된 경우 대응하는 잔기, 예컨대, -NH-C($R^{aa'}R^{aa}$)-C(=O)O-를 지칭한다.

[0179] "**양이온**"이란 용어는 양전하를 지니는 이온을 지칭한다. 양이온은 1가(예컨대, Na^+, K^+ 등), 2가(예컨대, Ca^{2+}, Mg^{2+} 등) 또는 다가(예컨대, Al^{3+} 등)일 수 있다. 바람직하게는, 양이온은 1가이다.

[0180] "**치료적 유효량**"이란 용어는 대상체에서 목적으로 하는 생물학적 반응을 이끌어내는 활성 화합물 또는 컨쥬게이트의 양을 의미한다. 이러한 반응은 치료 중인 질환 혹은 장애의 증상의 경감, 질환 혹은 질환 자체의 증상의 재발의 예방, 억제 혹은 지연, 치료를 받지 않은 것과 비교하여 대상체의 장기 지속의 증가, 또는 질환 혹은 질환 자체의 증상의 진행의 예방, 억제 혹은 지연을 포함한다. 유효량의 결정은 특히 본 명세서에서 제공되는 상세한 설명을 감안하여 당업자의 능력 내에서 잘 행해진다. 화합물 I의 독성 및 치료적 효능은 세포 배양물에서 및 실험 동물에서 표준 약제학적 절차에 의해 결정될 수 있다. 본 발명의 화합물 혹은 컨쥬게이트 또는 대상에게 투여될 기타 치료제의 유효량은 다발성 골수종의 단계, 범주 및 상태, 그리고 대상체의 특성, 예컨대, 일반적 건강, 연령, 성별, 체중 및 약물 내성 등에 따라 좌우될 것이다. 본 발명의 화합물 혹은 컨쥬게이트 또는 기타 투여될 치료제의 유효량은 또한 투여 경로 및 투약 형태에 따라 좌우될 것이다. 투약량 및 간격은 소망의 치료 효과를 유지하기에 충분한 활성 화합물의 혈장수준을 제공하도록 개별적으로 조정될 수 있다.

[0181] "**티올 반응성 기**"란 용어는 티올 모이어티와 반응할 작용기를 지칭한다. 티올 반응성 기의 예는 말레이미도, 비닐피리딘, 비닐 설폰, 비닐 설폰아마이드, 할로아세틸계 기(예컨대, 할로아세트아마이도) 또는 다이설파이드(예컨대, -SSR^d, 이때 R^d는 1 내지 4개의 탄소 원자를 지니는 직쇄 혹은 분지쇄 알킬, 페닐, 나이트로페닐, 다이나이트로페닐, 카복시나이트로페닐, 피리딜, 2-나이트로피리딜, 4-나이트로피리딜 또는 3-카복시-4-나이트로피

리딜임)를 포함하지만, 이들로 제한되는 것은 아니다.

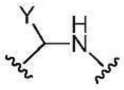
[0182] "**반응성 에스터**"란 용어는 아민 기 또는 하이드록실기에 의해 용이하게 대체되는 이탈기를 포함하는 에스터를 지칭한다. 반응성 에스터의 예는, N-하이드록시숙신이미드 에스터, N-하이드록시 설포숙신이미드 에스터, 나이트로페닐 에스터, 다이나이트로페닐 에스터, 테트라플루오로페닐 에스터, 설포-테트라플루오로페닐 에스터 및 펜타플루오로페닐 에스터를 포함하지만, 이들로 제한되는 것은 아니다. 바람직하게는, 반응성 에스터는 N-하이드록시숙신이미드(NHS) 에스터이다.

[0183] "**이민-함유 약물**" 또는 "**이민-함유 세포독성 화합물**"이란 용어는 적어도 하나의 이민 작용기를 지니는 (링커기 없이) 본 명세서에 기재된 화합물을 지칭한다. 바람직하게는, 이민-함유 약물은 하나의 이민 작용기를 포함한다.

[0184] **본 발명의 방법**

[0185] 제1양상에 있어서, 본 발명은 연결기에 의해 세포독성 화합물에 컨쥬게이트된 세포 결합제(CBA)를 포함하는 컨쥬게이트를 제조하는 방법에 관한 것으로, 해당 방법은 세포독성 화합물을 변형된 CBA와 약 4 내지 약 9의 pH에서 반응시키는 단계를 포함하되, 여기서,

[0186] a) 상기 변형된 CBA는 상기 CBA에 결합된 이작용성 가교제의 잔기를 포함하고, 상기 잔기는 상기 연결기 및 티올-반응성 기를 포함하며;

[0187] b) 상기 변형된 세포독성 화합물은 티올기, 및  로 표시된 기를 포함하고,

[0188] 상기 표시된 기 중,

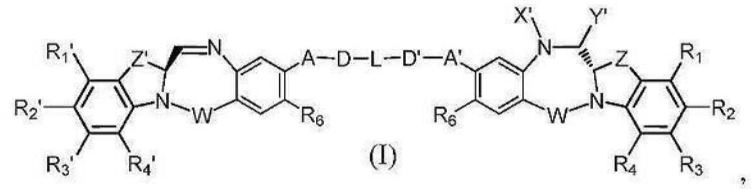
[0189] Y는 이탈기이고, 아황산염(HSO_3, HSO_2 또는 양이온과 함께 형성된 HSO_3^-, SO_3^{2-} 혹은 HSO_2^-의 염), 메타중아황산염($H_2S_2O_5$ 또는 양이온과 함께 형성된 $S_2O_5^{2-}$의 염), 모노-, 다이-, 트라이- 및 테트라-티오포스페이트(PO_3SH_3, $PO_2S_2H_2$, POS_3H_2, PS_4H_2 또는 양이온과 함께 형성된 PO_3S^{3-}, $PO_2S_2^{3-}$, POS_3^{3-} 혹은 PS_4^{3-}의 염), 티오포스페이트 에스터 $(R^iO)_2PS(OR^i)$, R^iS-, R^iSO, R^iSO_2, R^iSO_3, 티오설페이트(HS_2O_3 또는 양이온과 함께 형성된 $S_2O_3^{2-}$의 염), 다이티오나이트($H_2S_2O_4$ 또는 양이온과 함께 형성된 $S_2O_4^{2-}$의 염), 포스포로다이티오에이트($P(=S)(OR^{k'})(S)(OH)$ 또는 양이온과 함께 형성된 그의 염), 하이드록삼산($R^{k'}C(=O)NOH$ 또는 양이온과 함께 형성된 염), 포름알데하이드 설폭실레이트($HOCH_2SO_2^-$ 또는 $HOCH_2SO_2^-Na^+$ 등과 같은, 양이온과 함께 형성된 $HOCH_2SO_2^-$의 염) 또는 이들의 혼합물이며, 이때, R^i는 1 내지 10개의 탄소 원자를 지닌 직쇄 혹은 분지쇄 알킬이고 $-N(R^j)_2$, $-CO_2H$, $-SO_3H$ 및 $-PO_3H$로부터 선택된 적어도 하나의 치환기로 치환되며; R^i는 여기에 기재된 알킬기에 대해서 치환기로 더욱 선택적으로 치환될 수 있고; R^j는 1 내지 6개의 탄소 원자를 지니는 직쇄 혹은 분지쇄 알킬이며; $R^{k'}$는 1 내지 10개의 탄소 원자를 지니는 직쇄, 분지쇄 혹은 환식 알킬, 알케닐 혹은 알키닐, 아릴, 헤테로사이클릴 또는 헤테로아릴이다.

[0190] 소정의 실시형태에 있어서, 상기 변형된 세포독성 화합물은 티올기를 보유하는 이민-함유 세포독성 화합물을 이민 반응성 시약과 반응시킴으로써 생성된다.

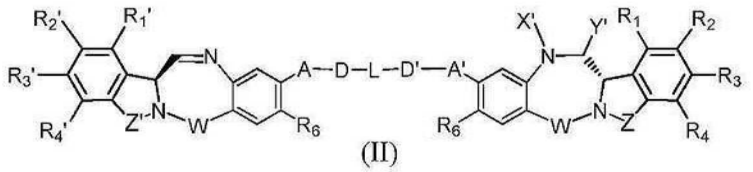
[0191] 소정의 실시형태에 있어서, 상기 방법은 상기 변형된 CBA와 반응시키기 전에 상기 세포독성 화합물을 정제시키는 단계를 추가로 포함할 수 있다.

[0192] 소정의 실시형태에 있어서,

[0193] (1) 상기 이민-함유 세포독성 화합물은 이하의 화학식들 또는 그의 약제학적으로 허용가능한 염 중 하나로 표시되고:



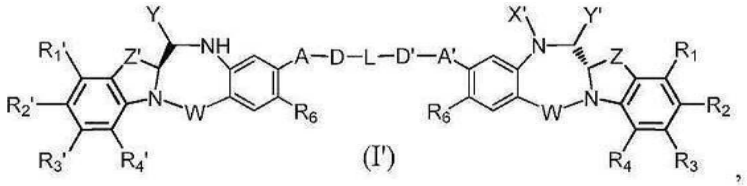
(I)



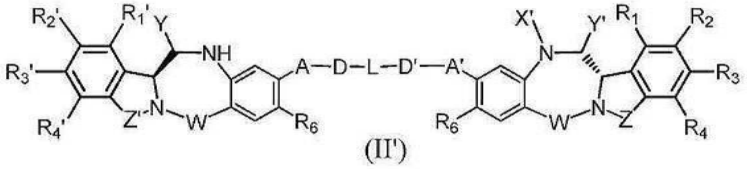
(II)

[0194]

[0195] (2) 상기 변형된 세포독성 화합물은 이하의 화학식들 또는 그의 약제학적으로 허용가능한 염 중 하나로 표시되며:



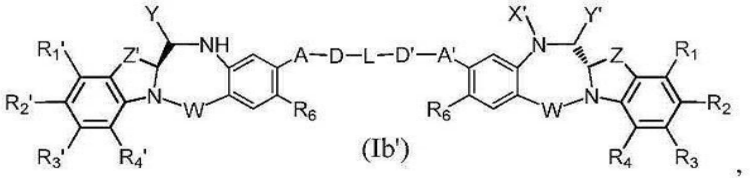
(I')



(II')

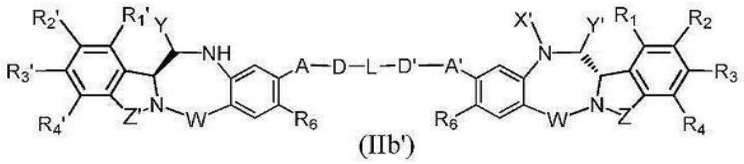
[0196]

[0197] (3) 상기 컨쥬게이트의 상기 변형된 세포독성 화합물 및 상기 연결기 부분은 이하의 화학식들 중 하나로 표시되되:



(Ib')

[0198]



(IIb')

[0199]

[0200] 식 중,

[0201] X'는 -H, 아민-보호기, 1 내지 10개의 탄소 원자를 지니는 선택적으로 치환된 직쇄, 분지쇄 혹은 환식 알킬, 알케닐 혹은 알키닐, 폴리에틸렌 글라이콜 단위 $-(CH_2CH_2O)_n-R^c$, 6 내지 18개의 탄소 원자를 지니는 선택적으로 치환된 아릴, 질소, 산소 및 황으로부터 독립적으로 선택된 1개 이상의 헤테로원자를 함유하는 선택적으로 치환된 5- 내지 18-원 헤테로아릴 고리, 및 O, S, N 및 P로부터 독립적으로 선택된 1 내지 6개의 헤테로원자를 함유하는 선택적으로 치환된 3- 내지 18-원 헤테로사이클릭 고리로부터 선택되고;

[0202] Y'는 -H, 옥소기, 1 내지 10개의 탄소 원자를 지니는 선택적으로 치환된 직쇄, 분지쇄 혹은 환식 알킬, 알케닐 혹은 알키닐, 선택적으로 치환된 6- 내지 18-원 아릴, 질소, 산소 및 황으로부터 독립적으로 선택된 1개 이상의 헤테로원자를 함유하는 선택적으로 치환된 5- 내지 18-원 헤테로아릴 고리, 1 내지 6개의 헤테로원자를 지니는 선택적으로 치환된 3 내지 18-원 헤테로사이클릭 고리로부터 선택되며;

[0203] R^c는 -H 또는 1 내지 4개의 탄소 원자를 지니는 치환 혹은 비치환된 직쇄 혹은 분지쇄 알킬이고;

[0204] R_1, R_2, R_3, R_4, R_1', R_2', R_3' 및 R_4'는 각각 독립적으로 -H, 1 내지 10개의 탄소 원자를 지니는 선택적으로 치환된 직쇄, 분지쇄 혹은 환식 알킬, 알케닐 혹은 알키닐, 폴리에틸렌 글라이콜 단위 $-(OCH_2CH_2)_n-R^c$, 할로겐, 구아니디늄[$-NH(C=NH)NH_2$], -OR, -NR'R'', $-NO_2$, -NCO, -NR'COR'', -SR, -SOR'로 표시되는 설폭사이드, $-SO_2R'$로 표시되는 설폰, 설포네이트 $-SO_3^-M^+$, 설페이트 $-OSO_3^-M^+$, $-SO_2NR'R''$로 표시되는 설폰아마이드, 사이아노, 아자이도, -COR', -OCOR', -OCONR'R''로 이루어진 군으로부터 선택되며;

[0205] R은, 각 경우에, 독립적으로 -H, 1 내지 10개의 탄소 원자를 지니는 선택적으로 치환된 직쇄, 분지쇄 혹은 환식 알킬, 알케닐 혹은 알키닐, 폴리에틸렌 글라이콜 단위 $-(CH_2CH_2O)_n-R^c$, 6 내지 18개의 탄소 원자를 지니는 선택적으로 치환된 아릴, 질소, 산소 및 황으로부터 독립적으로 선택된 1개 이상의 헤테로원자를 함유하는 선택적으로 치환된 5- 내지 18-원 헤테로아릴 고리, 또는 O, S, N 및 P로부터 독립적으로 선택된 1 내지 6개의 헤테로원자를 함유하는 선택적으로 치환된 3- 내지 18-원 헤테로사이클릭 고리로 이루어진 군으로부터 선택되고;

[0206] R' 및 R''는 각각 독립적으로 -H, -OH, -OR, -NHR, $-NR_2$, -COR, 1 내지 10개의 탄소 원자를 지니는 선택적으로 치환된 직쇄, 분지쇄 혹은 환식 알킬, 알케닐 혹은 알키닐, 폴리에틸렌 글라이콜 단위 $-(CH_2CH_2O)_n-R^c$, 및 O, S, N 및 P로부터 독립적으로 선택된 1 내지 6개의 헤테로원자를 지니는 선택적으로 치환된 3- 내지 18-원 헤테로사이클릭 고리로부터 선택되며;

[0207] n은 1 내지 24의 정수이고;

[0208] W는 C=O, C=S, CH_2, BH, SO 및 SO_2로부터 선택되며;

[0209] R_6은 -H, -R, -OR, -SR, -NR'R'', $-NO_2$ 또는 할로겐이고;

[0210] Z 및 Z'는 독립적으로 $-(CH_2)_{n'}-$, $-(CH_2)_{n'}-CR_7R_8-(CH_2)_{na'}-$, $-(CH_2)_{n'}-NR_9-(CH_2)_{na'}-$, $-(CH_2)_{n'}-O-(CH_2)_{na'}-$ 및 $-(CH_2)_{n'}-S-(CH_2)_{na'}-$로부터 선택되며;

[0211] n' 및 na'는 동일 또는 상이하고, 또한 0, 1, 2 및 3으로부터 선택되고;

[0212] R_7 및 R_8은 동일 또는 상이하고, 또한 각각 독립적으로 -H, -OH, -SH, -COOH, -NHR', 폴리에틸렌 글라이콜 단위 $-(OCH_2CH_2)_n-$, 아미노산, 2 내지 6개의 아미노산을 보유하는 펩타이드 단위, 1 내지 10개의 탄소 원자를 지니는 선택적으로 치환된 직쇄, 분지쇄 혹은 환식 알킬로부터 선택되며;

[0213] R_9는 독립적으로 -H, 1 내지 10개의 탄소 원자를 지니는 선택적으로 치환된 직쇄, 분지쇄 혹은 환식 알킬, 폴리에틸렌 글라이콜 단위 $-(OCH_2CH_2)_n-$으로부터 선택되고;

[0214] A 및 A'는 동일 또는 상이하고, 또한 독립적으로 -O-, 옥소(-C(=O)-), -CRR'O-, -CRR'-, -S-, -CRR'S-, $-N(R_5)-$ 및 $-CRR'N(R_5)-$로부터 선택되며;

[0215] R_5는 각 경우에 독립적으로 -H 또는 1 내지 10개의 탄소 원자를 지니는 선택적으로 치환된 직쇄 혹은 분지쇄 알킬이고;

[0216] D 및 D'는 동일 또는 상이하고, 또한 독립적으로 존재하지 않거나 또는 1 내지 10개의 탄소 원자를 지니는 선택적으로 치환된 직쇄, 분지쇄 혹은 환식 알킬, 알케닐 혹은 알키닐, 아미노산, 2 내지 6개의 아미노산을 보유하는 펩타이드 및 폴리에틸렌 글라이콜 단위 $(-OCH_2CH_2)_n-$으로 이루어진 군으로부터 선택되며;

[0217] L은 존재하지 않거나, 또는 존재할 경우에는, 티올기를 포함하거나, 또는 폴리에틸렌 글라이콜 단위 $(-OCH_2CH_2)_n-$, 1 내지 10개의 탄소 원자를 지니는 직쇄, 분지쇄 혹은 환식 알킬 혹은 알케닐, 페닐기, O, S, N 및 P로부터 독립적으로 선택된 1 내지 6개의 헤테로원자를 지니는 3- 내지 18-원 헤테로사이클릭 고리 또는 5- 내지 18-원 헤테로아릴 고리이되, 이때 상기 알킬, 알케닐, 페닐, 또는 헤테로사이클릭 혹은 헤테로아릴 고리는 선택적으로 치환되고;

[0218] 여기서, X', Y', R_6, R^c, R_1, R_2, R_3, R_4, R_1', R_2', R_3', R_4', L(예컨대, 선택적으로 치환된 기를 통해서) 중 적

어도 하나는, 화학식 Ib' 또는 IIb' 중의 연결기에 결합된다.

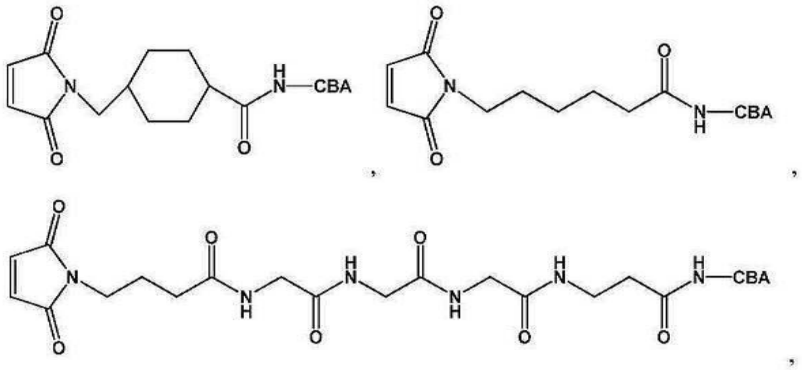
[0219] 소정의 실시형태에 있어서, 상기 변형된 CBA는 상기 CBA를 상기 이작용성 가교제와 반응시킴으로써 제조되고, 상기 이작용성 가교제는 상기 티올-반응성 기 및 상기 CBA와 반응성인 기를 포함하며, 이들 두 기는 상기 연결기에 결합된다.

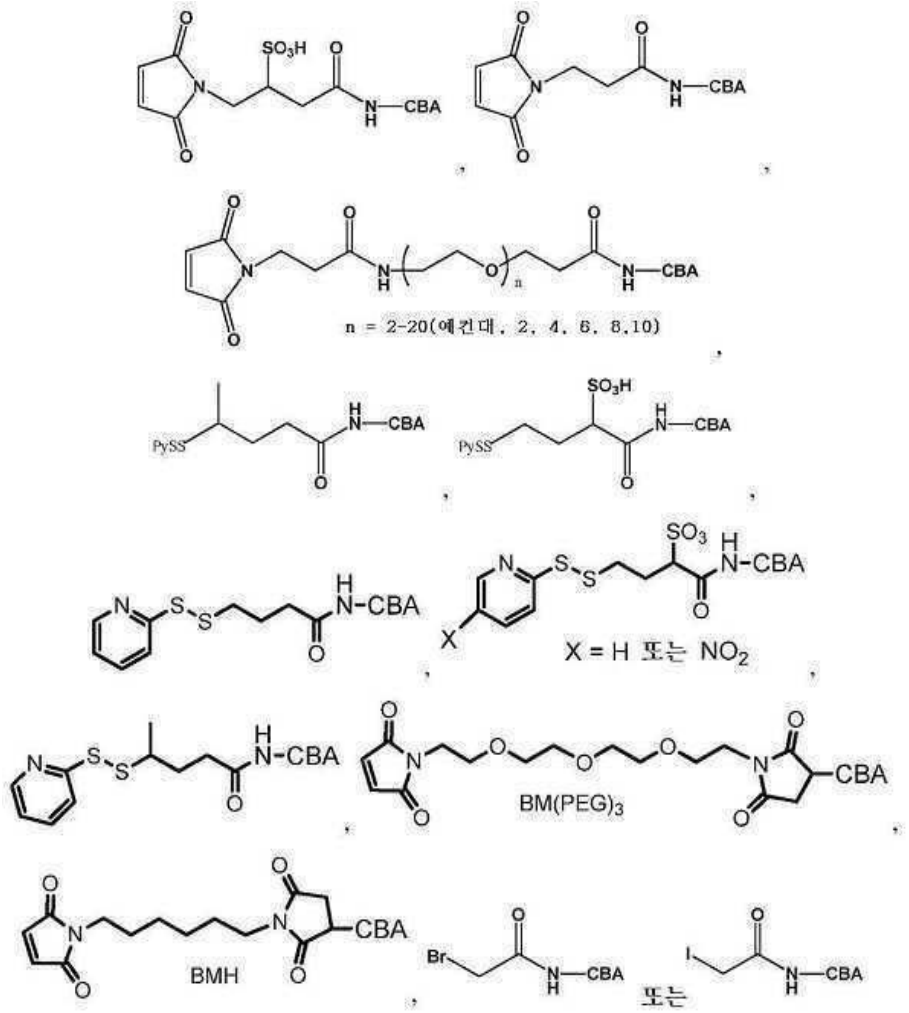
[0220] 소정의 실시형태에 있어서, 상기 CBA와 반응성인 상기 기는 CBA의 아미노기(Lys 곁사슬의 아미노기 등), 또는 CBA의 티올기(Cys 곁사슬의 티올기 등)와 반응한다.

[0221] 소정의 실시형태에 있어서, 상기 티올-반응성 기는 말레이미도, 비닐피리딘, 비닐 설폰, 비닐 설폰아마이드, 할로아세틸계 기 및 다이설파이드 기로 이루어진 군으로부터 선택된다.

[0222] 대안적으로, 상기 티올-반응성 기는 말레이미도, 할로아세트아마이도 또는 -SSR^{d}일 수 있되, 이때, R^{d}는 1 내지 4개의 탄소 원자를 지니는 직쇄 혹은 분지쇄 알킬, 페닐, 나이트로페닐, 다이나이트로페닐, 카복시나이트로페닐, 피리딜, 2-나이트로피리딜, 4-나이트로피리딜 또는 3-카복시-4-나이트로피리딜이다.

[0223] 소정의 실시형태에 있어서, 상기 변형된 CBA는,

[0224] 



[0225] 이다.

[0226] 예시적인 반응식은 도 8에 도시되어 있으며, 해당 반응식에서, "단계 1"에서, 이민 반응성 시약(친핵체(Nuc:)로서 반응식에 도시됨)은 티올 함유 약물에 첨가하여 반응시켜 티올기를 보유하는 변형된 약물을 형성할 수 있다. 변형된 약물은 선택적으로 정제되어 과잉의 이민 반응성 시약을 제거한다. "단계 2"에서, 항체는 티올 반응성기 X(말레이미드, SSPy, 비닐 설폰 등)를 함유하는 링커로 변형되고, pH 6 내지 9에서 티올기를 보유하는 변형된 약물과 반응하여 약물과 항체 사이에 안정적인 다이설파이드 혹은 티오에터 결합을 발생한다. "단계 3"에서, 부산물(예컨대, 과잉의 이민 반응성 시약, 항체와 반응하지 않는 변형된 약물 등)이 제거되어 컨쥬게이트가 조제된다. 항체에 컨쥬게이트된 약물 분자의 수는 n이며, 이는 예를 들어 1 내지 10일 수 있다.

[0227] 2-단계 컨쥬게이션 방법의 대표적인 예는 도 16에 기술되어 있으며, 여기서 항체는 우선 이작용성 가교제로 변형되어 유리 티올 모이어티를 지니는 이량체 화합물과 반응하기에 적합한 소망의 개수의 링커를 지니는 항체로 된다. 이 예에서, 항체 huMy9-6은 우선 SPDB로 변형되어 다이티오피리딜 모이어티를 함유하는 링커를 지니는 항체를 부여한다. 이어서 변형된 항체는 유리 티올, 예컨대, **2a**에 노출되어 목적으로 하는 컨쥬게이트 huMy9-6-SPDB-**2a**를 생성한다. 유사한 반응에 이용될 수 있는 추가의 적절한 티올 반응성 링커가 도 16에 포함된다.

[0228] 이민 반응성 시약은 유기 용매(예컨대, 다이메틸아세트아마이드, 다이메틸포름아마이드, 다이메틸설폭사이드, 아세토나이트릴, 에탄올, 메탄올, 염화메틸렌, 클로로포름, 다이옥산, 또는 이들의 혼합물) 또는 물(예컨대, 탈이온수)과 하나 이상의 유기 용매의 혼합물 중에서 티올기 보유 약물과 혼합될 수 있다. 단지 유기 용매가 이용될 경우, 이민 반응성 시약은 실온에서 30분 이상(예를 들어, 약 1시간, 약 2시간, 약 3시간, 약 4시간, 약 5시간, 약 10시간, 약 24시간 또는 반응이 완결될 때까지) 약물과 혼합될 수 있다. 바람직하게는, 인큐베이션/반응 시간은 약 0 내지 4시간, 또는 1 내지 3시간이다. 얻어진 혼합물은 pH 약 4 내지 약 9, 바람직하게는 약 6 내지 약 9에서 완충된 티올-반응성 기로 변형된 세포 결합제(예컨대, 항체)와 즉시 반응하는데 이용될 수 있다. 대안적으로, 상기 혼합물은 예를 들어, -20℃ 또는 -80℃에서 동결되어 보존될 수 있고, 나중에 세포 결합제(예컨대, 항체)에 의해 그의 재활성을 유지하면서 이용될 수 있다. 물과 유기 용매(들)의 혼합물이 혼화성 공용매 시스템(예컨대, 물과 다이메틸아세트아마이드)으로서 이용된다면, 약물과 이민 반응성 시약의 반응 혼합

물은 즉시 이용되거나 또는 티올-반응성 기를 보유하는 세포 결합제와 반응하도록 혼합 후 사용될 때까지 동결 상태로 유지된다. 물과 유기 용매(들)의 혼합물이 비혼화성 공용매 시스템(예컨대, 물 및 염화메틸렌)으로서 이용된다면, 약물과 이민 반응성 시약은 10분 이상(예를 들어, 약 30분, 약 1시간, 약 2시간, 약 5시간, 약 10시간, 약 24시간 또는 반응이 완료될 때까지) 혼합되고, 상기 수층이 수집되고, 약물 및 반응성 티올에 대해서(예컨대, UV 분광법 및 DTNB(5,5'-다이티오비스-(2-나이트로벤조산)) 시약에 의한 엘만 검정법에 의해) 정량화되며, pH 약 4 내지 약 9, 바람직하게는 약 6 내지 약 9에서 완충된 티올-반응성 기를 보유하는 세포 결합제(예컨대, 항체)에 첨가된다.

[0229] 제2양상에서, 본 발명은 연결기에 의해 세포독성 화합물에 컨쥬케이트된 세포 결합제(CBA)를 포함하는 컨쥬게이트를 제조하는 방법을 제공하되, 해당 방법은 상기 CBA를 이민-함유 세포독성 화합물, 이민 반응성 시약 및 상기 연결기를 포함하는 이작용성 가교제와 반응시켜 상기 컨쥬게이트를 형성하는 단계를 포함한다.

[0230] 소정의 실시형태에 있어서, 상기 세포 결합제(예컨대, 항체)는 약물(예컨대, 이민-함유 세포독성 화합물) 및 이민 반응성 시약과 접촉하여 제1혼합물을 형성하고; 상기 제1혼합물은 이어서 상기 이작용성 가교제와 접촉되어 상기 세포 결합-약물 컨쥬게이트를 형성한다. 바람직하게는, 상기 이작용성 가교제는 제1혼합물의 형성 직후 해당 제1혼합물과 접촉된다. 대안적으로, 상기 제1혼합물은 이작용성 가교제와 접촉하기 전에 소정 시간 간격(예컨대, 약 1 내지 10분, 약 10 내지 30분, 약 30분 내지 1시간, 약 1 내지 5시간, 약 5 내지 24시간, 또는 약 1 내지 2일) 동안 유지되었다.

[0231] 소정의 실시형태에 있어서, 상기 방법은 상기 컨쥬게이트를 정제시키는 단계를 추가로 포함할 수 있다.

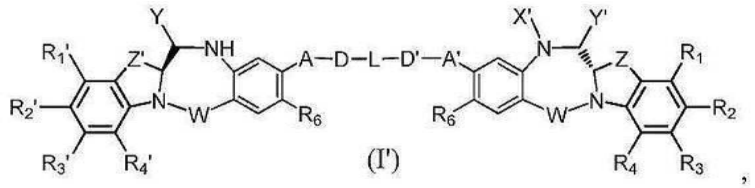
[0232] 예시적인 반응식이 도 10에 도시되어 있으며, 여기서 "단계 1"에서, 이민 반응성 시약(친핵체(Nuc:)로서 반응식 중에 표시됨)이 CBA(예컨대, 항체), 티올을 함유하는 약물, 티올 반응성 기 X(말레이미드, SSPy, 비닐 설폰 등) 및 반응성 에스터기를 둘 모두 포함하는 이작용성 가교제에 첨가되어, 반응을 pH 6 내지 9에서 진행시켜 안정적인 약물-항체 컨쥬게이트를 생성한다. "단계 2"에서, 부산물(예컨대, 과잉의 이민 반응성 시약, 항체와 반응하지 않는 변형된 약물 등)이 제거되어 컨쥬게이트가 조제된다. 항체에 컨쥬게이트된 약물 분자의 수는 n이며, 이는 예를 들어 1 내지 10일 수 있다.

[0233] 제3양상에 있어서, 본 발명은 연결기에 의해 세포독성 화합물에 컨쥬케이트된 세포 결합제(CBA)를 포함하는 컨쥬게이트를 제조하는 방법을 제공하되, 해당 방법은,

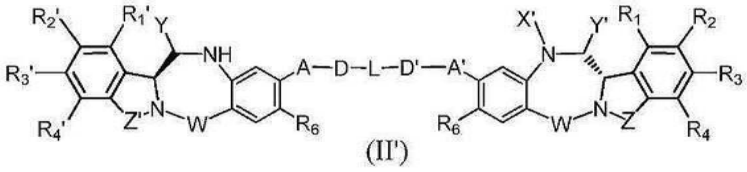
[0234] a) 세포독성 화합물을 상기 연결기를 포함하는 이작용성 가교제, 상기 CBA와 반응성인 기(티올기, 말레이미드기, 할로아세트아마이드기 또는 아민기 등) 및 상기 변형된 세포독성 화합물과 반응성인 기와 반응시켜, 상기 이작용성 가교제의 잔기에 공유결합된 변형된 세포독성 화합물을 형성하는 단계(여기서, 상기 잔기는 상기 연결기 및 상기 CBA와 반응성인 기를 포함함); 및

[0235] b) 상기 변형된 세포독성 화합물을, 약 4 내지 약 9의 pH에서, 상기 CBA와 반응성인 기를 통해서 상기 CBA와 반응시켜, 상기 컨쥬게이트를 형성하는 단계를 포함하되,

[0236] 상기 세포독성 화합물은 이하의 화학식들 또는 그의 약제학적으로 허용가능한 염 중 하나로 표시된다:



(I'),



(II')

[0237]

[0238] 식 중,

[0239] Y는 이탈기이고, 아황산염(HSO_3, HSO_2 또는 양이온과 함께 형성된 HSO_3^-, SO_3^{2-} 혹은 HSO_2^-의 염), 메타중아황산염

($H_2S_2O_5$ 또는 양이온과 함께 형성된 $S_2O_5^{2-}$의 염), 모노-, 다이-, 트라이- 및 테트라-티오포스페이트(PO_3SH_3, $PO_2S_2H_2$, POS_3H_2, PS_4H_2 또는 양이온과 함께 형성된 PO_3S^{3-}, $PO_2S_2^{3-}$, POS_3^{3-} 혹은 PS_4^{3-}의 염), 티오포스페이트 에스터 $(R^iO)_2PS(OR^i)$, R^iS-, R^iSO, R^iSO_2, R^iSO_3, 티오설페이트(HS_2O_3 또는 양이온과 함께 형성된 $S_2O_3^{2-}$의 염), 다이티오나이트($H_2S_2O_4$ 또는 양이온과 함께 형성된 $S_2O_4^{2-}$의 염), 포스포로다이티오에이트(P(=S)($OR^{k'}$)(S)(OH) 또는 양이온과 함께 형성된 그의 염), 하이드록삼산($R^{k'}C(=O)NOH$ 또는 양이온과 함께 형성된 염), 포름알데하이드 설폭실레이트($HOCH_2SO_2^-$ 또는 $HOCH_2SO_2^-Na^+$ 등과 같은, 양이온과 함께 형성된 $HOCH_2SO_2^-$의 염) 또는 이들의 혼합물이며, 이때, R^i는 1 내지 10개의 탄소 원자를 지닌 직쇄 혹은 분지쇄 알킬이고 $-N(R^j)_2$, $-CO_2H$, $-SO_3H$ 및 $-PO_3H$로부터 선택된 적어도 하나의 치환기로 치환되며; R^i는 여기에 기재된 알킬기에 대해서 치환기로 더욱 선택적으로 치환될 수 있고; R^j는 1 내지 6개의 탄소 원자를 지니는 직쇄 혹은 분지쇄 알킬이며; $R^{k'}$는 1 내지 10개의 탄소 원자를 지니는 직쇄, 분지쇄 혹은 환식 알킬, 알케닐 혹은 알키닐, 아릴, 헤테로사이클릴 또는 헤테로아릴이고;

[0240] X'는 -H, 아민-보호기, 1 내지 10개의 탄소 원자를 지니는 선택적으로 치환된 직쇄, 분지쇄 혹은 환식 알킬, 알케닐 혹은 알키닐, 폴리에틸렌 글라이콜 단위 $-(CH_2CH_2O)_n-R^c$, 6 내지 18개의 탄소 원자를 지니는 선택적으로 치환된 아릴, 질소, 산소 및 황으로부터 독립적으로 선택된 1개 이상의 헤테로원자를 함유하는 선택적으로 치환된 5- 내지 18- 원 헤테로아릴 고리, 및 O, S, N 및 P로부터 독립적으로 선택된 1 내지 6개의 헤테로원자를 함유하는 선택적으로 치환된 3- 내지 18-원 헤테로사이클릭 고리로부터 선택되며;

[0241] Y'는 -H, 옥소기, 1 내지 10개의 탄소 원자를 지니는 선택적으로 치환된 직쇄, 분지쇄 혹은 환식 알킬, 알케닐 혹은 알키닐, 선택적으로 치환된 6- 내지 18-원 아릴, 질소, 산소 및 황으로부터 독립적으로 선택된 1개 이상의 헤테로원자를 함유하는 선택적으로 치환된 5- 내지 18-원 헤테로아릴 고리, 1 내지 6개의 헤테로원자를 지니는 선택적으로 치환된 3 내지 18-원 헤테로사이클릭 고리로부터 선택되고;

[0242] R^c는 -H 또는 1 내지 4개의 탄소 원자를 지니는 치환 혹은 비치환된 직쇄 혹은 분지쇄 알킬이며;

[0243] R_1, R_2, R_3, R_4, R_1', R_2', R_3' 및 R_4'는 각각 독립적으로 -H, 1 내지 10개의 탄소 원자를 지니는 선택적으로 치환된 직쇄, 분지쇄 혹은 환식 알킬, 알케닐 혹은 알키닐, 폴리에틸렌 글라이콜 단위 $-(OCH_2CH_2)_n-R^c$, 할로겐, 구아니디늄[$-NH(C=NH)NH_2$], -OR, -NR'R'', $-NO_2$, -NCO, -NR'COR'', -SR, -SOR'로 표시되는 설폭사이드, $-SO_2R'$로 표시되는 설폰, 설포네이트 $-SO_3^-M^+$, 설페이트 $-OSO_3^-M^+$, $-SO_2NR'R''$로 표시되는 설폰아마이드, 사이아노, 아자이도, -COR', -OCOR', -OCONR'R''로 이루어진 군으로부터 선택되고;

[0244] R은, 각 경우에, 독립적으로 -H, 1 내지 10개의 탄소 원자를 지니는 선택적으로 치환된 직쇄, 분지쇄 혹은 환식 알킬, 알케닐 혹은 알키닐, 폴리에틸렌 글라이콜 단위 $-(CH_2CH_2O)_n-R^c$, 6 내지 18개의 탄소 원자를 지니는 선택적으로 치환된 아릴, 질소, 산소 및 황으로부터 독립적으로 선택된 1개 이상의 헤테로원자를 함유하는 선택적으로 치환된 5- 내지 18-원 헤테로아릴 고리, 또는 O, S, N 및 P로부터 독립적으로 선택된 1 내지 6개의 헤테로원자를 함유하는 선택적으로 치환된 3- 내지 18-원 헤테로사이클릭 고리로 이루어진 군으로부터 선택되며;

[0245] R' 및 R''는 각각 독립적으로 -H, -OH, -OR, -NHR, $-NR_2$, -COR, 1 내지 10개의 탄소 원자를 지니는 선택적으로 치환된 직쇄, 분지쇄 혹은 환식 알킬, 알케닐 혹은 알키닐, 폴리에틸렌 글라이콜 단위 $-(CH_2CH_2O)_n-R^c$, 및 O, S, N 및 P로부터 독립적으로 선택된 1 내지 6개의 헤테로원자를 지니는 선택적으로 치환된 3- 내지 18-원 헤테로사이클릭 고리로부터 선택되고;

[0246] n은 1 내지 24의 정수이며;

[0247] W는 C=O, C=S, CH_2, BH, SO 및 SO_2로부터 선택되고;

[0248] R_6은 -H, -R, -OR, -SR, -NR'R'', $-NO_2$ 또는 할로겐이며;

[0249] Z 및 Z'는 독립적으로 $-(CH_2)_{n'}-$, $-(CH_2)_{n'}-CR_7R_8-(CH_2)_{na'}-$, $-(CH_2)_{n'}-NR_9-(CH_2)_{na'}-$, $-(CH_2)_{n'}-O-(CH_2)_{na'}-$ 및 $-(CH_2)_{n'}-S-(CH_2)_{na'}-$로부터 선택되고;

[0250] n' 및 na'는 동일 또는 상이하고, 또한 0, 1, 2 및 3으로부터 선택되며;

[0251] R_7 및 R_8은 동일 또는 상이하고, 또한 각각 독립적으로 -H, -OH, -SH, -COOH, -NHR', 폴리에틸렌 글라이콜 단위 $-(OCH_2CH_2)_n-$, 아미노산, 2 내지 6개의 아미노산을 보유하는 펩타이드 단위, 1 내지 10개의 탄소 원자를 지니는 선택적으로 치환된 직쇄, 분지쇄 혹은 환식 알킬로부터 선택되며;

[0252] R_9는 독립적으로 -H, 1 내지 10개의 탄소 원자를 지니는 선택적으로 치환된 직쇄, 분지쇄 혹은 환식 알킬, 폴리에틸렌 글라이콜 단위 $-(OCH_2CH_2)_n-$으로부터 선택되고;

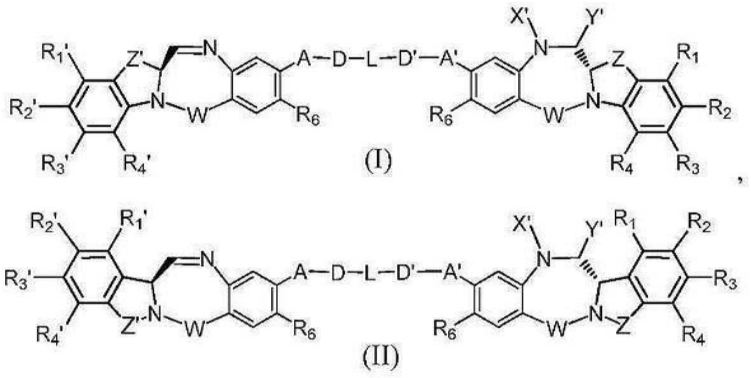
[0253] A 및 A'는 동일 또는 상이하고, 또한 독립적으로 -O-, 옥소(-C(=O)-), -CRR'O-, -CRR'-, -S-, -CRR'S-, $-N(R_5)-$ 및 $-CRR'N(R_5)-$로부터 선택되며;

[0254] R_5는 각 경우에 독립적으로 -H 또는 1 내지 10개의 탄소 원자를 지니는 선택적으로 치환된 직쇄 혹은 분지쇄 알킬이고;

[0255] D 및 D'는 동일 또는 상이하고, 또한 독립적으로 존재하지 않거나 또는 1 내지 10개의 탄소 원자를 지니는 선택적으로 치환된 직쇄, 분지쇄 혹은 환식 알킬, 알케닐 혹은 알키닐, 아미노산, 2 내지 6개의 아미노산을 보유하는 펩타이드 및 폴리에틸렌 글라이콜 단위 $(-OCH_2CH_2)_n-$으로 이루어진 군으로부터 선택되며;

[0256] L은 존재하지 않거나, 또는 존재할 경우에는, 티올기를 포함하거나, 또는 폴리에틸렌 글라이콜 단위 $(-OCH_2CH_2)_n-$, 1 내지 10개의 탄소 원자를 지니는 직쇄, 분지쇄 혹은 환식 알킬 혹은 알케닐, 페닐기, O, S, N 및 P로부터 독립적으로 선택된 1 내지 6개의 헤테로원자를 지니는 3- 내지 18-원 헤테로사이클릭 고리 또는 5- 내지 18-원 헤테로아릴 고리이고, 이때, 상기 알킬, 알케닐, 페닐, 또는 헤테로사이클릭 혹은 헤테로아릴 고리는 선택적으로 치환된다.

[0257] 소정의 실시형태에 있어서, 상기 세포독성 화합물은 하기 화학식들의 티올기를 보유하는 이민-함유 세포독성 화합물을 반응 혼합물 중에서 이민 반응성 시약과 반응시킴으로써 생성된다:

[0258] 

[0259] 소정의 실시형태에 있어서, 상기 방법은 단계 a) 전에 상기 세포독성 화합물을 정제시키는 단계를 추가로 포함할 수 있다.

[0260] 소정의 실시형태에 있어서, 상기 방법은 단계 b) 전에 상기 변형된 세포독성 화합물을 정제시키는 단계를 추가로 포함할 수 있다.

[0261] 소정의 실시형태에 있어서, 상기 반응 혼합물은 동결된 혼합물이 해동되어 단계 a)를 수행하기 전에 동결 상태로 보존된다.

[0262] 소정의 실시형태에 있어서, 상기 방법은 해동 전에 그리고 단계 b)가 수행되기 전에 단계 a)의 상기 반응 혼합물을 동결된 상태로 보존하는 단계를 추가로 포함할 수 있다.

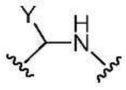
[0263] 소정의 실시형태에 있어서, 상기 이작용성 가교제는 비스-말레이미도헥산 또는 BMPEO이다.

[0264] 예시적인 반응식은 도 11에 도시되어 있고, 여기서 "단계 1"에서, 이민 반응성 시약(친핵체(Nuc:)로서 반응식 중에 표시됨)이 티올을 함유하는 세포독성 화합물에 첨가된다. 얻어진 세포독성 화합물은, 세포독성 화합물이 "단계 2"에서 이작용성 가교제(예컨대, 비스말레이미도헥산 또는 BMPEO)와 반응하여 티올-반응기를 보유하는 제2변형된 약물을 생성하기 전에, 선택적으로 정제된다. 이어서, "단계 3"에서, 티올-함유 CBA(예컨대, 항체)가 첨가되고, 그 반응은 (pH 6 내지 9에서) 진행되어 안정적인 약물-항체 컨쥬게이트를 생성한다. "단계 4"에서, 부산물(예컨대, 과잉의 이민 반응성 시약, 항체와 반응하지 않는 변형된 약물 등)이 제거되어 컨쥬게이트가 조제된다. 항체에 컨쥬게이트된 약물 분자의 수는 n이며, 이는 예를 들어 1 내지 10일 수 있다.

[0265] 이민 반응성 시약은 유기 용매(예컨대, 다이메틸아세트아마이드, 다이메틸포름아마이드, 다이메틸설폭사이드, 아세토나이트릴, 에탄올, 메탄올, 염화메틸렌, 클로로포름, 다이옥산, 또는 이들의 혼합물) 또는 물(예컨대, 탈이온수)과 1종 이상의 유기 용매의 혼합물 중에서 티올-반응성 기를 보유하는 약물과 혼합될 수 있다. 단지 유기 용매가 이용될 경우, 이민 반응성 시약은 실온에서 30분 이상(예를 들어, 약 1시간, 약 2시간, 약 3시간, 약 4시간, 약 5시간, 약 10시간, 약 24시간 또는 반응이 완결될 때까지) 동안 약물과 혼합될 수 있다. 바람직하게는, 인큐베이션/반응 시간은 약 0 내지 4시간 또는 1 내지 3시간이다. 얻어진 혼합물은 pH 약 4 내지 약 9, 바람직하게는 약 6 내지 약 9에서 완충된 티올-반응성 기로 변형된 세포 결합제(예컨대, 항체)와 즉시 반응하는데 이용될 수 있다. 대안적으로, 상기 혼합물은 예를 들어, -20℃ 또는 -80℃에서 동결되어 보존되고, 나중에 세포 결합제(예컨대, 항체)에 의해 그의 재활성을 유지하면서 이용될 수 있다. 물과 유기 용매(들)의 혼합물이 혼화성 공용매 시스템(예컨대, 물 및 다이메틸아세트아마이드)으로서 이용된다면, 상기 약물과 이민 반응성 시약의 반응 혼합물은 혼합 직후 이용되거나, 티올-반응성 기를 보유하는 세포 결합제와 반응하는데 이용될 때까지 동결 상태로 유지된다. 물과 유기 용매(들)의 혼합물이 비혼화성 공용매 시스템(예컨대, 물 및 염화메틸렌)으로서 이용된다면, 약물과 이민 반응성 시약은 10분 이상(예를 들어, 약 30분, 약 1시간, 약 2시간, 약 5시간, 약 10시간, 약 24시간 또는 반응이 완결될 때까지) 동안 혼합되고, 수층이 수집되며, 약물에 대해서 (예컨대, UV 분광법에 의해) 정량화되고, pH 약 4 내지 약 9, 바람직하게는 약 6 내지 약 9에서 완충된 티올기를 보유하는 세포 결합제(예컨대, 항체)에 첨가된다.

[0266] 추가의 양상에 있어서, 본 발명은 연결기에 의해 세포독성 화합물에 컨쥬케이트된 세포 결합제(CBA)를 포함하는 컨쥬게이트를 제조하는 방법에 관한 것으로, 해당 방법은 변형된 세포독성 화합물을 상기 CBA와 약 4 내지 약 9의 pH에서 반응시키는 단계를 포함하되, 이때 상기 변형된 세포독성 화합물은

[0267] a) 상기 세포독성 화합물에 결합된 이작용성 가교제의 잔기(상기 잔기는 상기 연결기 및 반응성 에스터와 티올-반응성 기로부터 선택된 반응성 기를 포함함) 및

[0268] b)  로 표시된 기를 포함한다:

[0269] 상기 표시된 기 중,

[0270] Y는 이탈기이고, 아황산염(HSO_3, HSO_2 또는 양이온과 함께 형성된 HSO_3^-, SO_3^{2-} 혹은 HSO_2^-의 염), 메타중아황산염($H_2S_2O_5$ 또는 양이온과 함께 형성된 $S_2O_5^{2-}$의 염), 모노-, 다이-, 트라이- 및 테트라-티오포스페이트(PO_3SH_3, $PO_2S_2H_2$, POS_3H_2, PS_4H_2 또는 양이온과 함께 형성된 PO_3S^{3-}, $PO_2S_2^{3-}$, POS_3^{3-} 혹은 PS_4^{3-}의 염), 티오포스페이트 에스터 $(R^iO)_2PS(OR^i)$, R^iS-, R^iSO, R^iSO_2, R^iSO_3, 티오설페이트(HS_2O_3 또는 양이온과 함께 형성된 $S_2O_3^{2-}$의 염), 다이티오나이트($H_2S_2O_4$ 또는 양이온과 함께 형성된 $S_2O_4^{2-}$의 염), 포스포로다이티오에이트($P(=S)(OR^{k'})(S)(OH)$ 또는 양이온과 함께 형성된 그의 염), 하이드록삼산($R^{k'}C(=O)NOH$ 또는 양이온과 함께 형성된 염), 포름알데하이드 설폭실레이트($HOCH_2SO_2^-$ 또는 $HOCH_2SO_2^-Na^+$ 등과 같은, 양이온과 함께 형성된 $HOCH_2SO_2^-$의 염) 또는 이들의 혼합물이며, 이때, R^i는 1 내지 10개의 탄소 원자를 지닌 직쇄 혹은 분지쇄 알킬이고 $-N(R^j)_2$, $-CO_2H$, $-SO_3H$ 및 $-PO_3H$로부터 선택된 적어도 하나의 치환기로 치환되며; R^i는 여기에 기재된 알킬기에 대해서 치환기로 더욱 선택적으로 치환될 수 있고; R^j는 1 내지 6개의 탄소 원자를 지니는 직쇄 혹은 분지쇄 알킬이며; $R^{k'}$는 1 내지 10개의 탄소 원자

를 지니는 직쇄, 분지쇄 혹은 환식 알킬, 알케닐 혹은 알키닐, 아릴, 헤테로사이클릴 또는 헤테로아릴이다.

[0271] 소정의 실시형태에 있어서, 상기 변형된 세포독성 화합물은, 이민 반응성 시약을, 상기 연결기 및 상기 반응성 기를 보유하는 이민-함유 세포독성 화합물과 반응시킴으로써 생성된다.

[0272] 소정의 실시형태에 있어서, 상기 방법은 상기 CBA와 반응시키기 전에 상기 변형된 세포독성 화합물을 정제시키는 단계를 추가로 포함할 수 있다.

[0273] 소정의 실시형태에 있어서, 상기 반응성 에스터는 N-하이드록시숙신이미드 에스터, N-하이드록시 설포숙신이미드 에스터, 나이트로페닐 에스터, 다이나이트로페닐 에스터, 테트라플루오로페닐 에스터, 설포-테트라플루오로페닐 에스터 및 펜타플루오로페닐 에스터로 이루어진 군으로부터 선택될 수 있다. 바람직하게는, 상기 반응성 에스터는 N-하이드록시숙신이미드 에스터이다.

[0274] 소정의 실시형태에 있어서, 상기 티올-반응성 기는 말레이미도, 비닐 피리딘, 비닐 설폰, 비닐 설폰아마이드, 할로아세틸계 기 및 다이설파이드 기로 이루어진 군으로부터 선택될 수 있다.

[0275] 소정의 실시형태에 있어서, 상기 티올-반응성 기는 말레이미도, 할로아세트아마이도 또는 $-SSR^d$일 수 있고, 이때 R^d는 1 내지 4개의 탄소 원자를 지니는 직쇄 혹은 분지쇄 알킬, 페닐, 나이트로페닐, 다이나이트로페닐, 카복시나이트로페닐, 피리딜, 2-나이트로피리딜, 4-나이트로피리딜 또는 3-카복시-4-나이트로피리딜이다.

[0276] 예시적인 반응식이 도 7에 도시되어 있으며, 여기서 "단계 1"에서, 이민 반응성 시약(친핵체(Nuc:)로서 반응식 중에 표시됨)이 반응성 에스터를 함유하는 약물(**1c**)에 첨가되어, 반응되어 변형된 약물을 형성한다. 변형된 약물은 선택적으로 정제되어 과잉의 이민 반응성 시약을 제거할 수 있다. "단계 2"에서, 반응성 에스터를 지닌 변형된 약물은 pH 6 내지 9에서 완충된 항체와 반응한다. "단계 3"에서, 부산물(예컨대, 과잉의 이민 반응성 시약, 항체와 반응하지 않는 변형된 약물 등)이 제거되고, 컨쥬게이트가 조제된다. 항체에 컨쥬게이트된 약물 분자의 수는 n이며, 이는 예를 들어 1 내지 10일 수 있다.

[0277] 본 발명의 예시적인 방법을 묘사한 다른 반응식이 도 9에 도시되어 있다. "단계 1"에서, 이민 반응성 시약이 티올-반응성 기를 포함하는 약물(여기서 R은 말레이미드기, SSPy 등)에 첨가되어 반응하여 변형된 약물을 형성한다. 변형된 약물은 선택적으로 정제되어 과잉의 이민 반응성 시약을 제거한다. "단계 2"에서, 변형된 약물은 반응성 티올을 포함하는 항체와 반응하여 안정적인 다이설파이드 혹은 티오에터 결합을 통해서 약물에 공유 결합된 항체를 지니는 항체-약물 컨쥬게이트를 형성한다. 반응성 티올기를 지니는 항체는 본 명세서에 기재된 방법에 의해, 예를 들어, 사슬간 다이설파이드를 환원시키거나 시스테인을 유전적으로 암호화하거나 또는 티올 혹은 화학적으로 마스킹된 티올을 포함하는 링커로 항체를 변형시킴으로써 생성될 수 있다. "단계 3"에서, 항체와 반응하지 않은 약물이 제거되어 컨쥬게이트가 조제된다. 항체에 컨쥬게이트된 약물 분자의 수는 n이며, 이는 예를 들어 1 내지 10일 수 있다.

[0278] 이민 반응성 시약은 유기 용매(예컨대, 다이메틸 아세트아마이드, 에탄올, 염화메틸렌, 클로로포름, 다이옥산, 또는 이들의 혼합물) 또는 물(예컨대, 탈이온수)과 1종 이상의 유기 용매의 혼합물 중에서 활성화된 에스터(예컨대, N-하이드록시숙신이미딜 에스터, 펜타플루오로페놀 에스터, 설포 N-하이드록시숙신이미딜 에스터)를 보유하는 약물과 혼합될 수 있다. 단지 유기 용매가 이용될 경우, 이민 반응성 시약은 0 내지 100℃의 온도에서, 바람직하게는 0 내지 30℃의 온도에서, 더 바람직하게는 실온에서 5분 이상(예를 들어, 약 30분, 1시간, 약 2시간, 약 3시간, 약 4시간, 약 5시간, 약 10시간, 약 24시간 또는 반응이 완결될 때까지) 동안 약물과 혼합될 수 있다. 바람직하게는, 인큐베이션/반응 시간은 약 0 내지 4시간, 또는 1 내지 3시간이다. 얻어지는 반응 혼합물은 pH 약 4 내지 약 9, 바람직하게는 약 6 내지 약 9에서 완충된 세포 결합제(예컨대, 항체)와 즉시 반응하는 데 이용될 수 있다. 대안적으로, 반응 혼합물은 예를 들어, -20℃ 또는 -80℃에서 동결되어 보존되고, 나중에 항체에 의해 그의 재활성을 유지하면서 이용될 수 있다. 물과 유기 용매(들)의 혼합물이 혼화성 공용매 시스템(예컨대, 물 및 다이메틸아세트아마이드)으로서 이용된다면, 상기 약물과 이민 반응 혼합물은 혼합 직후 이용되거나, 세포 결합제(예컨대, 항체)와 반응하기 위하여, 이용될 때까지 동결 상태로 유지된다. 물과 유기 용매의 혼합물이 비혼화성 공용매 시스템(예컨대, 물 및 염화메틸렌)으로서 이용된다면, 약물과 이민 반응성 시약은 10분 이상 동안 혼합되고, 수층이 수집되며, 약물에 대해서 정량화되고, pH 약 4 내지 약 9, 바람직하게는 약 6 내지 약 9에서 완충된 세포 결합제(예컨대, 항체)에 첨가된다.

[0279] 상기 양상들 중 어느 하나에 있어서, 적절한 양의 이민 반응성 시약이 이용될 수 있다. 예를 들어, 약물에 대해서 약 0.1 내지 약 30몰 당량의 이민 반응성 시약이 이용될 수 있다. 바람직하게는, 약 1 내지 약 10몰

당량, 더 바람직하게는, 약 1 내지 약 5몰 당량, 더욱더 바람직하게는 약 3 내지 약 5몰 당량의 이민 반응성 시약이 이용될 수 있다.

[0280] 이 일반적인 절차를 이용해서, 상기 양상들 중 어느 하나에 있어서, 이하의 2-이민 반응성 시약 중 어느 하나가 이용될 수 있다: 아황산염(H_2SO_3, H_2SO_2 또는 양이온과 함께 형성된 HSO_3^-, SO_3^{2-} 혹은 HSO_2^-의 염), 메타중아황산염($H_2S_2O_5$ 또는 양이온과 함께 형성된 $S_2O_5^{2-}$의 염), 모노, 다이, 트라이 및 테트라-티오포스페이트(PO_3SH_3, $PO_2S_2H_3$, POS_3H_3, PS_4H_3 또는 양이온과 함께 형성된 PO_3S^{3-}, $PO_2S_2^{3-}$, POS_3^{3-} 혹은 PS_4^{3-}의 염), 티오포스페이트 에스터($(R^iO)_2PS(OR^i)$, R^iSH, R^iSOH, R^iSO_2H, R^iSO_3H), 각종 아민류(하이드록실아민(예컨대, NH_2OH), 하이드라진(예컨대, NH_2NH_2), $NH_2O\text{-}R^i$, $R^{i'}NH\text{-}R^i$, $NH_2\text{-}R^i$), $NH_2\text{-}CO\text{-}NH_2$, $NH_2\text{-}C(=S)\text{-}NH_2$, 티오설페이트($H_2S_2O_3$ 또는 양이온과 함께 형성된 $S_2O_3^{2-}$의 염), 다이티오나이트($H_2S_2O_4$ 또는 양이온과 함께 형성된 $S_2O_4^{2-}$의 염), 포스포로다이티오에이트($P(=S)(OR^k)(SH)(OH)$ 또는 양이온과 함께 형성된 그의 염), 하이드록삼산($R^kC(=O)NHOH$ 또는 양이온과 함께 형성된 염), 하이드라자이드($R^kCONHNH_2$), 포름알데하이드 설폭실레이트($HOCH_2SO_2H$ 또는 $HOCH_2SO_2^-Na^+$ 등과 같은, 양이온과 함께 형성된 $HOCH_2SO_2^-$의 염), 당화 뉴클레오타이드(GDP-만노스 등), 플루다라빈 또는 이들의 혼합물, 이때, R^i 및 $R^{i'}$는 각각 독립적으로 1 내지 10개의 탄소 원자를 지닌 직쇄 혹은 분지쇄 알킬이고 $-N(R^j)_2$, $-CO_2H$, $-SO_3H$ 및 $-PO_3H$로부터 선택된 적어도 하나의 치환기로 치환되며; R^i 및 $R^{i'}$는 여기에 기재된 알킬기에 대해서 치환기로 더욱 선택적으로 치환될 수 있고; R^j는 1 내지 6개의 탄소 원자를 지니는 직쇄 혹은 분지쇄 알킬이며; R^k는 1 내지 10개의 탄소 원자를 지니는 직쇄, 분지쇄 혹은 환식 알킬, 알케닐 혹은 알키닐, 아릴, 헤테로사이클릴 또는 헤테로아릴이다(바람직하게는, R^k는 1 내지 4개의 탄소 원자를 지니는 직쇄 혹은 분지쇄 알킬이고; 더 바람직하게는, R^k는 메틸, 에틸 또는 프로필이다). 바람직하게는, 상기 양이온은 1가 양이온, 예컨대, Na^+ 또는 K^+이다.

[0281] 바람직하게는, 상기 이민 반응성 시약은 아황산염(예컨대, $NaHSO_3$ 또는 $KHSO_3$), 하이드록실아민, 하이드라진 및 유레아로부터 선택된다. 더 바람직하게는, 상기 이민 반응성 시약은 $NaHSO_3$ 또는 $KHSO_3$이다.

[0282] 일 실시형태에 있어서, 상기 양상들 중 어느 하나에 기재된 변형된 약물은 세포 결합제와 반응시키기 전에 정제된다. 당업계에 공지된 기타 적절한 방법은 변형된 약물을 정제시키는데 이용될 수 있다. 예를 들어, 변형된 약물은 칼럼 크로마토그래피(예컨대, 실리카겔 크로마토그래피) 또는 HPLC에 의해 정제될 수 있다.

[0283] 다른 실시형태에 있어서, 상기 양상들 중 어느 하나에 따라 제조된 세포 결합-약물 컨쥬게이트는 접선 유동 여과(tangential flow filtration), 흡착 크로마토그래피, 흡착 여과, 선택적 침전, 비흡수 여과 또는 이들의 조합에 의해 정제된다. 바람직하게는, 접선 유동 여과(TFF, 교차 유동 여과, 한외여가 및 투석으로도 알려짐) 및/또는 흡착 크로마토그래피 수지는 컨쥬게이트의 정제를 위하여 이용된다.

[0284] 펠리콘 타입 시스템(Pellicon type system)(Millipore, 매사추세츠주의 빌레리카시에 소재), 사토콘 카세트 시스템(Sartocon Cassette system)(Sartorius AG, 뉴욕주의 에지우드시에 소재) 및 센트라세트 타입 시스템(Centrasette type system)(Pall Corp., 뉴욕주의 이스트 힐즈시에 소재)을 비롯하여 임의의 적절한 TFF 시스템이 이용될 수 있다.

[0285] 임의의 적절한 흡착 크로마토그래피 수지가 이용될 수 있다. 바람직한 흡착 크로마토그래피 수지는 하이드록시아파타이트 크로마토그래피, 소수성 전하 유도크로마토그래피(hydrophobic charge induction chromatography: HCIC), 소수성 상호작용 크로마토그래피(hydrophobic interaction chromatography: HIC), 이온 교환 크로마토그래피, 혼합 모드 이온 교환 크로마토그래피, 고정화 금속 친화성 크로마토그래피(immobilized metal affinity chromatography: IMAC), 염료 리간드 크로마토그래피, 친화성 크로마토그래피, 역상 크로마토그래피, 및 이들의 조합을 위한 수지들을 포함한다. 적절한 하이드록시아파타이트 수지의 예는 세라믹 하이드록시아파타이트(CHT I형 및 II형, Bio-Rad Laboratories, 캘리포니아주의 에르쿨레스시에 소재), HA 울트로겔(Ultrogel) 하이드록시아파타이트(Pall Corp., 뉴욕주의 이스트 힐즈시에 소재), 및 세라믹 플루오로아파타이트(CFT I형 및 II형,

Bio-Rad Laboratories, 캘리포니아주의 에르쿨레스시에 소재)를 포함한다. 적절한 HCIC 수지의 예는 MEP 하이퍼셀(Hypercel) 수지(Pall Corp., 뉴욕주의 이스트 힐즈시에 소재)이다. 적절한 HIC 수지의 예는 뷰틸-세파로스(Sepharose), 헥실-세파로스, 페닐-세파로스 및 옥틸 세파로스 수지(모두 GE Healthcare로부터 입수가능, 뉴저지주의 피스카타웨이시에 소재)뿐만 아니라, 마크로-프렙(Macro-prep) 메틸 및 마크로-프렙 t-뷰틸 수지(Biorad Laboratories, 캘리포니아주의 에르쿨레스시에 소재)를 포함한다. 적절한 이온 교환 수지의 예는 SP-세파로스 수지, CM-세파로스 수지 및 Q-세파로스 수지(모두 GE Healthcare로부터 입수가능, 뉴저지주의 피스카타웨이시에 소재), 그리고 우노스피어(Unosphere) S 수지(Bio-Rad Laboratories, 캘리포니아주의 에르쿨레스시에 소재)를 포함한다. 적절한 혼합 모드 이온 교환체의 예는 베이커본드(Bakerbond ABx) ABx 수지(JT Baker, 뉴저지주의 필스버스시에 소재)를 포함한다. 적절한 IMAC 수지의 예는 킬레이팅 세파로스 수지(Chelating Sepharose resin)(GE Healthcare, 뉴저지주의 피스카타웨이시에 소재) 및 프로피니티(Profinity) IMAC 수지(Bio-Rad Laboratories, 캘리포니아주의 에르쿨레스시에 소재)를 포함한다. 적절한 염료 리간드 수지의 예는 블루 세파로스 수지(Blue Sepharose resin)(GE Healthcare, 뉴저지주의 피스카타웨이시에 소재) 및 아피-겔 블루 수지(Affi-gel Blue resin)(Bio-Rad Laboratories, 캘리포니아주의 에르쿨레스시에 소재)를 포함한다. 적절한 친화성 수지의 예는 단백질 A 세파로스 수지(예컨대, MabSelect, GE Healthcare, 뉴저지주의 피스카타웨이시에 소재)(여기서 세포 결합제는 항체임), 및 렉틴 친화성 수지, 예를 들어, 렌틸 렉틴 세파로스 수지(Lentil Lectin Sepharose resin)(GE Healthcare, 뉴저지주의 피스카타웨이시에 소재)(여기서 세포 결합제는 적절한 렉틴 결합 부위들을 보유함)를 포함한다. 대안적으로, 세포 결합제에 특이적인 항체가 이용될 수 있다. 이러한 항체는, 예를 들어, 세파로스 4 패스트 플로 수지(Sepharose 4 Fast Flow resin)(GE Healthcare, 뉴저지주의 피스카타웨이시에 소재)에 고정화될 수 있다. 적절한 역상 수지의 예는 C4, C8 및 C18 수지(Grace Vydac, 캘리포니아주의 헤스페리아시에 소재)를 포함한다.

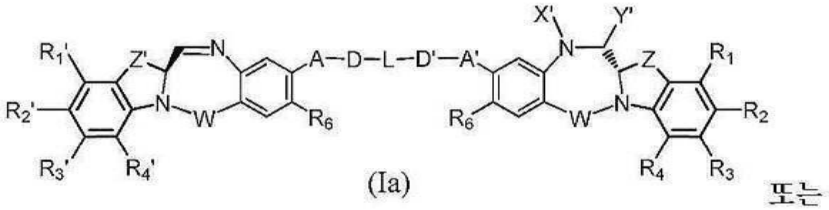
[0286] 임의의 적절한 비흡수 크로마토그래피 수지가 본 발명의 방법에 이용될 수 있다. 적절한 크로마토그래피 수지의 예는, 세파덱스(SEPHADEX)(상표명) G-25, G-50, G-100, 세파크릴(SEPHACRYL)(상표명) 수지(예컨대, S-200 및 S-300), 수퍼덱스(SUPERDEX)(상표명) 수지(예컨대, 수퍼덱스(SUPERDEX)(상표명) 75 및 수퍼덱스(SUPERDEX)(상표명) 200), 바이오-겔(BIO-GEL)(등록상표) 수지(예컨대, P-6, P-10, P-30, P-60 및 P-100), 및 기타 당업자에게 공지된 것들을 포함하지만, 이들로 제한되는 것은 아니다.

[0287] **연결 모이어티를 보유하는 약물**

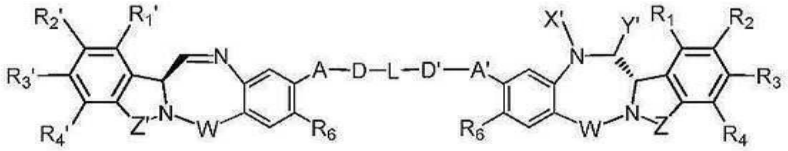
[0288] 본 방법에 이용될 수 있는 약물은 US2010/0316656, US 2010/003641, US2010/0203007에 기재된 화합물을 포함하며, 이들 문헌은 모두 참조로 본 명세서에 포함된다.

[0289] 소정의 다른 실시형태에 있어서, 연결기를 통해서 세포 결합제와 컨쥬게이트될 수 있는 세포독성 화합물은 상기 연결기를 포함하지 않는다. 대신에, 이작용성 가교 시약(상기 연결기를 포함함)은 링커없는 세포독성 화합물을 링커기를 통해서 CBA와 컨쥬게이트하는데 필요로 될 수 있다.

[0290] 이와 같이 해서, 제1특정 실시형태에 있어서, 반응성 기와 결합된 연결기에 공유 결합된 약물(본 발명의 방법에서(예컨대, 상기 본 발명의 제4양상에 기재된 바와 같은 1-단계 시약 방법에서) 이용될 수 있거나, 본 발명의 방법(예컨대, 본 발명의 제3양상에 기재된 방법)의 중간 생성물일 수 있음)은, CBA에 세포독성 화합물을 공유 결합할 수 있는, 반응성 기가 결합되는 연결기를 포함하는, 반응성 기, 예컨대, 반응성 에스터 혹은 티올-반응성 기(일괄적으로 "반응성 기")를 보유하는 반응성 기이며, 여기서 상기 세포독성 화합물은 이하의 화학식들 또는 그의 약제학적으로 허용가능한 염 중 어느 하나로 표시될 수 있다:



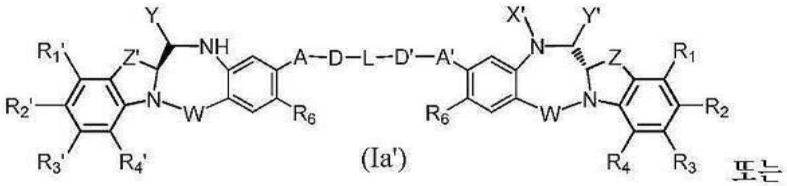
(Ia) 또는



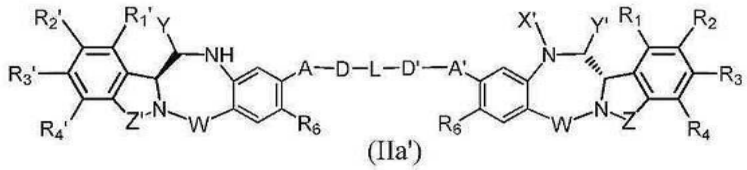
(IIa)

[0291] .

[0292] 이민 반응성 시약과 반응 시, 세포독성 화합물은 이하의 화학식들 중 하나로 표시될 수 있다:



(Ia') 또는



(IIa')

[0293]

[0294] 식 중,

[0295] Y는 아황산염(HSO_3^-, HSO_2^- 또는 양이온과 함께 형성된 HSO_3^-, SO_3^{2-} 혹은 HSO_2^-의 염), 메타중아황산염($H_2S_2O_5$ 또는 양이온과 함께 형성된 $S_2O_5^{2-}$의 염), 모노-, 다이-, 트라이- 및 테트라-티오포스페이트(PO_3SH_3, $PO_2S_2H_2$, POS_3H_2, PS_4H_2 또는 양이온과 함께 형성된 PO_3S^{3-}, $PO_2S_2^{3-}$, POS_3^{3-} 혹은 PS_4^{3-}의 염), 티오포스페이트 에스터 $(R^iO)_2PS(OR^i)$, R^iS^-, R^iSO^-, $R^iSO_2^-$, $R^iSO_3^-$, 티오설페이트($HS_2O_3^-$ 또는 양이온과 함께 형성된 $S_2O_3^{2-}$의 염), 다이티오나이트($H_2S_2O_4$ 또는 양이온과 함께 형성된 $S_2O_4^{2-}$의 염), 포스포로다이티오에이트($P(=S)(OR^{k'})(S)(OH)$ 또는 양이온과 함께 형성된 그의 염), 하이드록삼산($R^{k'}C(=O)NOH$ 또는 양이온과 함께 형성된 염), 포름알데하이드 설폭실레이트($HOCH_2SO_2^-$ 또는 $HOCH_2SO_2^-Na^+$ 등과 같은, 양이온과 함께 형성된 $HOCH_2SO_2^-$의 염) 또는 이들의 혼합물이되, 이때, R^i는 1 내지 10개의 탄소 원자를 지닌 직쇄 혹은 분지쇄 알킬이고 $-N(R^j)_2$, $-CO_2H$, $-SO_3H$ 및 $-PO_3H$로부터 선택된 적어도 하나의 치환기로 치환되며; R^i는 여기에 기재된 알킬기에 대해서 치환기로 더욱 선택적으로 치환될 수 있고; R^j는 1 내지 6개의 탄소 원자를 지니는 직쇄 혹은 분지쇄 알킬이며; $R^{k'}$는 1 내지 10개의 탄소 원자를 지니는 직쇄, 분지쇄 혹은 환식 알킬, 알케닐 혹은 알키닐, 아릴, 헤테로사이클릴 또는 헤테로아릴이고;

[0296] X'는 -H, -OH, 아민-보호기, 상기 반응성 기가 결합된 상기 연결기, 1 내지 10개의 탄소 원자를 지니는 선택적으로 치환된 직쇄, 분지쇄 혹은 환식 알킬, 알케닐 혹은 알키닐, 폴리에틸렌 글라이콜 단위 $-(CH_2CH_2O)_n-R^c$, 6 내지 18개의 탄소 원자를 지니는 선택적으로 치환된 아릴, 질소, 산소 및 황으로부터 독립적으로 선택된 1개 이상의 헤테로원자를 함유하는 선택적으로 치환된 5- 내지 18-원 헤테로아릴 고리, 및 O, S, N 및 P로부터 독립적으로 선택된 1 내지 6개의 헤테로원자를 함유하는 선택적으로 치환된 3- 내지 18-원 헤테로사이클릭 고리로부터 선택되며;

[0297] Y'는 -H, 옥소기, 상기 반응성 기가 결합된 상기 연결기, 1 내지 10개의 탄소 원자를 지니는 선택적으로 치환된

직쇄, 분지쇄 혹은 환식 알킬, 알케닐 혹은 알키닐, 선택적으로 치환된 6- 내지 18-원 아릴, 질소, 산소 및 황으로부터 독립적으로 선택된 1개 이상의 헤테로원자를 함유하는 선택적으로 치환된 5- 내지 18-원 헤테로아릴 고리, 1 내지 6개의 헤테로원자를 지니는 선택적으로 치환된 3- 내지 18-원 헤테로사이클릭 고리로부터 선택되고;

[0298] R^c는 -H 또는 1 내지 4개의 탄소 원자를 지니는 치환 혹은 비치환된 직쇄 혹은 분지쇄 알킬 또는 상기 반응성 기가 결합된 상기 연결기이며;

[0299] R_1, R_2, R_3, R_4, R_1', R_2', R_3' 및 R_4'는, 각각 독립적으로 -H, 1 내지 10개의 탄소 원자를 지니는 선택적으로 치환된 직쇄, 분지쇄 혹은 환식 알킬, 알케닐 혹은 알키닐, 폴리에틸렌 글라이콜 단위 $-(OCH_2CH_2)_n-R^c$, 할로겐, 구아니디늄[$-NH(C=NH)NH_2$], -OR, $-NR'R''$, $-NO_2$, -NCO, $-NR'COR''$, -SR, -SOR'로 표시되는 설폭사이드, $-SO_2R'$로 표시되는 설폰, 설포네이트 $-SO_3^-M^+$, 설페이트 $-OSO_3^-M^+$, $-SO_2NR'R''$로 표시되는 설폰아마이드, 사이아노, 아자이도, -COR', -OCOR', $-OCONR'R''$ 및 상기 반응성 기가 결합된 상기 연결기로 이루어진 군으로부터 선택되고;

[0300] R은, 각 경우에, 독립적으로 -H, 1 내지 10개의 탄소 원자를 지니는 선택적으로 치환된 직쇄, 분지쇄 혹은 환식 알킬, 알케닐 혹은 알키닐, 폴리에틸렌 글라이콜 단위 $-(CH_2CH_2O)_n-R^c$, 6 내지 18개의 탄소 원자를 지니는 선택적으로 치환된 아릴, 질소, 산소 및 황으로부터 독립적으로 선택된 1개 이상의 헤테로원자를 함유하는 선택적으로 치환된 5- 내지 18-원 헤테로아릴 고리, 또는 O, S, N 및 P로부터 독립적으로 선택된 1 내지 6개의 헤테로원자를 함유하는 선택적으로 치환된 3- 내지 18-원 헤테로사이클릭 고리로 이루어진 군으로부터 선택되며;

[0301] R' 및 R''는 각각 독립적으로 -H, -OH, -OR, -NHR, $-NR_2$, -COR, 1 내지 10개의 탄소 원자를 지니는 선택적으로 치환된 직쇄, 분지쇄 혹은 환식 알킬, 알케닐 혹은 알키닐, 폴리에틸렌 글라이콜 단위 $-(CH_2CH_2O)_n-R^c$, 및 O, S, N 및 P로부터 독립적으로 선택된 1 내지 6개의 헤테로원자를 지니는 선택적으로 치환된 3- 내지 18-원 헤테로사이클릭 고리로부터 선택되고;

[0302] n은 1 내지 24의 정수이며;

[0303] W는 C=O, C=S, CH_2, BH, SO 및 SO_2로부터 선택되고;

[0304] R_6은 -H, -R, -OR, -SR, $-NR'R''$, $-NO_2$, 할로겐 또는 상기 반응성 기가 결합된 상기 연결기이며;

[0305] Z 및 Z'는 독립적으로 $-(CH_2)_{n'}-$, $-(CH_2)_{n'}-CR_7R_8-(CH_2)_{na'}-$, $-(CH_2)_{n'}-NR_9-(CH_2)_{na'}-$, $-(CH_2)_{n'}-O-(CH_2)_{na'}-$ 및 $-(CH_2)_{n'}-S-(CH_2)_{na'}-$로부터 선택되고;

[0306] n' 및 na'는 동일 또는 상이하고, 또한 0, 1, 2 및 3으로부터 선택되며;

[0307] R_7 및 R_8은 동일 또는 상이하고, 또한 각각 독립적으로 -H, -OH, -SH, -COOH, -NHR', 폴리에틸렌 글라이콜 단위 $-(OCH_2CH_2)_n-$, 아미노산, 2 내지 6개의 아미노산을 보유하는 펩타이드 단위, 1 내지 10개의 탄소 원자를 지니는 선택적으로 치환된 직쇄, 분지쇄 혹은 환식 알킬로부터 선택되며;

[0308] R_9는 독립적으로 -H, 1 내지 10개의 탄소 원자를 지니는 선택적으로 치환된 직쇄, 분지쇄 혹은 환식 알킬, 폴리에틸렌 글라이콜 단위 $-(OCH_2CH_2)_n-$으로부터 선택되고;

[0309] A 및 A'는 동일 또는 상이하고, 또한 독립적으로 -O-, 옥소(-C(=O)-), -CRR'O-, -CRR'-, -S-, -CRR'S-, $-N(R_5)-$ 및 $-CRR'N(R_5)-$로부터 선택되며;

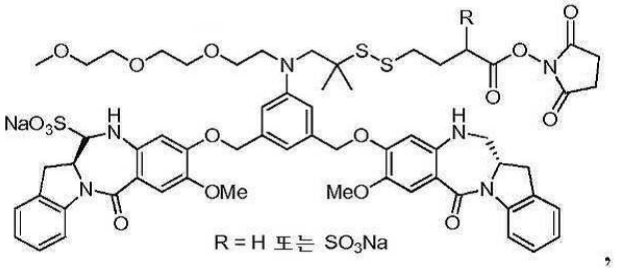
[0310] R_5는 각 경우에 독립적으로 -H 또는 1 내지 10개의 탄소 원자를 지니는 선택적으로 치환된 직쇄 혹은 분지쇄 알킬이고;

[0311] D 및 D'는 동일 또는 상이하고, 또한 독립적으로 존재하지 않거나 또는 1 내지 10개의 탄소 원자를 지니는 선택적으로 치환된 직쇄, 분지쇄 혹은 환식 알킬, 알케닐 혹은 알키닐, 아미노산, 2 내지 6개의 아미노산을 보유하는 펩타이드 및 폴리에틸렌 글라이콜 단위 $(-OCH_2CH_2)_n-$으로 이루어진 군으로부터 선택되며;

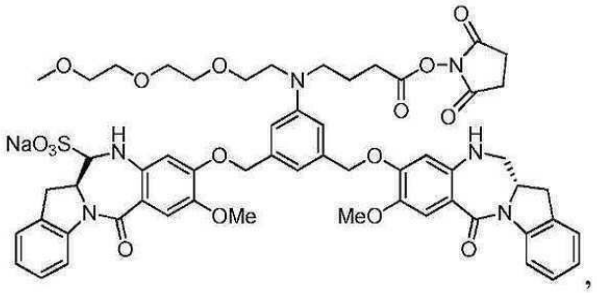
[0312] L은 존재하지 않거나, 상기 반응성 기가 결합된 상기 연결기, 폴리에틸렌 글라이콜 단위 $(-OCH_2CH_2)_n-$, 1 내지 10개의 탄소 원자를 지니는 직쇄, 분지쇄 혹은 환식 알킬 혹은 알케닐, 페닐기, O, S, N 및 P로부터 독립적으로 선택된 1 내지 6개의 헤테로원자를 지니는 3 내지 18-원 헤테로사이클릭 고리 또는 5- 내지 18-원 헤테로아릴 고리이되, 이때 상기 알킬 또는 알케닐은 상기 반응성 기가 결합된 상기 연결기에 의해 선택적으로 치환되고; 페닐 또는 헤테로사이클릭 또는 헤테로아릴 고리는 선택적으로 치환될 수 있으며, 여기서 상기 치환기는 상기 반응성 기가 결합된 상기 연결기일 수 있다.

[0313] 바람직하게는, L은 존재하지 않거나, 또는 선택적으로 치환된 페닐기 및 선택적으로 치환된 피리딜기로부터 선택되되, 이때 상기 페닐 및 상기 피리딜기는 상기 반응성 기가 결합된 상기 연결기를 보유하거나, 또는 L은 상기 반응성 기가 결합된 상기 연결기(즉, -N(연결기)-)를 보유하는 아민기이거나, 또는 L은 1 내지 6개의 탄소 원자를 지니면서 상기 반응성 기가 결합된 상기 연결기를 보유하는 직쇄, 분지쇄 혹은 환식 알킬 또는 알케닐이다.

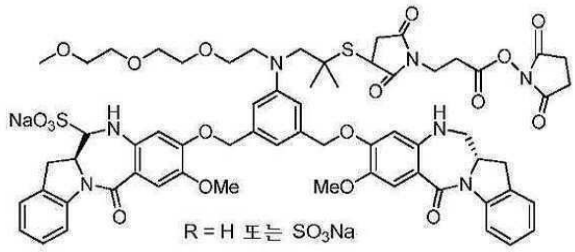
[0314] 화학식 Ia' 및 IIa'의 일부 대표적인 화합물은 이하에 열거되어 있다:

[0315] 

,



,

[0316] 

[0317] 소정의 실시형태에 있어서,

[0318] X'는 -H, -OH, 1 내지 10개의 탄소 원자를 지니는 선택적으로 치환된 직쇄, 분지쇄 혹은 환식 알킬, 알케닐 혹은 알키닐, 페닐, 상기 반응성 기가 결합된 상기 연결기 및 아민-보호기로부터 선택된다. 바람직하게는, X'는 -H, -OH, -Me 또는 상기 반응성 기가 결합된 상기 연결기이다. 더 바람직하게는, X'는 -H로 이루어진 군으로부터 선택된다;

[0319] Y'는 -H, 옥소기, 1 내지 10개의 탄소 원자를 지닌 치환된 혹은 비치환된 직쇄, 분지쇄 혹은 환식 알킬, 알케닐 혹은 알키닐로 이루어진 군으로부터 선택된다. 바람직하게는, Y'는 -H 또는 옥소로부터 선택된다. 더 바람직하게는, Y'는 -H이다;

[0320] W는 C=O이다;

[0321] R_1, R_2, R_3, R_4, R_1', R_2', R_3' 및 R_4'는 각각 독립적으로 -H, -NR'R'', -NR (C=O)R, -OR, -SR, $-NO_2$ 및 상기 반응성 기가 결합된 상기 연결기로부터 선택된다. 바람직하게는, R_2, R_3, R_2' 및 R_3' 중 하나는 상기 반응성 기가

결합된 상기 연결기이고, 나머지는 -H이다;

[0322] R은, 각 경우에, 독립적으로 -H, 1 내지 10개의 탄소 원자를 지니는 선택적으로 치환된 직쇄, 분지쇄 혹은 환식 알킬, 알케닐 혹은 알키닐 또는 페닐로 이루어진 군으로부터 선택된다;

[0323] R' 및 R''는 동일 또는 상이하고, 또한 독립적으로 -H, -OH, -OR, 1 내지 10개의 탄소 원자를 지니는 선택적으로 치환된 직쇄, 분지쇄 혹은 환식 알킬, 알케닐 혹은 알키닐 또는 페닐로부터 선택된다;

[0324] R_6은 $-OR^c$ 또는 $-SR^c$이되, 이때 R^c는 -H, 1 내지 4개의 탄소 원자를 지니는 직쇄 혹은 분지쇄 알킬이다. 바람직하게는, R_6은 -OMe 또는 -SMe이다. 더욱더 바람직하게는, R_6은 -OMe이다;

[0325] Z 및 Z'는 $-CH_2-$이다;

[0326] A 및 A'는 동일 또는 상이하고, 또한 -O-, -S-, $-NR_5$ 및 옥소(C=O)로부터 선택된다. 바람직하게는, A 및 A'는 동일 또는 상이하고, 또한 -O- 및 -S-로부터 선택된다. 더 바람직하게는, A 및 A'는 -O-이다;

[0327] D 및 D'는 동일 또는 상이하고, 또한 독립적으로 폴리에틸렌 글라이콜 단위 $(-OCH_2CH_2)_n$(이때, n은 1 내지 24의 정수임), 아미노산, 2 내지 6개의 아미노산을 보유하는 펩타이드, 또는 1 내지 10개의 탄소 원자를 지니는 직쇄, 분지쇄 혹은 환식 알킬, 알케닐 혹은 알키닐로부터 선택되되, 상기 알킬, 알케닐 및 알키닐은 할로겐, -OR, -NR'COR'', -SR 및 -COR'로 이루어진 군으로부터 독립적으로 선택된 1개 이상(예컨대, 2, 3, 4, 5, 6 또는 그 이상)으로 선택적으로 치환된다;

[0328] 바람직하게는, D 및 D'는 동일 또는 상이하고, 또한 독립적으로 1 내지 10개의 탄소 원자를 지니는 직쇄, 분지쇄 혹은 환식 알킬, 알케닐 혹은 알키닐로부터 선택된다. 더 바람직하게는, D 및 D'는 1 내지 4개의 탄소 원자를 보유하는 직쇄 혹은 분지쇄 알킬이다. 더더욱 바람직하게는, D 및 D'는 동일 또는 상이하고, 또한 1 내지 4개의 탄소 원자를 지니는 직쇄 알킬로부터 선택된다;

[0329] L은 존재하지 않거나, 또는 선택적으로 치환된 페닐기 및 선택적으로 치환된 피리딜기로부터 선택되되, 이때 상기 페닐 및 상기 피리딜기는 상기 반응성 기가 결합된 상기 연결기를 보유하거나, 또는 L은 상기 반응성 기가 결합된 상기 연결기(즉, -N (연결기)-)를 보유하는 아민기이거나, 또는 L은 1 내지 6개의 탄소 원자를 지니면서 상기 반응성 기가 결합된 상기 연결기를 보유하는 직쇄, 분지쇄 혹은 환식 알킬 또는 알케닐이다.

[0330] 제2특정 실시형태에 있어서, 세포독성 이량체 Ia 또는 IIa에 대해서, 변수는 이하에 기재된 바와 같다:

[0331] W는 C=O이고;

[0332] R_1, R_2, R_1', R_2', R_4 및 R_4'는 -H이며;

[0333] R_3 또는 R_3' 중 한쪽은 선택적으로 상기 반응성 기가 결합된 상기 연결기이고 다른 쪽은 -H이며;

[0334] R_6은 -OMe이고;

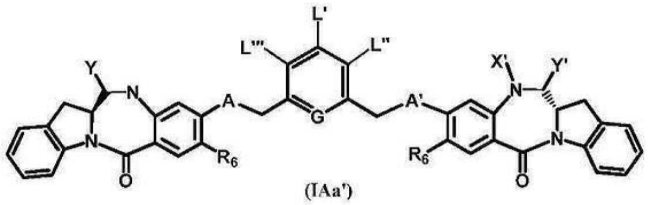
[0335] Z 및 Z'는 $-CH_2-$이며;

[0336] X'는 -H이고;

[0337] Y'는 -H이며;

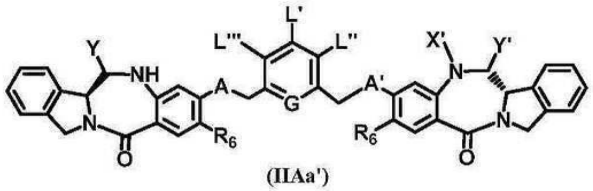
[0338] A 및 A'는 -O-이고; 나머지 변수들은 제1특정 실시형태에 기재된 바와 같다.

[0339] 제3특정 실시형태에 있어서, 화학식 Ia' 또는 IIa'의 상기 세포독성 이량체(반응성 기가 부착된 상기 연결기에 결합됨)는 이하의 화학식들로 표시된다:



(IAa')

;



(IIAa')

[0340]

[0341] 식 중,

[0342] X'는 -H, -OH, 1 내지 10개의 탄소 원자를 지닌 치환된 혹은 비치환된 직쇄, 분지쇄 혹은 환식 알킬, 알케닐 혹은 알키닐, 페닐 및 아민-보호기로 이루어진 군으로부터 선택된다. 바람직하게는, X'는 -H, -OH 또는 -Me이다. 더 바람직하게는, X'는 -H이다;

[0343] Y'는 -H, 옥소기, 1 내지 10개의 탄소 원자를 지닌 치환된 혹은 비치환된 직쇄, 분지쇄 혹은 환식 알킬, 알케닐 혹은 알키닐로 이루어진 군으로부터 선택된다. 바람직하게는, Y'는 -H 또는 -Me로부터 선택된다. 더 바람직하게는 Y'는 -H이다;

[0344] L', L'' 및 L'''는 동일 또는 상이하고, 또한 독립적으로 -H, 1 내지 10개의 탄소 원자를 지니는 선택적으로 치환된 직쇄, 분지쇄 혹은 환식 알킬, 알케닐 혹은 알키닐, 폴리에틸렌 글라이콜 단위 $-(OCH_2CH_2)_n-R^c$, 할로겐, 구아니디늄[$-NH(C=NH)NH_2$], -OR, -NR'R'', $-NO_2$, -NR'COR'', -SR, -SOR'로 표시되는 설폭사이드, $-SO_2R'$로 표시되는 설폰, 설포네이트 $-SO_3^-M^+$, 설페이트 $-OSO_3^-M^+$, $-SO_2NR'R''$로 표시되는 설폰아마이드, 사이아노, 아자이도, -COR', -OCOR', -OCONR'R'' 및 상기 반응성 기가 결합된 상기 연결기로부터 선택되며, 단, L', L'' 및 L''' 중 단지 하나는 상기 반응성 기가 결합된 상기 연결기이다. 바람직하게는, L'는 상기 반응성 기가 결합된 상기 연결기이다. 대안적으로, L', L'' 또는 L''' 중 하나는 상기 반응성 기가 결합된 상기 연결기인 한편, 나머지는 -H이다. 더 바람직하게는, L'는 상기 반응성 기가 결합된 상기 연결기이고, L'' 및 L'''는 -H이다;

[0345] R_6은 $-OR^c$ 또는 $-SR^c$이되, R^c는 1 내지 4개의 탄소 원자를 지니는 직쇄 혹은 분지쇄 알킬이다. 바람직하게는, R_6은 -OMe 또는 -SMe이다. 더욱더 바람직하게는, R_6은 - OMe이다;

[0346] A 및 A'는 -O- 및 -S-로부터 선택된다. 바람직하게는, A 및 A'는 -O-이다;

[0347] R은 -H, 1 내지 10개의 탄소 원자를 지니는 선택적으로 치환된 직쇄, 분지쇄 혹은 환식 알킬, 알케닐 혹은 알키닐 또는 PEG기 $(CH_2CH_2O)_n-R^c$이다;

[0348] n은 1 내지 24의 정수이다;

[0349] R^c는 1 내지 4개의 탄소 원자를 지니는 직쇄 혹은 분지쇄 알킬이다;

[0350] R' 및 R''는 동일 또는 상이하고, 또한 -H, -OH, -OR, $-NRR^{g'}$, -COR, 1 내지 10개의 탄소 원자를 지니는 선택적으로 치환된 직쇄, 분지쇄 혹은 환식 알킬, 알케닐 혹은 알키닐, 6 내지 18개의 탄소 원자를 지니는 선택적으로 치환된 아릴, O, S, N 및 P로부터 선택된 1 내지 6개의 헤테로원자를 지니는 선택적으로 치환된 3- 내지 18-원 헤테로사이클릭 고리, PEG기 $-(CH_2CH_2O)_n-R^c$로부터 선택되되, 이때 n은 1 내지 24의 정수이고, 바람직하게는 n은 2, 4 또는 8이며; $R^{g'}$는 -H, 1 내지 10개의 탄소 원자를 지니는 선택적으로 치환된 직쇄, 분지쇄 혹은 환식 알킬, 알케닐 혹은 알키닐 또는 PEG기 $(CH_2CH_2O)n-R^c$이다;

[0351] G는 -CH- 또는 -N-으로부터 선택되고; 나머지 변수는 제1특정 실시형태에 기재된 바와 같다.

[0352] 제4특정 실시형태에 있어서, 화학식 IAa' 또는 IIAa'의 세포독성 이량체에 대해서, L'는 이하의 화학식으로 표시된다:

[0353] $-W'-R^x-V-R^y-J$

[0354] 식 중,

[0355] W' 및 V는 동일 또는 상이하고, 또한 각각 독립적으로 존재하지 않거나, 또는 $-CR^eR^{e'}$, -O-, -O-C(=O)-, -C(=O)-O-, -S-, -SO-, $-SO_2-$, $-CH_2-S-$, $-CH_2O-$, $-CH_2NR^e-$, -O-(C=O)O-, -O-(C=O)N(R^e)-, -N(R^e)-, -N(R^e)-C(=O)-, -C(=O)-N(R^e)-, -N(R^e)-C(=O)O-, -N(C(=O)R^e)C(=O)-, -N(C(=O)R^e)-, $-(O-CH_2-CH_2)_n-$, -SS- 또는 -C(=O)-, 또는 아미노산, 또는 2 내지 8개의 아미노산을 지니는 펩타이드로부터 선택되며;

[0356] R^x 및 R^y는 동일 또는 상이하고, 또한 각각 독립적으로 존재하지 않거나, 또는 1 내지 10개의 탄소 원자를 지니는 선택적으로 치환된 직쇄, 분지쇄 혹은 환식 알킬, 알케닐 혹은 알키닐, 6 내지 10개의 탄소 원자를 보유하는 아릴 또는 O, N 혹은 S로부터 선택된 1 내지 3개의 헤테로원자를 보유하는 3- 내지 8-원 헤테로사이클릭 고리이며;

[0357] R^e 및 $R^{e'}$는 동일 또는 상이하고, 또한 -H, 1 내지 10개의 탄소 원자를 지니는 직쇄, 분지쇄 혹은 환식 알킬, 알케닐 혹은 알키닐 또는 $-(CH_2-CH_2-O)_n-R^k$로부터 선택되되, 이때 R^k는 -H, 2차 아미노(예컨대, $-NHR^{101}$) 혹은 3차 아미노($-NR^{101}R^{102}$) 기를 선택적으로 보유하는 1 내지 6개의 탄소 원자를 지니는 직쇄, 분지쇄, 환식 알킬 또는 5- 혹은 6-원 질소 함유 헤테로사이클, 예컨대, 피페리딘 또는 몰폴린이며, 여기서 R^{101} 및 R^{102}는 각각 독립적으로 1 내지 10개의 탄소 원자를 지니는 직쇄, 분지쇄 혹은 환식 알킬, 알케닐 혹은 알키닐이고; 바람직하게는, R^{101} 및 R^{102}는 각각 독립적으로 1 내지 6개의 탄소 원자를 지닌 직쇄 혹은 분지쇄 알킬이며;

[0358] n은 1 내지 24의 정수이고;

[0359] J는 이에 결합된 상기 반응성 기를 포함하고, 말레이미드, 할로아세트아마이도, -SH, $-SSR^d$, $-CH_2SH$, $-CH(Me)SH$, $-C(Me)_2SH$ 및 -COE로부터 선택되되, 이때, -COE는 N-하이드록시숙신이미드 에스터, N-하이드록시 설포숙신이미드 에스터, 나이트로페닐(예컨대, 2 혹은 4-나이트로페닐) 에스터, 다이나이트로페닐(예컨대, 2,4-다이나이트로페닐) 에스터, 설포-테트라플루오로페닐(예컨대, 4-설포-2,3,5,6-테트라플루오로페닐) 에스터 및 펜타플루오로페닐 에스터로부터 선택되지만 이들로 제한되는 것은 아닌 반응성 에스터를 나타내며, 여기서 R^{c1}은 -H 또는 1 내지 4개의 탄소 원자를 지니는 치환 혹은 비치환된 직쇄 혹은 분지쇄 알킬이고,

[0360] R^d는 페닐, 나이트로페닐(예컨대, 2 혹은 4-나이트로페닐), 다이나이트로페닐(예컨대, 2 혹은 4-나이트로페닐), 카복시나이트로페닐(예컨대, 3-카복시-4-나이트로페닐), 피리딜 또는 나이트로피리딜(예컨대, 4-나이트로피리딜)로부터 선택된다.

[0361] 바람직하게는, J는 -SH, $-SSR^d$, 말레이미드 또는 N-하이드록시숙신이미드 에스터이다.

[0362] 바람직하게는, $R^{e'}$는 -H 또는 -Me이고; R^e는 1 내지 6개의 탄소 원자를 지니는 직쇄 혹은 분지쇄 알킬 또는 $-(CH_2-CH_2-O)_n-R^k$이며; n은 2 내지 8의 정수이고; 바람직하게는 R^k는 -H, -Me 또는 $-CH_2CH_2-NMe_2$이고, 변수의 나머지는 제3 특정 실시형태에서 위에 기재된 바와 같다.

[0363] 다른 바람직한 실시형태에 있어서, V는 아미노산 또는 2 내지 8개의 아미노산을 지니는 펩타이드이다. 더 바람직하게는, V는 발린-시트룰린, gly-gly-gly 또는 ala-leu-ala-leu이다.

[0364] 다른 바람직한 실시형태에 있어서, W'는 -O-, -N(R^e)- 또는 -N(R^e)-C(=O)-이고; R^e는 -H, 1 내지 4개의 탄소 원

자를 지니는 직쇄 혹은 분지쇄 알킬 또는 $-(CH_2-CH_2-O)_n-R^k$이며; R^x는 1 내지 6개의 탄소 원자를 지닌 직쇄 혹은 분지쇄 알킬이고; V는 존재하지 않거나, $-(O-CH_2-CH_2)_n-$, -C(=O)-NH-, -S-, -NH-C(=O)-이며; R^y는 존재하지 않거나, 또는 1 내지 4개의 탄소 원자를 지니는 직쇄 혹은 분지쇄 알킬이고; J는 -SH, $-SSR^d$ 또는 -COE(바람직하게는, N-하이드록시숙신이미드 에스터)이다. 나머지 변수들은 제4특정 실시형태에 기재된 바와 같다.

[0365] 다른 바람직한 실시형태에 있어서, W'는 -O-, $-N(R^e)-$ 또는 $-N(R^e)-C(=O)-$이고; R^e는 H, -Me 또는 $-(CH_2-CH_2-O)_n-Me$이며; n은 2 내지 6의 정수이고; R^x는 1 내지 6개의 탄소 원자를 보유하는 직쇄 혹은 분지쇄 알킬이며; V 및 R^y는 존재하지 않고; J는 -COE, 바람직하게는 N-하이드록시숙신이미드 에스터이다.

[0366] 제5특정 실시형태에 있어서, L'는 이하의 화학식으로 표시된다:

[0367] $$-W'-[CR_{1''}R_{2''}]_a-V-[Cy]_{0-1}-[CR_{3''}R_{4''}]_b-COE$$

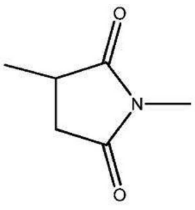
[0368] 식 중,

[0369] $R_{1''}$, $R_{2''}$ 및 $R_{3''}$은 각각 독립적으로 -H 또는 -Me이고;

[0370] $R_{4''}$는 -H, -Me, $-SO_3H$ 또는 $-SO_3^-M^+$이되, M^+는 약제학적으로 허용가능한 양이온이며;

[0371] a는 0 내지 2의 정수이고, b는 0 내지 3의 정수이며;

[0372] Cy는 N 헤테로원자를 보유하는 선택적으로 치환된 5-원 헤테로사이클릭 고리이고, 바람직하게는 Cy는



이다.

[0373] 소정의 실시형태에 있어서, 예컨대, 제4 또는 제5특정 실시형태에 있어서, W'는 $-N(R^e)-$이다.

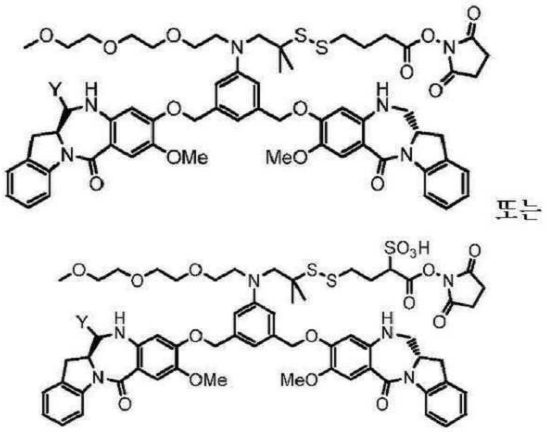
[0374] 소정의 실시형태에 있어서, 예컨대, 제4 또는 제5특정 실시형태에 있어서, R^e는 $-(CH_2-CH_2-O)_{2-6}-R^k$이되, 이때, R^k는 -H, 1 내지 6개의 탄소 원자를 지니는 직쇄, 분지쇄, 환식 알킬이다.

[0375] 소정의 실시형태에 있어서, 예컨대, 제4 또는 제5특정 실시형태에 있어서, V는 -S- 또는 -SS-이다.

[0376] 제6특정 실시형태에 있어서, L'는, 예컨대, 제4 또는 제5특정 실시형태에 있어서, 이하의 화학식으로 표시된다:

[0377] $$-NR^e-[CR_{1''}R_{2''}]_a-S-[CR_{3''}R_{4''}]_b-COE$$.

[0378] 소정의 실시형태에 있어서, 상기 반응성 기가 부착된 상기 연결기에 결합된 상기 세포독성 화합물은, 제4, 제5 및 제6특정 실시형태에 있어서, 이하로 표시된다:

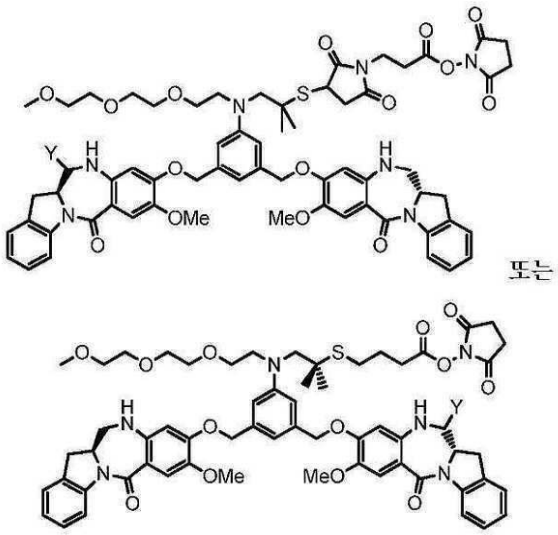
[0379] 

[0380] 식 중, Y는 $-SO_3M$이고, M은 -H 또는 약제학적으로 허용가능한 양이온이다.

[0381] 제7특정 실시형태에 있어서, L'는, 제4, 제5 또는 제6특정 실시형태에 있어서, 이하의 화학식으로 표시된다:

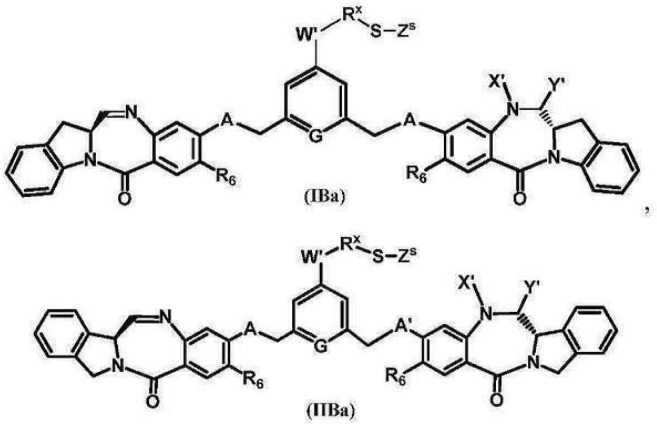
[0382] $-NR^e-[CR_1{\cdot\cdot}R_2{\cdot\cdot}]_a-S-Cy-[CR_3{\cdot\cdot}R_4{\cdot\cdot}]_b-COE$.

[0383] 소정의 실시형태에 있어서, 상기 반응성 기가 부착된 상기 연결기에 결합된 상기 세포독성 화합물은, 예컨대, 제4, 제5 및 제7특정 실시형태에 있어서, 이하와 같다:

[0384] 

[0385] 식 중, Y는 $-SO_3M$이고, M은 -H 또는 약제학적으로 허용가능한 양이온이다.

[0386] 제8특정 실시형태에 있어서, 화학식 (Ia) 및 (IIa)의 세포독성 화합물은 이하의 화합물들로 표시된다:

[0387] 

[0388] 식 중,

[0389] W'는 존재하지 않거나, 또는 -O-, -N(R^e)-, -N(R^e)-C(=O)-, -N(C(=O)R^e)-, -S- 또는 -CH_2-S-, -CH_2NR^e-로부터 선택되고;

[0390] R^x는 존재하지 않거나 또는 1 내지 10개의 탄소 원자를 지니는 직쇄, 분지쇄 혹은 환식 알킬로부터 선택되며;

[0391] R^e는 -H, 1 내지 10개의 탄소 원자를 지니는 직쇄, 분지쇄 혹은 환식 알킬, 알케닐 혹은 알키닐 또는 -(CH_2-CH_2-O)$_n$-R^k이되, 이때, R^k는 -H, 2차 아미노(예컨대, -NHR^{101}) 혹은 3차 아미노(-N$R^{101}R^{102}$) 기를 보유하는, 1 내지 6개의 탄소 원자를 지니는 직쇄, 분지쇄, 환식 알킬 또는 5 혹은 6-원 질소 함유 헤테로사이클, 예컨대, 피페리딘 또는 몰폴린이고, 이때 R^{101} 및 R^{102}는 각각 독립적으로 1 내지 10개의 탄소 원자를 지니는 직쇄, 분지쇄 혹은 환식 알킬, 알케닐 혹은 알키닐이다. 바람직하게는, R^{101} 및 R^{102}는 각각 독립적으로 1 내지 6개의 탄소 원자를 지닌 직쇄 혹은 분지쇄 알킬이고;

[0392] Z^s는 -H, -SR^m이며;

[0393] R^m은 R^d 또는, N-하이드록시숙신이미드 에스터, N-하이드록시프탈이미드 에스터, N-하이드록시 설포-숙신이미드 에스터, 파라-나이트로페닐 에스터, 다이나이트로페닐 에스터, 펜타플루오로페닐 에스터로부터 선택된 반응성 에스터를 보유하는 1 내지 4개의 탄소 원자를 지니는 치환 혹은 비치환된 직쇄 혹은 분지쇄 알킬이고;

[0394] R^d는 페닐, 나이트로페닐, 다이나이트로페닐, 카복시나이트로페닐, 피리딜 또는 나이트로피리딜로부터 선택되고;

[0395] n은 1 내지 24의 정수이며; 변수의 나머지는 제4특정 실시형태에서 위에 기재된 바와 같다.

[0396] 바람직하게는, R^k는 -H 또는 -Me이고, n은 2 내지 8의 정수이다. 바람직하게는, R^x는 1 내지 6개의 탄소 원자를 지닌 직쇄 혹은 분지쇄 알킬이고; 나머지 변수들은 제5 특정 실시형태에서 위에서 기재된 바와 같다.

[0397] 소정의 실시형태에 있어서, 제8특정 실시형태에 기재된 화학식 IBa 및 IIBa의 화합물에 대해서, 변수는 이하에 기재된 바와 같다:

[0398] X' 및 Y'는 둘 모두 -H이고;

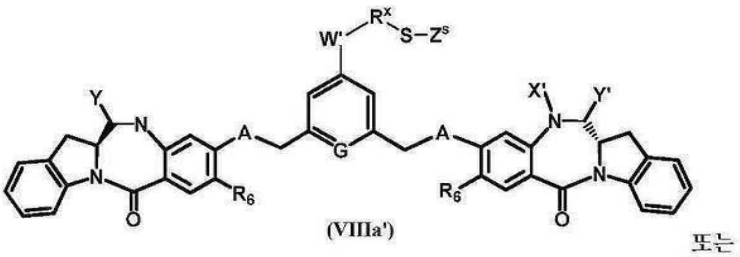
[0399] A 및 A'는 둘 모두 -O-이며;

[0400] R_6은 -OMe이고;

[0401] R^x는 1 내지 6개의 탄소 원자를 지닌 직쇄 혹은 분지쇄 알킬이며; 나머지 변수들은 제8특정 실시형태에 있어서 위에서 기재된 바와 같다.

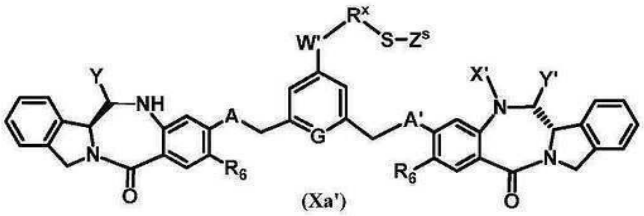
[0402] 바람직하게는, R^x는 -(CH_2)$_p$-(CR^fR^g)-이되, 이때, R^f 및 R^g는 각각 독립적으로 H 또는 1 내지 4개의 탄소 원자를 지니는 직쇄 혹은 분지쇄 알킬로부터 선택되고; p는 0, 1, 2 또는 3이다. 더 바람직하게는, R^f 및 R^g는 동일 혹은 상이하고 -H 및 -Me으로부터 선택되며; p는 1이다.

[0403] 제9특정 실시형태에 있어서, 상기 반응기가 부착된 상기 연결기에 결합된 상기 세포독성 화합물은 이하의 화학식들 중 어느 하나로 표시된다:



(VIIIa')

또는



(Xa')

[0404]

[0405] 식 중,

[0406] Y는 $-SO_3M$, $-SO_2M$ 또는 $-OSO_3M$으로부터 선택되고;

[0407] M은 -H 또는 약제학적으로 허용가능한 양이온, 예컨대, Na^+ 또는 K^+이며;

[0408] X'는 -H, -OH, 1 내지 10개의 탄소 원자를 지닌 치환된 혹은 비치환된 직쇄, 분지쇄 혹은 환식 알킬, 알케닐 또는, 페닐 및 아민-보호기로 이루어진 군으로부터 선택되며;

[0409] Y'는 -H, 옥소기, 1 내지 10개의 탄소 원자를 지닌 치환된 혹은 비치환된 직쇄, 분지쇄 혹은 환식 알킬, 알케닐 혹은 알키닐로 이루어진 군으로부터 선택되고;

[0410] A 및 A'는 -O- 및 -S-로부터 선택되며;

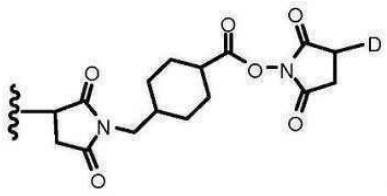
[0411] W'는 존재하지 않거나, 또는 -O-, $-N(R^e)-$, $-N(R^e)-C(=O)-$, $-N(C(=O)R^e)-$, -S- 또는 $-CH_2-S-$, $-CH_2NR^e-$로부터 선택되고;

[0412] R^x는 존재하지 않거나 또는 1 내지 10개의 탄소 원자를 지니는 직쇄, 분지쇄 혹은 환식 알킬로부터 선택되며;

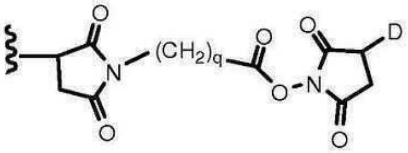
[0413] R^e는 -H, 1 내지 10개의 탄소 원자를 지니는 직쇄, 분지쇄 혹은 환식 알킬, 알케닐 혹은 알키닐 또는 $-(CH_2-CH_2-O)_n-R^k$이되, 이때, R^k는 -H, 2차 아미노(예컨대, $-NHR^{101}$) 혹은 3차 아미노($-NR^{101}R^{102}$) 기를 보유하는, 1 내지 6개의 탄소 원자를 지니는 직쇄, 분지쇄, 환식 알킬 또는 5- 혹은 6-원 질소 함유 헤테로사이클, 예컨대, 피페리딘 또는 몰폴린이고, 이때 R^{101} 및 R^{102}는 각각 독립적으로 1 내지 10개의 탄소 원자를 지니는 직쇄, 분지쇄 혹은 환식 알킬, 알케닐 혹은 알키닐이며;

[0414] G는 -CH- 또는 -N-으로부터 선택되고;

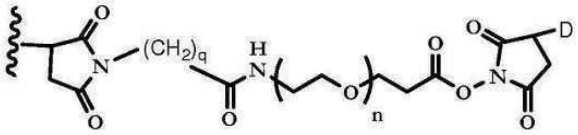
[0415] Z^s는 -H이거나, 또는 이하의 화학식들 중 어느 하나로부터 선택된다:



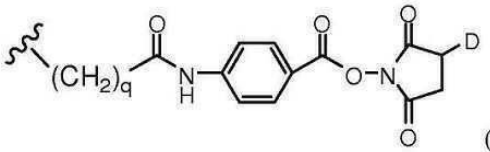
(a1);



(a2);

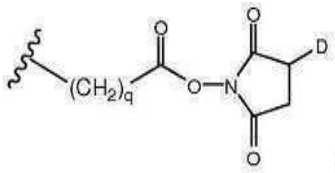


(a3);

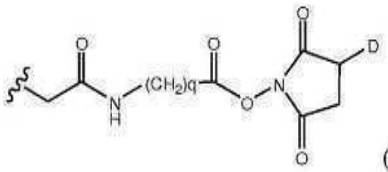


(a4);

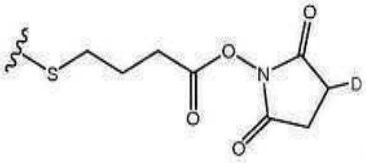
[0416]



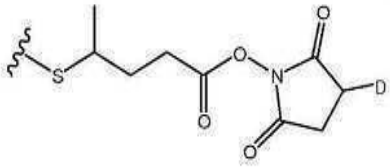
(a5);



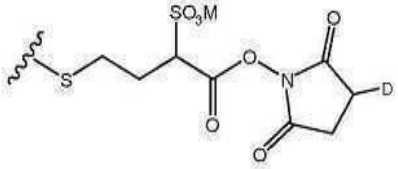
(a6);



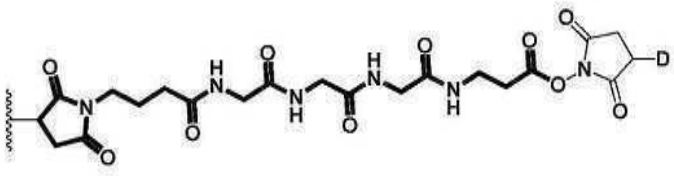
(a7);



(a8);



(a9) 및



(a10)

[0417]

[0418] 식 중,

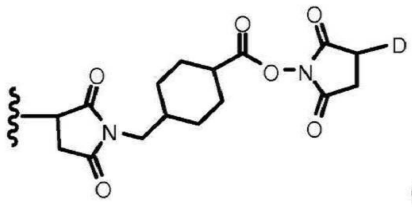
[0419] q는 1 내지 5의 정수이고; 바람직하게는 q는 2이며;

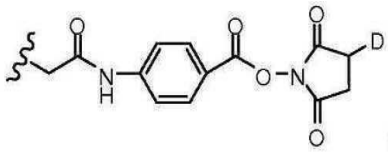
[0420] n은 2 내지 6의 정수이고; 바람직하게는 n은 4이며;

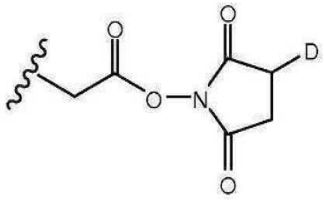
[0421] D는 -H 또는 $-SO_3M$이고;

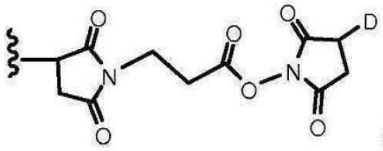
[0422] M은 -H 또는 약제학적으로 허용가능한 양이온, 예컨대, Na^+ 또는 K^+이다.

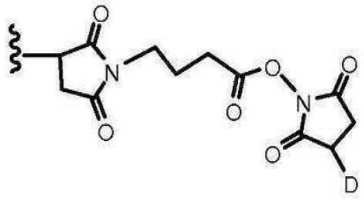
[0423] 소정의 실시형태에 있어서, Z^s는 이하의 화학식들 중 어느 하나로 표시된다:

[0424] 
(a1);


(a4');


(a5');


(a12);

[0425] 
(a13)

[0426] 소정의 실시형태, 예컨대, 제9특정 실시형태에 있어서, W'는 $-N(R^e)-$이다.

[0427] 소정의 실시형태에 있어서, R^e는 $-(CH_2-CH_2-O)_n-R^k$이되, 이때, R^k는 -H, 1 내지 6개의 탄소 원자를 지니는 직쇄, 분지쇄, 환식 알킬이다.

[0428] 소정의 실시형태에 있어서, R^k는 -H 또는 -Me이고, n은 4이며, q는 2이다.

[0429] 소정의 실시형태에 있어서, R^x는 1 내지 6개의 탄소 원자를 지닌 직쇄 혹은 분지쇄 알킬이다.

[0430] 소정의 실시형태에 있어서, R^x는 $-(CH_2)_p-(CR^fR^g)-$이되, 이때, R^f 및 R^g는 각각 독립적으로 -H 또는 1 내지 4개의 탄소 원자를 지니는 직쇄 혹은 분지쇄 알킬로부터 선택되고; p는 0, 1, 2 또는 3이다.

[0431] 소정의 실시형태에 있어서, R^f 및 R^g는 동일 또는 상이하고, 또한 -H 및 -Me로부터 선택되며; p는 1이다.

[0432] 제10특정 실시형태에 있어서, 제9특정 실시형태의 변수들은 이하에 표시된다: Y는 $-SO_3M$이고; M은 -H 또는 약제학적으로 허용가능한 양이온(예컨대, Na^+)이며; X' 및 Y'는 둘 모두 -H이고; A 및 A'는 둘 모두 -O-이며; R_6은 -OMe이고; R^x는 1 내지 6개의 탄소 원자를 지닌 직쇄 혹은 분지쇄 알킬이다.

[0433] 상기 실시형태들, 예컨대, 제1 내지 제9특정 실시형태 중 어느 하나에 있어서, Y는 $-SO_3M$, $-SO_2M$ 및 설페이트 $-OSO_3M$으로부터 선택된다. 바람직하게는, Y는 $-SO_3M$이고, 이때 M은 바람직하게는 -H, Na^+ 또는 K^+이다.

[0434] 상기 실시형태들, 예컨대, 제1 내지 제10특정 실시형태 중 어느 하나에 있어서, W는, 존재할 경우, C=O이다.

[0435] 상기 실시형태들, 예컨대, 제1 내지 제10특정 실시형태 중 어느 하나에 있어서, Z 및 Z'는, 존재할 경우, $-CH_2-$이다.

[0436] 상기 실시형태들, 예컨대, 제1 내지 제10특정 실시형태 중 어느 하나에 있어서, X'는 -H, -OH, 1 내지 10개의 탄소 원자를 지니는 선택적으로 치환된 직쇄, 분지쇄 혹은 환식 알킬, 알케닐 혹은 알키닐, 페닐, 상기 반응성 기가 결합된 상기 연결기 및 아민-보호기로 이루어진 군으로부터 선택된다. 바람직하게는, X'는 -H, -OH, -Me 또는 상기 반응성 기가 결합된 상기 연결기이다. 더 바람직하게는, X'는 -H이다.

[0437] 상기 실시형태들, 예컨대, 제1 내지 제10특정 실시형태 중 어느 하나에 있어서, Y'는 -H, 옥소기, 1 내지 10개의 탄소 원자를 지닌 치환된 혹은 비치환된 직쇄, 분지쇄 혹은 환식 알킬, 알케닐 혹은 알키닐로 이루어진 군으로부터 선택된다. 바람직하게는, Y'는 -H 또는 옥소이다. 더 바람직하게는, Y'는 -H이다.

[0438] 상기 실시형태들, 예컨대, 제1 내지 제10특정 실시형태 중 어느 하나에 있어서, A 및 A'는 동일 또는 상이하고, 또한 -O-, -S-, $-NR_5-$ 및 옥소 -(C=O)-로부터 선택된다. 바람직하게는, A 및 A'는 동일 또는 상이하고, 또한 -O- 및 -S-로부터 선택된다. 더 바람직하게는, A 및 A'는 -O-이다.

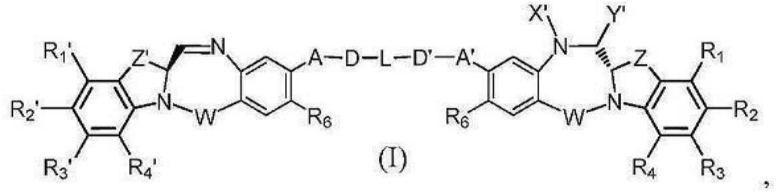
[0439] 상기 실시형태들, 예컨대, 제1 내지 제10특정 실시형태 중 어느 하나에 있어서, D 및 D'는, 존재할 경우에는, 동일 또는 상이하고, 또한 독립적으로 폴리에틸렌 글라이콜 단위 $(-OCH_2CH_2)_n$(이때 n은 1 내지 24의 정수임), 아미노산, 2 내지 6개의 아미노산을 보유하는 펩타이드, 또는 1 내지 10개의 탄소 원자를 지니는 직쇄, 분지쇄 혹은 환식 알킬, 알케닐 혹은 알키닐로부터 선택되되, 이때 상기 알킬, 알케닐 및 알키닐은 할로겐, -OR, -NR'COR'', -SR 및 -COR'로 이루어진 군으로부터 독립적으로 선택된 1개 이상의 치환기로 선택적으로 치환된다. 바람직하게는, D 및 D'는 1 내지 4개의 탄소 원자를 보유하는 직쇄 혹은 분지쇄 알킬이다.

[0440] 제11특정 실시형태에 있어서, 제1, 제3 및 제9특정 실시형태의 세포독성 화합물의 각종 기는 이하에 표시된다: W는 C=O이고; R_1, R_2, R_1' R_2', R_4 및 R_4'는 -H이고; R_3 또는 R_3' 중 한쪽은 선택적으로 상기 반응성 기가 결합된 상기 연결기이고 다른 쪽은 -H이며; R_6은 -OMe이고; Z 및 Z'는 $-CH_2-$이며; X'는 -H이고; Y'는 -H이며; A 및 A'는 -O-이다.

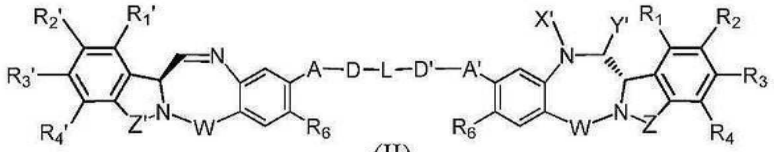
[0441] 다른 실시형태에 있어서, 상기 특정 실시형태 중 어느 하나에서와 같은 상기 반응성 기가 부착된 상기 연결기는 리스트 1에 열거된 것들 중 어느 하나이다.

[0442] 다른 실시형태에 있어서, 부착된 링커 모이어티(예컨대 위에서 기재된 링커 모이어티)가 없는 세포독성 이량체는, 본 발명의 방법에서 이용되도록 하기 위하여(예컨대, 세포 결합제와 추가로 반응하여 약물-CBA 컨쥬게이트를 형성하기 위하여), 이작용성 가교 시약과 더욱 반응하여 반응성 기가 부착된 연결 모이어티를 보유하는 약물을 형성할 수 있다. 대안적으로, 부착된 링커 모이어티(예컨대 위에서 기재된 링커 모이어티)가 없는 세포독성 이량체는 1-단계 반응에서 이작용성 가교 시약 및 세포-결합 시약과 더욱 반응하여 약물-CBA 컨쥬게이트를 직접 형성할 수 있다. 어느 경우에 있어서도, 이민-반응성 시약은 반응 혼합물에 첨가되어 약물-CBA 컨쥬게이트를 형성하는 반응 전에 약물-이민 반응성 시약 부가물(예컨대 중아황산염 부가물)을 형성할 수 있다. 바람직하게는, 부착된 링커 모이어티(예컨대 위에서 기재된 링커 모이어티)가 없는 세포독성 이량체는, 반응 혼합물이 약물-CBA 컨쥬게이트를 형성하는 후속 반응에서 이용되기 전에, 우선 이민 반응성 시약으로 사전 인큐베이팅되어 상기 부가물을 형성할 수 있다.

[0443] 이와 같이 해서, 제12특정 실시형태에 있어서, 상기 이민-함유 세포독성 화합물은 이하의 화학식들, 또는 그의 약제학적으로 허용가능한 염 중 어느 하나로 표시되고:



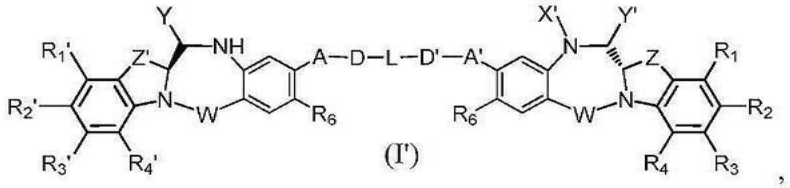
(I),



(II)

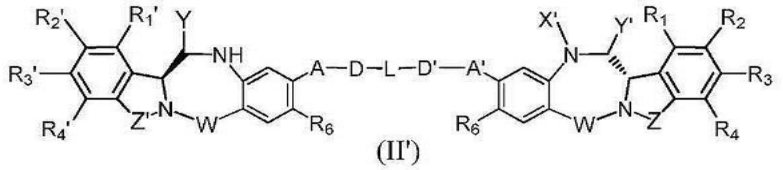
[0444]

[0445] 아민 반응 시약과 반응 후, 상기 세포독성 화합물은 이하의 화학식, 또는 그의 약제학적으로 허용가능한 염으로 표시된다:



(I'),

[0446]



(II')

[0447]

[0448] 식 중,

[0449] Y는 아황산염(HSO_3, HSO_2 또는 양이온과 함께 형성된 HSO_3^-, SO_3^{2-} 혹은 HSO_2^-의 염), 메타중아황산염($H_2S_2O_5$ 또는 양이온과 함께 형성된 $S_2O_5^{2-}$의 염), 모노-, 다이-, 트라이- 및 테트라-티오포스페이트(PO_3SH_3, $PO_2S_2H_2$, POS_3H_2, PS_4H_2 또는 양이온과 함께 형성된 PO_3S^{3-}, $PO_2S_2^{3-}$, POS_3^{3-} 혹은 PS_4^{3-}의 염), 티오포스페이트 에스터 $(R^iO)_2PS(OR^i)$, R^iS-, R^iSO, R^iSO_2, R^iSO_3, 티오설페이트(HS_2O_3 또는 양이온과 함께 형성된 $S_2O_3^{2-}$의 염), 다이티오나이트($H_2S_2O_4$ 또는 양이온과 함께 형성된 $S_2O_4^{2-}$의 염), 포스포로다이티오에이트$(P(=S)(OR^{k'})(S)(OH)$ 또는 양이온과 함께 형성된 그의 염), 하이드록삼산($R^{k'}C(=O)NOH$ 또는 양이온과 함께 형성된 염), 포름알데하이드 설폭실레이트($HOCH_2SO_2^-$ 또는 $HOCH_2SO_2^-Na^+$ 등과 같은, 양이온과 함께 형성된 $HOCH_2SO_2^-$의 염) 또는 이들의 혼합물이며, 이때, R^i는 1 내지 10개의 탄소 원자를 지닌 직쇄 혹은 분지쇄 알킬이고 $-N(R^j)_2$, $-CO_2H$, $-SO_3H$ 및 $-PO_3H$로부터 선택된 적어도 하나의 치환기로 치환되며; R^i는 여기에 기재된 알킬기에 대해서 치환기로 더욱 선택적으로 치환될 수 있고; R^j는 1 내지 6개의 탄소 원자를 지니는 직쇄 혹은 분지쇄 알킬이며; $R^{k'}$는 1 내지 10개의 탄소 원자를 지니는 직쇄, 분지쇄 혹은 환식 알킬, 알케닐 혹은 알키닐, 아릴, 헤테로사이클릴 또는 헤테로아릴이고; 바람직하게는, Y는 중아황산염, 차아황산염 또는 메타중아황산염, 또는 그의 염(예컨대 나트륨염)의 부가물이다;

[0450] X'는 -H, -OH, 아민-보호기, 1 내지 10개의 탄소 원자를 지니는 선택적으로 치환된 직쇄, 분지쇄 혹은 환식 알킬, 알케닐 혹은 알키닐, 폴리에틸렌 글라이콜 단위 $-(CH_2CH_2O)_n-R^c$, 6 내지 18개의 탄소 원자를 지니는 선택적으로 치환된 아릴 (예컨대, 페닐), 질소, 산소 및 황으로부터 독립적으로 선택된 1개 이상의 헤테로원자를 함유하는 선택적으로 치환된 5- 내지 18-원 헤테로아릴 고리, 및 O, S, N 및 P로부터 독립적으로 선택된 1 내지 6개의 헤테로원자를 함유하는 선택적으로 치환된 3- 내지 18-원 헤테로사이클릭 고리로 이루어진 군으로부터 선택

된다. 바람직하게는, X'는 -H, -OH 또는 -Me이다. 더 바람직하게는, X'는 -H이다;

[0451] Y'는 -H, 옥소기, 1 내지 10개의 탄소 원자를 지니는 선택적으로 치환된 직쇄, 분지쇄 혹은 환식 알킬, 알케닐 혹은 알키닐, 선택적으로 치환된 6- 내지 18-원 아릴, 질소, 산소 및 황으로부터 독립적으로 선택된 1개 이상의 헤테로원자를 함유하는 선택적으로 치환된 5- 내지 18-원 헤테로아릴 고리, 1 내지 6개의 헤테로원자를 지니는 선택적으로 치환된 3- 내지 18-원 헤테로사이클릭 고리로 이루어진 군으로부터 선택된다. 바람직하게는, Y'는 -H 또는 옥소로부터 선택된다. 더 바람직하게는, Y'는 -H이다;

[0452] R^c는 -H 또는 1 내지 4개의 탄소 원자를 지니는 치환 혹은 비치환된 직쇄 혹은 분지쇄 알킬이다;

[0453] R_1, R_2, R_3, R_4, R_1', R_2', R_3' 및 R_4'는 각각 독립적으로 -H, 1 내지 10개의 탄소 원자를 지니는 선택적으로 치환된 직쇄, 분지쇄 혹은 환식 알킬, 알케닐 혹은 알키닐, 폴리에틸렌 글라이콜 단위 $-(OCH_2CH_2)_n-R^c$, 할로겐, 구아니디늄[-NH(C=NH)NH_2], -OR, -NR'R'', $-NO_2$, -NCO, -NR'COR'', -SR, -SOR'로 표시되는 설폭사이드, $-SO_2R'$로 표시되는 설폰, 설포네이트 $-SO_3^-M^+$, 설페이트 $-OSO_3^-M^+$, $-SO_2NR'R''$로 표시되는 설폰아마이드, 사이아노, 아자이도, -COR', -OCOR', -OCONR'R''로 이루어진 군으로부터 선택되고, 바람직하게는, R_2, R_3, R_2' 및 R_3' 중 1, 2, 3개 또는 모두는 -H이다;

[0454] M은 -H 또는 약제학적으로 허용가능한 양이온이다;

[0455] R은, 각 경우에, 독립적으로 -H, 1 내지 10개의 탄소 원자를 지니는 선택적으로 치환된 직쇄, 분지쇄 혹은 환식 알킬, 알케닐 혹은 알키닐, 폴리에틸렌 글라이콜 단위 $-(CH_2CH_2O)_n-R^c$, 6 내지 18개의 탄소 원자를 지니는 선택적으로 치환된 아릴, 질소, 산소 및 황으로부터 독립적으로 선택된 1개 이상의 헤테로원자를 함유하는 선택적으로 치환된 5- 내지 18-원 헤테로아릴 고리, 또는 O, S, N 및 P로부터 독립적으로 선택된 1 내지 6개의 헤테로원자를 함유하는 선택적으로 치환된 3- 내지 18-원 헤테로사이클릭 고리로 이루어진 군으로부터 선택된다;

[0456] R' 및 R''는 동일 또는 상이하고, 또한 독립적으로 -H, -OH, -OR, -NHR, $-NR_2$, -COR, 1 내지 10개의 탄소 원자를 지니는 선택적으로 치환된 직쇄, 분지쇄 혹은 환식 알킬, 알케닐 혹은 알키닐, 폴리에틸렌 글라이콜 단위 $-(CH_2CH_2O)_n-R^c$, 및 O, S, N 및 P로부터 독립적으로 선택된 1 내지 6개의 헤테로원자를 지니는 선택적으로 치환된 3- 내지 18-원 헤테로사이클릭 고리로부터 선택된다;

[0457] n은 1 내지 24의 정수이다;

[0458] W는 C=O, C=S, CH_2, BH, SO 및 SO_2로부터 선택된다;

[0459] R_6은 -H, -R, -OR, -SR, -NR'R'', $-NO_2$, 할로겐, $-OR^c$ 또는 $-SR^c$이고; 바람직하게는, R_6은 -OMe 또는 -SMe이다. 더욱더 바람직하게는, R_6은 -OMe이다;

[0460] Z 및 Z'는 독립적으로 $-(CH_2)_{n'}-$, $-(CH_2)_{n'}-CR_7R_8-(CH_2)_{na'}-$, $-(CH_2)_{n'}-NR_9-(CH_2)_{na'}-$, $-(CH_2)_{n'}-O-(CH_2)_{na'}-$ 및 $-(CH_2)_{n'}-S-(CH_2)_{na'}-$로부터 선택된다;

[0461] n' 및 na'는 동일 또는 상이하고, 또한 0, 1, 2 및 3으로부터 선택된다;

[0462] R_7 및 R_8은 동일 또는 상이하고, 또한 각각 독립적으로 -H, -OH, -SH, -COOH, -NHR', 폴리에틸렌 글라이콜 단위 $-(OCH_2CH_2)_n-$, 아미노산, 2 내지 6개의 아미노산을 보유하는 펩타이드 단위, 1 내지 10개의 탄소 원자를 지니는 선택적으로 치환된 직쇄, 분지쇄 혹은 환식 알킬로부터 선택되고;

[0463] R_9는 독립적으로 -H, 1 내지 10개의 탄소 원자를 지니는 선택적으로 치환된 직쇄, 분지쇄 혹은 환식 알킬, 폴리에틸렌 글라이콜 단위 $-(OCH_2CH_2)_n-$으로부터 선택된다;

[0464] A 및 A'는 동일 또는 상이하고, 또한 독립적으로 -O-, 옥소(-C(=O)-), -CRR'O-, -CRR'-, -S-, -CRR'S-, $-N(R_5)-$ 및 $-CRR'N(R_5)-$로부터 선택된다. 바람직하게는, A 및 A'는 동일 또는 상이하고, 또한 -O- 및 -S-로부터 선택된다. 더 바람직하게는, A 및 A'는 -O-이다;

[0465] R_5는 각 경우에 독립적으로 -H 또는 1 내지 10개의 탄소 원자를 지니는 선택적으로 치환된 직쇄 혹은 분지쇄 알킬이다;

[0466] D 및 D'는 동일 또는 상이하고, 또한 독립적으로 존재하지 않거나 또는 1 내지 10개의 탄소 원자를 지니는 선택적으로 치환된 직쇄, 분지쇄 혹은 환식 알킬, 알케닐 혹은 알키닐, 아미노산, 2 내지 6개의 아미노산을 보유하는 펩타이드 및 폴리에틸렌 글라이콜 단위 $(-OCH_2CH_2)_n-$으로 이루어진 군으로부터 선택된다;

[0467] L은 존재하지 않거나, 또는 존재할 경우에는, 티올기를 포함하고, 또한 폴리에틸렌 글라이콜 단위 $(-OCH_2CH_2)_n-$, 1 내지 10개의 탄소 원자를 지니는 직쇄, 분지쇄 혹은 환식 알킬 혹은 알케닐, 페닐기, O, S, N 및 P로부터 독립적으로 선택된 1 내지 6개의 헤테로원자를 지니는 3- 내지 18-원 헤테로사이클릭 고리 또는 5- 내지 18-원 헤테로아릴 고리이며, 이때 상기 알킬, 알케닐, 페닐, 또는 헤테로사이클릭 혹은 헤테로아릴 고리는 선택적으로 치환된다.

[0468] 이러한 이민-함유 세포독성 화합물의 대표적인 구조는 표 15에 표시되어 있다. 화합물 **1, 3, 4, 5** 및 **1d**를 참조하면 된다.

[0469] 소정의 실시형태에 있어서,

[0470] W는 C=O이고;

[0471] R_1, R_2, R_3, R_4, $R_{1'}$, $R_{2'}$, $R_{3'}$ 및 $R_{4'}$는 -H이며;

[0472] Z 및 Z'는 $-CH_2-$이고;

[0473] A 및 A'는 둘 모두 -O-이며;

[0474] W는 -(C=O)-이고;

[0475] G는 -CH-이며;

[0476] R_6은 -H, 또는 선택적으로 치환된 C1-C10 직쇄, C1-C10 분지쇄, 또는 C3-C7 사이클릭 알킬, -O-알킬 또는 -O-할로-알킬, 예컨대, -OMe이며;

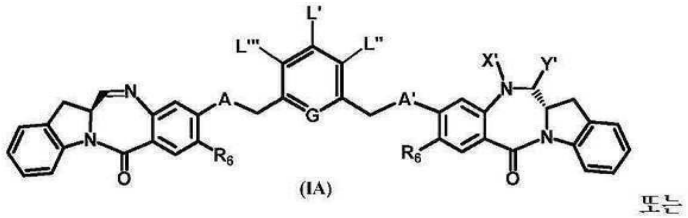
[0477] X'는 -H, -OH, 1 내지 10개의 탄소 원자를 지닌 치환된 혹은 비치환된 직쇄, 분지쇄 혹은 환식 알킬, 알케닐 혹은 알키닐, 페닐 및 아민-보호기로 이루어진 군으로부터 선택되고;

[0478] Y'는 -H, 옥소기, 1 내지 10개의 탄소 원자를 지닌 치환된 혹은 비치환된 직쇄, 분지쇄 혹은 환식 알킬, 알케닐 혹은 알키닐로 이루어진 군으로부터 선택된다.

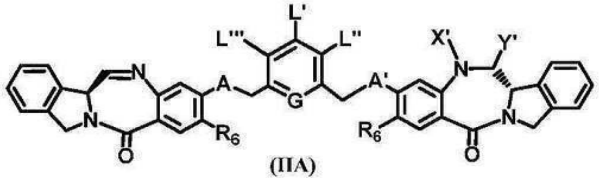
[0479] 바람직하게는, Y는 $-SO_3M$, $-SO_2M$ 또는 $-OSO_3M$으로부터 선택되되, 이때 M은 -H 또는 약제학적으로 허용가능한 양이온, 예컨대, Na^+ 또는 K^+이다.

[0480] 바람직하게는, Y는 $-SO_3M$이고; M은 -H 또는 Na^+이다.

[0481] 소정의 실시형태에 있어서, 상기 이민-함유 세포독성 화합물은 이하의 화학식들 중 어느 하나로 표시된다:



또는



[0482]

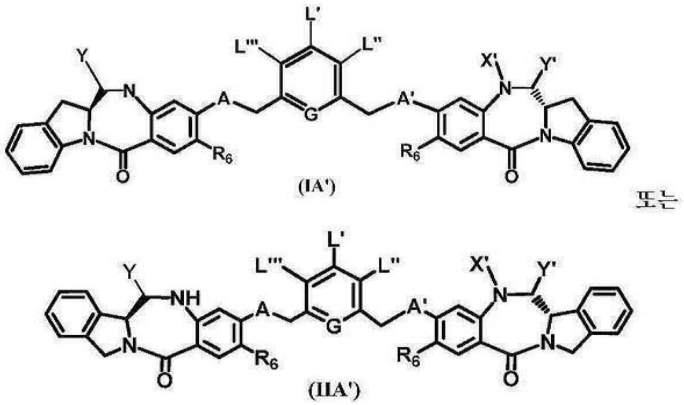
[0483] 식 중,

[0484] L', L'' 및 L'''는 동일 또는 상이하고, 또한 독립적으로 -H, 1 내지 10개의 탄소 원자를 지니는 선택적으로 치환된 직쇄, 분지쇄 혹은 환식 알킬, 알케닐 혹은 알키닐, 폴리에틸렌 글라이콜 단위 $-(OCH_2CH_2)_n-R^c$, 할로겐, 구아니딘[$-NH(C=NH)NH_2$], -OR, -NR'R'', $-NO_2$, -NR'COR'', -SR, -SOR'로 표시되는 설폭사이드, $-SO_2R'$로 표시되는 설폰, 설포네이트 $-SO_3M$, 설페이트 $-OSO_3M$, $-SO_2NR'R''$로 표시되는 설폰아마이드, 사이아노, 아자이도, -COR', -OCOR', -OCONR'R''로부터 선택되고;

[0485] M은 -H 또는 약제학적으로 허용가능한 양이온이며;

[0486] G는 -CH- 또는 -N-으로부터 선택되된다.

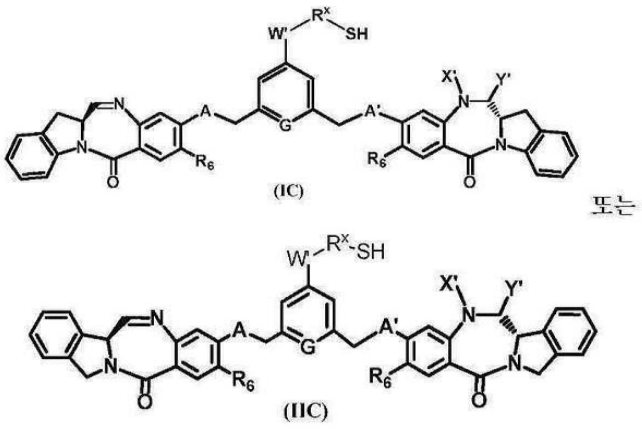
[0487] 소정의 실시형태에 있어서, 상기 세포독성 화합물은, 존재할 경우, 이하의 화학식들, 또는 그의 약제학적으로 허용가능한 염 중 하나로 표시된다:

[0488] 

[0489] 소정의 실시형태에 있어서, L', L'' 또는 L''' 중 하나는 티올기를 보유하는 한편, 나머지는 -H이다. 바람직하게는, L'는 티올기를 보유하고, L'' 및 L'''는 -H이다.

[0490] 소정의 실시형태에 있어서, A 및 A'는 둘 모두 -O-이고; R_6은 -OMe이며; G는 -CH-이다.

[0491] 소정의 실시형태에 있어서, 상기 이민-함유 세포독성 화합물은 이하의 화학식들 중 어느 하나로 표시될 수 있다:

[0492] 

[0493] 식 중,

[0494] W'는 존재하지 않거나, 또는 존재할 경우, $-CR^eR^{e'}-$, -O-, -O-C(=O)-, -C(=O)-O-, -S-, -SO-, $-SO_2-$, $-CH_2-S-$, $-CH_2O-$, $-CH_2NR^e-$, -O-(C=O)O-, -O- (C=O)N(R^e)-, -N(R^e)-, -N(R^e)-C(=O)-, -C(=O)-N(R^e)-, -N(R^e)-C(=O)O-, $-N(C(=O)R^e)C(=O)-$, $-N(C(=O)R^e)-$, $-(O-CH_2-CH_2)_n-$, -SS- 또는 -C(=O)-, 또는 아미노산, 또는 2 내지 8개의 아미

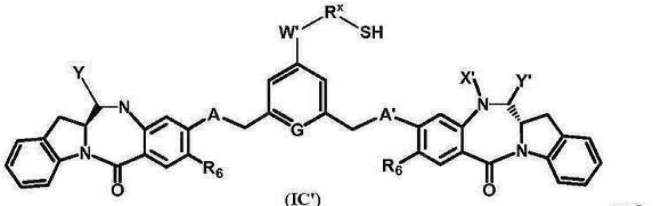
노산을 지니는 펩타이드로부터 선택되고;

[0495] R^x는 존재하지 않거나, 또는 존재할 경우에는, 1 내지 10개의 탄소 원자를 지니는 선택적으로 치환된 직쇄, 분지쇄 혹은 환식 알킬, 알케닐 혹은 알키닐, 6 내지 10개의 탄소 원자를 보유하는 아릴 또는 O, N 혹은 S로부터 선택된 1 내지 3개의 헤테로원자를 보유하는 3- 내지 8-원 헤테로사이클릭 고리이며;

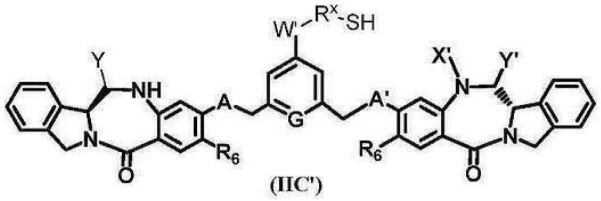
[0496] R^e 및 $R^{e'}$는 동일 또는 상이하고, 또한 -H, 1 내지 10개의 탄소 원자를 지니는 직쇄, 분지쇄 혹은 환식 알킬, 알케닐 혹은 알키닐 또는 $-(CH_2-CH_2-O)_n-R^k$로부터 선택되되, 이때, R^k는 -H, 2차 아미노(예컨대, $-NHR^{101}$) 혹은 3차 아미노($-NR^{101}R^{102}$) 기를 보유하는, 1 내지 6개의 탄소 원자를 지니는 직쇄, 분지쇄, 환식 알킬 또는 5- 혹은 6-원 질소 함유 헤테로사이클, 예컨대, 피페리딘 또는 몰폴린이고, 이때 R^{101} 및 R^{102}는 각각 독립적으로 1 내지 10개의 탄소 원자를 지니는 직쇄, 분지쇄 혹은 환식 알킬, 알케닐 혹은 알키닐이며; 바람직하게는, R^{101} 및 R^{102}는 각각 독립적으로 1 내지 6개의 탄소 원자를 지닌 직쇄 혹은 분지쇄 알킬이고;

[0497] n은 1 내지 24의 정수이다.

[0498] 소정의 실시형태에 있어서, 상기 세포독성 화합물은, 존재할 경우, 이하의 화학식들, 또는 그의 약제학적으로 허용가능한 염 중 하나로 표시될 수 있다:



또는



[0499] .

[0500] 소정의 실시형태에 있어서,

[0501] Y는 $-SO_3M$, $-SO_2M$ 또는 $-OSO_3M$으로부터 선택되고;

[0502] M은 -H 또는 약제학적으로 허용가능한 양이온, 예컨대, Na^+ 또는 K^+이며;

[0503] X'는 -H, -OH, 1 내지 10개의 탄소 원자를 지닌 치환된 혹은 비치환된 직쇄, 분지쇄 혹은 환식 알킬, 알케닐 혹은 알키닐, 페닐 및 아민-보호기로 이루어진 군으로부터 선택되며;

[0504] Y'는 -H, 옥소기, 1 내지 10개의 탄소 원자를 지닌 치환된 혹은 비치환된 직쇄, 분지쇄 혹은 환식 알킬, 알케닐 혹은 알키닐로 이루어진 군으로부터 선택되고;

[0505] A 및 A'는 -O- 및 -S-로부터 선택되며;

[0506] W'는 존재하지 않거나, 또는 -O-, $-N(R^e)-$, $-N(R^e)-C(=O)-$, $-N(C(=O)R^e)-$, -S- 또는 $-CH_2-S-$, $-CH_2NR^e-$로부터 선택되고;

[0507] R^x는 존재하지 않거나 또는 1 내지 10개의 탄소 원자를 지니는 직쇄, 분지쇄 혹은 환식 알킬로부터 선택되며;

[0508] R^e는 -H, 1 내지 10개의 탄소 원자를 지니는 직쇄, 분지쇄 혹은 환식 알킬, 알케닐 혹은 알키닐 또는 $-(CH_2-CH_2-O)_n-R^k$이되, 이때, R^k는 -H, 2차 아미노(예컨대, $-NHR^{101}$) 혹은 3차 아미노($-NR^{101}R^{102}$) 기를 보유하는, 1 내지 6개의 탄소 원자를 지니는 직쇄, 분지쇄, 환식 알킬 또는 5- 혹은 6-원 질소 함유 헤테로사이클, 예컨대, 피페리딘

또는 몰폴린이되, 이때 R^{101} 및 R^{102}는 각각 독립적으로 1 내지 10개의 탄소 원자를 지니는 직쇄, 분지쇄 혹은 환식 알킬, 알케닐 혹은 알키닐이며;

[0509] G는 -CH- 또는 -N-으로부터 선택된다.

[0510] 소정의 실시형태에 있어서, W'는 $-N(R^e)-$이다.

[0511] 소정의 실시형태에 있어서, R^e는 $-(CH_2-CH_2-O)_n-R^k$이되, 이때, R^k는 -H, 1 내지 6개의 탄소 원자를 지니는 직쇄, 분지쇄, 환식 알킬이다.

[0512] 소정의 실시형태에 있어서, R^k는 -H 또는 -Me이고, n은 4이며, q는 2이다.

[0513] 소정의 실시형태에 있어서, R^x는 1 내지 6개의 탄소 원자를 지닌 직쇄 혹은 분지쇄 알킬이다.

[0514] 소정의 실시형태에 있어서, R^x는 $-(CH_2)_p-(CR^fR^g)-$이되, 이때, R^f 및 R^g는 각각 독립적으로 -H 또는 1 내지 4개의 탄소 원자를 지니는 직쇄 혹은 분지쇄 알킬로부터 선택되고; p는 0, 1, 2 또는 3이다.

[0515] 소정의 실시형태에 있어서, R^f 및 R^g는 동일 또는 상이하고, 또한 -H 및 -Me로부터 선택되며; p는 1이다.

[0516] 소정의 실시형태에 있어서,

[0517] Y는 $-SO_3M$, $-SO_2M$ 또는 설페이트 $-OSO_3M$; 바람직하게는 $-SO_3M$이고;

[0518] M은 -H 또는 약제학적으로 허용가능한 양이온(예컨대, Na^+)이며;

[0519] X' 및 Y'는 둘 모두 -H이고;

[0520] A 및 A'는 둘 모두 -O-이며;

[0521] R_6은 -OMe이고;

[0522] R^x는 1 내지 6개의 탄소 원자를 지닌 직쇄 혹은 분지쇄 알킬이다.

[0523] 소정의 실시형태에 있어서, 상기 이작용성 가교제는:

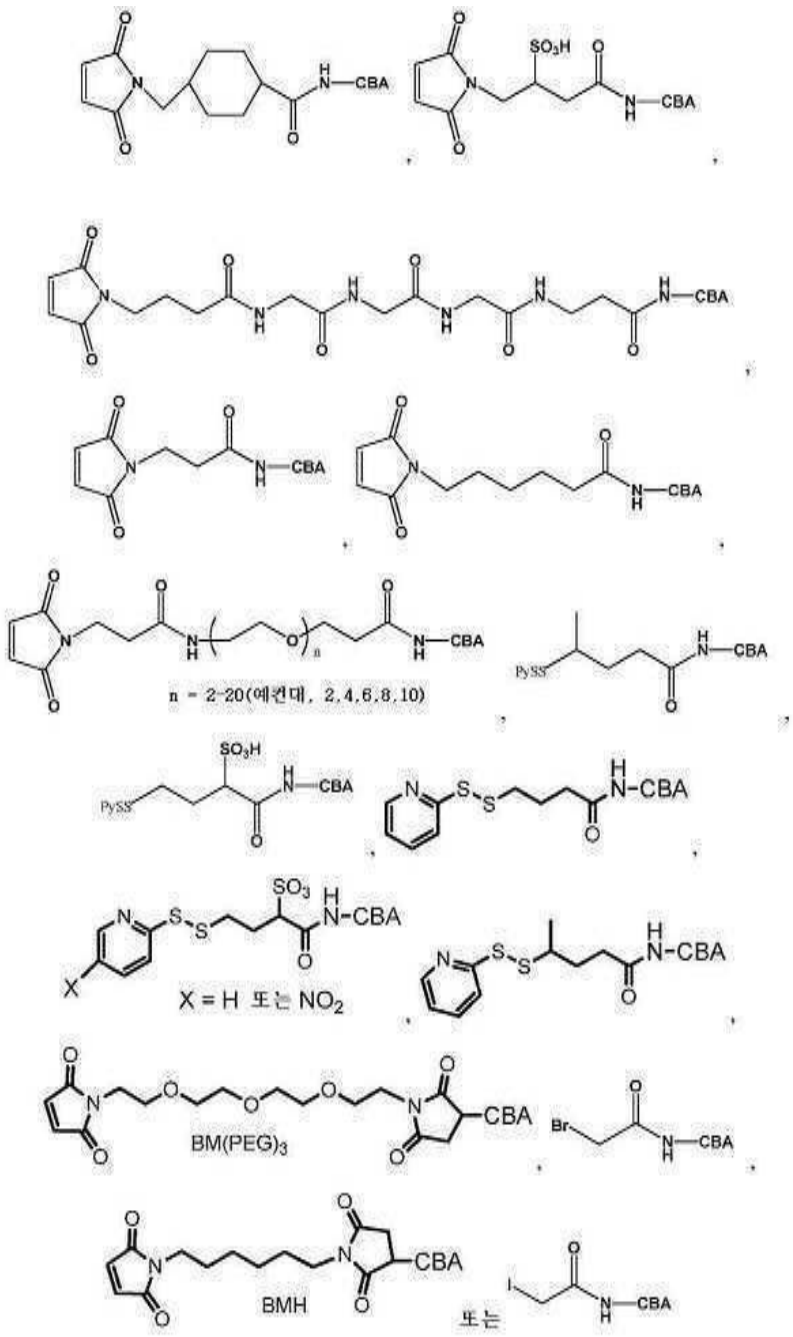
[0524] N-숙신이미딜 4-(말레이미도메틸)사이클로헥산카복실레이트(SMCC), N-숙신이미딜-4-(N-말레이미도메틸)-사이클로헥산-1-카복시-(6-아마이도카프로에이트)(LC-SMCC), κ-말레이미도운데칸산 N-숙신이미딜 에스터(KMUA), γ-말레이미도뷰티르산 N-숙신이미딜 에스터(GMBS), ε-말레이미도카프로산 N-하이드록시숙신이미드 에스터(EMCS), m-말레이미도벤조일-N-하이드록시숙신이미드 에스터(MBS), N-(α-말레이미도아세톡시)-숙신이미드 에스터(AMAS), 숙신이미딜-6-(β-말레이미도프로피온아마이도)헥사노에이트(SMPH), N-숙신이미딜 4-(p-말레이미도페닐)-뷰티레이트(SMPB), N-(p-말레이미도페닐)아이소사이아네이트(PMPI), *N*-숙신이미딜-4-(4-나이트로피리딜-2-다이티오)뷰타노에이트로부터 선택된 말레이미도계 모이어티; 또는,

[0525] N-숙신이미딜-4-(아이오도아세틸)-아미노벤조에이트(SIAB), N-숙신이미딜 아이오도아세테이트(SIA), N-숙신이미딜 브로모아세테이트(SBA), 및 N-숙신이미딜 3-(브로모아세트아미도)프로피오네이트(SBAP), 비스-말레이미도폴리에틸렌글라이콜(BMPEO), $BM(PEO)_2$, $BM(PEO)_3$, N-(β-말레이미도프로필옥시)숙신이미드 에스터(BMPS), 5-말레이미도발레르산 NHS, HBVS, 4-(4-N-말레이미도페닐)-뷰티르산 하이드라자이드·HCl(MPBH), 숙신이미딜-(4-비닐설포닐)벤조에이트(SVSB), 다이티오비스-말레이미도에탄(DTME), 1,4-비스-말레이미도뷰탄(BMB), 1,4-비스말레이미딜-2,3-다이하이드록시뷰탄(BMDB), 비스-말레이미도헥산(BMH), 비스-말레이미도에탄(BMOE), 설포숙신이미딜 4-(N-말레이미도-메틸)사이클로헥산-1-카복실레이트(설포-SMCC), 설포숙신이미딜(4-아이오도-아세틸)아미노벤조에이트(설포-SIAB), m-말레이미도벤조일-N-하이드록시설포숙신이미드 에스터(설포-MBS), N-(γ-말레이미도뷰티릴옥시)설포숙신이미드 에스터(설포-GMBS), N-(ε-말레이미도카프로일옥시)설포숙신이미도 에스터(설포-EMCS), N-(κ-말레이미도운데카노일옥시)설포숙신이미드 에스터(설포-KMUS), 설포숙신이미딜 4-(p-말레이미도페닐)뷰티레이트(설포-SMPB), CX1-1, 설포-Mal 및 PEG_n-Mal로부터 선택된 할로아세틸계 모이어티이다.

[0526] 소정의 실시형태에 있어서, 상기 이작용성 가교제는 SMCC, 설포-SMCC, BMPS, GMBS, SIA, SIAB, *N*-숙신이미딜-

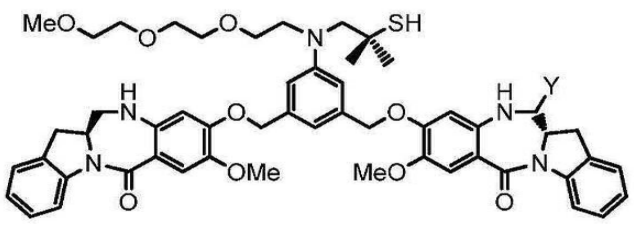
4-(4-나이트로피리딜-2-다이티오)뷰타노에이트, 비스-말레이미도헥산 또는 BMPEO로 이루어진 군으로부터 선택된다.

[0527] 소정의 실시형태에 있어서, 상기 변형된 CBA는, 존재할 경우, 이하와 같다:



[0528]

[0529] 제13특정 실시형태에 있어서, 상기 이민-함유 세포독성 화합물은 이하와 같다:



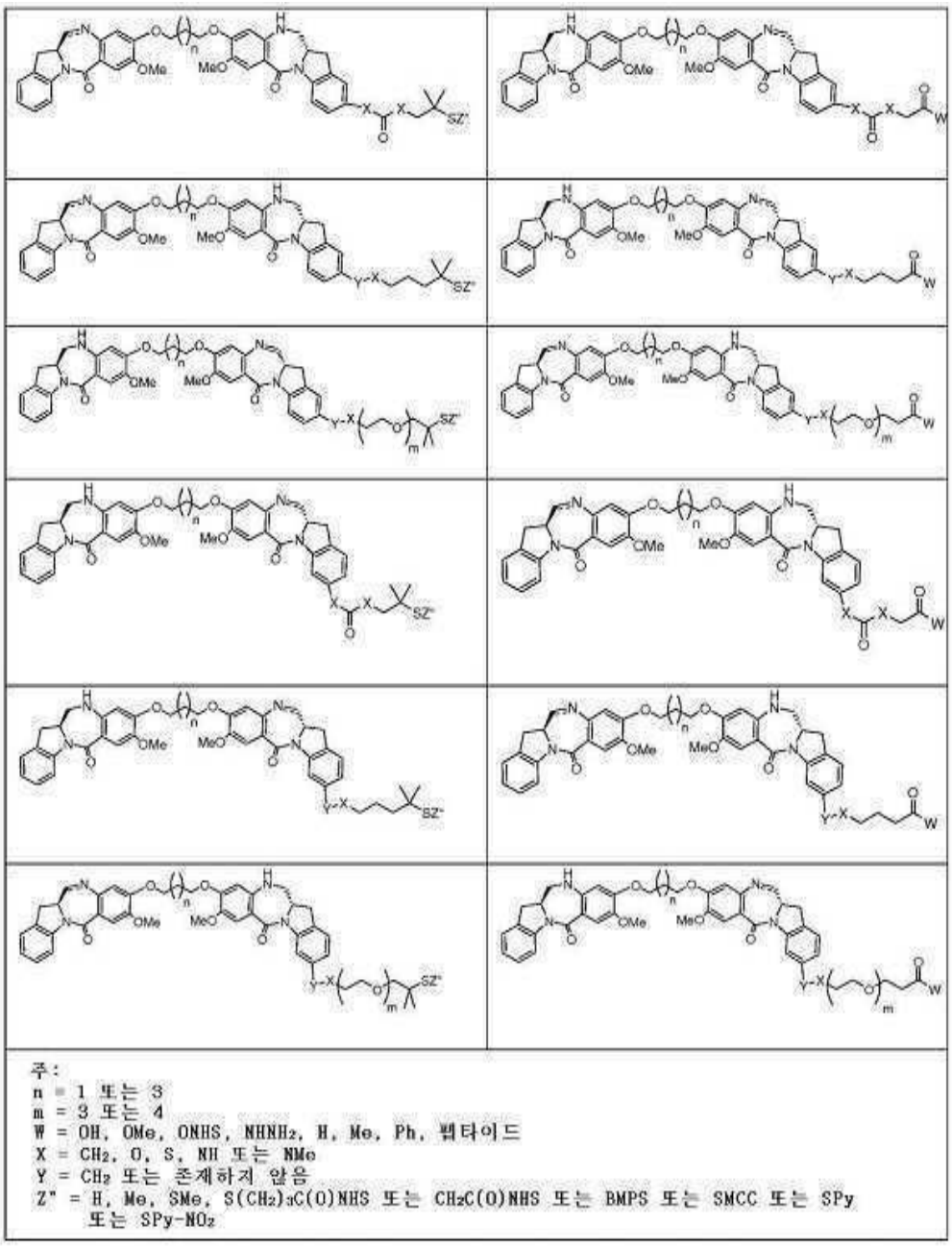
[0530]

[0531] 이작용성 가교제는 당업계에 공지된 임의의 이작용성 링커일 수 있다. 예를 들어, 약물-링커 화합물을 제조하는데 이용될 수 있는 이작용성 링커는 세포독성 화합물과 다이설파이드 결합, 티오에터 결합, 산 불안정성 결합, 광불안정성 결합, 펩티다제 불안정성 결합 및 에스터라제 불안정성 결합을 형성하는 것들이다(예를 들어,

미국 특허 5,208,020호; 제5,475,092호; 제6,441,163호; 제6,716,821호; 제6,913,748호; 제7,276,497호; 제7,276,499호; 제7,368,565호; 제7,388,026호 및 제7,414,073호 참조, 이들 문헌은 모두 참조로 본 명세서에 포함된다). 바람직하게는, 이작용성 가교제는 세포독성 화합물과 다이설파이드 결합, 티오에터 및 펩타이드 불안정성 결합을 형성하는 것들이다. 본 발명에서 이용될 수 있는 기타 이작용성 가교제는 비절단가능한 링커, 예컨대, 미국 특허 공개 제US 2005/0169933호에 기재된 것들, 혹은 하전된 링커 혹은 친수성 링커를 포함하며, US 2009/0274713, US 2010/01293140 및 WO 2009/134976에 기재되어 있고, 이들 문헌의 각각은 명시적으로 참조로 본 명세서에 포함된다. 본 발명의 약물-링커 화합물을 제조하는데 이용될 수 있는 이작용성 가교제는 또한 문헌[*Thermo Scientific Pierce Crosslinking Technical Handbook*]에 기재된 것들을 포함하며, 이 문헌의 전체의 교시내용은 모두 참조로 본 명세서에 포함된다.

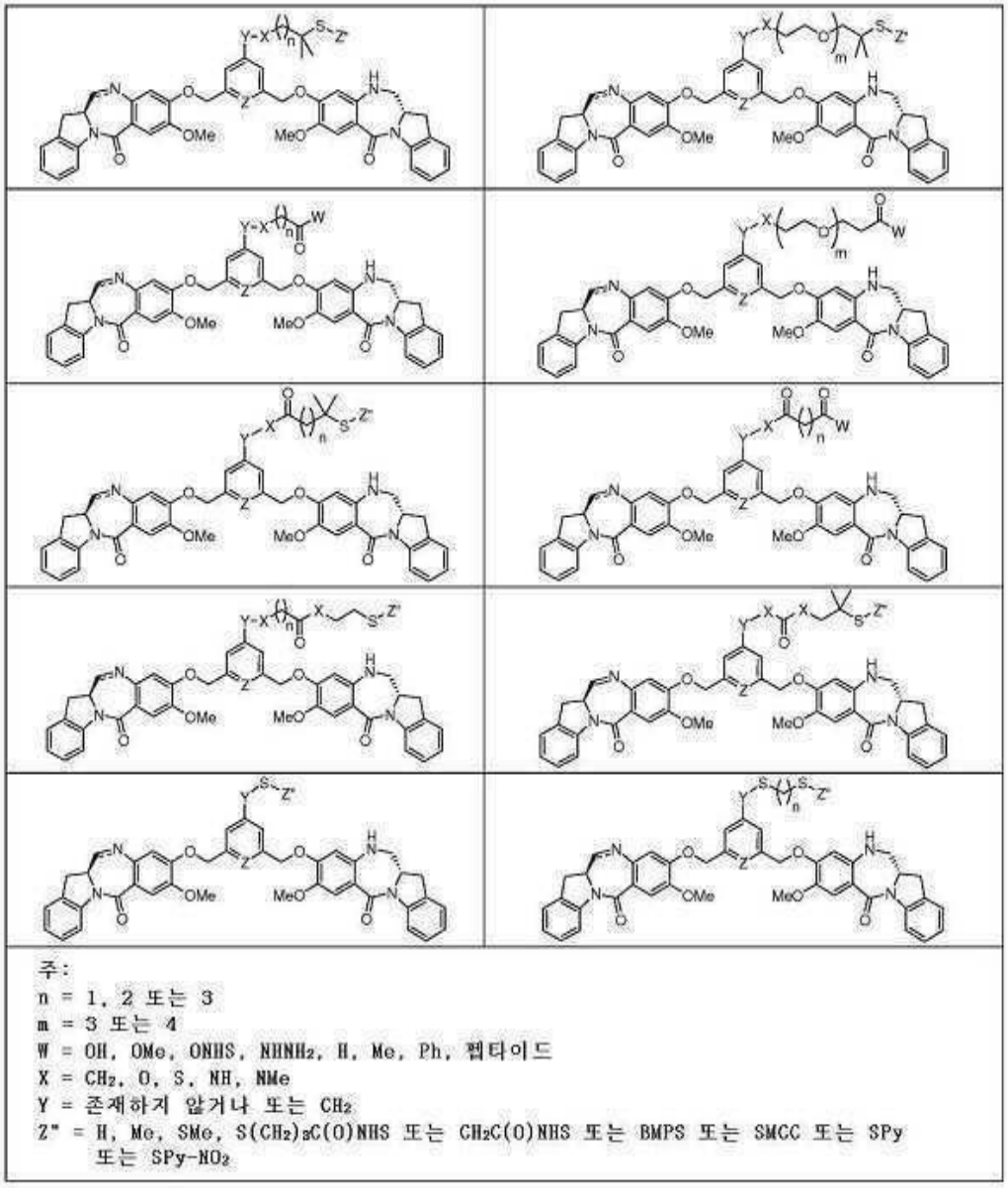
[0532] 다른 바람직한 실시형태에 있어서, 본 발명에서 이용될 수 있는 약물(반응성 기가 부착되는 링커기를 지니거나 지니지 않음)은 표 1 내지 7에 표시된 화합물들 중 어느 하나이다. 다른 바람직한 실시형태에 있어서, 본 발명에 의해 제조될 수 있는 세포 결합-약물 컨쥬게이트는 표 8에 표시된 컨쥬게이트들 중 어느 하나이다.

[0533] 표 1. 본 발명의 대표적인 화합물의 구조



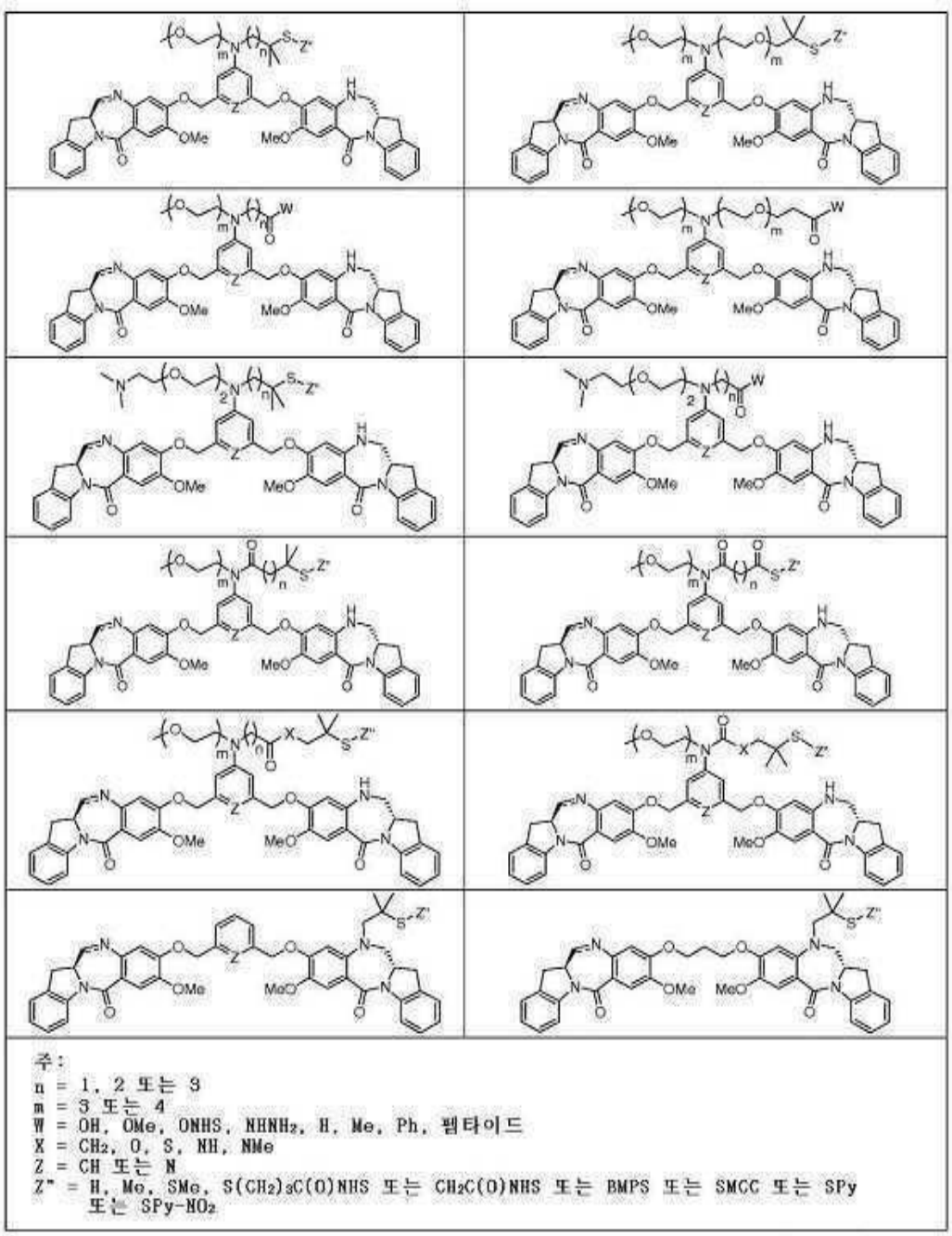
[0534]

[0535] 표 2. 본 발명의 대표적인 화합물의 구조(계속)



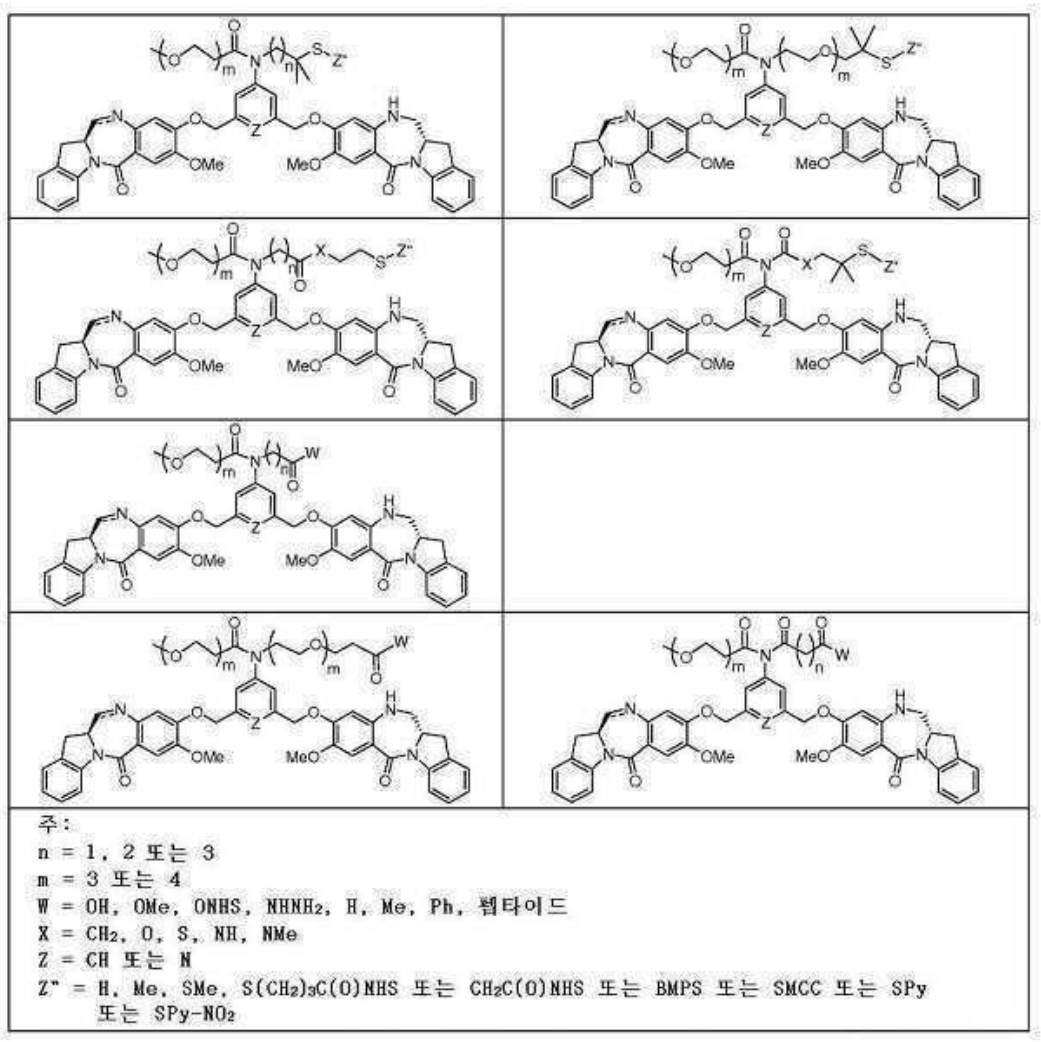
[0536]

[0537] 표 3. 본 발명의 대표적인 화합물의 구조(계속)



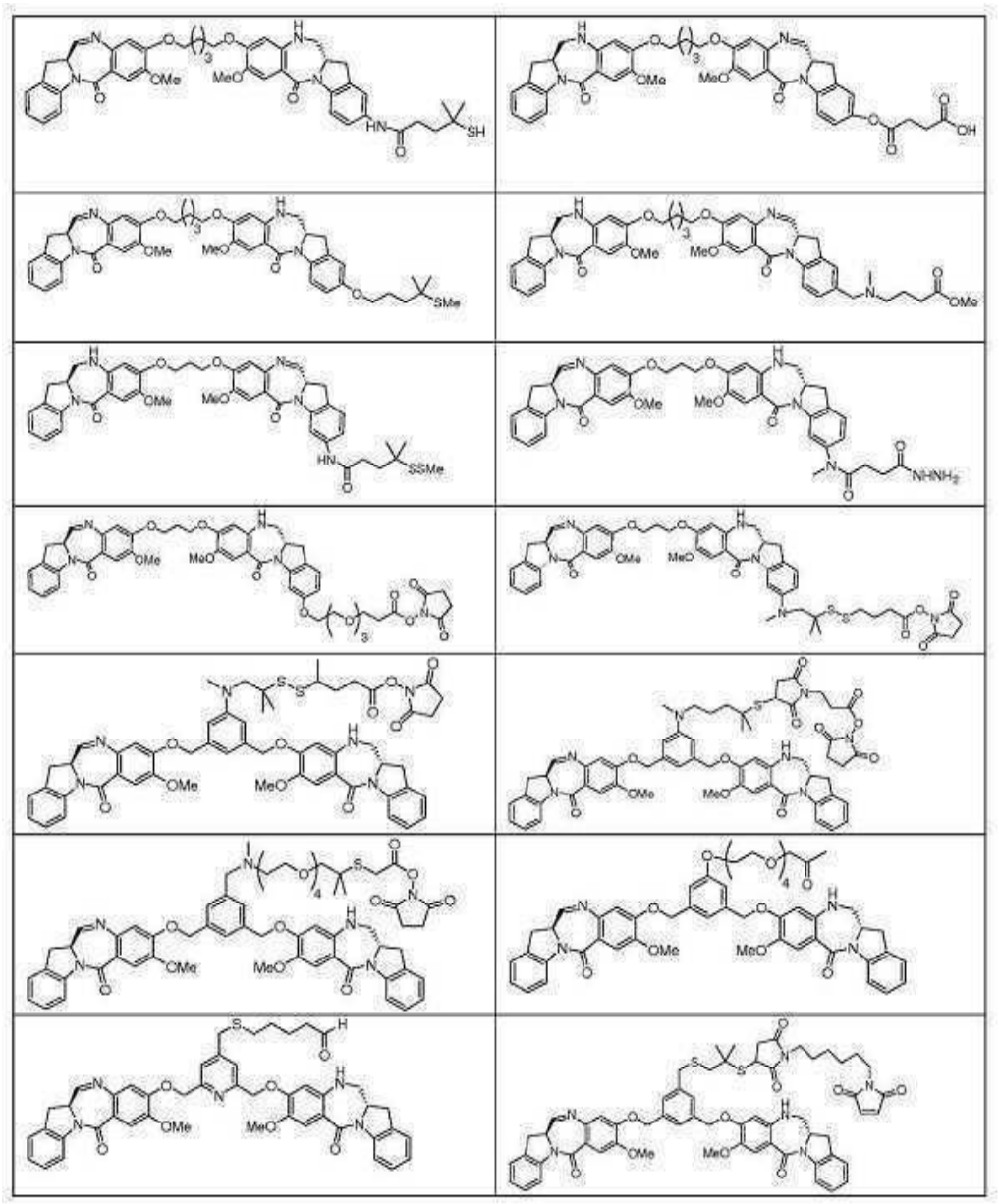
[0538]

[0539] 표 4. 본 발명의 대표적인 화합물의 구조(계속)



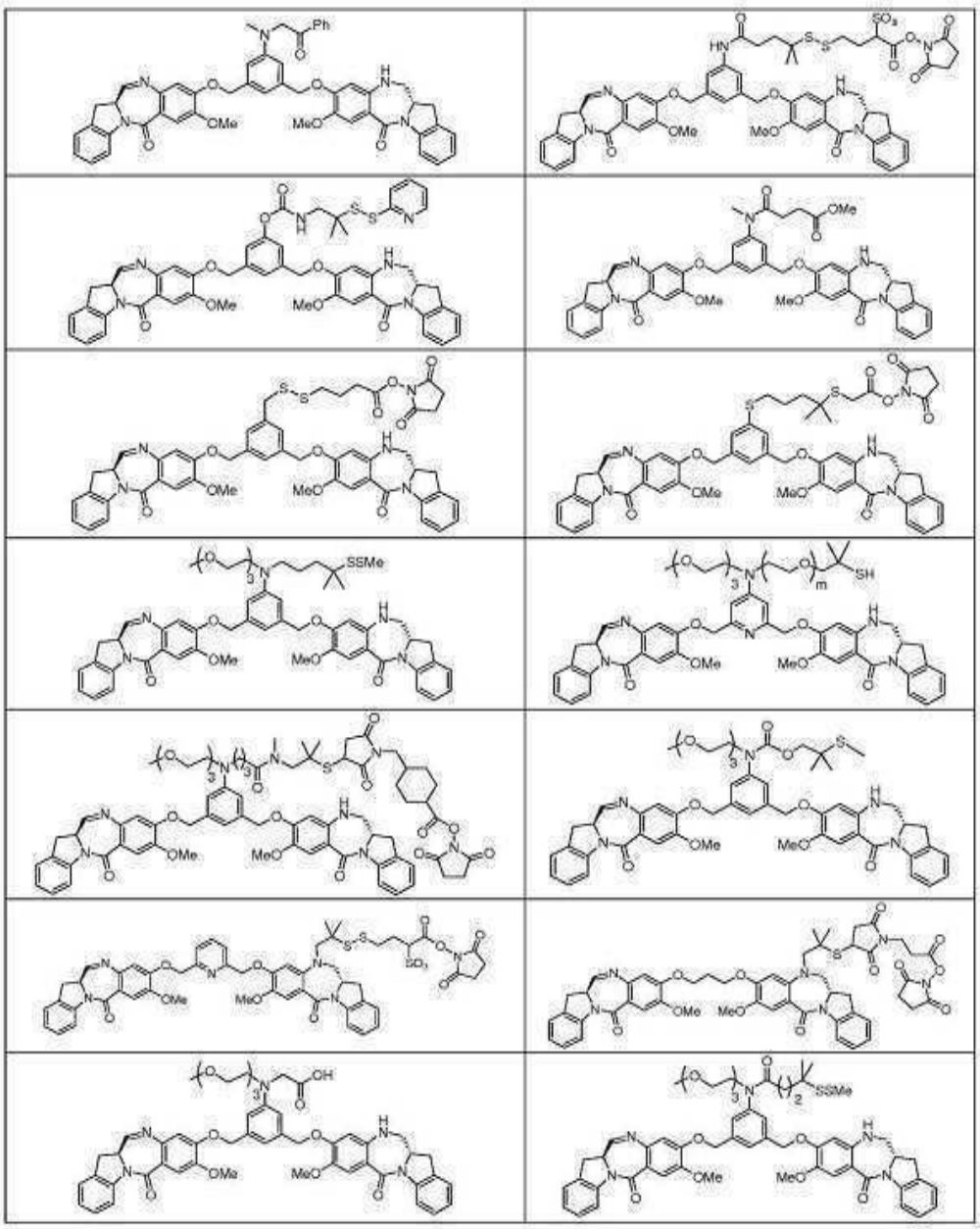
[0540]

[0541] 표 5. 본 발명의 대표적인 화합물의 구조(계속)



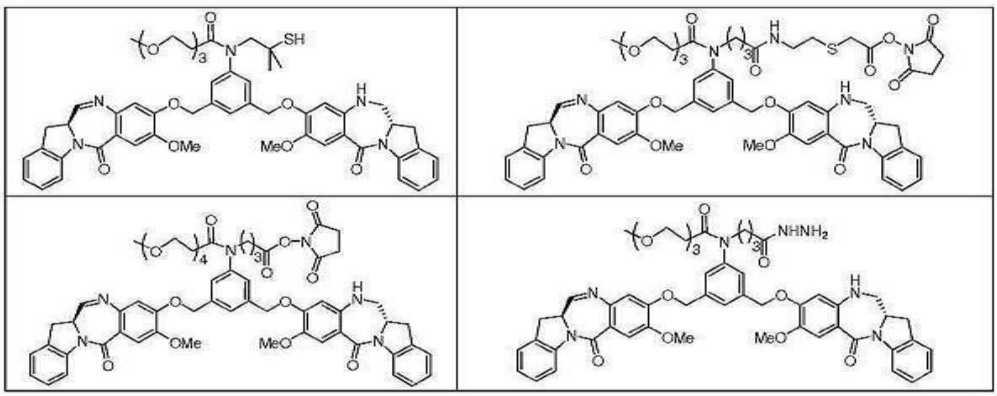
[0542]

[0543] 표 6 본 발명의 대표적인 화합물의 구조(계속)



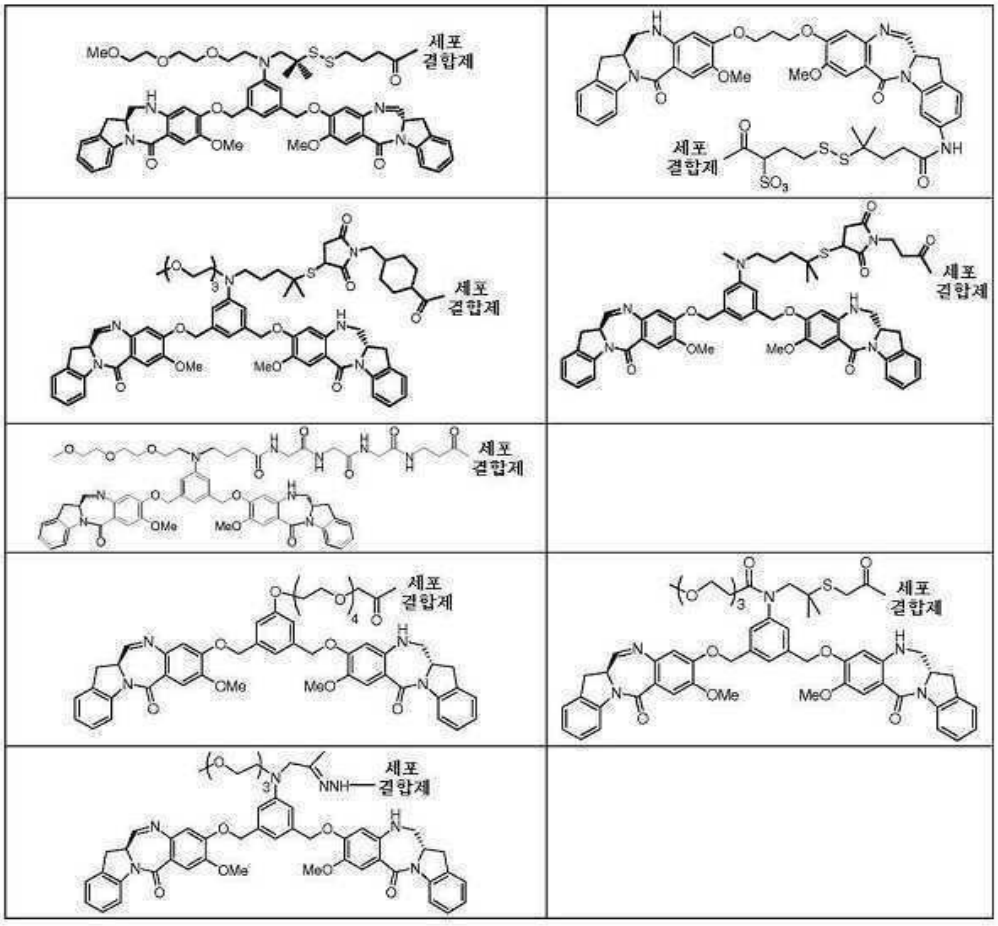
[0544]

[0545] 표 7. 본 발명의 대표적인 화합물의 구조(계속)



[0546]

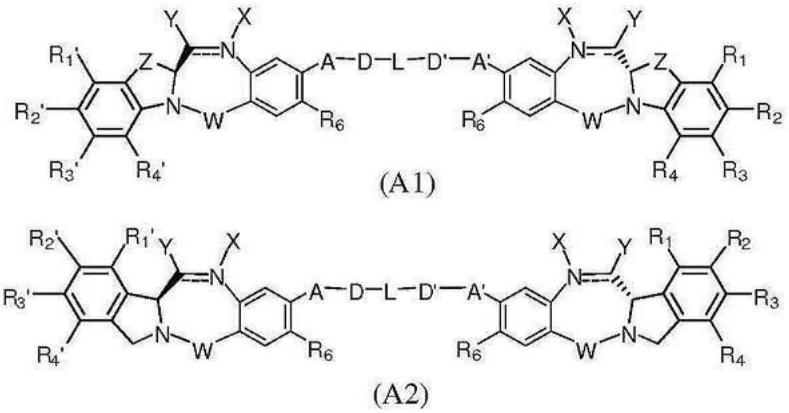
[0547] 표 8. 본 발명의 대표적인 컨쥬게이트의 구조(계속).



[0548]

[0549] 표 1 내지 표 8에 있어서 위에서 기재된 화합물 혹은 컨쥬게이트 중 어느 것에 있어서도, 이민 이중 결합은 본 발명의 방법에 따라 이민-반응성 시약(예컨대, 본 명세서에 기재된 것들)과 반응할 수 있고/반응되어, 중아황산염 부가물을 비롯한 부가물을 형성할 수 있다. 표 1 내지 표 7의 화합물들 중에서의 이러한 이민-보호된 부가물은 본 발명의 컨쥬게이트를 생성하기 위하여 본 발명의 방법에 따라 추가의 반응에 이용될 수 있다. 마찬가지로, 이민-보호된 부가물을 포함하는 화합물은 표 8에 있어서의 컨쥬게이트를 생성하기 위하여 본 발명의 방법에서 이용될 수 있다.

[0550] 다른 실시형태에 있어서, 본 발명의 방법에 이용될 수 있는 연결 모이어티(예컨대, 반응성 기가 부착된 링커 기)를 선택적으로 보유하는 약물은 화학식 A1 또는 A2로 표시되거나; 또는 그들의 약제학적으로 허용가능한 용매화물, 염, 수화물 혹은 수화염, 그들의 광학적 이성질체, 라세미체, 부분입체이성질체, 거울상이성질체 또는 이들 화합물의 다형성 결정 구조이다:



[0551]

[0552] 식 중,

[0553] N과 C 사이의 이중선 ═ 은 단일 결합 혹은 이중 결합을 나타내고, 단 N과 C 사이의 ═ 중 적어도 하나는 이중 결합을 나타내며, 이것이 이중 결합인 경우, X는 존재하지 않고, Y는 -H이며, 이것이 단일 결합인 경우, X는 -H 또는 화합물을 프로드럭으로 전환시키는 아민 보호 모이어티이고; 바람직하게는, 이중 결합인 경우, X는 존재하지 않고, Y는 -H이고, 이중 결합은 부가물이 약물-CBA 컨쥬게이트를 제조하는 본 발명의 방법에 이용되기 전에 본 발명의 이민-반응성 시약과 반응하여 부가물을(예컨대, 중아황산염 부가물)을 형성할 수 있으며;

[0554] Y는 -H, -OR, -OCOR'로 표시되는 에스터, -OCOOR'로 표시되는 카보네이트, -OCONR'R''로 표시되는 카바메이트, -NR'R''로 표시되는 아민 혹은 하이드록실아민, -NRCOR'로 표시되는 아마이드, -NRCOP로 표시되는 펩타이드이고, 이때 P는 아미노산 또는 2 내지 20개의 아미노산 단위를 포함하는 폴리펩타이드, -SR'로 표시되는 티오에터, -SOR'로 표시되는 설폭사이드, $-SO_2R'$로 표시되는 설폰, 아황산염 $-SO_3$, 중아황산염 $-OSO_3$, $-SO_2M$, $-SO_3M$, $-OSO_3M$, 할로겐, 사이아노, 아자이도 또는 티올로부터 선택되며; 이때 M은 -H 또는 약제학적으로 허용가능한 양이온(Na^+ 등)이거나; 또는

[0555] Y는 아황산염(HSO_3, HSO_2 또는 양이온과 함께 형성된 HSO_3^-, SO_3^{2-} 혹은 HSO_2^-의 염), 메타중아황산염($H_2S_2O_5$ 또는 양이온과 함께 형성된 $S_2O_5^{2-}$의 염), 모노-, 다이-, 트라이- 및 테트라-티오포스페이트(PO_3SH_3, $PO_2S_2H_2$, POS_3H_2, PS_4H_2 또는 양이온과 함께 형성된 PO_3S^{3-}, $PO_2S_2^{3-}$, POS_3^{3-} 혹은 PS_4^{3-}의 염), 티오포스페이트 에스터 $(R^iO)_2PS(OR^i)$, R^iS-, R^iSO, R^iSO_2, R^iSO_3, 티오설페이트(HS_2O_3 또는 양이온과 함께 형성된 $S_2O_3^{2-}$의 염), 다이티오나이트($H_2S_2O_4$ 또는 양이온과 함께 형성된 $S_2O_4^{2-}$의 염), 포스포로다이티오에이트($P(=S)(OR^{k'})(S)(OH)$ 또는 양이온과 함께 형성된 그의 염), 하이드록삼산($R^{k'}C(=O)NOH$ 또는 양이온과 함께 형성된 염), 포름알데하이드 설폭실레이트($HOCH_2SO_2^-$ 또는 $HOCH_2SO_2^-Na^+$ 등과 같은, 양이온과 함께 형성된 $HOCH_2SO_2^-$의 염) 또는 이들의 혼합물이며, 이때, R^i는 1 내지 10개의 탄소 원자를 지닌 직쇄 혹은 분지쇄 알킬이고 $-N(R^j)_2$, $-CO_2H$, $-SO_3H$ 및 $-PO_3H$로부터 선택된 적어도 하나의 치환기로 치환되며; R^i는 여기에 기재된 알킬기에 대해서 치환기로 더욱 선택적으로 치환될 수 있고; R^j는 1 내지 6개의 탄소 원자를 지니는 직쇄 혹은 분지쇄 알킬이며; $R^{k'}$는 1 내지 10개의 탄소 원자를 지니는 직쇄, 분지쇄 혹은 환식 알킬, 알케닐 혹은 알키닐, 아릴, 헤테로사이클릴 또는 헤테로아릴이고;

[0556] R, R' 및 R''는 동일 또는 상이하고, 또한 -H, 치환 혹은 비치환된 1 내지 10개의 탄소 원자를 지니는 직쇄, 분지쇄 혹은 환식 알킬, 알케닐 혹은 알키닐, 폴리에틸렌 글라이콜 단위 $(-OCH_2CH_2)_n$,(이때 n은 1 내지 2000(바람직하게는 1 내지 200 또는 1 내지 20)의 정수임), 질소, 산소 및 황으로부터 독립적으로 선택된 1개 이상의 헤테로원자를 포함하는 5- 혹은 6-원 헤테로아릴 고리, 질소, 산소 및 황으로부터 독립적으로 선택된 1개 이상의 헤테로원자를 포함하는 5- 내지 18-원 융합 고리 시스템(여기서 고리 중 적어도 하나는 방향족임), 6 내지 18개의 탄소 원자를 지니는 아릴, O, S, N 및 P로부터 선택되는 1 내지 6개의 헤테로원자를 지니는 3- 내지 18-원 헤테로사이클릭 고리로부터 선택되되, 여기서 상기 치환기는 할로겐, $-OR_7$, $-NR_8R_9$, $-NO_2$, -NRCOR', $-SR_{10}$, -SOR'로 표시되는 설폭사이드, $-SO_2R'$로 표시되는 설폰, 아황산염 $-SO_3$, 중아황산염 $-OSO_3$, $-SO_2NRR'$로 표시되는 설폰아마이드, 사이아노, 아자이도, $-COR_{11}$, $-OCOR_{11}$ 또는 $-OCONR_{11}R_{12}$이고;

[0557] R_7, R_8, R_9, R_{10}, R_{11} 및 R_{12}는 각각 독립적으로 -H, 1 내지 10개의 탄소 원자를 지니는 직쇄, 분지쇄 혹은 환식 알킬, 알케닐 혹은 알키닐, 폴리에틸렌 글라이콜 단위 $(-OCH_2CH_2)_n$(이때 n은 1 내지 2000(바람직하게는 1 내지 200 또는 1 내지 20)의 정수임), 질소, 산소 및 황으로부터 독립적으로 선택된 1개 이상의 헤테로원자를 포함하는 5- 혹은 6-원 헤테로아릴 고리, 질소, 산소 및 황으로부터 독립적으로 선택된 1개 이상의 헤테로원자를 포함하는 5- 내지 18-원 융합 고리 시스템(여기서 고리 중 적어도 하나는 방향족임), 6 내지 18개의 탄소 원자를 지니는 아릴, O, S, N 및 P로부터 선택되는 1 내지 6개의 헤테로원자를 지니는 3- 내지 18-원 헤테로사이클릭 고리를 지니는 3- 내지 10-원 헤테로사이클릭 고리로부터 선택되고, R_{10}은 선택적으로 SR_{13} 또는 COR_{13}이며;

[0558] R_{13}은 1 내지 10개의 탄소 원자를 지니는 직쇄, 분지쇄 혹은 환식 알킬, 알케닐 혹은 알키닐, 질소, 산소 및 황

으로부터 독립적으로 선택된 1개 이상의 헤테로원자를 포함하는 5- 혹은 6-원 헤테로아릴 고리, 질소, 산소 및 황으로부터 독립적으로 선택된 1개 이상의 헤테로원자를 포함하는 5- 내지 18-원 융합 고리 시스템(여기서 고리 중 적어도 하나는 방향족임), 6 내지 18개의 탄소 원자를 지니는 아릴, O, S, N 및 P로부터 선택되는 1 내지 6개의 헤테로원자를 지니는 3- 내지 18-원 헤테로사이클릭 고리로부터 선택되고, 선택적으로 R_{11}은 OR_{14}이되, R_{14}는 R과 동일한 정의를 지니며, 선택적으로 R''는 -OH이고;

[0559] W는 C=O, C=S, CH_2, BH, SO 또는 SO_2이며;

[0560] R_1, R_2, R_3, R_4, R_1', R_2', R_3' 및 R_4'는 각각 독립적으로 -H, 치환 또는 비치환된 1 내지 10개의 탄소 원자를 지니는 직쇄, 분지쇄 혹은 환식 알킬, 알케닐 혹은 알키닐, 폴리에틸렌 글라이콜 단위 $(-OCH_2CH_2)_n$(이때 n은 1 내지 2000(바람직하게는 1 내지 200 또는 1 내지 20)의 정수임), 또는 할로겐, 구아니디늄[-NH(C=NH)NH_2], $-OR_7$, $-NR_8R_9$, $-NO_2$, -NRCOR', $-SR_{10}$, -SOR'로 표시되는 설폭사이드, $-SO_2R'$로 표시되는 설폰, 아황산염 $-SO_3$, 중아황산염 $-OSO_3$, $-SO_2NRR'$로 표시되는 설폰아마이드, 사이아노, 아자이도, $-COR_{11}$, $-OCOR_{11}$ 또는 $-OCONR_{11}R_{12}$로부터 선택된 치환기로부터 선택되되, R_7, R_8, R_9, R_{10}, R_{11} 및 R_{12}는 위에 정의된 바와 같고, 선택적으로, R_1, R_2, R_3, R_4, R_1', R_2', R_3' 또는 R_4'는 중 어느 하나는, 상기 반응성 기가 부착된 상기 연결기(존재한다면)로, 이는 상기 반응성 기가 부착된 상기 연결기를 선택적으로 보유하는 폴리피롤로, 폴리-인돌릴, 폴리-이미다졸릴, 폴리피롤로-이미다졸릴, 폴리-피롤로-인돌릴 또는 폴리미이다졸로-인돌릴 단위로부터 선택될 수 있으며;

[0561] Z는 $-(CH_2)_n-$(이때, n은 1, 2 또는 3임), $-CR_{15}R_{16}$, $-NR_{17}$, -O- 또는 -S-로부터 선택되되, 이때 R_{15}, R_{16} 및 R_{17}은 각각 독립적으로 -H, 1 내지 10개의 탄소 원자를 지니는 직쇄, 분지쇄 혹은 환식 알킬, 폴리에틸렌 글라이콜 단위 $(-OCH_2CH_2)_n$으로부터 선택되고, 이때 n은 1 내지 2000(바람직하게는 1 내지 200, 또는 1 내지 20)이며;

[0562] R_6은 -OR, -SR 또는 -NRR'이고, 이때 R 및 R'는 위에 부여된 바와 동일한 정의를 지니며, 선택적으로 R_6은 (존재한다면) 상기 반응성 기가 부착된 상기 연결기이고;

[0563] X'는 $-CH_2$, -NR, -CO, -BH, -SO 또는 $-SO_2$로부터 선택되되, R은 위에서 부여된 것과 동일한 정의를 지니며;

[0564] Y'는 -O-, $-CH_2-$, -NR 또는 -S이되, 이때 R은 위에서 부여된 것과 동일한 정의를 지니고;

[0565] Z'는 $-CH_2$ 또는 $-(CH_2)_n$이되, 이때 n은 2, 3 또는 4이고, 단 X', Y' 및 Z'는 모두 동시에 CH_2는 아니며;

[0566] A 및 A'는 동일 또는 상이하고, 또한 -O-, -CRR'O-, -S-, -CRR'S-, $-NR_{15}-$ 또는 $-CRR'NR_{15}-$로부터 선택되되, 이때, R 및 R'는 위에서 부여된 것과 동일한 정의를 지니고, R_{15}는 R과 동일한 정의를 지니며;

[0567] D 및 D'는 동일 또는 상이하고, 또한 독립적으로, 할로겐, $-OR_7$, $-NR_8R_9$, $-NO_2$, -NRCOR', $-SR_{10}$, -SOR'로 표시되는 설폭사이드, $-SO_2R'$로 표시되는 설폰, 아황산염 $-SO_3$, 중아황산염 $-OSO_3$, $-SO_2NRR'$로 표시되는 설폰아마이드, 사이아노, 아자이도, $-COR_{11}$, $-OCOR_{11}$ 또는 $-OCONR_{11}R_{12}$로 중 어느 하나로 선택적으로 치환된 1 내지 10개의 탄소 원자를 지니는 직쇄, 분지쇄 혹은 환식 알킬, 알케닐 혹은 알키닐(이때 R_7, R_8, R_9, R_{10}, R_{11} 및 R_{12}는 위에서 정의된 바와 같음), 또는 폴리에틸렌 글라이콜 단위 $(-OCH_2CH_2)_n$(이때 n은 1 내지 2000(바람직하게는 1 내지 200 또는 1 내지 20)의 정수임)으로부터 선택되고;

[0568] L은 선택적 페닐기 또는 O, S, N 및 P로부터 선택된 1 내지 6개의 헤테로원자를 지니며 선택적으로 치환된 3- 내지 18-원 헤테로사이클릭 고리이며, 이때, 상기 치환기는 (존재한다면) 상기 반응성 기가 부착된 상기 연결기, 또는 1 내지 10개의 탄소 원자를 지니는 직쇄, 분지쇄 혹은 환식 알킬, 알케닐 혹은 알키닐(이는 할로겐, $-OR_7$, $-NR_8R_9$, $-NO_2$, -NRCOR', $-SR_{10}$, -SOR'로 표시되는 설폭사이드, $-SO_2R'$로 표시되는 설폰, 아황산염 $-SO_3$, 중아황산염 $-OSO_3$, $-SO_2NRR'$로 표시되는 설폰아마이드, 사이아노, 아자이도, $-COR_{11}$, $-OCOR_{11}$ 또는 $-OCONR_{11}R_{12}$ 중 어느 하나로 선택적으로 치환되며, 이때, R_7, R_8, R_9, R_{10}, R_{11} 및 R_{12}는 위에 부여된 것과 동일한 정의를 지님), 폴리에틸렌 글라이콜 단위 $(-OCH_2CH_2)n$(이때 n은 1 내지 2000(바람직하게는 1 내지 200 또는 1 내지 20)의 정수임)이며; 선택적으로, L 자체는 상기 반응성 기가 부착된 상기 연결기이고; 단 상기 화합물은

반응성 기가 부착된 1개 이하의 연결기를 지닌다.

[0569] 하나의 바람직한 실시형태에 있어서, 화학식 A1 또는 A2의 약물에 대해서,

[0570] N과 C 사이의 이중선 ═ 은 단일 결합 혹은 이중 결합을 나타내고, 단 이것이 이중 결합인 경우, X는 존재하지 않고, Y는 -H이며, 이것이 단일 결합인 경우, X는 -H 또는 상기 화합물을 프로드럭으로 전환시키는 아민 보호기이고;

[0571] Y는 -H, -OR, NR'R'', 아황산염 $-SO_3M$, 또는 중아황산염 $-OSO_3M$으로부터 선택되되, 이때 M은 -H 또는 약제학적으로 허용가능한 양이온(예컨대, Na^+)이고;

[0572] R은 -H, 1 내지 10개의 탄소 원자를 지니는 직쇄, 분지쇄 혹은 환식 알킬, 알케닐 혹은 알키닐, 폴리에틸렌 글라이콜 단위 $(-OCH_2CH_2)_n$(이때 n은 1 내지 2000(바람직하게는 1 내지 200 또는 1 내지 20)의 정수임), 6 내지 10개의 탄소 원자를 지니는 아릴, 3 내지 10개의 탄소 원자를 지니는 헤테로사이클릭 고리로부터 선택되며;

[0573] W는 C=O, CH_2 또는 SO_2이고;

[0574] R_1, R_2, R_3, R_4, R_1', R_2', R_3' 및 R_4'는 각각 독립적으로 -H, $-NO_2$ 또는 (존재한다면) 상기 반응성 기가 부착된 상기 연결기로부터 선택되며;

[0575] R_6은 $-OR_{18}$이되, 이때 R_{18}은 R과 동일한 정의를 지니고;

[0576] Z는 $-(CH_2)_n$(이때 n은 1, 2 또는 3임), $-CR_{15}R_{16}$, $-NR_{17}$, -O- 또는 -S-로부터 선택되되, 이때, R_{15}, R_{16} 및 R_{17}은 각각 독립적으로 -H, 1 내지 10개의 탄소 원자를 지니는 직쇄, 분지쇄 혹은 환식 알킬, 폴리에틸렌 글라이콜 단위 $(-OCH_2CH_2)_n$(이때 n은 1 내지 2000(바람직하게는 1 내지 200 또는 1 내지 20)의 정수임)으로부터 선택되며;

[0577] X'는 $-CH_2$ 또는 C=O로부터 선택되고;

[0578] Y'는 -O-, -NR 또는 -S이되, 이때 R은 위에서 정의된 바와 같으며;

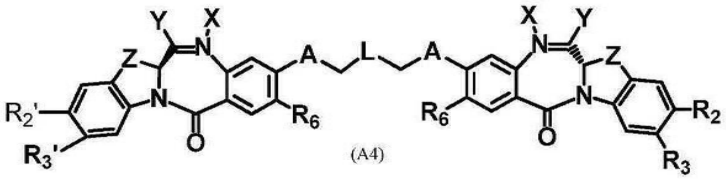
[0579] Z'는 $-CH_2-$ 또는 $-(CH_2)_2-$이고;

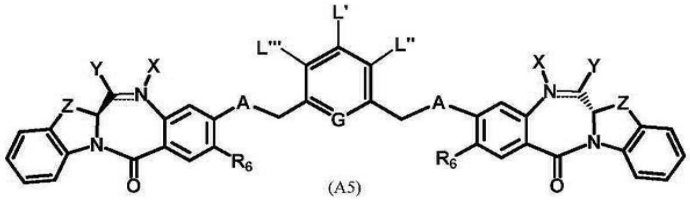
[0580] A 및 A'는 각각 -O-이며;

[0581] D 및 D'는 동일 또는 상이하고, 또한 독립적으로 1 내지 10개의 탄소 원자를 지니는 직쇄, 분지쇄 혹은 환식 알킬, 알케닐 혹은 알키닐로부터 선택되며;

[0582] L은 선택적으로 치환된 3 내지 10개의 탄소 원자를 지니는 선택적 페닐 기 또는 헤테로사이클 고리(여기서 치환기는 (존재한다면) 상기 반응성 기가 부착된 상기 연결기임)이거나, 또는 1 내지 10개의 탄소 원자를 지니는 직쇄, 분지쇄 혹은 환식 알킬, 알케닐 혹은 알키닐(할로겐, $-OR_7$, $-NR_8R_9$ $-NO_2$, -NRCOR', $-SR_{10}$, -SOR'로 표시되는 설폭사이드, $-SO_2R'$로 표시되는 설폰, 아황산염 $-SO_3$, 중아황산염 $-OSO_3$, $-SO_2NRR'$로 표시되는 설폰아마이드, 사이아노, 아자이도, $-COR_{11}$, $-OCOR_{11}$ 또는 $-OCONR_{11}R_{12}$ 중 어느 하나로 선택적으로 치환됨), 폴리에틸렌 글라이콜 단위 $(-OCH_2CH_2)_n$(이때 n은 1 내지 2000(바람직하게는 1 내지 200 또는 1 내지 20)의 정수임)으로부터 선택되고; 선택적으로, L 자체는 반응성기가 부착된 상기 연결기이며; 또는 그들의 약제학적으로 허용가능한 용매화물, 염, 수화물 혹은 수화염, 그들의 광학적 이성질체, 라세미체, 부분입체이성질체, 거울상이성질체 또는 이들 화합물의 다형성 결정 구조.

[0583] 다른 바람직한 실시형태에 있어서, 화학식 A1 또는 A2의 약물은 화학식 A4 또는 A5의 화합물, 또는 그들의 약제학적으로 허용가능한 용매화물, 염, 수화물 혹은 수화염, 그들의 광학적 이성질체, 라세미체, 부분입체이성질체, 거울상이성질체 또는 이들 화합물의 다형성 결정 구조로 표시된다:

[0584] 

[0585] 

[0586] 식 중,

[0587] N과 C 사이의 이중선 ═ 은 단일 결합 혹은 이중 결합을 나타내고, 단 이것이 이중 결합인 경우, X는 존재하지 않고, Y는 -H이며, 이것이 단일 결합인 경우, X는 -H 또는 상기 화합물을 프로드럭으로 전환시키는 아민 보호기이고;

[0588] Y는 -H, -OH, -OR로 표시되는 에터, -NR'R'', 아황산염 $-SO_3M$ 또는 중아황산염 $-OSO_3M$으로부터 선택되고;

[0589] M은 -H 또는 약제학적으로 허용가능한 양이온(예컨대, Na^+)이며;

[0590] R, R' 및 R''는 1 내지 10개의 탄소 원자를 지니는 직쇄, 분지쇄 혹은 환식 알킬, 알케닐 혹은 알키닐로부터 선택되고;

[0591] R_2, R_3, R_2' 및 R_3' 중 하나는 (존재한다면) 반응성기가 부착된 상기 연결기이고 나머지는 -H, -NRCOR' 또는 $-NO_2$이며;

[0592] R_6은 -OR이고, 이때 R은 위에서와 동일한 정의를 지니며;

[0593] Z는 $-CH_2-$ 또는 -NR이고, 이때 R은 위에서와 동일한 정의를 지니며;

[0594] A는 -O- 또는 $-NR_{15}$이고;

[0595] L은 $-(CH_2)_{nn}-$(여기서 nn은 0 또는 1 내지 5의 정수임), 또는 2 내지 4개의 탄소 원자를 지니는 치환 혹은 비치환된 알킬 또는 알케닐(여기서 상기 치환기는 할로겐, $-OR_7$, $-NR_8R_9$, $-NO_2$, -NRCOR', $-SR_{10}$, -SOR'로 표시되는 설폭사이드, $-SO_2R$'로 표시되는 설폰, 아황산염 $-SO_3$, 중아황산염 $-OSO_3$, $-SO_2NRR$'로 표시되는 설폰아마이드, 사이아노, 아자이도, $-COR_{11}$, $-OCOR_{11}$ 또는 $-OCONR_{11}R_{12}$로부터 선택됨)이며;

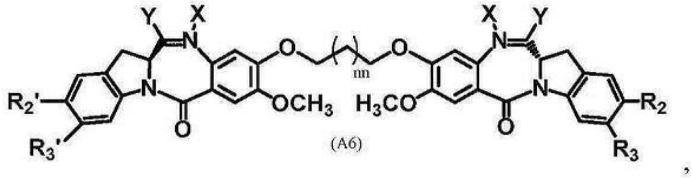
[0596] R_7, R_8, R_9, R_{10}, R_{11}, R_{12} 및 R_{15}는 위에서 부여된 것과 동일한 정의를 지니고;

[0597] 선택적으로, L 자체는 (존재한다면) 반응성기가 부착된 상기 연결기이며;

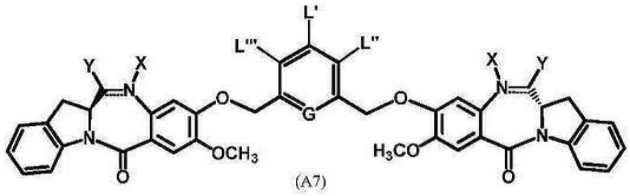
[0598] L', L'' 또는 L''' 중 하나는 (존재한다면) 반응성기가 부착된 상기 연결기인 한편, 나머지는 -H이고; 바람직하게는 L'는 (존재한다면) 반응성기가 부착된 상기 연결기이며;

[0599] G는 -CH- 또는 -N-이다.

[0600] 또 다른 바람직한 실시형태에 있어서, 화학식 A1 또는 A2의 화합물은 이하의 화학식 A6 또는 A7로부터의 화학식의 화합물, 또는 그들의 약제학적으로 허용가능한 용매화물, 염, 수화물 혹은 수화염, 그들의 광학적 이성질체, 라세미체, 부분입체이성질체, 거울상이성질체 또는 이들 화합물의 다형성 결정 구조로 표시된다:



,



[0601]

[0602] 식 중,

[0603] N과 C 사이의 이중선 ═ 은 단일 결합 혹은 이중 결합을 나타내고, 단 이것이 이중 결합인 경우, X는 존재하지 않고, Y는 -H이며, 이것이 단일 결합인 경우, X는 -H 또는 상기 화합물을 프로드럭으로 전환시키는 아민 보호기이고;

[0604] Y는 -H, -OH, -OR로 표시되는 에터, 아황산염 $-SO_3$ 또는 중아황산염 $-OSO_3$로부터 선택되며;

[0605] R은 1 내지 10개의 탄소 원자를 지니는 직쇄, 분지쇄 혹은 환식 알킬, 알케닐 혹은 알키닐로부터 선택되고;

[0606] nn은 0 또는 1 내지 5의 정수이며;

[0607] R_2, R_3, R_2' 및 R_3' 중 하나는 (존재한다면) 반응성기가 부착된 상기 연결기이고, 나머지는 -H, -NRCOR' 또는 $-NO_2$이며;

[0608] L', L'' 또는 L''' 중 하나는 (존재한다면) 반응성기가 부착된 상기 연결기이되, 단, L', L'' 또는 L''' 중 하나가 반응성 기에 부착된 상기 연결기이면, 나머지는 -H(예컨대, L'가 반응성 기에 부착된 상기 연결기이면, L'' 및 L'''는 -H임)이고;

[0609] G는 -CH- 또는 -N-이다.

[0610] 다른 특정 실시형태에 있어서, 화학식 A4 및 A6의 R_2, R_3, R_2' 및 R_3' 중 하나는 반응성 기에 부착된 상기 연결기(존재한다면)이고, 또한 화학식 $\mathbf{-W'-R^x-V-R^y-J}$로 표시되며, 나머지는 -H이고; 화학식 A5 및 A7 중 L'' 및 L'''는 -H이고, L'는 (존재한다면) 반응성기가 부착된 상기 연결기이고, 또한 $\mathbf{-W'-R^x-V-R^y-J}$ 로 표시된다:

[0611] 식 중,

[0612] W'는 존재하지 않거나, $-CR^cR^e-$, -O-, -O-C(=O)-, -S-, $-CH_2-S-$, -O-(C=O)O-, -O-(C=O)N(R^e)-, -N(R^e)-, -N(R^e)-C(=O)-, -N(R^e)-C(=O)O- 또는 -C(=O)-이고;

[0613] R^x는 존재하지 않거나 또는 1 내지 10개의 탄소 원자를 지니는 선택적으로 치환된 직쇄, 분지쇄 혹은 환식 알킬, 알케닐 혹은 알키닐이며;

[0614] V는 존재하지 않거나, $-(CH_2-CH_2-O)_n-$, -O-, -O-C(=O)-, -S-, -O-(C=O)O-, O-(C=O)N(R^e)-, -N(R^e)-, -N(R^e)-C(=O)-, -N(R^e)-C(=O)O-, -C(=O)-, 아미노산, 또는 2 내지 8개의 아미노산을 지니는 펩타이드이고;

[0615] R^y는 존재하지 않거나, 또는 1 내지 10개의 탄소 원자를 지니는 직쇄, 분지쇄 혹은 환식 알킬이며;

[0616] R^c는 -H 또는 1 내지 4개의 탄소 원자를 지니는 직쇄 혹은 분지쇄 알킬이고;

[0617] R^e는 -H, 1 내지 10개의 탄소 원자를 지니는 직쇄, 분지쇄 혹은 환식 알킬, 알케닐 혹은 알키닐 또는 $-(CH_2-CH_2-$

O)$_n$-R^{c}이며;

[0618] n은 1 내지 24의 정수이고;

[0619] J는 제4특정 실시형태에 있어서 위에 기재된 바와 같다.

[0620] 바람직하게는, R^{c}는 -H 또는 -Me; R^{e}는 1 내지 6개의 탄소 원자를 지니는 직쇄 혹은 분지쇄 알킬 또는 -(CH$_2$-CH$_2$-O)$_n$-R^{c}이고; n은 2 내지 8의 정수이며, 변수의 나머지는 제4특정 실시형태에서 위에 기재된 바와 같다.

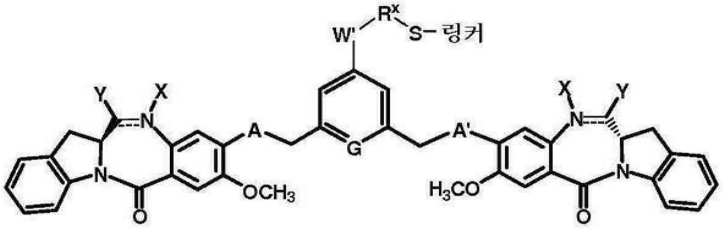
[0621] 다른 바람직한 실시형태에 있어서, V는 아미노산 또는 2 내지 8개의 아미노산을 지니는 펩타이드이다. 더 바람직하게는, V는 발린-시트룰린, gly-gly-gly 또는 ala-leu-ala-leu이다.

[0622] 바람직하게는, J는 위에 기재된 바와 같이 -SH, -SSR^d 또는 -COE이다.

[0623] 다른 특정 실시형태에 있어서, 화학식 A4 및 A6의 R$_2$, R$_3$, R$_2$' 및 R$_3$' 중 하나는 (존재한다면) 반응성기가 부착된 상기 연결기이고, 또한 화학식 **-W'-R^x-S-Z^s** 로 표시되며; 화학식 A5 및 A7 중 L'' 및 L'''는 -H이고, L'는 **-W'-R^x-S-Z^s** 로 표시되며, 여기서 변수들은 제8 및 제9특정 실시형태에 기재된 바와 같다.

[0624] 다른 실시형태에 있어서, 화학식 A1 내지 A7(이민-반응성 시약에 의한 프레-인큐베이션과 함께 혹은 없이)의 화합물은, 반응성 기에 부착된 상기 연결기가 이미 존재하지 않는다면, 위에서 기재된 이작용성 가교 시약과 더욱 반응하여 본 발명의 방법에서 이용될 수 있는, 반응성 기에 부착된 상기 연결기를 보유하는 이민-함유 약물을 형성할 수 있다.

[0625] 소정의 실시형태에 있어서, 본 발명의 방법에서 이용될 수 있는 반응성 기에 부착된 상기 연결기를 보유하는 이민-함유 약물은 이하의 화학식들 중 어느 하나로 표시된다:



(A8)

[0626]

[0627] 식 중,

[0628] "링커"는 위에 기재된(제9특정 실시형태에 있어서) 화학식 a1, a2, a3, a4, a5, a6, a7 또는 a8로 표시된다;

[0629] q는 1 내지 5의 정수이고;

[0630] n은 2 내지 6의 정수이며;

[0631] D는 -H 또는 -SO$_3$M이고;

[0632] M은 -H 또는 약제학적으로 허용가능한 양이온, 예컨대, Na$^+$ 또는 K$^+$이며; 나머지 변수들은 제8 또는 제9 특정 실시형태에서 기재된 바와 같다.

[0633] 바람직하게는, q는 2이고, n은 4이다.

[0634] 바람직한 실시형태에 있어서, 링커는 위에 기재된 화학식 a1, a4, a5, a9 또는 a10으로 표시된다.

[0635] 소정의 실시형태에 있어서, 바로 위에 기재된 화학식 A8의 화합물에 대해서, 변수는 이하에 기재된 바와 같다:

[0636] W'는 -O-, -N(R^e)-, -N(R^e)-C(=O)-, -N(COR^e)-, -S- 또는 -CH$_2$-S-이고;

[0637] R^{x}는 존재하지 않거나 또는 1 내지 6개의 탄소 원자를 지니는 직쇄, 분지쇄 혹은 환식 알킬로부터 선택되며;

[0638] R^e는 -H, 1 내지 10개의 탄소 원자를 지니는 직쇄, 분지쇄 혹은 환식 알킬, 알케닐 혹은 알키닐 또는 $-(CH_2-CH_2-O)_n-R^k$이되, 이때, R^k는 -H, 1차, 2차 혹은 3차 아미노 기 또는 5- 혹은 6-원 질소 함유 헤테로사이클, 예컨대, 피페리딘 또는 몰폴린을 선택적으로 보유하는, 1 내지 6개의 탄소 원자를 지니는 직쇄, 분지쇄, 환식 알킬이고;

[0639] n은 1 내지 24의 정수이고, 변수의 나머지는 바로 위의 실시형태에서 위에 기재된 바와 같다.

[0640] 바람직하게는, R^k는 -H 또는 -Me이고, n은 2 내지 8의 정수이다. 바람직하게는, R^x는 1 내지 6개의 탄소 원자를 지닌 직쇄 혹은 분지쇄 알킬이다.

[0641] 다른 바람직한 실시형태에 있어서, 링커는 위에서 표시된 화학식 a1, a4, a5, a10 및 a11로부터 선택된 화학식 중 어느 하나로 표시되고; 변수의 나머지는 제9 특정 실시형태에서 위에 기재된 바와 같다.

[0642] 소정의 실시형태에 있어서, 바로 위에 기재된 화학식 A8의 화합물에 대해서, 변수는 이하에 기재된 바와 같다:

[0643] X' 및 Y'는 둘 모두 -H이고;

[0644] A 및 A'는 둘 모두 -O-이며;

[0645] R_6은 -OMe이고;

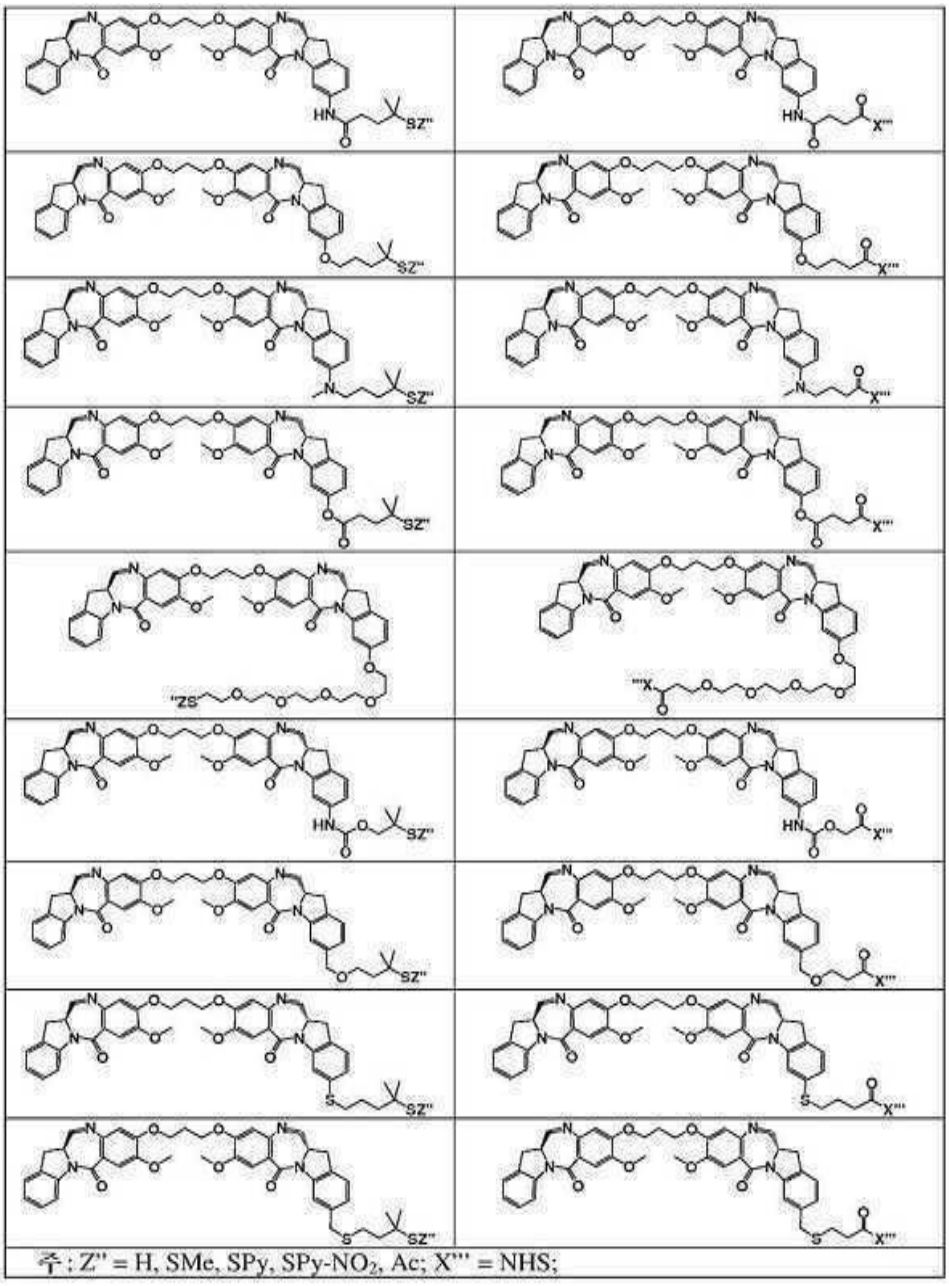
[0646] R^x는 1 내지 6개의 탄소 원자를 지닌 직쇄 혹은 분지쇄 알킬이며; 나머지 변수는 위에서 기재된 바와 같다.

[0647] 바람직하게는, R^x는 $-(CH_2)_p-(CR^fR^g)-$이되, 이때, R^f 및 R^g는 각각 독립적으로 -H 또는 1 내지 4개의 탄소 원자를 지니는 직쇄 혹은 분지쇄 알킬로부터 선택되고; p는 0, 1, 2 또는 3이다. 더 바람직하게는, R^f 및 R^g는 동일 혹은 상이하고, -H 및 -Me로부터 선택되며; p는 1이다.

[0648] 다른 바람직한 실시형태에 있어서, 링커는 위에 표시된 화학식 a1, a4, a5, a10 및 a11 중 어느 하나로 표시되며; 나머지 변수는 위에서 기재된 바와 같다.

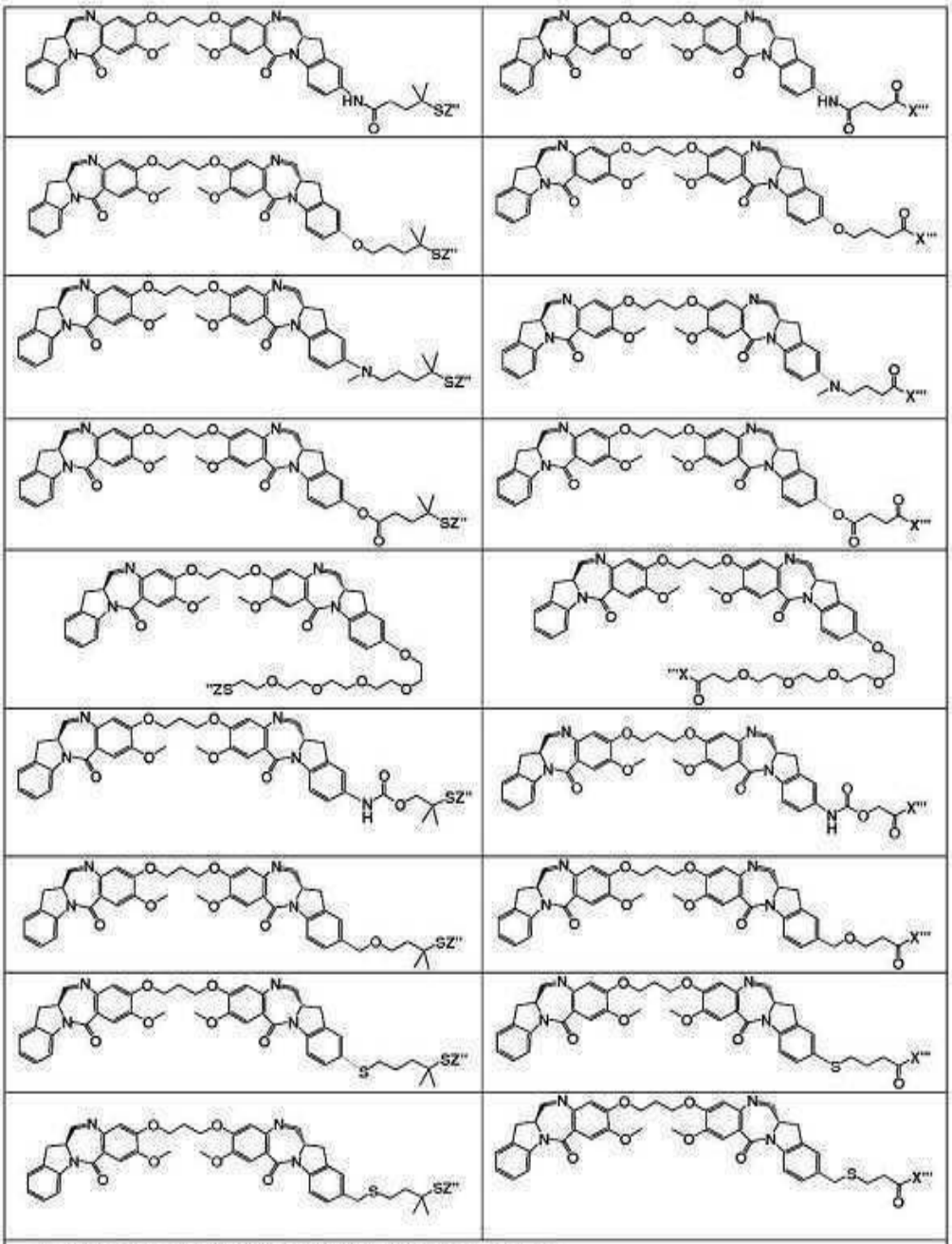
[0649] 다른 바람직한 실시형태에 있어서, 화학식 A1, A2 또는 A3의 약물은 표 11 내지 표 13에 표시된 화합물들 중 어느 하나이고, 컨쥬게이트는 표 14에 표시된 컨쥬게이트들 중 어느 하나이다.

[0650] 표 11. 본 발명의 방법에서 이용될 수 있는 대표적인 약물의 구조(계속).



[0651]

[0652] 표 12. 본 발명의 방법에서 이용될 수 있는 대표적인 약물의 구조(계속).

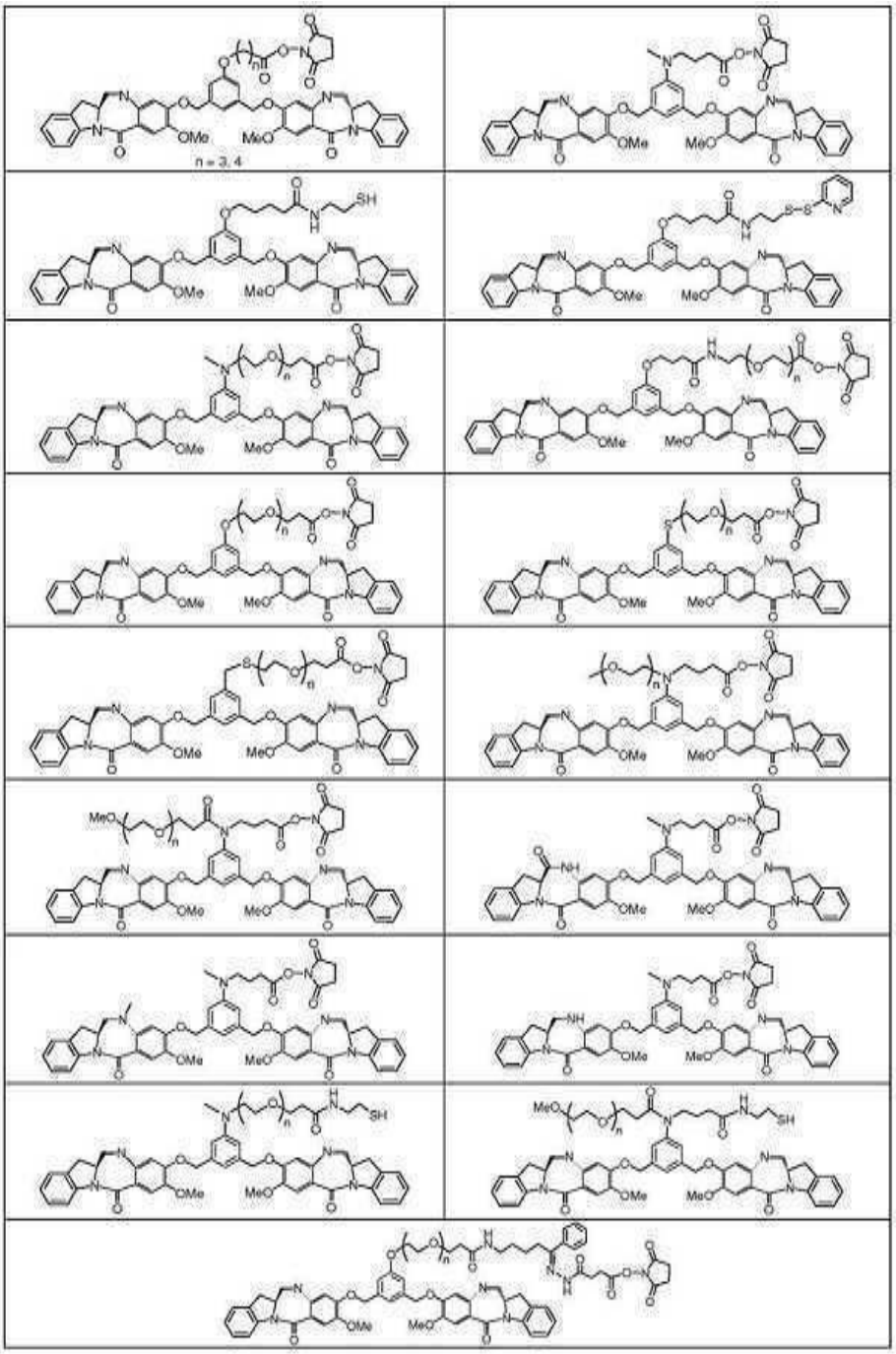


주 : Z'' = H, SMe, SPy, SPy-NO_2, Ac; X''' = NHS;

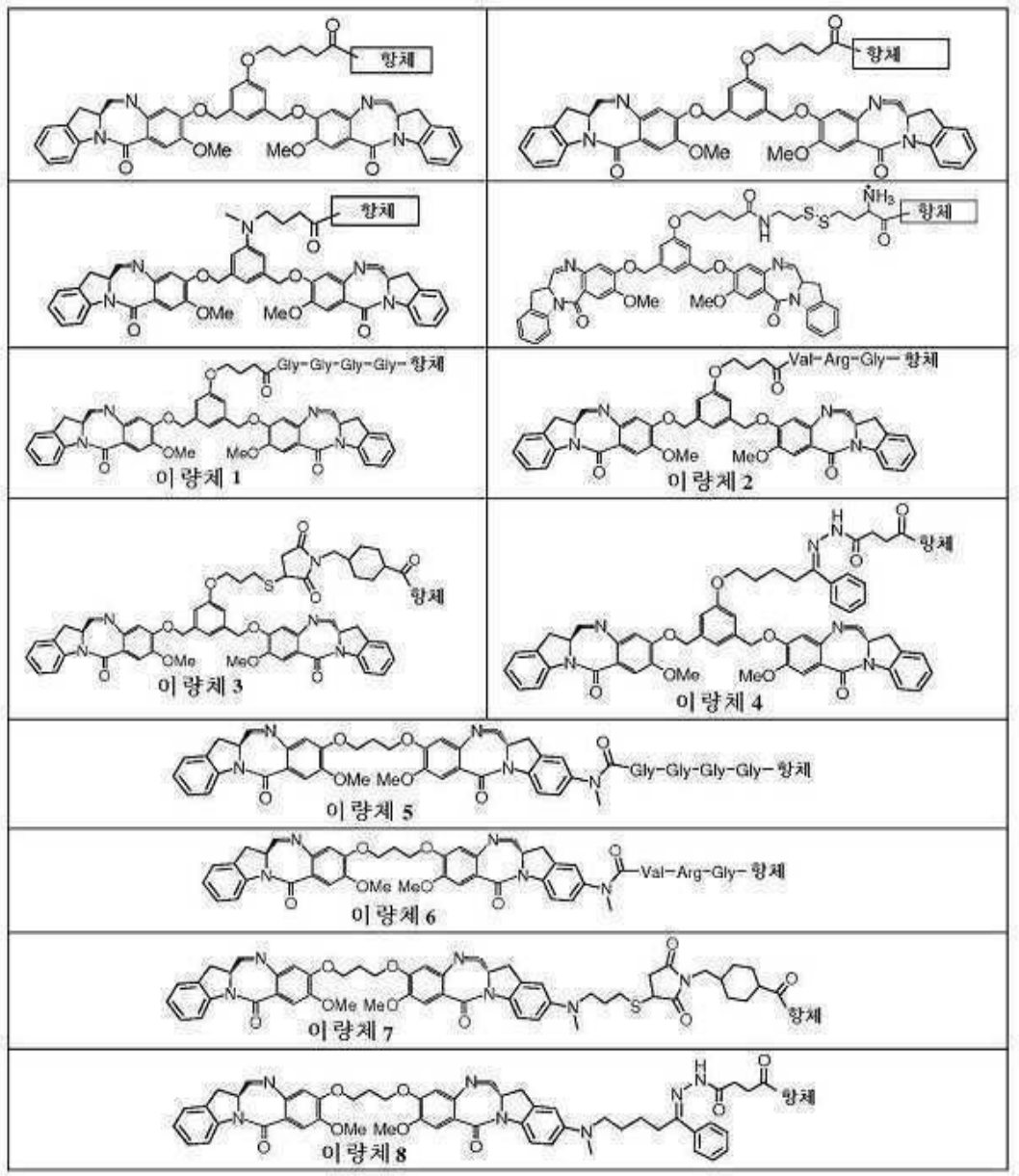
[0653]

[0654] 표 13. 본 발명의 방법에서 이용될 수 있는 대표적인 약물의 구조(계속).

[0655]



[0656] 표 14. 본 발명의 방법에 의해 제조될 수 있는 대표적인 컨쥬게이트의 구조.



[0657]

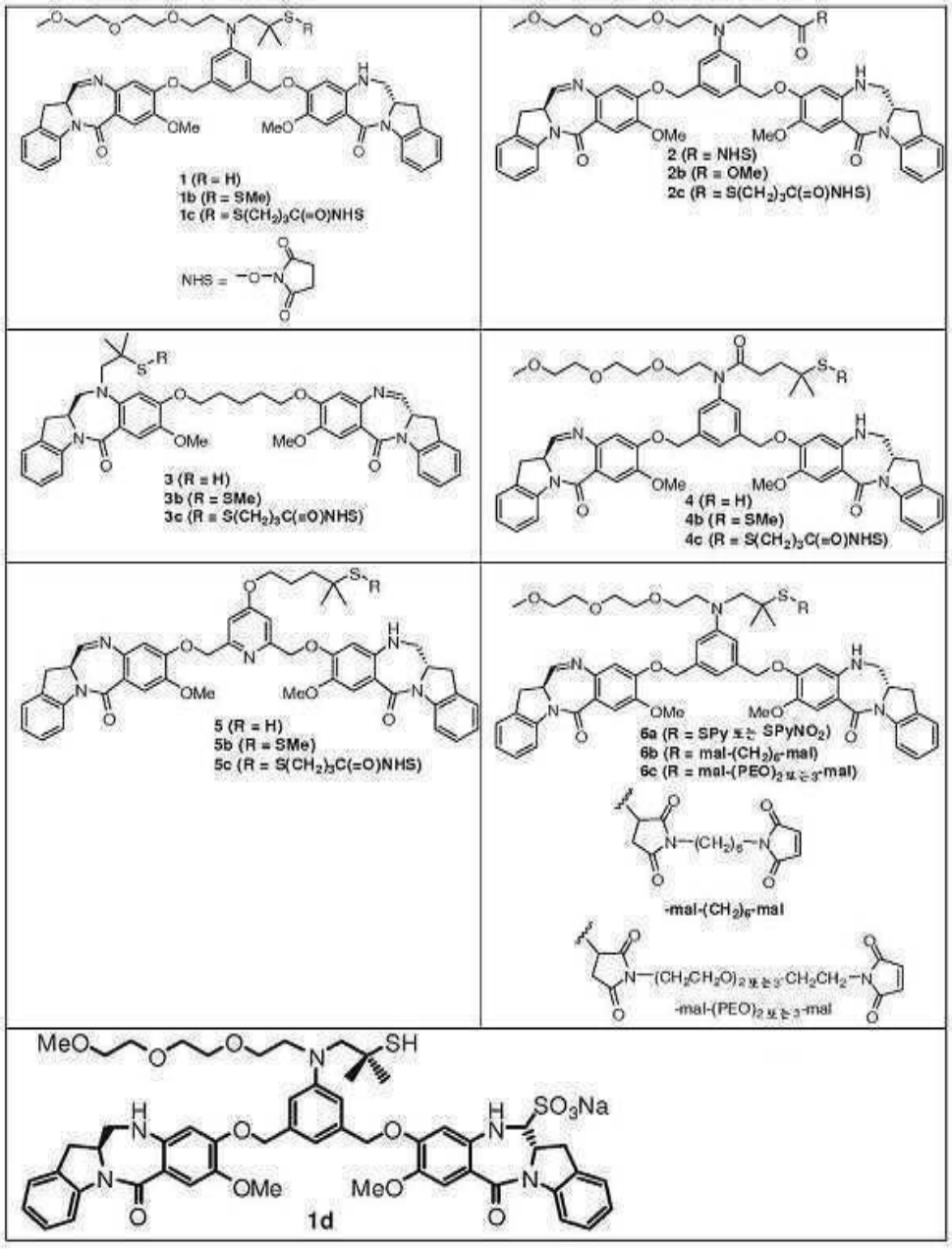
[0658] 표 11 내지 13의 임의의 화합물 및 표 14의 임의의 컨쥬게이트는 해당 이민 반응성 시약과 반응하는 적어도 하나의 그의 이민 결합을 지니므로, 부가물, 예컨대, 중아황산염 부가물을 형성할 수 있다.

[0659] 일 실시형태에 있어서, 연결 모이어티를 보유하는 이민-함유 약물은 위에서 기재된 반응성 에스터기, 티올 혹은 티올 반응성 기를 지니는 것들이다.

[0660] 대안적으로, 위에서 기재된 약물은 이작용성 가교제와 더 반응하여 연결 모이어티를 보유하는 약물을 형성할 수 있다. 기재된 임의의 이작용성 가교제가 이용될 수 있다.

[0661] 다른 바람직한 실시형태에 있어서, 본 발명에서 이용될 수 있는 약물은 표 15에 표시된 화합물들 중 어느 하나이다.

[0662] 표 15. 본 방법에서 이용될 수 있는 대표적인 약물 화합물.



[0663]

[0664] **세포 결합제**

[0665] 본 발명의 컨쥬게이트의 치료제로서의 효율은 적절한 세포 결합제의 주의깊은 선택에 의존한다. 세포 결합제는 현재 공지된 임의의 종류일 수 있거나, 또는 공지되어 있는 것일 수 있고, 펩타이드 및 비-펩타이드를 포함한다. 일반적으로, 이들은 항체(특히 단클론성 항체), 림포카인, 호르몬, 성장 인자, 비타민(예컨대, 폴레이트 등, 이는 그의 세포 표면 수용체, 예컨대, 폴레이트 수용체에 결합될 수 있음), 영양소-수송 분자(예컨대, 트랜스페린), 또는 임의의 기타 세포 결합 분자 혹은 물질일 수 있다.

[0666] 소정의 실시형태에 있어서, 세포 결합제는 단백질 혹은 폴리펩타이드, 또는 단백질 혹은 폴리펩타이드를 포함하는 화합물이다. 바람직하게는, 단백질 혹은 폴리펩타이드는 곁사슬 $-NH_2$기를 지니는 1개 이상의 Lys 잔기를 포함한다. 대안적으로 혹은 부가적으로, 단백질 또는 폴리펩타이드는 1개 이상의 Cys 잔기를 포함한다. Cys 잔기의 곁사슬 -SH기는 무손상 상태일 수 있거나, 또는 환원될 수 있는 다이설파이드 결합 중에 있을 수 있다. 바람직하게는, 다이설파이드 결합(들)의 환원은 단백질 혹은 폴리펩타이드의 세포 결합 기능에 유의하게 부정적으로 영향을 미치지 않는다(예컨대, 항체 혹은 그의 항원-결합 부분의 경우에, 다이설파이드 결합의 환원은 경쇄/중쇄의 분리를 실질적으로 증가시키지 않는다.

[0667] Lys 곁사슬 $-NH_2$기 및/또는 Cys 곁사슬 -SH기는 링커에 공유 결합될 수 있고, 이는 이어서 본 발명의 이량체 화합물에 연결되므로, 본 발명의 이량체 화합물에 세포 결합제를 컨쥬게이팅시킬 수 있다. 각 단백질 기반 세포 결합제는 이작용성 가교제를 통해서 본 발명의 화합물을 연결하는데 이용가능한 다수의 Lys 곁사슬 $-NH_2$기 및/또는 Cys 곁사슬 -SH기를 포함할 수 있다.

[0668] 이용될 수 있는 세포 결합제의 더욱 구체적인 예는 이하를 포함한다:

[0669] 다클론성 항체;

[0670] 단클론성 항체;

[0671] Fab, Fab' 및 $F(ab')_2$, Fv, 미니바디, 다이아바디, 트라이바디, 테트라바디 등과 같은 항체의 단편(Parham, *J. Immunol.* 131:2895-2902 (1983); Spring *et al. J. Immunol.* 113:470-478 (1974); Nisonoff *et al. Arch. Biochem. Biophys.* 89:230-244 (1960), Kim *et al.*, Mol, Cancer Ther., 7: 2486-2497 (2008), Carter, Nature Revs., 6 : 343-357 (2006));

[0672] 인터페론(예컨대, α, β, ɣ);

[0673] IL-2, IL-3, IL-4, IL-6 등과 같은 림포카인;

[0674] 호르몬, 예컨대, 인슐린, TRH(갑상선 자극 호르몬 방출 호르몬: thyrotropin releasing hormone), MSH(멜라닌세포-자극 호르몬: melanocyte-stimulating hormone), 안드로겐 및 에스트로겐 등과 같은 스테로이드 호르몬;

[0675] 성장 인자 및 집락 자극 인자, 예컨대, EGF, TGF-알파, FGF, VEGF, G-CSF, M-CSF 및 GM-CSF(Burgess, *Immunology Today* 5: 155-158 (1984));

[0676] 트랜스페린(O'Keefe *et al. J. Biol. Chem.* 260:932-937 (1985));

[0677] 비타민, 예컨대, 폴레이트;

[0678] 파이브로넥틴 III형(FN3) 반복의 컨센서스 서열에 기초한 단백질 스캐폴드(또한 센티린(Centyrin)으로서 공지됨; 본 명세서에 참조로 병합된 미국 특허 공개 제2010/0255056호 참조);

[0679] 설계자 안키린 반복 단백질(Designer Ankyrin Repeat Protein)(DARPin; 본 명세서에 참조로 병합된 미국 특허 출원 제20040132028호; 제20090082274호; 제20110118146호; 제20110224100호), 참조로 본 명세서에 병합된 C. Zahnd *et al*. 2010, Cancer Res., 70; 1595-1605); 및

[0680] 파이브로넥틴 도메인 스캐폴드 단백질(애드넥틴(Adnectin): 본 명세서에 참조로 병합된 미국 특허 출원 제20070082365호; 제20080139791호).

[0681] 단클론성 항체 수법은 특정 단클론성 항체의 형태로 예시적인 특정 세포 결합제의 생산을 허용한다. 특히 당업계에 잘 알려져 있는 것은, 무손상 표적 세포, 표적 세포로부터 단리된 항원, 전체 바이러스(whole virus), 약화된 전체 바이러스, 및 바이러스 코드 단백질 등과 같은 바이러스 단백질 등과 같은 대상 항원으로 마우스, 래트, 햄스터 혹은 기타 임의의 포유동물을 면역화함으로써 생성된 단클론성 항체를 작성하기 위한 수법이다. 감작된 인간 세포가 또한 이용될 수 있다. 단클론성 항체를 작성하는 다른 방법은 scFv(단쇄 가변 영역), 구체적으로는 인간 scFv의 파지 라이브러리의 이용이다(예컨대, Griffiths *et al.*, 미국 특허 제5,885,793호 및 제5,969,108호; McCafferty *et al.*, WO 92/01047; Liming *et al.*, WO 99/06587 참조). 또한, 미국 특허 제5,639,641호에 개시된 재표면화된(resurfaced) 항체가 또한 이용될 수 있고, 이는 키메라 항체 및 인간화 항체일 수 있다. 적절한 세포 결합제의 선택은 표적화될 특정 세포 모집단에 좌우되는 선택의 문제이지만, 일반적으로 인간 단클론성 항체는 적절한 것이 이용가능하다면 바람직하다.

[0682] 예를 들어, 단클론성 항체 MY9는 CD33 항원에 대해서 특이적으로 결합하는 쥣과 IgG_1 항체이고{J.D. Griffin *et al* 8 Leukemia Res., 521 (1984)}, 표적 세포가 급성 골수성 백혈병(acute myelogenous leukemia: AML) 질환에서와 같이 CD33을 발현한다면 이용될 수 있다. 세포 결합제는 특이적 혹은 비특이적 방식으로 세포를 결합할 수 있는 임의의 화합물일 수 있다. 일반적으로, 이들은 항체(특히 단클론성 항체 및 항체 단편), 인터페론, 림포카인, 호르몬, 성장 인자, 비타민, 영양소-수송 분자(예컨대 트랜스페린), 또는 임의의 기타 세포결합 분자 혹은 물질일 수 있다.

[0683] 세포 결합제가 항체인 경우, 이것은 폴리펩타이드인 항체에 결합하고, 경막 분자(예컨대, 수용체) 혹은 리간드,

예컨대, 성장 인자일 수 있다. 예시적인 항원은 레닌 같은 분자; 성장 호르몬, 예컨대, 인간 성장 호르몬 및 소 성장 호르몬; 성장 호르몬 방출 인자; 부갑상선 호르몬; 갑상선 자극 호르몬; 지방단백질; 알파-1-안티트립신; 인슐린 A-사슬; 인슐린 B-사슬; 프로인슐린; 여포 자극 호르몬; 칼시토닌; 황체형성 호르몬; 글루카곤; 응혈 인자, 예컨대, 인자 vmc, 인자 IX, 조직 인자(tissue factor: TF) 및 폰 빌더브란드(von Willebrands) 인자; 항-응혈 인자, 예컨대, 단백질 C; 동맥 나트륨이뇨 인자; 폐 계면활성제; 플라스미노겐 활성제, 예컨대, 유로키나제 혹은 인간 유린 혹은 조직형 플라스미노겐 활성제(t-PA); 봄베신; 트롬빈; 조혈 성장 인자; 종양 괴사 인자-알파 및 -베타; 엔케팔리나제; RANTES(regulated on activation normally T-cell expressed and secreted); 인간 대식세포 염증성 단백질(MIP-1-알파); 혈청 알부민, 예컨대, 인간 혈청 알부민; 뮬러리안-억제 물질; 렐락신 A-사슬; 렐락신 B-사슬; 프로렐락신; 마우스 성선자극호르몬-연관 펩타이드; 미생물 단백질, 예컨대, 베타-락타마제; DNase; IgE; 세포독성 T-림프구 연관 항원(cytotoxic T-lymphocyte associated antigen: CTLA), 예컨대, CTLA-4; 인히빈; 액티빈; 혈관 내피 성장 인자(vascular endothelial growth factor: VEGF); 호르몬 혹은 성장 인자용의 수용체; 단백질 A 혹은 D; 류마티스 인자; 신경영양 인자, 예컨대, 골 유래 신경영양 인자(bone-derived neurotrophic factor: BDNF), 뉴로트로핀-3, -4, -5 또는 -6(NT-3, NT4, NT-5 또는 NT-6), 또는 신경 성장 인자, 예컨대, NGF-β 혈소판 유래 성장 인자(vascular endothelial growth factor: PDGF); 섬유아세포 성장 인자, 예컨대, aFGF 및 bFGF; 섬유아세포 성장 인자 수용체 2(FGFR2); 상피세포 성장 인자(epidermal growth factor: EGF); 형질전환 성장 인자(transforming growth factor: TGF), 예컨대, TGF-알파, 및 TGF-β1, TGF-β2, TGF-β3, TGF-β4 또는 TGF-β5를 포함하는 TGF-베타; 인슐린-유사 성장 인자-I 및 -II(IGF-I 및 IGF-II); 데스(1-3)-IGF-I(뇌 IGF-I), 인슐린-유사 성장 인자 결합 단백질, EpCAM, GD3, FLT3, PSMA, PSCA, MUC1, MUC1 6, STEAP, CEA, TENB2, EphA 수용체, EphB 수용체, 폴레이트 수용체, FOLR1, 메소텔린, 크립토, 알파$_v$베타$_6$, 인테그린, VEGF, VEGFR, EGFR, 트랜스페린 수용체, IRTA1, IRTA2, IRTA3, IRTA4, IRTA5; CD 단백질, 예컨대, CD2, CD3, CD4, CD5, CD6, CD8, CD11, CD14, CD19, CD20, CD21, CD22, CD25, CD26, CD28, CD30, CD33, CD36, CD37, CD38, CD40, CD44, CD52, CD55, CD56, CD59, CD70, CD79, CD80. CD81, CD103, CD105, CD134, CD137, CD138, CD152 또는 전문이 참조로 병합되는 미국 공개 공보 제20080171040호 혹은 미국 공개 공보 제20080305044호에 개시된 하나 이상의 종양-연관 항원 혹은 세포-표면 수용체에 결합되는 항체; 면역독소; 골 형성 단백질(bone morphogenetic protein: BMP); 인터페론, 예컨대, 인터페론-알파, -베타 및 -감마; 집락 자극 인자(CSF), 예컨대, M-CSF, GM-CSF 및 G-CSF; 인터류킨(IL), 예컨대, IL-1 내지 IL-10; 슈퍼옥사이드 디스뮤타제; T-세포 수용체; 표면 막 단백질; 붕괴 가속 인자; 바이러스 항원, 예를 들어, HIV 엔빌로프(envelope)의 부분; 수송 단백질; 호밍(homing) 수용체; 어드레신; 조절 단백질; 인테그린, 예컨대, CD11a, CD11b, CD11c, CD18, ICAM, VLA-4 및 VCAM; 종양 연관 항원, 예컨대, HER2, HER3 혹은 HER4 수용체; 엔도글린, c-Met, 1GF1R, PSGR, NGEP, PSMA, PSCA, LGR5, B7H4, 및 상기 열거된 폴리펩타이드의 어느 것의 단편을 포함한다.

[0684] 부가적으로, 골수 세포에 결합되는 GM-CSF는, 급성 골수성 백혈병으로부터 병든 세포에 세포 결합제로서 이용될 수 있다. 활성화된 T-세포에 결합되는 IL-2는 이식 편대 거부의 예방을 위하여, 이식편-대-숙주 질환의 치료 및 예방을 위하여, 그리고 급성 T-세포 백혈병의 치료를 위하여 이용될 수 있다. 멜라닌 세포에 결합되는 MSH는, 흑색종의 처리를 위하여 이용될 수 있고, 따라서 흑색종을 목적으로 한 항체일 수 있다. 엽산은 난소 및 기타 종양에서 발현되는 폴레이트 수용체를 표적화하는데 이용될 수 있다. 상피세포 성장 인자는 폐 및 두경부 등과 같은 편평 암을 표적화하는데 이용될 수 있다. 소마토스타틴은 신경아세포종 및 기타 종양 유형을 표적화하는데 이용될 수 있다.

[0685] 유방 및 고환의 암은 세포 결합제로서 각각 에스트로겐(또는 에스트로겐 유사체) 또는 안드로겐(또는 안드로겐 유사체)으로 성공적으로 표적화될 수 있다.

[0686] 일 실시형태에 있어서, 상기 세포 결합제는 인간화 단클론성 항체이다. 다른 실시형태에 있어서, 세포 결합제는 huMy9-6, 또는 기타 관련된 항체이고, 이는 미국 특허 제7,342,110호 및 제7,557,189호(본 명세서에 참조로 병합됨)에 기재되어 있다. 다른 실시형태에 있어서, 상기 세포 결합제는 미국 가출원 제61/307,797호, 제61/346,595호, 제61/413,172호 및 미국 특허 출원 제13/033,723호(US 2012-0009181 A1로서 공개됨)에 기재된 항폴레이트 수용체 항체이다. 이들 출원의 모두의 교시내용은 참조로 그의 전문이 본 명세서에 병합된다.

[0687] 소정의 실시형태에 있어서, 세포 결합제는 미국 특허 제7,342,110호 및 제7,557,189호(본 명세서에 참조로 병합됨)에 기재된 huMy9-6 또는 그의 관련 항체 등과 같은, 본 명세서에 개시된 항체와 항원-결합을 위한 주용한 서열을 공유하는 단클론성 항체 혹은 그의 항원-결합일 수 있다. 이들 유도체 항체는 본 명세서에 기재된 항체와 비교해서, 실질적으로 동일 혹은 동등한 (1) 경쇄 및/또는 중쇄 CDR3 영역; (2) 경쇄 및/또는 중쇄 CDR1, CDR2

및 CDR3 영역; 또는 (3) 경쇄 및/또는 중쇄 영역을 지닐 수 있다. 이들 영역 내의 서열은 CDR 영역 내에 치환을 비롯한 보존적 아미노산 치환을 포함할 수 있다. 바람직하게는, 1, 2, 3, 4 혹은 5 이하의 보존적 치환이 있다. 소정의 실시형태에 있어서, 유도체 항체는 본 명세서에 기재된 항체에 대해서 적어도 약 90%, 95%, 99% 또는 100% 동일한 경쇄 영역 및/또는 중쇄 영역을 지닌다. 이들 유도체 항체는 본 명세서에 기재된 항체와 비교해서 표적 항원 대해서 실질적으로 동일한 결합 특이성 및/또는 친화성을 지닐 수 있다. 바람직하게는, 유도체 항체의 K_d 및/또는 $k_{오프}$값은 본 명세서에 기재된 항체의 10-배(보다 높거나 보다 낮음), 5-배(보다 높거나 보다 낮음), 3-배(보다 높거나 보다 낮음) 또는 2-배(보다 높거나 보다 낮음) 이내이다. 이들 유도체 항체는 완전 인간 항체 혹은 인간화 항체 혹은 키메라 항체일 수 있다. 유도체 항체는 임의의 기술-인식된 방법에 따라서 생산될 수 있다.

[0688] 일 실시형태에 있어서, 상기 항폴레이트 수용체 항체는 인간 폴레이트 수용체 1에 특이적으로 결합하는 인간화 항체 혹은 그의 항원 결합 단편이되, 이때 상기 항체는 (a) GYFMN(서열번호 1)을 포함하는 중쇄 CDR1; RIHPYDGDTFYNQXaa$_1$FXaa$_2$Xaa$_3$(서열번호 2)을 포함하는 중쇄 CDR2; 및 YDGSRAMDY(서열번호 3)을 포함하는 중쇄 CDR3; 및 (b) KASQSVSFAGTSLMH(서열번호 4)을 포함하는 경쇄 CDR1; RASNLEA(서열번호 5)을 포함하는 경쇄 CDR2; 및 QQSREYPYT(서열번호 6)을 포함하는 경쇄 CDR3을 포함하며; Xaa$_1$은 K, Q, H 및 R로부터 선택되고; Xaa$_2$는 Q, H, N 및 R로부터 선택되며; Xaa$_3$은 G, E, T, S, A 및 V로부터 선택된다. 바람직하게는, 중쇄 CDR2 서열은 RIHPYDGDTFYNQKFQG(서열번호 7)을 포함한다.

[0689] 다른 실시형태에 있어서, 상기 항폴레이트 수용체 항체는

[0690] QVQLVQSGAEVVKPGASVKISCKASGYTFTGYFMNWVKQSPGQSLEWIGRIHPYDGDTFYNQKFQGKATLTVDKSSNTAHMELLSLTSEDFAVYYCTRYDGSRAMDYWGQGTTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK(서열번호 8)의 아미노산 서열을 지니는 중쇄를 포함하는 인간 폴레이트 수용체 1에 특이적으로 결합하는 인간화 항체 혹은 그의 항원 결합 단편이다.

[0691] 다른 실시형태에 있어서, 상기 항폴레이트 항체는 2010년 4월 7일에 ATCC에 기탁되어 ATCC 기탁 번호 PTA-10772 및 PTA-10773 또는 10774를 지니는 플라스미드 DNA에 의해 암호화된 인간화 항체 또는 그의 항원 결합 단편이다.

[0692] 다른 실시형태에 있어서, 상기 항폴레이트 수용체 항체는

[0693] DIVLTQSPLSLAVSLGQPAIISCKASQSVSFAGTSLMHWYHQKPGQQPRLLIYRASNLEAGVPDRFSGSGSKTDFTLNISPVEAEDAATYYCQQSREYPYTFGGGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC(서열번호 9); 또는

[0694] DIVLTQSPLSLAVSLGQPAIISCKASQSVSFAGTSLMHWYHQKPGQQPRLLIYRASNLEAGVPDRFSGSGSKTDFTLTISPVEAEDAATYYCQQSREYPYTFGGGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC(서열번호 10)의 아미노산 서열을 지니는 경쇄를 포함하는 인간 폴레이트 수용체 1에 특이적으로 결합하는 인간화 항체 혹은 그의 항원 결합 단편이다.

[0695] 다른 실시형태에 있어서, 상기 항폴레이트 수용체 항체는 서열번호 8의 아미노산 서열을 지니는 중쇄 및 서열번호 9 또는 서열번호 10의 아미노산 서열을 지니는 경쇄를 포함하는 인간 폴레이트 수용체 1에 특이적으로 결합하는 인간화 항체 혹은 그의 항원 결합 단편이다. 바람직하게는, 항체는 서열번호 8의 아미노산 서열을 지니는 중쇄 및 서열번호 10의 아미노산 서열을 지니는 경쇄를 포함한다(hu FOLR1).

[0696] 다른 실시형태에 있어서, 항폴레이트 수용체 항체는 2010년 4월 7일에 ATCC에 기탁되어 ATCC 기탁 번호 PTA-10772 및 PTA-10773 또는 10774를 지니는 플라스미드 DNA에 의해 암호화된 인간화 항체 또는 그의 항원 결합 단편이다.

[0697] 다른 실시형태에 있어서, 항폴레이트 수용체 항체는,

[0698] QVQLVQSGAEVVKPGASVKISCKASGYTFTGYFMNWVKQSPGQSLEWIGRIHPYDGDTFYNQKFQGKATLTVDKSSNTAHMELLSLTSEDFAVYYCTRYDGSRAMDYWGQGTTVTVSS(서열번호 11)와 적어도 약 90%, 95%, 99% 혹은 100% 동일한 중쇄 가변 영역과,

[0699] DIVLTQSPLSLAVSLGQPAIISCKASQSVSFAGTSLMHWYHQKPGQQPRLLIYRASNLEAGVPDRFSGSGSKTDFTLNISPVEAEDAATYYCQQSREYPYTF

GGGTKLEIKR(서열번호 12);

[0700] 또는 DIVLTQSPLSLAVSLGQPAIISCKASQSVSFAGTSLMHWYHQKPGQQPRLLIYR ASNLEAGVPDRFSGSGSKTDFTLTISPVEAEDAATYYCQQSREYPYTFGGGTKLEIKR(서열번호 13)과 적어도 약 90%, 95%, 99% 혹은 100% 동일한 경쇄 가변 영역을 포함하는 인간화 항체 혹은 그의 항원 결합 단편이다.

[0701] 세포 결합제, 예컨대, 항체는, 아민 -반응성 기, 예컨대, N-하이드록시숙신이미드기(NHS기), 티올-반응성 말레이미도, 비닐피리딘, 비닐 설폰, 비닐 설폰아마이드 또는 할로아세틸계 기, 또는 티올기를 보유하는 헤테로이작용성 가교제로 변형될 수 있다.

[0702] 항체 중의 티올 잔기는 a) 2-이미노티올란 혹은 호모시스테인 티올아세톤 등과 같은 티올-생성 시약에 의한 항체의 변형, 또는 b) SPP, SPDP, SPDB, 설포-SPDB 등과 같은 다이설파이드-함유 헤테로이작용성 가교제와의 반응을 거친 후 다이설파이드 결합의 DTT 혹은 TCEP에 의한 환원에 의해 유리 티올을 생성, c) 비천연 시스테인 잔기를 혼입시키는 돌연변이 유발, 예컨대, 시스테인-공학적 조작된 항체(US2007/0092940 A1, US 2010/0003766 A1, US 7723485 B2), 또는 d) 천연 다이설파이드 결합의 환원(del Rosario, R. B. *et al.*, Cancer Res. Suppl. 1990, 50, 804s-808s)을 포함하는 당업계에 공지된 다수의 방법에 의해 도입될 수 있다.

[0703] 항체 중의 티올-반응성 기, 예컨대, 말레이미도, 비닐피리딘, 비닐 설폰, 비닐 설폰아마이드 혹은 할로아세틸계 기는 티올-반응성 기를 보유하는 헤테로이작용성 가교제(SPDB, *N*-숙신이미딜-4-(4-나이트로피리딜-2-다이티오)뷰타노에이트, 설포-SMCC, SMCC, LC-SMCC, KMUA, BMPS, GMBS, 설포-GMBS, EMCS, 설포-EMCS, AMAS, SVSB, SPP, NHS-(PEG)n-mal을 포함하지만 이들로 제한되는 것은 아니고, 이때 n = 1 내지 24, 바람직하게는 2, 4, 8, 12 및 24임)로 항체를 변형시킴으로써 도입될 수 있다. 말레이미도계 모이어티를 포함하는 가교제는 *N*-숙신이미딜 4-(말레이미도메틸)사이클로헥산-카복실레이트(SMCC), SMCC의 "장쇄" 유사체(LC-SMCC)인 *N*-숙신이미딜-4-(N-말레이미도메틸)-사이클로헥산-1-카복시-(6-아마이도카프로에이트), κ-말레이미도운데칸산 *N*-숙신이미딜 에스터(KMUA), γ-말레이미도뷰티르산 *N*-숙신이미딜 에스터(GMBS), ε-말레이미도카프로산 *N*-하이드록시숙신이미드 에스터(EMCS), m-말레이미도벤조일-*N*-하이드록시숙신이미드 에스터(MBS), *N*-(α-말레이미도아세톡시)-숙신이미드 에스터(AMAS), 숙신이미딜-6-(β-말레이미도프로피온아마이도)헥사노에이트(SMPH), *N*-숙신이미딜 4-(p-말레이미도페닐)-뷰티레이트(SMPB) 및 *N*-(p-말레이미도페닐)아이소사이아네이트(PMPI)를 포함한다. 비닐피리딘을 함유하는 티올 반응성 화합물은 (Friedman M. et. Al. *Int. J. Peptide Protein Res.* **1974**, 6, 183-185; Mak A. et. Al. Anal. Biochem. **1978**, 84, 432-440)에 기재되어 있다. 비닐 설폰 모이어티를 함유하는 티올 반응성 화합물은 (Masri M. S. J. Protein Chem., **1988**, 7, 49-54; Morpurgo, M. et. Al. Bioconjugate Chem. **1996**, 7, 363-368)에 기재되어 있다. 할로아세틸계 모이어티를 포함하는 가교 시약은 *N*-숙신이미딜-4-(아이오도아세틸)-아미노벤조에이트(SIAB), *N*-숙신이미딜 아이오도아세테이트(SIA), *N*-숙신이미딜 브로모아세테이트(SBA), 및 *N*-숙신이미딜 3-(브로모아세트아미도)프로피오네이트(SBAP)를 포함한다.

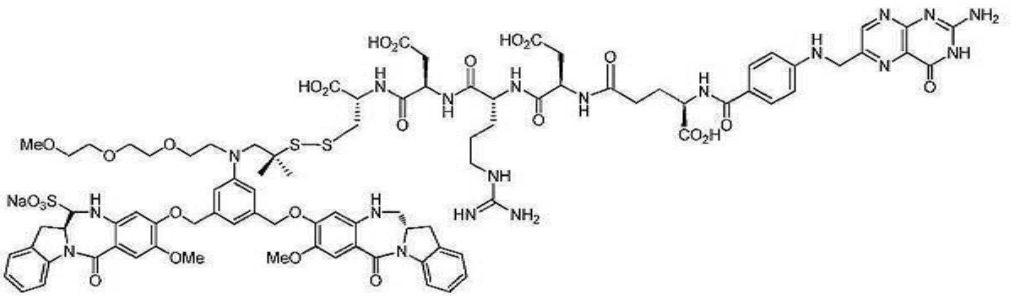
[0704] 변형된 항체는 당업계에 공지된 임의의 적절한 방법, 예를 들어, 겔 여과, TFF 혹은 이온 교환 크로마토그래피 또는 친화성 크로마토그래피에 의해 정제될 수 있다.

[0705] 후술하는 실시예에서 그리고 본 명세서에서 인용된 모든 문헌은 그들의 전문이 참조로 명확하게 병합된다.

[0706] **세포 결합-약물 컨쥬게이트**

[0707] 본 발명은, 예컨대, 다이설파이드 링커, 티오에터 링커, 아마이드 결합 링커, 펩티다제-불안정성 링커, 산-불안정성 링커, 에스터라제-불안정성 링커를 포함하지만, 이들로 제한되는 것은 아닌 각종 링커를 통해서 본 발명의 1종 이상의 세포독성 화합물에 연결된 세포결합제를 포함하는 세포 결합-약물 컨쥬게이트를 제조하는 개량된 방법을 제공한다.

[0708] 본 발명의 방법을 이용해서 제조될 수 있는 대표적인 컨쥬게이트는 항체/세포독성 화합물, 항체 단편/세포독성 화합물, 상피세포 성장 인자(EGF)/세포독성 화합물, 멜라닌 세포 자극 호르몬(MSH)/세포독성 화합물, 갑상선 자극 호르몬(thyroid stimulating hormone: TSH)/세포독성 화합물, 소마토스타틴/세포독성 화합물, 폴레이트/세포독성 화합물, 에스트로겐/세포독성 화합물, 에스트로겐 유사체/세포독성 화합물, 안드로겐/세포독성 화합물 및 안드로겐 유사체/세포독성 화합물을 포함한다. 대표적인 폴레이트/세포독성 화합물 컨쥬게이트는 이하에 묘사되되, 2개의 약물 단량체 중 하나의 이민 결합 상에 선택적 $-SO_3Na$ 부가물을 지니고 있다. 이 컨쥬게이트에 대한 대표적인 반응식은 도 26에 도시되어 있다.



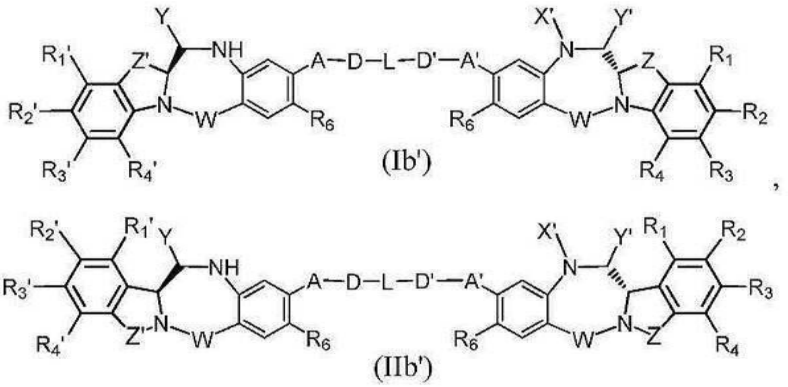
폴레이트/세포독성 화합물 컨쥬게이트

[0709]

[0710] 바람직한 실시형태에 있어서, 본 발명은 공유 결합을 통해 연결된 인돌리노벤조다이아제핀 이량체 화합물(예컨대, 화학식 Ib', IIb', Iab', IIAb', IBb', IIBb', XIIIb', Xb' 등) 및 세포 결합제를 포함하는 컨쥬게이트를 제조하는 방법을 제공한다. 링커는 세포독성제를 다수의 방법으로 그의 표적에 전달하기 위하여 종양/원치않는 증식 세포의 부위에서 절단될 수 있다. 링커는, 예를 들어, 낮은 pH(하이드라존), 환원성 환경(다이설파이드), 열분해(아마이드/펩타이드 링크)에 의해, 또는 효소 반응(에스터라제/글라이코시다제)을 통해서 절단될 수 있다.

[0711] 바람직한 양상에 있어서, 본 발명의 방법에 의해 생성될 수 있는 대표적인 세포독성 컨쥬게이트는 항체/인돌리노벤조다이아제핀 이량체 화합물, 항체 단편/인돌리노벤조다이아제핀 이량체 화합물, 상피세포 성장 인자(EGF)/인돌리노벤조다이아제핀 이량체 화합물, 멜라닌 세포 자극 호르몬(MSH)/인돌리노벤조다이아제핀 이량체 화합물, 갑상선 자극 호르몬(TSH)/인돌리노벤조다이아제핀 이량체 화합물, 소마토스타틴/ 인돌리노벤조다이아제핀 이량체 화합물, 폴레이트/인돌리노벤조다이아제핀 이량체 화합물, 에스트로겐/인돌리노벤조다이아제핀 이량체 화합물, 에스트로겐 유사체/인돌리노벤조다이아제핀 이량체 화합물, 전립선 특이적 막 항원(prostate specific membrane antigen: PSMA) 억제제/인돌리노벤조다이아제핀 이량체 화합물, 매트립타제 억제제/인돌리노벤조다이아제핀 이량체 화합물, 설계된 안키린 반복 단백질(designed ankyrin repeat protein: DARPin)/인돌리노벤조다이아제핀 이량체 화합물, 안드로겐/인돌리노벤조다이아제핀 이량체 화합물, 및 안드로겐 유사체/인돌리노벤조다이아제핀 이량체 화합물이다.

[0712] 이와 같이 해서, 제14특정 실시형태에 있어서, 본 발명의 방법은 세포독성 화합물 및 세포 결합제(CBA)를 포함하는 컨쥬게이트를 제조하되, 이때, 상기 세포독성 화합물은 연결기를 통해서 상기 CBA에 공유 결합되고, 상기 컨쥬게이트의 상기 세포독성 화합물 및 상기 연결기 부분은 이하의 화학식들 또는 그의 약제학적으로 허용가능한 염 중 어느 하나로 표시된다:



(Ib'),

(IIb')

[0713]

[0714] 식 중,

[0715] Y는 이탈기이고, 아황산염(HSO_3, HSO_2 또는 양이온과 함께 형성된 HSO_3^-, SO_3^{2-} 혹은 HSO_2^-의 염), 메타중아황산염($H_2S_2O_5$ 또는 양이온과 함께 형성된 $S_2O_5^{2-}$의 염), 모노-, 다이-, 트라이- 및 테트라-티오포스페이트(PO_3SH_3, $PO_2S_2H_2$, POS_3H_2, PS_4H_2 또는 양이온과 함께 형성된 PO_3S^{3-}, $PO_2S_2^{3-}$, POS_3^{3-} 혹은 PS_4^{3-}의 염), 티오포스페이트 에스터 $(R^iO)_2PS(OR^i)$, R^iS-, R^iSO, R^iSO_2, R^iSO_3, 티오설페이트(HS_2O_3 또는 양이온과 함께 형성된 $S_2O_3^{2-}$의 염), 다이티

오나이트($H_2S_2O_4$ 또는 양이온과 함께 형성된 $S_2O_4^{2-}$의 염), 포스포로다이티오에이트(P(=S)($OR^{k'}$)(S)(OH) 또는 양이온과 함께 형성된 그의 염), 하이드록삼산($R^{k'}C(=O)NOH$ 또는 양이온과 함께 형성된 염), 포름알데하이드 설폭실레이트($HOCH_2SO_2^-$ 또는 $HOCH_2SO_2^-Na^+$ 등과 같은, 양이온과 함께 형성된 $HOCH_2SO_2^-$의 염) 또는 이들의 혼합물이되, 이때, R^i는 1 내지 10개의 탄소 원자를 지닌 직쇄 혹은 분지쇄 알킬이고 $-N(R^j)_2$, $-CO_2H$, $-SO_3H$ 및 $-PO_3H$로부터 선택된 적어도 하나의 치환기로 치환되며; R^i는 여기에 기재된 알킬기에 대해서 치환기로 더욱 선택적으로 치환될 수 있고; R^j는 1 내지 6개의 탄소 원자를 지니는 직쇄 혹은 분지쇄 알킬이며; $R^{k'}$는 1 내지 10개의 탄소 원자를 지니는 직쇄, 분지쇄 혹은 환식 알킬, 알케닐 혹은 알키닐, 아릴, 헤테로사이클릴 또는 헤테로아릴이고; 바람직하게는, Y는 중아황산염, 차아황산염 또는 메타중아황산염의 부가물, 또는 이들의 염(나트륨염 등)이며;

[0716] X'는 -H, 아민-보호기, 상기 연결기, 1 내지 10개의 탄소 원자를 지니는 선택적으로 치환된 직쇄, 분지쇄 혹은 환식 알킬, 알케닐 혹은 알키닐, 폴리에틸렌 글라이콜 단위 $-(CH_2CH_2O)_n-R^c$, 6 내지 18개의 탄소 원자를 지니는 선택적으로 치환된 아릴, 질소, 산소 및 황으로부터 독립적으로 선택된 1개 이상의 헤테로원자를 함유하는 선택적으로 치환된 5- 내지 18-원 헤테로아릴 고리, 및 O, S, N 및 P로부터 독립적으로 선택된 1 내지 6개의 헤테로원자를 함유하는 선택적으로 치환된 3- 내지 18-원 헤테로사이클릭 고리로부터 선택되고;

[0717] Y'는 -H, 옥소기, 상기 연결기, 1 내지 10개의 탄소 원자를 지니는 선택적으로 치환된 직쇄, 분지쇄 혹은 환식 알킬, 알케닐 혹은 알키닐, 선택적으로 치환된 6- 내지 18-원 아릴, 질소, 산소 및 황으로부터 독립적으로 선택된 1개 이상의 헤테로원자를 함유하는 선택적으로 치환된 5- 내지 18-원 헤테로아릴 고리, 1 내지 6개의 헤테로원자를 지니는 선택적으로 치환된 3- 내지 18-원 헤테로사이클릭 고리로부터 선택되며;

[0718] R^c는 -H 또는 1 내지 4개의 탄소 원자를 지니는 치환 혹은 비치환된 직쇄 혹은 분지쇄 알킬 또는 상기 연결기이고;

[0719] R_1, R_2, R_3, R_4, R_1', R_2', R_3' 및 R_4'는 각각 독립적으로 -H, 1 내지 10개의 탄소 원자를 지니는 선택적으로 치환된 직쇄, 분지쇄 혹은 환식 알킬, 알케닐 혹은 알키닐, 폴리에틸렌 글라이콜 단위 $-(OCH_2CH_2)_n-R^c$, 할로겐, 구아니디늄[$-NH(C=NH)NH_2$], -OR, -NR'R'', $-NO_2$, -NCO, -NR'COR'', -SR, -SOR'로 표시되는 설폭사이드, $-SO_2R'$로 표시되는 설폰, 설포네이트 $-SO_3^-M^+$, 설페이트 $-OSO_3^-M^+$, $-SO_2NR'R''$로 표시되는 설폰아마이드, 사이아노, 아자이도, -COR', -OCOR', -OCONR'R'' 및 상기 연결기로 이루어진 군으로부터 선택되며;

[0720] M은 -H 또는 약제학적으로 허용가능한 양이온, 예컨대, Na^+이고;

[0721] R은, 각 경우에, 독립적으로 -H, 1 내지 10개의 탄소 원자를 지니는 선택적으로 치환된 직쇄, 분지쇄 혹은 환식 알킬, 알케닐 혹은 알키닐, 폴리에틸렌 글라이콜 단위 $-(CH_2CH_2O)_n-R^c$, 6 내지 18개의 탄소 원자를 지니는 선택적으로 치환된 아릴, 질소, 산소 및 황으로부터 독립적으로 선택된 1개 이상의 헤테로원자를 함유하는 선택적으로 치환된 5- 내지 18-원 헤테로아릴 고리, 또는 O, S, N 및 P로부터 독립적으로 선택된 1 내지 6개의 헤테로원자를 함유하는 선택적으로 치환된 3- 내지 18-원 헤테로사이클릭 고리로 이루어진 군으로부터 선택되며;

[0722] R' 및 R''는 각각 독립적으로 -H, -OH, -OR, -NHR, $-NR_2$, -COR, 1 내지 10개의 탄소 원자를 지니는 선택적으로 치환된 직쇄, 분지쇄 혹은 환식 알킬, 알케닐 혹은 알키닐, 폴리에틸렌 글라이콜 단위 $-(CH_2CH_2O)_n-R^c$, 및 O, S, N 및 P로부터 독립적으로 선택된 1 내지 6개의 헤테로원자를 지니는 선택적으로 치환된 3- 내지 18-원 헤테로사이클릭 고리로부터 선택되고;

[0723] R^c는 -H 또는 1 내지 4개의 탄소 원자를 지니는 치환 혹은 비치환된 직쇄 혹은 분지쇄 알킬 또는 상기 연결기이며;

[0724] n은 1 내지 24의 정수이고;

[0725] W는 C=O, C=S, CH_2, BH, SO 및 SO_2로부터 선택되며;

[0726] R_6은 -H, -R, -OR, -SR, -NR'R'', $-NO_2$, 할로겐 또는 상기 연결기이고;

[0727] Z 및 Z'는 독립적으로 $-(CH_2)_{n'}-$, $-(CH_2)_{n'}-CR_7R_8-(CH_2)_{na'}-$, $-(CH_2)_{n'}-NR_9-(CH_2)_{na'}-$, $-(CH_2)_{n'}-O-(CH_2)_{na'}-$ 및 $-(CH_2)_{n'}-S-(CH_2)_{na'}-$로부터 선택되며;

[0728] n' 및 na'는 동일 또는 상이하고, 또한 0, 1, 2 및 3으로부터 선택되며;

[0729] R_7 및 R_8은 동일 또는 상이하고, 또한 각각 독립적으로 -H, -OH, -SH, -COOH, -NHR', 폴리에틸렌 글라이콜 단위 $-(OCH_2CH_2)_n-$, 아미노산, 2 내지 6개의 아미노산을 보유하는 펩타이드 단위, 1 내지 10개의 탄소 원자를 지니는 선택적으로 치환된 직쇄, 분지쇄 혹은 환식 알킬로부터 선택되며;

[0730] R_9는 독립적으로 -H, 1 내지 10개의 탄소 원자를 지니는 선택적으로 치환된 직쇄, 분지쇄 혹은 환식 알킬, 폴리에틸렌 글라이콜 단위 $-(OCH_2CH_2)_n-$으로부터 선택되고;

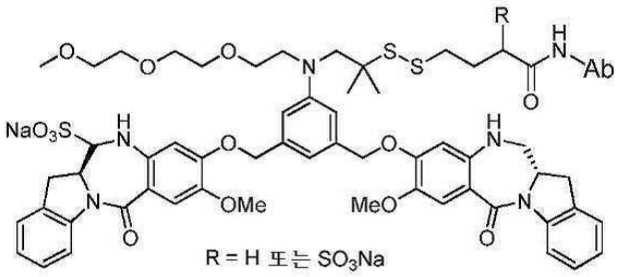
[0731] A 및 A'는 동일 또는 상이하고, 또한 독립적으로 -O-, 옥소(-C(=O)-), -CRR'O-, -CRR'-, -S-, -CRR'S-, $-N(R_5)-$ 및 $-CRR'N(R_5)-$로부터 선택되며;

[0732] R_5는 각 경우에 독립적으로 -H 또는 1 내지 10개의 탄소 원자를 지니는 선택적으로 치환된 직쇄 혹은 분지쇄 알킬이고;

[0733] D 및 D'는 동일 또는 상이하고, 또한 독립적으로 존재하지 않거나 또는 1 내지 10개의 탄소 원자를 지니는 선택적으로 치환된 직쇄, 분지쇄 혹은 환식 알킬, 알케닐 혹은 알키닐, 아미노산, 2 내지 6개의 아미노산을 보유하는 펩타이드 및 폴리에틸렌 글라이콜 단위 $(-OCH_2CH_2)_n-$으로 이루어진 군으로부터 선택되며;

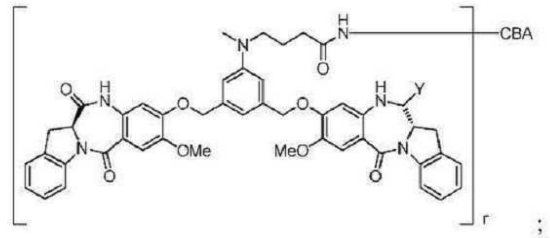
[0734] L은 존재하지 않거나, 상기 연결기, 폴리에틸렌 글라이콜 단위 $(-OCH_2CH_2)_n-$, 선택적으로 치환된 1 내지 10개의 탄소 원자를 지니는 직쇄, 분지쇄 혹은 환식 알킬 혹은 알케닐, 페닐기, O, S, N 및 P로부터 독립적으로 선택된 1 내지 6개의 헤테로원자를 지니는 3- 내지 18-원 헤테로사이클릭 고리 또는 5- 내지 18-원 헤테로아릴 고리이며, 이때 상기 알킬 또는 알케닐은 상기 연결기로 선택적으로 치환되고; 페닐 또는 헤테로사이클릭 또는 헤테로아릴 고리는 선택적으로 치환될 수 있으며 여기서 상기 치환기는 상기 연결기를 포함할 수 있다.

[0735] 대표적인 컨쥬게이트는 이하에 제시된다("Ab"는 항체 등과 같은 CBA를 나타낸다):

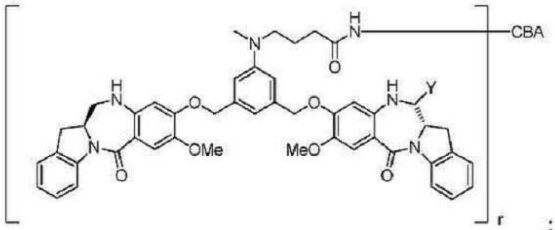
[0736] 

[0737] 소정의 실시형태에 있어서, Y는 $-SO_2M$, $-SO_3M$ 또는 $-OSO_3M$이다.

[0738] 소정의 실시형태에 있어서, 본 발명의 방법에 의해 합성될 수 있는 컨쥬게이트는 이하를 포함한다:

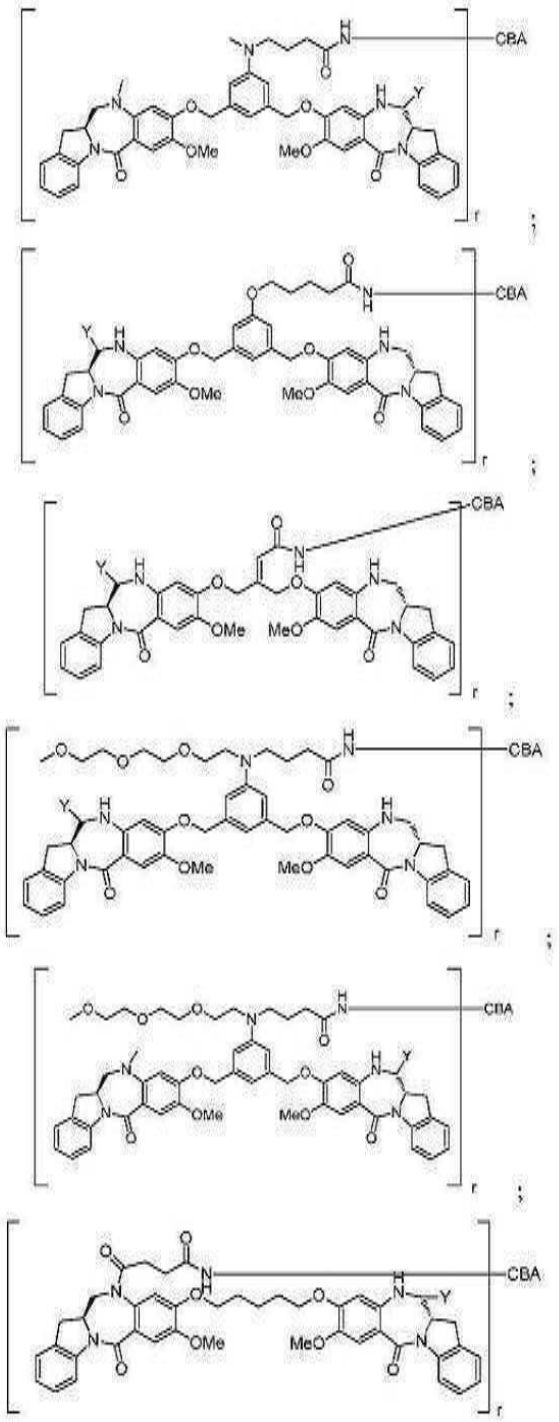


;



;

[0739]



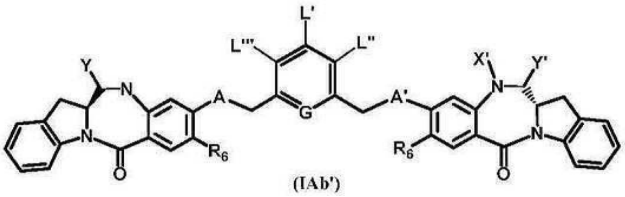
[0740]

[0741] 식 중,

[0742] CBA는 상기 세포 결합제이고, r은 1 내지 10의 정수이며, Y는 -H, 중아황산염, 차아황산염, 메타중아황산염, 또는 그의 염의 부가물, 또는 $-SO_3M$이고, M은 -H 또는 약제학적으로 허용가능한 양이온이다.

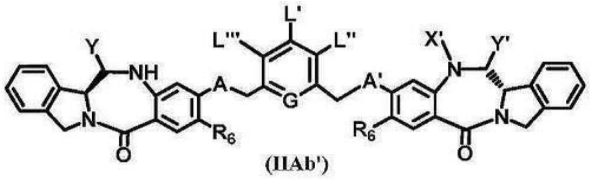
[0743] 소정의 실시형태에 있어서, L은 존재하지 않거나, 또는 선택적으로 치환된 페닐기 및 선택적으로 치환된 피리딜기로부터 선택되거나(이때 상기 페닐 및 상기 피리딜기는 상기 연결기를 보유함), 또는 L은 상기 연결기(즉, -N(연결기)-)를 보유하는 아민기이거나, 또는 L은 1 내지 6개의 탄소 원자를 지니면서 상기 연결기를 보유하는 직쇄, 분지쇄 혹은 환식 알킬 또는 알케닐이다.

[0744] 제15특정 실시형태에 있어서, 상기 연결기에 결합된 상기 세포독성 화합물은 이하의 화학식들 중 어느 하나로 표시된다:



(IAb')

또는



(IIAb')

[0745]

[0746] 식 중,

[0747] L', L'' 및 L'''는 동일 또는 상이하고, 또한 독립적으로 -H, 1 내지 10개의 탄소 원자를 지니는 선택적으로 치환된 직쇄, 분지쇄 혹은 환식 알킬, 알케닐 혹은 알키닐, 폴리에틸렌 글라이콜 단위 $-(OCH_2CH_2)_n-R^c$, 할로겐, 구아니딘[-NH(C=NH)NH_2], -OR, -NR'R'', $-NO_2$, -NR'COR'', -SR, -SOR'로 표시되는 설폭사이드, $-SO_2R'$로 표시되는 설폰, 설포네이트 $-SO_3M$, 설페이트 $-OSO_3M$, $-SO_2NR'R''$로 표시되는 설폰아마이드, 사이아노, 아자이도, -COR', -OCOR', -OCONR'R'' 및 상기 연결기로부터 선택되되, 단 L', L'' 및 L''' 중 단지 하나는 상기 연결기이고;

[0748] G는 -CH- 또는 -N-으로부터 선택된다. 나머지 기들은 위에서 제14 특정 실시형태에 기재되어 있다.

[0749] 소정의 실시형태에 있어서, L', L'' 또는 L''' 중 하나는 상기 연결기인 반면, 나머지는 -H이다. 바람직하게는, L'는 상기 연결기이고, L'' 및 L'''는 -H이다.

[0750] 소정의 실시형태에 있어서, A 및 A'는 둘 모두 -O-이고, R_6은 -OMe이며, G는 -CH-이다.

[0751] 제16특정 실시형태에 있어서, L'는 이하의 화학식으로 표시된다:

[0752] $-W'-R^x-V-R^y-J$

[0753] 식 중,

[0754] W' 및 V는 동일 또는 상이하고, 또한 각각 독립적으로 존재하지 않거나, 또는 $-CR^eR^{e'}$, -O-, -O-C(=O)-, -C(=O)-O-, -S-, -SO-, $-SO_2-$, $-CH_2-S-$, $-CH_2O-$, $-CH_2NR^e-$, -O-(C=O)O-, -O-(C=O)N(R^e)-, -N(R^e)-, -N(R^e)-C(=O)-, -C(=O)-N(R^e)-, -N(R^e)-C(=O)O-, -N(C(=O)R^e)C(=O)-, -N(C(=O)R^e)-, $-(O-CH_2-CH_2)_n-$, -SS- 또는 -C(=O)-, 또는 아미노산, 또는 2 내지 8개의 아미노산을 지니는 펩타이드로부터 선택되며;

[0755] R^x 및 R^y는 동일 또는 상이하고, 또한 각각 독립적으로 존재하지 않거나, 또는 선택적으로 치환된 1 내지 10개의 탄소 원자를 지니는 직쇄, 분지쇄 혹은 환식 알킬, 알케닐 혹은 알키닐, 6 내지 10개의 탄소 원자를 보유하는 아릴 또는 O, N 혹은 S로부터 선택된 1 내지 3개의 헤테로원자를 보유하는 3- 내지 8-원 헤테로사이클릭 고리이며;

[0756] R^e 및 $R^{e'}$는 동일 또는 상이하고, 또한 -H, 1 내지 10개의 탄소 원자를 지니는 직쇄, 분지쇄 혹은 환식 알킬, 알케닐 혹은 알키닐 또는 $-(CH_2-CH_2-O)_n-R^k$이되, 이때, R^k는 -H, 2차 아미노(예컨대, $-NHR^{101}$) 혹은 3차 아미노($-NR^{101}R^{102}$) 기를 보유하는, 1 내지 6개의 탄소 원자를 지니는 직쇄, 분지쇄, 환식 알킬 또는 5- 혹은 6-원 질소 함유 헤테로사이클, 예컨대, 피페리딘 또는 몰폴린이고, 이때 R^{101} 및 R^{102}는 각각 독립적으로 1 내지 10개의 탄소 원자를 지니는 직쇄, 분지쇄 혹은 환식 알킬, 알케닐 혹은 알키닐이며; 바람직하게는, R^{101} 및 R^{102}는 각각 독립적으로 1 내지 6개의 탄소 원자를 지닌 직쇄 혹은 분지쇄 알킬이고;

[0757] n은 1 내지 24의 정수이고;

[0758] J는 상기 CBA에 공유 결합되고, 숙신이미드, 아세트아마이도, -S-, -SS-, $-CH_2S-$, -CH(Me)S-, $-C(Me)_2S-$, $-NR^{c1}-$, $-CH_2NR^{c1}-$, $-NR^{c1}N-$ 및 -C(=O)-로부터 선택되되, R^{c1}은 -H 또는 1 내지 4개의 탄소 원자를 지니는 치환 혹은 비치환된 직쇄 혹은 분지쇄 알킬이다.

[0759] 소정의 실시형태에 있어서, J는 -S-, -SS-, 숙신이미드 또는 -C(=O)-이다.

[0760] 소정의 실시형태에 있어서, $R^{e'}$는 -H 또는 -Me이고; R^{e}는 1 내지 6개의 탄소 원자를 지니는 직쇄 혹은 분지쇄 알킬 또는 $-(CH_2-CH_2-O)_n-R^k$이며; n은 2 내지 8의 정수이고; R^k는 -H, -Me 또는 $-CH_2CH_2-NMe_2$이며, 변수의 나머지는 제15특정 실시형태에서 위에 기재된 바와 같다.

[0761] 소정의 실시형태에 있어서, V는 아미노산 또는 2 내지 8개의 아미노산을 지니는 펩타이드이다.

[0762] 소정의 실시형태에 있어서, V는 발린-시트룰린, gly-gly-gly 또는 ala-leu-ala-leu이다.

[0763] 소정의 실시형태에 있어서,

[0764] W'는 -O-, $-N(R^e)-$ 또는 $-N(R^e)-C(=O)-$이고;

[0765] R^e는 H, 1 내지 4개의 탄소 원자를 지니는 직쇄 혹은 분지쇄 알킬 또는 $-(CH_2-CH_2-O)_n-R^k$이며;

[0766] R^x는 1 내지 6개의 탄소 원자를 지닌 직쇄 혹은 분지쇄 알킬이고;

[0767] V는 존재하지 않거나, $-(O-CH_2-CH_2)_n-$, -C(=O)-NH-, -S-, -NH-C(=O)-이며;

[0768] R^y는 존재하지 않거나, 또는 1 내지 4개의 탄소 원자를 지니는 직쇄 혹은 분지쇄 알킬이고;

[0769] J는 -S-, -SS- 또는 -C(=O)-이고, 나머지 기들은 제16특정 실시형태에 정의된 바와 같다.

[0770] 소정의 실시형태에 있어서,

[0771] W'는 -O-, $-N(R^e)-$ 또는 $-N(R^e)-C(=O)-$이고;

[0772] R^e는 -H, -Me 또는 $-(CH_2-CH_2-O)_n-Me$이며;

[0773] n은 2 내지 6의 정수이고;

[0774] R^x는 1 내지 6개의 탄소 원자를 보유하는 직쇄 혹은 분지쇄 알킬이며;

[0775] V 및 R^y는 존재하지 않고;

[0776] J는 -C(=O)-이다. 나머지 기들은 제16특정 실시형태에 정의된 바와 같다.

[0777] 제17특정 실시형태에 있어서, 제16특정 실시형태에서의 L'는 이하의 화학식으로 표시된다:

[0778] $$-W'-[CR_{1''}R_{2''}]_a-V-[Cy]_{0-1}-[CR_{3''}R_{4''}]_b-C(=O)-$$

[0779] 식 중,

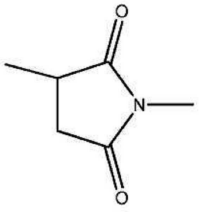
[0780] $R_{1''}$, $R_{2''}$ 및 $R_{3''}$는 각각 독립적으로 -H 또는 1 내지 4개의 탄소 원자를 지니는 직쇄 혹은 분지쇄 알킬, 바람직하게는 -Me이고;

[0781] $R_{4''}$는 -H, 1 내지 4개의 탄소 원자를 지니는 직쇄 혹은 분지쇄 알킬(바람직하게는 -Me), $-SO_3H$ 또는 $-SO_3^-M^+$이며, 이때 M^+는 약제학적으로 허용가능한 양이온이고;

[0782] a는 0 내지 5(예컨대, 0 내지 2, 3, 4 또는 5)의 정수이며, b는 0 내지 6(예컨대, 0 내지 3, 4, 5 또는

6)이고;

[0783] Cy는 N 헤테로원자를 보유하는 선택적으로 치환된 5-원 헤테로사이클릭 고리이며, 바람직하게는 Cy



이다.

[0784] 제16 또는 제17특정 실시형태 등에서와 같은 소정의 실시형태에 있어서, W'는 -N(R^e)-이다.

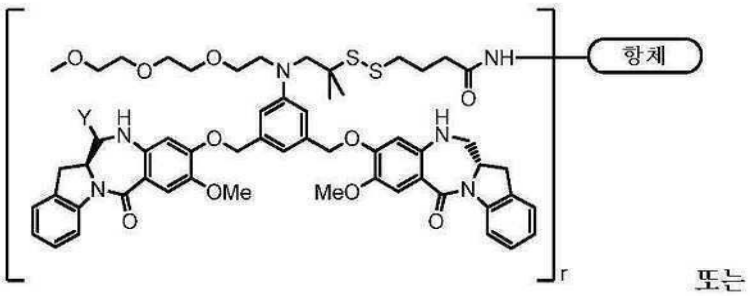
[0785] 제16 또는 제17특정 실시형태 등에서와 같은 소정의 실시형태에 있어서, R^e는 $-(CH_2-CH_2-O)_{2-6}-R^k$이되, 이때, R^k는 1 내지 6개의 탄소 원자를 지닌 직쇄 혹은 분지쇄 알킬이다.

[0786] 제16 또는 제17특정 실시형태 등에서와 같은 소정의 실시형태에 있어서, V는 -S- 또는 -SS-이다.

[0787] 제18 특정 실시형태에 있어서, 제16 또는 제17 특정 실시형태에서의 L'는 이하의 화학식으로 표시된다:

[0788] $-NR^e-[CR_1{\cdot\cdot}R_2{\cdot\cdot}]_a-S-[CR_3{\cdot\cdot}R_4{\cdot\cdot}]_b-C(=O)-$.

[0789] 제16 내지 제17특정 실시형태 등에서와 같은 소정의 실시형태에 있어서, 상기 컨쥬게이트는 이하와 같다:



[0790]

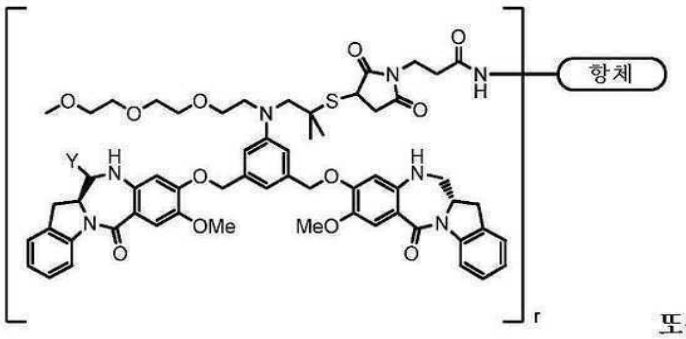
[0791] 식 중, r은 1 내지 10의 정수이고, Y는 $-SO_3M$이며, M은 -H 또는 약제학적으로 허용가능한 양이온이다.

[0792] 제16 내지 제18특정 실시형태 등에서와 같은 소정의 실시형태에 있어서, 상기 항체는 huMy9-6이다.

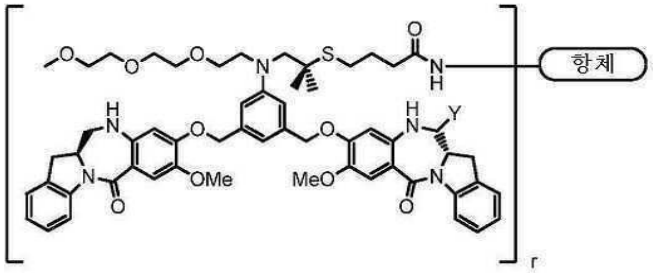
[0793] 제19특정 실시형태에 있어서, 제16 또는 제17특정 실시형태에서의 L'는 이하의 화학식으로 표시된다:

[0794] $-NR^e-[CR_1{\cdot\cdot}R_2{\cdot\cdot}]_a-S-Cy-[CR_3{\cdot\cdot}R_4{\cdot\cdot}]_b-C(=O)-$.

[0795] 제16, 제17 및 제19특정 실시형태 등과 같은 소정의 실시형태에 있어서, 상기 컨쥬게이트는



또는

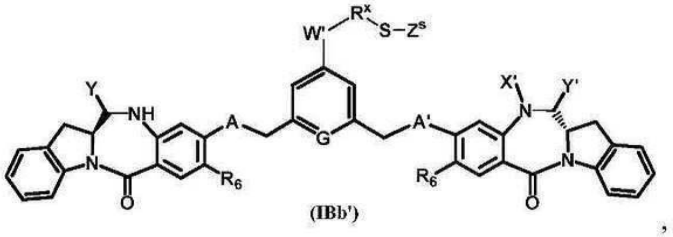


[0796] 이되,

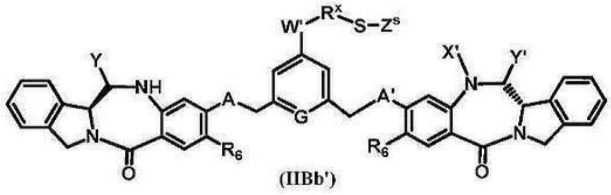
[0797] 식 중, r은 1 내지 10의 정수이고, Y는 $-SO_3M$이며, M은 -H 또는 약제학적으로 허용가능한 양이온이다.

[0798] 제16, 제17 및 제19특정 실시형태 등과 같은 소정의 실시형태에 있어서, 상기 항체는 huMy9-6이다.

[0799] 제21특정 실시형태에 있어서, 상기 연결기에 결합된 상기 세포독성 화합물은 이하의 화학식으로 표시된다:



,



[0800]

[0801] 식 중,

[0802] W'는 존재하지 않거나, 또는 -O-, $-N(R^e)-$, $-N(R^e)-C(=O)-$, $-N(C(=O)R^e)-$, -S-, $-CH_2-S-$ 또는 $-CH_2NR^e-$로부터 선택되고;

[0803] R^x는 존재하지 않거나 또는 1 내지 10개의 탄소 원자를 지니는 직쇄, 분지쇄 혹은 환식 알킬로부터 선택되며;

[0804] R^e는 -H, 1 내지 10개의 탄소 원자를 지니는 직쇄, 분지쇄 혹은 환식 알킬, 알케닐 혹은 알키닐 또는 $-(CH_2-CH_2-O)_n-R^k$이되, R^k는 -H, 2차 아미노(예컨대, $-NHR^{101}$) 혹은 3차 아미노($-NR^{101}R^{102}$) 기를 보유하는, 1 내지 6개의 탄소 원자를 지니는 직쇄, 분지쇄, 환식 알킬 또는 5 혹은 6-원 질소 함유 헤테로사이클, 예컨대, 피페리딘 또는 몰폴린이며, R^{101} 및 R^{102}는 각각 독립적으로 1 내지 10개의 탄소 원자를 지니는 직쇄, 분지쇄 혹은 환식 알킬, 알케닐 혹은 알키닐이고;

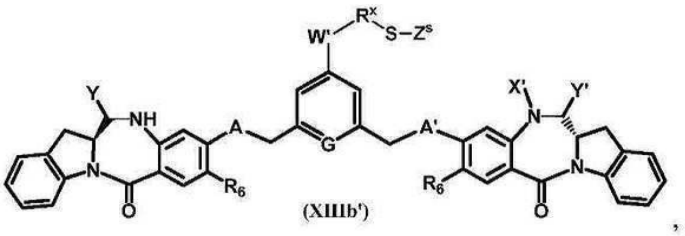
[0805] Z^s는 CBA에 연결되고, 또한 결합 또는 $-SR^m-$이며;

[0806] R^m은 R^d 또는, N-하이드록시숙신이미드 에스터, N-하이드록시프탈이미드 에스터, N-하이드록시 설포-숙신이미드 에스터, 파라-나이트로페닐 에스터, 다이나이트로페닐 에스터 및 펜타플루오로페닐 에스터로부터 선택된 반응성 에스터를 보유하는 치환된 1 내지 4개의 탄소 원자를 지니는 직쇄 혹은 분지쇄 알킬이고;

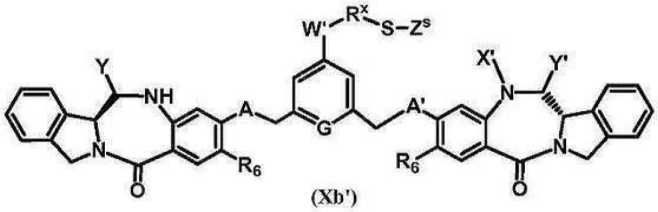
[0807] R^d는 페닐, 나이트로페닐, 다이나이트로페닐, 카복시나이트로페닐, 피리딜 또는 나이트로피리딜로부터 선택되며;

[0808] n은 1 내지 24의 정수이고; 변수의 나머지는 제8 또는 제15특정 실시형태에서 위에 기재된 바와 같다.

[0809] 제21특정 실시형태에 있어서, 상기 연결기에 결합된 상기 세포독성 화합물은 이하의 화학식로 표시된다:



,



[0810]

[0811] 식 중,

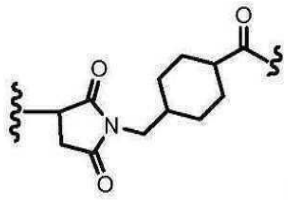
[0812] W'는 존재하지 않거나, 또는 -O-, $-N(R^e)-$, $-N(R^e)-C(=O)-$, $-N(C(=O)R^e)-$, -S-, $-CH_2-S-$ 또는 $-CH_2NR^e-$로부터 선택되고;

[0813] R^x는 존재하지 않거나 또는 1 내지 10개의 탄소 원자를 지니는 직쇄, 분지쇄 혹은 환식 알킬로부터 선택되며;

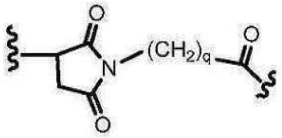
[0814] R^e는 -H, 1 내지 10개의 탄소 원자를 지니는 직쇄, 분지쇄 혹은 환식 알킬, 알케닐 혹은 알키닐 또는 $-(CH_2-CH_2-O)_n-R^k$이되, 이때, R^k는 -H, 2차 아미노(예컨대, $-NHR^{101}$) 혹은 3차 아미노($-NR^{101}R^{102}$) 기를 보유하는, 1 내지 6개의 탄소 원자를 지니는 직쇄, 분지쇄, 환식 알킬 또는 5 혹은 6-원 질소 함유 헤테로사이클, 예컨대, 피페리딘 또는 몰폴린이고, 이때 R^{101} 및 R^{102}는 각각 독립적으로 1 내지 10개의 탄소 원자를 지니는 직쇄, 분지쇄 혹은 환식 알킬, 알케닐 혹은 알키닐이며;

[0815] n은 2 내지 6의 정수이고;

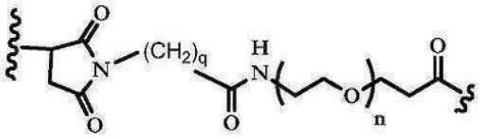
[0816] Z^s는 상기 CBA에 연결되며, 또한



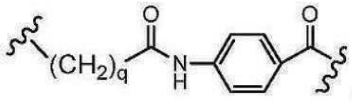
(b1);



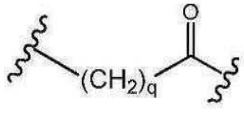
(b2);



(b3);

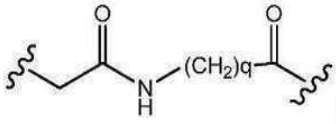


(b4);

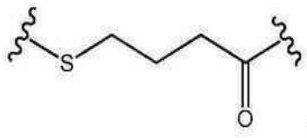


(b5);

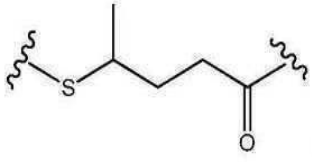
[0817]



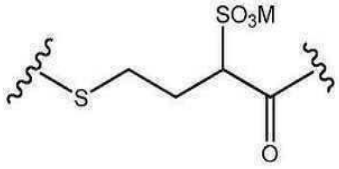
(b6);



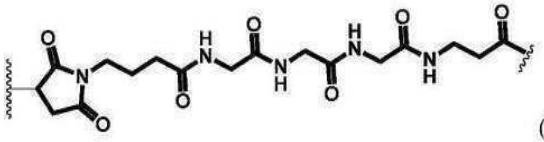
(b7);



(b8);



(b9) 및



(b10)

[0818]

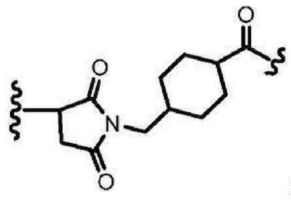
[0819] 로부터 선택되되;

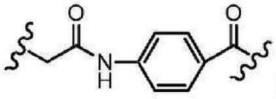
[0820] 식 중,

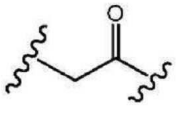
[0821] q는 1 내지 5의 정수이며;

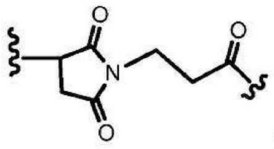
[0822] M은 -H 또는 약제학적으로 허용가능한 양이온, 예컨대, Na^+ 또는 K^+이다.

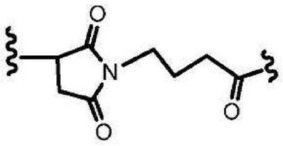
[0823] 소정의 실시형태에 있어서, Z^s는 이하의 화학식들 중 어느 하나로 표시된다:

[0824] 
(b1);


(b4');


(b5');

[0825] 
(b12);


(b13)

[0826] 제21특정 실시형태 등과 같은 소정의 실시형태에 있어서, W'는 $-N(R^e)-$이다.

[0827] 제21특정 실시형태 등과 같은 소정의 실시형태에 있어서, R^e는 $-(CH_2-CH_2-O)_n-R^k$이되, 이때, R^k는 -H, 1 내지 6개의 탄소 원자를 지니는 직쇄, 분지쇄, 환식 알킬이다.

[0828] 제21특정 실시형태 등과 같은 소정의 실시형태에 있어서, R^k는 -H 또는 -Me이고, n은 4이며, q는 2이다.

[0829] 제21특정 실시형태 등과 같은 소정의 실시형태에 있어서, R^x는 1 내지 6개의 탄소 원자를 지닌 직쇄 혹은 분지쇄 알킬이다.

[0830] 제21특정 실시형태 등과 같은 소정의 실시형태에 있어서, R^x는 $-(CH_2)_P-(CR^fR^g)-$이되, 이때 R^f 및 R^g는 각각 독립적으로 H 또는 1 내지 4개의 탄소 원자를 지니는 직쇄 혹은 분지쇄 알킬로부터 선택되고; p는 0, 1, 2 또는 3이다.

[0831] 제21특정 실시형태 등과 같은 소정의 실시형태에 있어서, R^f 및 R^g는 동일 또는 상이하고, 또한 -H 및 -Me로부터 선택되며; p는 1이다.

[0832] 제22특정 실시형태에 있어서, 제21특정 실시형태에 기재된 화학식 VIIIb' 및 Xb'의 컨쥬게이트에 있어서, 변수는 이하에 기재된 바와 같다:

[0833] Y는 $-SO_3M$이고;

[0834] M은 -H 또는 약제학적으로 허용가능한 양이온(예컨대, Na^+)이며;

[0835] X' 및 Y'는 둘 모두 -H이고;

[0836] A 및 A'는 둘 모두 -O-이며;

[0837] R_6은 -OMe이고;

[0838] R^x는 1 내지 6개의 탄소 원자를 지닌 직쇄 혹은 분지쇄 알킬이다.

[0839] 제14 내지 제21특정 실시형태 등과 같은 소정의 실시형태에 있어서, Y는 $-SO_3M$, $-SO_2M$ 및 설페이트 $-OSO_3M$으로부터 선택된다. 바람직하게는, Y는 $-SO_3M$이다. 바람직하게는, M은 -H, Na^+ 또는 K^+이다.

[0840] 제14 내지 제22특정 실시형태 등과 같은 소정의 실시형태에 있어서, W는, 존재할 경우, C=O이다.

[0841] 제14 내지 제22특정 실시형태 등과 같은 소정의 실시형태에 있어서, Z 및 Z'는, 존재할 경우, $-CH_2-$이다.

[0842] 제14 내지 제22특정 실시형태 등과 같은 소정의 실시형태에 있어서, X'는 -H, -OH, 1 내지 10개의 탄소 원자를 지니는 선택적으로 치환된 직쇄, 분지쇄 혹은 환식 알킬, 알케닐 혹은 알키닐, 페닐, 상기 연결기 및 아민-보호기로 이루어진 군으로부터 선택된다. 소정의 실시형태에 있어서, X'는 -H, -OH, -Me 또는 상기 연결기이다. 바람직하게는, X'는 -H이다.

[0843] 제14 내지 제22특정 실시형태 등과 같은 소정의 실시형태에 있어서, Y'는 -H, 옥소기, 1 내지 10개의 탄소 원자를 지닌 치환된 혹은 비치환된 직쇄, 분지쇄 혹은 환식 알킬, 알케닐 혹은 알키닐로 이루어진 군으로부터 선택된다. 바람직하게는, Y'는 -H 또는 옥소이다. 더 바람직하게는, -H이다.

[0844] 제14 내지 제22특정 실시형태 등과 같은 소정의 실시형태에 있어서, A 및 A'는 동일 또는 상이하고, 또한 -O-, -S-, $-N(R_5)-$ 및 옥소(C=O)로부터 선택된다. 바람직하게는, A 및 A'는 동일 또는 상이하고, 또한 -O- 및 -S-로부터 선택된다. 더 바람직하게는, A 및 A'는 -O-이다.

[0845] 제14 내지 제22특정 실시형태 등과 같은 소정의 실시형태에 있어서, D 및 D'는, 존재할 경우에는, 동일 또는 상이하고, 또한 폴리에틸렌 글라이콜 단위 $(-OCH_2CH_2)_n$(이때, n은 1 내지 24의 정수임), 아미노산, 2 내지 6개의 아미노산을 보유하는 펩타이드, 또는 1 내지 10개의 탄소 원자를 지니는 직쇄, 분지쇄 혹은 환식 알킬, 알케닐 혹은 알키닐로부터 선택되되, 상기 알킬, 알케닐 및 알키닐은 할로겐, -OR, -NR'COR'', -SR 및 -COR'로 이루어진 군으로부터 독립적으로 선택된 1개 이상의 치환기로 선택적으로 치환된다. 바람직하게는, D 및 D'는 1 내지 4개의 탄소 원자를 보유하는 직쇄 혹은 분지쇄 알킬이다.

[0846] 제23특정 실시형태에 있어서, 제20특정 실시형태에 기재된 화학식 Ibb' 또는 IIBb'의 화합물에 대해서, 변수는 이하에 기재된 바와 같다:

[0847] Y는 $-SO_3M$이고;

[0848] M은 -H 또는 Na^+이며;

[0849] X' 및 Y'는 둘 모두 -H이고;

[0850] A 및 A'는 둘 모두 -O-이며;

[0851] R_6은 -OMe이고;

[0852] R^x는 1 내지 6개의 탄소 원자를 지닌 직쇄 혹은 분지쇄 알킬이다.

[0853] 바람직하게는, R^x는 $-(CH_2)_p-(CR^fR^g)-$이되, 이때 R^f 및 R^g는 각각 독립적으로 -H 또는 1 내지 4개의 탄소 원자를 지니는 직쇄 혹은 분지쇄 알킬로부터 선택되고; p는 0, 1, 2 또는 3이다. 더 바람직하게는, R^f 및 R^g는 동일 또는 상이하고, 또한 -H 및 -Me로부터 선택되며; p는 1이다.

[0854] 제24특정 실시형태에 있어서, 제14, 제15 또는 제21특정 실시형태에 기재된 바와 같이 본 발명의 컨쥬게이트는 이하로 표시된다:

[0855] Y는 $-SO_3M$이되, 이때, M은 -H 또는 약제학적으로 허용가능한 양이온(예컨대, Na^+)이고;

[0856] W는 C=O이며;

[0857] R_1, R_2, R_1', R_2', R_4 및 R_4'는 -H이고;

[0858] R_3 또는 R_3' 중 하나는 선택적으로 상기 연결기이며 나머지는 -H이며;

[0859] R_6은 -OMe이고;

[0860] Z 및 Z'는 $-CH_2$이며;

[0861] X'는 -H이고;

[0862] Y'는 -H이며;

[0863] A 및 A'는 -O-이다.

[0864] 제14 내지 제24특정 실시형태 등과 같은 상기 본 발명의 컨쥬게이트의 특정 실시형태들 중 어느 하나에 있어서, Y는 $-SO_3M$, $-SO_2M$ 및 설페이트 $-OSO_3M$으로부터 선택된다. 바람직하게는, Y는 $-SO_3M$이다.

[0865] 제14 내지 제24특정 실시형태 등과 같은 소정의 실시형태에 있어서, M은 -H, Na^+ 또는 K^+이다

[0866] 제14 내지 제24특정 실시형태 등과 같은 상기 본 발명의 컨쥬게이트의 특정 실시형태들 중 어느 하나에 있어서, W는, 존재할 경우, C=O이다.

[0867] 제14 내지 제24특정 실시형태 등과 같은 상기 본 발명의 컨쥬게이트의 특정 실시형태들 중 어느 하나에 있어서, Z 및 Z'는, 존재할 경우, $-CH_2-$이다.

[0868] 제14 내지 제24특정 실시형태 등과 같은 상기 본 발명의 컨쥬게이트의 특정 실시형태들 중 어느 하나에 있어서, X'는 -H, -OH, 1 내지 10개의 탄소 원자를 지니는 선택적으로 치환된 직쇄, 분지쇄 혹은 환식 알킬, 알케닐 혹은 알키닐, 페닐, 상기 연결기 및 아민-보호기로 이루어진 군으로부터 선택된다. 소정의 실시형태에 있어서, X'는 -H, -OH, -Me 또는 상기 연결기이다. 소정의 실시형태에 있어서, X'는 -H이다.

[0869] 제14 내지 제24특정 실시형태 등과 같은 상기 본 발명의 컨쥬게이트의 특정 실시형태들 중 어느 하나에 있어서, Y'는 -H, 옥소기, 1 내지 10개의 탄소 원자를 지닌 치환된 혹은 비치환된 직쇄, 분지쇄 혹은 환식 알킬, 알케닐 혹은 알키닐로 이루어진 군으로부터 선택된다. 소정의 실시형태에 있어서, Y'는 -H 또는 옥소이다. 소정의 실시형태에 있어서, Y'는 -H이다.

[0870] 제14 내지 제24특정 실시형태 등과 같은 상기 본 발명의 컨쥬게이트의 특정 실시형태들 중 어느 하나에 있어서, A 및 A'는 동일 또는 상이하고, 또한 -O-, -S-, $-N(R_5)-$ 및 옥소(C=O)로부터 선택된다. 소정의 실시형태에 있어서, A 및 A'는 동일 또는 상이하고, 또한 -O- 및 -S-로부터 선택된다. 소정의 실시형태에 있어서, A 및 A'는 -O-이다.

[0871] 제14 내지 제24특정 실시형태 등과 같은 상기 본 발명의 컨쥬게이트의 특정 실시형태들 중 어느 하나에 있어서, D 및 D'는, 존재할 경우에는, 동일 또는 상이하고, 또한 독립적으로 폴리에틸렌 글라이콜 단위 $(-OCH_2CH_2)_n$(이때, n은 1 내지 24의 정수임), 아미노산, 2 내지 6개의 아미노산을 보유하는 펩타이드, 또는 1 내지 10개의 탄소 원자를 지니는 직쇄, 분지쇄 혹은 환식 알킬, 알케닐 혹은 알키닐로부터 선택되되, 이때 상기 알킬, 알케닐 및 알키닐은 할로겐, -OR, -NR'COR'', -SR 및 -COR'로 이루어진 군으로부터 독립적으로 선택된 1개 이상의 치환기로 선택적으로 치환된다. 소정의 실시형태에 있어서, D 및 D'는 1 내지 4개의 탄소 원자를 보유하는 직쇄 혹은 분지쇄 알킬이다.

[0872] 소정의 실시형태에 있어서, 제14 내지 제24특정 실시형태 등과 같은, 상기 기재된 실시형태 중 어느 하나의 컨쥬게이트는, 1 내지 10종의 세포독성 화합물, 2 내지 9종의 세포독성 화합물, 3 내지 8종의 세포독성 화합물, 4 내지 7종의 세포독성 화합물 또는 5 내지 6종의 세포독성 화합물을 포함할 수 있고, 각 세포독성 화합물은 CBA에 세포독성 화합물을 연결하는 상기 연결기를 포함하며, 컨쥬게이트 상의 각 세포독성 화합물은 동일하다.

[0873] 소정의 실시형태에 있어서, 제14 내지 제24특정 실시형태 등과 같은, 상기 기재된 실시형태 중 어느 하나의 컨쥬게이트는, 1 내지 10종의 세포독성 화합물, 2 내지 9종의 세포독성 화합물, 3 내지 8종의 세포독성 화합물, 4 내지 7종의 세포독성 화합물 또는 5 내지 6종의 세포독성 화합물을 포함할 수 있고, 각 세포독성 화합물은 CBA에 세포독성 화합물을 연결하는 상기 연결기를 포함하며, 컨쥬게이트 상의 각 세포독성 화합물은 동일하다.

[0874] 소정의 실시형태에 있어서, 제14 내지 제24특정 실시형태 등과 같은, 상기 기재된 실시형태 중 어느 하나의 컨쥬게이트는, 1 내지 10종의 전체 세포독성 화합물 및 (미변형된) 이민-함유 세포독성 화합물, 2 내지 9종의 전체 세포독성 화합물 및 (미변형된) 이민-함유 세포독성 화합물, 3 내지 8종의 전체 세포독성 화합물 및 (미변형된) 이민-함유 세포독성 화합물, 4 내지 7종의 전체 세포독성 화합물 및 (미변형된) 이민-함유 세포독성 화합물, 또는 5 내지 6종의 전체 세포독성 화합물 및 (미변형된) 이민-함유 세포독성 화합물을 포함할 수 있고, 각 세포독성 화합물 혹은 (미변형된) 이민-함유 세포독성 화합물은 CBA에 세포독성 화합물 또는 (미변형된) 이민-함유 세포독성 화합물을 연결하는 상기 연결기를 포함하며, 컨쥬게이트 상의 각 세포독성 화합물 또는 (미변형된) 이민-함유 세포독성 화합물은 ((중아황산염) 변형을 제외하고) 동일하다.

[0875] 제14 내지 제24특정 실시형태 등과 같은, 컨쥬게이트 실시형태들 중 어느 것에 있어서도, 상기 세포 결합제는 종양 세포, 바이러스 감염 세포, 미생물 감염 세포, 기생충 감염 세포, 자가면역 세포, 활성화 세포, 골수 세포, 활성화된 T-세포, B 세포 또는 멜라닌세포; CD4, CD6, CD19, CD20, CD22, CD30, CD33, CD37, CD38, CD40, CD44, CD56, EpCAM, CanAg, CALLA 또는 Her-2 항원을 발현하는 세포; Her-3 항원; 또는 인슐린 성장 인자 수용체, 상피세포 성장 인자 수용체 및 폴레이트 수용체를 발현하는 세포로부터 선택된 표적 세포에 결합될 수 있다.

[0876] 제14 내지 제24특정 실시형태 등과 같은, 컨쥬게이트 실시형태들 중 어느 것에 있어서도, 세포 결합제는 표적 세포에 특이적으로 결합하는 항체, 단쇄 항체, 항체 단편, 표적 세포에 특이적으로 결합하는 단클론성 항체, 단쇄 단클론성 항체 또는 단클론성 항체 단편, 표적 세포에 특이적으로 결합하는 키메라 항체, 키메라 항체 단편, 표적 세포에 특이적으로 결합하는 도메인 항체, 도메인 항체 단편, 림포카인, 호르몬, 비타민, 성장 인자, 집락 자극 인자 또는 영양소-수송 분자일 수 있다.

[0877] 상기 항체는 재표면화된 항체, 재표면화된 단쇄 항체, 또는 재표면화된 항체 단편일 수 있다.

[0878] 상기 항체는 단클론성 항체, 단쇄 단클론성 항체 또는 그의 단클론성 항체 단편일 수 있다.

[0879] 상기 항체는 인간화 항체, 인간화 단쇄 항체 또는 인간화 항체 단편일 수 있다.

[0880] 제1 내지 제24특정 실시형태 등과 같은, 본 명세서의 특정 실시형태들 중 어느 하나에 있어서, 상기 이민 반응성 시약은 아황산염(H_2SO_3, H_2SO_2 또는 양이온과 함께 형성된 HSO_3^-, SO_3^{2-} 혹은 HSO_2^-의 염), 메타중아황산염($H_2S_2O_5$ 또는 양이온과 함께 형성된 $S_2O_5^{2-}$의 염), 모노, 다이, 트라이 및 테트라-티오포스페이트(PO_3SH_3, $PO_2S_2H_3$, POS_3H_3, PS_4H_3 또는 양이온과 함께 형성된 PO_3S^{3-}, $PO_2S_2^{3-}$, POS_3^{3-} 혹은 PS_4^{3-}의 염), 티오포스페이트 에스터 ($(R^iO)_2PS(OR^i)$, R^iSH, R^iSOH, R^iSO_2H, R^iSO_3H), 각종 아민류(하이드록실아민(예컨대, NH_2OH), 하이드라진(예컨대, NH_2NH_2), NH_2O-R^i, $R^{i'}NH-R^i$, NH_2-R^i), $NH_2-CO-NH_2$, $NH_2-C(=S)-NH_2$, 티오설페이트(HS_2O_3 또는 양이온과 함께 형성된 $S_2O_3^{2-}$의 염), 다이티오나이트($H_2S_2O_4$ 또는 양이온과 함께 형성된 $S_2O_4^{2-}$의 염), 포스포로다이티오에이트 ($P(=S)(OR^k)(SH)(OH)$ 또는 양이온과 함께 형성된 그의 염), 하이드록삼산($R^kC(=O)NHOH$ 또는 양이온과 함께 형성된 염), 하이드라자이드($R^kCONHNH_2$), 포름알데하이드 설폭실레이트($HOCH_2SO_2H$ 또는 $HOCH_2SO_2^-Na^+$ 등과 같은, 양이온과 함께 형성된 $HOCH_2SO_2^-$의 염), 당화 뉴클레오타이드(GDP-만노스 등), 플루다라빈 또는 이들의 혼합물로 이루어진 군으로부터 선택되되, 이때, R^i 및 $R^{i'}$는 각각 독립적으로 1 내지 10개의 탄소 원자를 지닌 직쇄 혹은 분지쇄 알킬이고 $-N(R^j)_2$, $-CO_2H$, $-SO_3H$ 및 $-PO_3H$로부터 선택된 적어도 하나의 치환기로 치환되며; R^i 및 $R^{i'}$는 여기에 기재된 알킬기에 대해서 치환기로 더욱 선택적으로 치환될 수 있고; R^j는 1 내지 6개의 탄소 원자를 지니는 직쇄 혹은 분지쇄 알킬이며; R^k는 1 내지 10개의 탄소 원자를 지니는 직쇄, 분지쇄 혹은 환식 알킬, 알케닐 혹은 알키닐, 아릴, 헤테로사이클릴 또는 헤테로아릴이다.

[0881] 바람직하게는, 상기 이민 반응성 시약은 아황산염, 하이드록실아민, 하이드라진 및 유레아로부터 선택된다. 더 바람직하게는, 상기 이민 반응성 시약은 $NaHSO_3$ 또는 $KHSO_3$이다.

[0882] 제1 내지 제24특정 실시형태 등과 같은, 본 명세서의 특정 실시형태들 중 어느 하나에 있어서, 상기 이민-함유

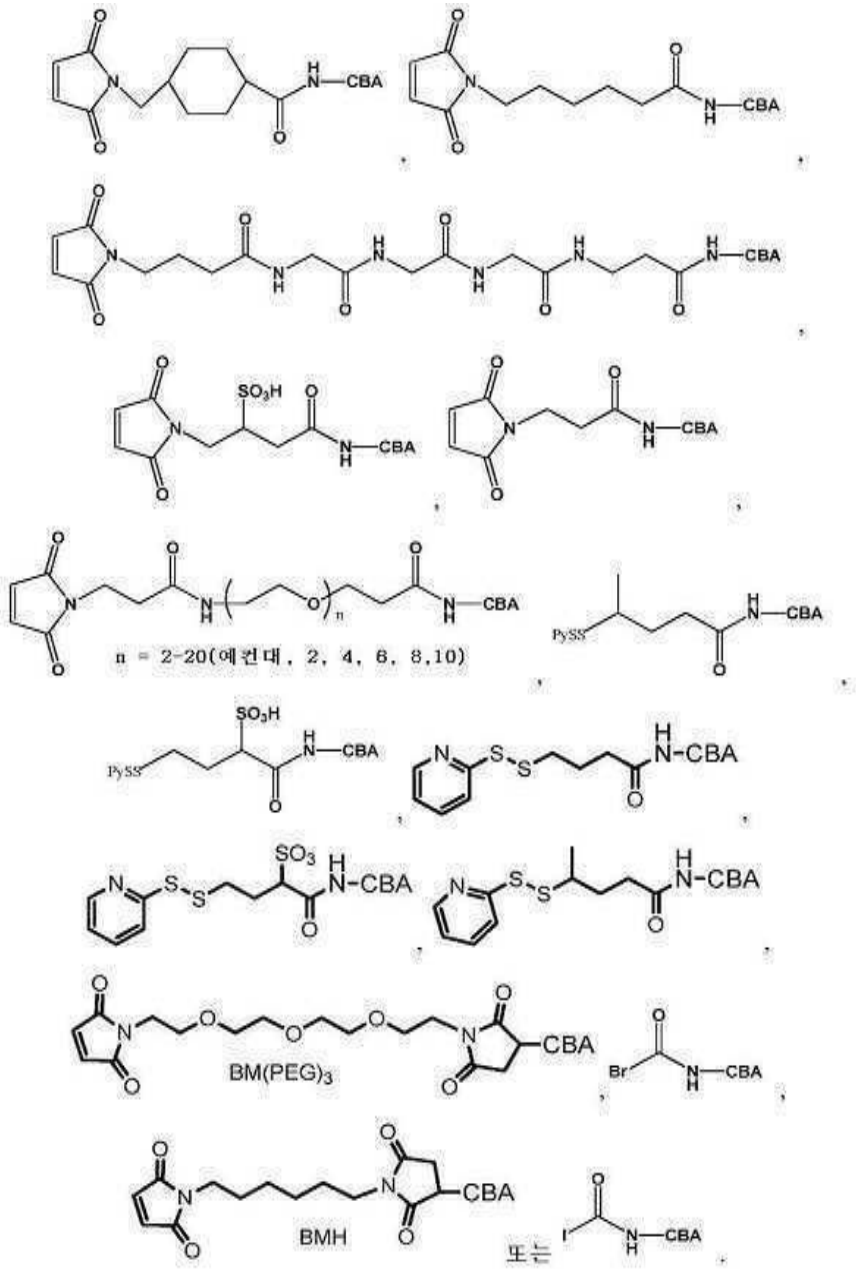
세포독성 화합물에 대해서 약 0.1 내지 약 30몰 당량의 상기 이민 반응성 시약이 이용된다. 소정의 실시형태에 있어서, 상기 이민-함유 세포독성 화합물에 대해서 약 1 내지 약 10몰 당량의 상기 이민 반응성 시약이 이용된다. 소정의 실시형태에 있어서, 상기 이민-함유 세포독성 화합물에 대해서 약 3 내지 약 5몰 당량의 상기 이민 반응성 시약이 이용된다.

[0883] 제1 내지 제24특정 실시형태 등과 같은, 본 명세서의 특정 실시형태들 중 어느 하나에 있어서, 상기 이작용성 가교제는 티오에터 결합를 통해서 세포 결합제에 세포독성제를 연결하며, 말레이미도- 또는 할로아세틸계 모이어티를 지닐 수 있고, 여기서, 말레이미도계 모이어티를 지니는 이작용성 가교제는, N-숙신이미딜 4-(말레이미도메틸)사이클로헥산카복실레이트(SMCC), N-숙신이미딜-4-(N-말레이미도메틸)-사이클로헥산-1-카복시-(6-아마이도카프로에이트)(LC-SMCC), κ-말레이미도운데칸산 N-숙신이미딜 에스터(KMUA), γ-말레이미도뷰티르산 N-숙신이미딜 에스터(GMBS), ε-말레이미도카프로산 N-하이드록시숙신이미드 에스터(EMCS), m-말레이미도벤조일-N-하이드록시숙신이미드 에스터(MBS), N-(α-말레이미도아세톡시)-숙신이미드 에스터(AMAS), 숙신이미딜-6-(β-말레이미도프로피온아마이도)헥사노에이트(SMPH), N-숙신이미딜 4-(p-말레이미도페닐)-뷰티레이트(SMPB), N-(p-말레이미도페닐)아이소사이아네이트(PMPI), *N*-숙신이미딜-4-(4-나이트로피리딜-2-다이티오)뷰타노에이트로부터 선택되고; 할로아세틸계 모이어티를 지니는 이작용성 가교제는 N-숙신이미딜-4-(아이오도아세틸)-아미노벤조에이트(SIAB), N-숙신이미딜 아이오도아세테이트(SIA), N-숙신이미딜 브로모아세테이트(SBA), 및 N-숙신이미딜 3-(브로모아세트아마이도)프로피오네이트(SBAP), 비스-말레이미도폴리에틸렌글라이콜(BMPEO), $BM(PEO)_2$, $BM(PEO)_3$, N-(β말레이미도프로필옥시)숙신이미드 에스터(BMPS), 5-말레이미도발레르산 NHS, HBVS, 4-(4-N-말레이미도페닐)-뷰티르산 하이드라자이드·HCl(MPBH), 숙신이미딜-(4-비닐설포닐)벤조에이트(SVSB), 다이티오비스-말레이미도에탄(DTME), 1,4-비스-말레이미도뷰탄(BMB), 1,4-비스말레이미딜-2,3-다이하이드록시뷰탄(BMDB), 비스-말레이미도헥산(BMH), 비스-말레이미도에탄(BMOE), 설포숙신이미딜 4-(N-말레이미도-메틸)사이클로헥산-1-카복실레이트(설포-SMCC), 설포숙신이미딜(4-아이오도-아세틸)아미노벤조에이트(설포-SIAB), m-말레이미도벤조일-N-하이드록시설포숙신이미드 에스터(설포-MBS), N-(γ-말레이미도뷰티릴옥시)설포숙신이미드 에스터(설포-GMBS), N-(ε-말레이미도카프로일옥시)설포숙신이미도 에스터(설포-EMCS), N-(κ-말레이미도운데카노일옥시)설포숙신이미드 에스터(설포-KMUS), 설포숙신이미딜 4-(p-말레이미도페닐)뷰티레이트(설포-SMPB), CX1-1, 설포-Mal 및 PEG_n-Mal로부터 선택된다.

[0884] 소정의 실시형태에 있어서, 상기 이작용성 가교제는 SMCC, 설포-SMCC, BMPS, GMBS, SIA, SIAB, *N*-숙신이미딜-4-(4-나이트로피리딜-2-다이티오)뷰타노에이트, 비스-말레이미도헥산 또는 BMPEO로 이루어진 군으로부터 선택된다.

[0885] 제1 내지 제24특정 실시형태 등과 같은 실시형태들 중 어느 것에 있어서도, 상기 컨쥬게이트는 접선 유동 여과, 흡착 크로마토그래피, 흡착 여과, 선택적 침전, 비흡수 여과 또는 이들의 조합에 의해 정제된다. 바람직하게는, 상기 컨쥬게이트는 접선 유동 여과 및/또는 흡착 크로마토그래피에 의해 정제된다.

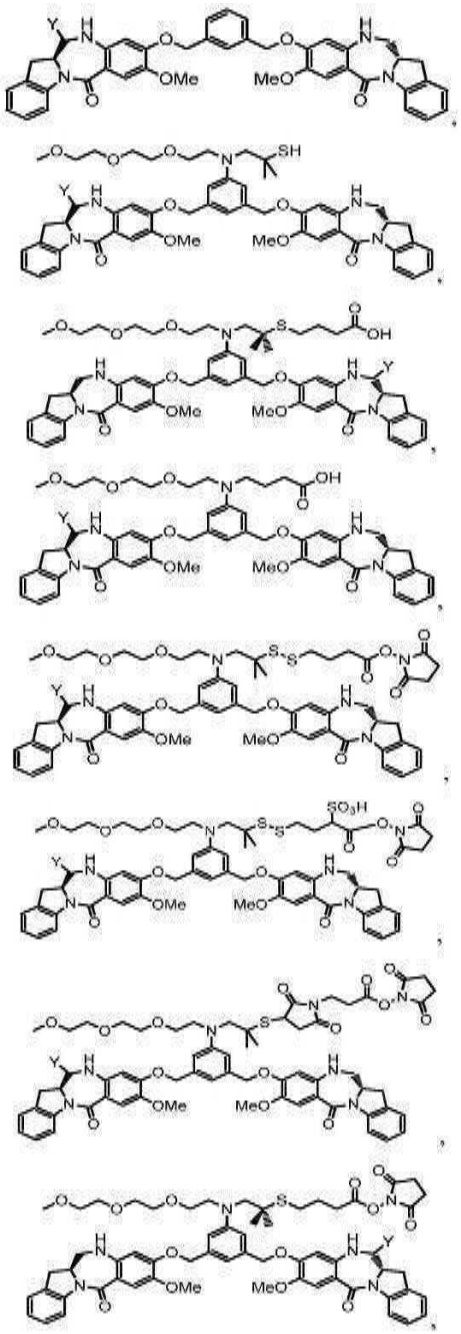
[0886] 제1 내지 제24특정 실시형태 등과 같은 소정의 실시형태에 있어서, 티올-반응성 기를 보유하는 상기 세포 결합제(CBA)는



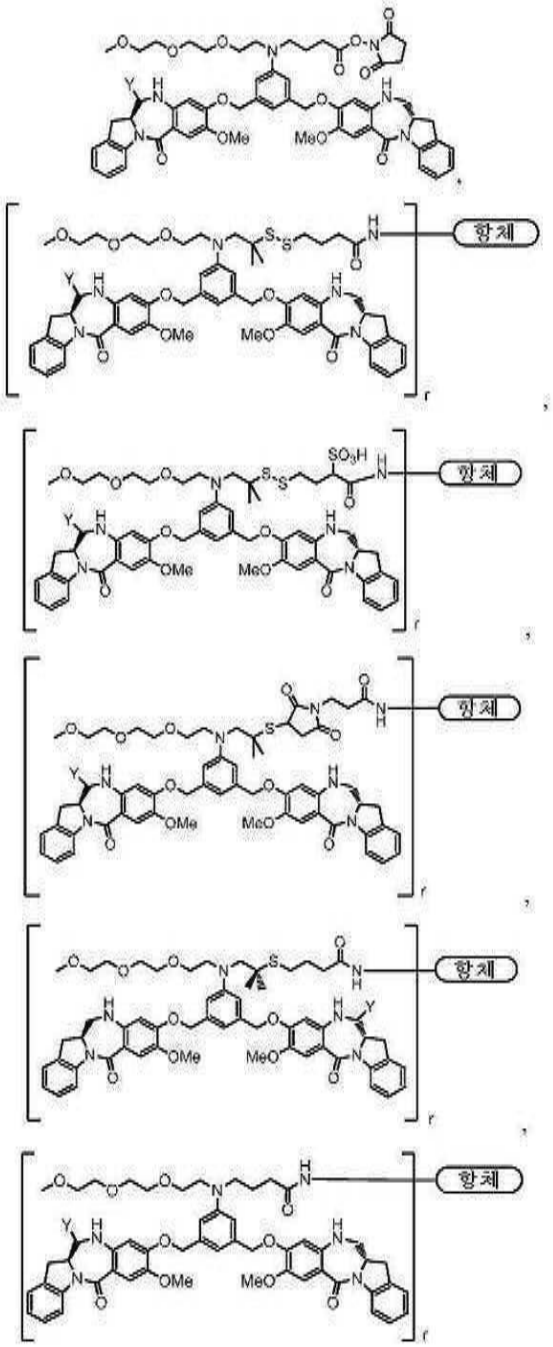
[0887]

[0888] 이다.

[0889] 본 발명의 방법에 의해 제조된 화합물 혹은 컨쥬게이트는 구체적으로 이하를 포함한다:



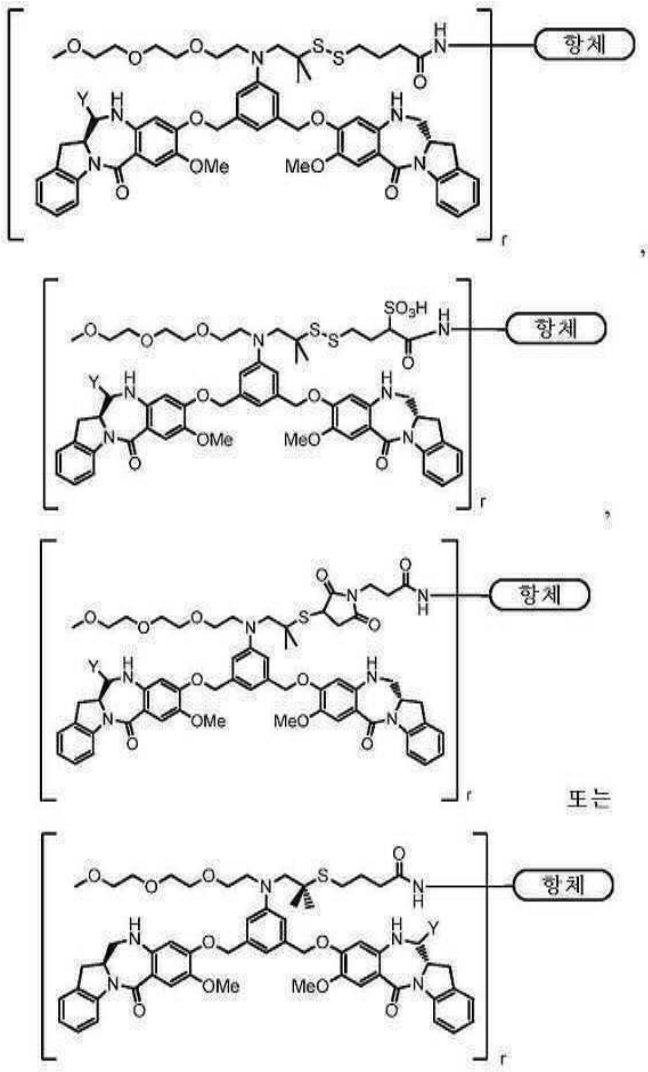
[0890]



[0891]

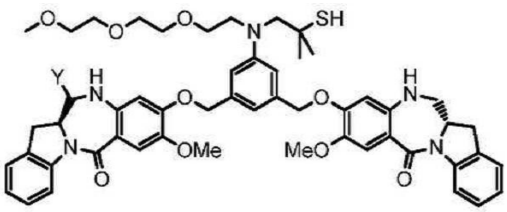
[0892] 여기서, r은 1 내지 10의 정수이고, Y는 -H 또는 $-SO_3M$이며, M은 -H 또는 약제학적으로 허용가능한 양이온이다

[0893] 제25특정 실시형태에 있어서, 본 발명은 이하의 화학식:



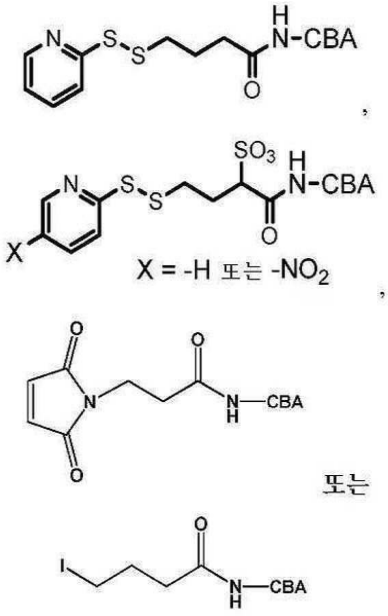
[0894]

[0895] 의 컨쥬게이트를 제조하는 방법을 제공하되, 상기 방법은 이하의 화학식:



[0896]

[0897] 의 세포독성 화합물을 이하의 화학식:



[0898]

[0899] 의 변형된 CBA와 각각 약 4 내지 약 9의 pH에서 반응시키는 단계를 포함한다:

[0900] 식 중,

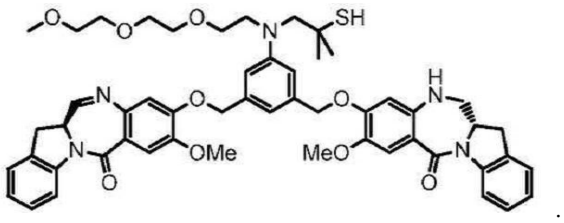
[0901] r은 1 내지 10의 정수이고;

[0902] Y는 이탈기이고, 아황산염(HSO_3, HSO_2 또는 양이온과 함께 형성된 HSO_3^-, SO_3^{2-} 혹은 HSO_2^-의 염), 메타중아황산염($H_2S_2O_5$ 또는 양이온과 함께 형성된 $S_2O_5^{2-}$의 염), 모노-, 다이-, 트라이- 및 테트라-티오포스페이트(PO_3SH_3, $PO_2S_2H_2$, POS_3H_2, PS_4H_2 또는 양이온과 함께 형성된 PO_3S^{3-}, $PO_2S_2^{3-}$, POS_3^{3-} 혹은 PS_4^{3-}의 염), 티오포스페이트 에스터 $(R^iO)_2PS(OR^i)$, R^iS-, R^iSO, R^iSO_2, R^iSO_3, 티오설페이트(HS_2O_3 또는 양이온과 함께 형성된 $S_2O_3^{2-}$의 염), 다이티오나이트($H_2S_2O_4$ 또는 양이온과 함께 형성된 $S_2O_4^{2-}$의 염), 포스포로다이티오에이트($P(=S)(OR^{k'})(S)(OH)$ 또는 양이온과 함께 형성된 그의 염), 하이드록삼산($R^{k'}C(=O)NOH$ 또는 양이온과 함께 형성된 염), 포름알데하이드 설폭실레이트($HOCH_2SO_2^-$ 또는 $HOCH_2SO_2^-Na^+$ 등과 같은, 양이온과 함께 형성된 $HOCH_2SO_2^-$의 염) 또는 이들의 혼합물이며, 이때, R^i는 1 내지 10개의 탄소 원자를 지닌 직쇄 혹은 분지쇄 알킬이고 $-N(R^j)_2$, $-CO_2H$, $-SO_3H$ 및 $-PO_3H$로부터 선택된 적어도 하나의 치환기로 치환되며; R^i는 여기에 기재된 알킬기에 대해서 치환기로 더욱 선택적으로 치환될 수 있고; R^j는 1 내지 6개의 탄소 원자를 지니는 직쇄 혹은 분지쇄 알킬이며; $R^{k'}$는 1 내지 10개의 탄소 원자를 지니는 직쇄, 분지쇄 혹은 환식 알킬, 알케닐 혹은 알키닐, 아릴, 헤테로사이클릴 또는 헤테로아릴이고; 바람직하게는 Y는 $-SO_3M$이며;

[0903] M은 -H 또는 약제학적으로 허용가능한 양이온이다.

[0904] 소정의 실시형태에 있어서, Y는 $-SO_3M$이고; M은 -H 또는 약제학적으로 허용가능한 양이온이다.

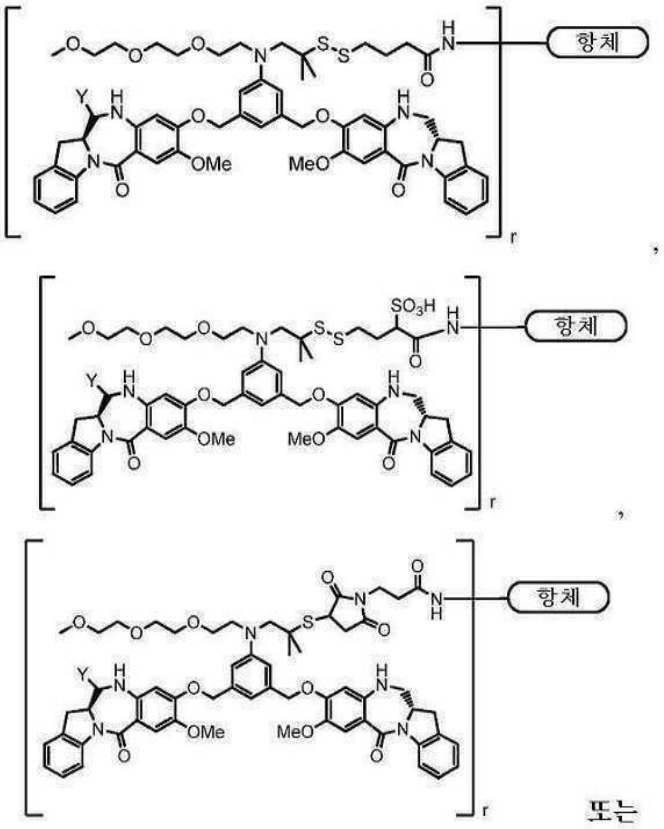
[0905] 소정의 실시형태에 있어서, 상기 세포독성 화합물은 이민 반응성 시약을, 이하의 화학식의 이민-함유 세포독성 화합물과 반응시킴으로써 생성된다:

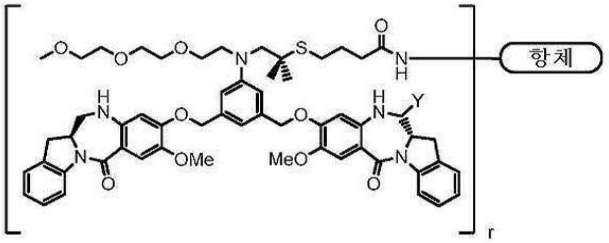
[0906] 

.

[0907] 소정의 실시형태에 있어서, 상기 CBA는 huMy9-6이다.

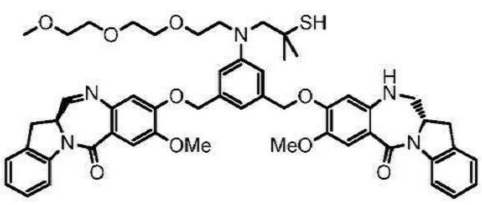
[0908] 제26특정 실시형태에 있어서, 본 발명은 이하의 화학식:

[0909] 

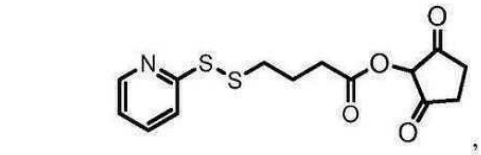
[0910] 

[0911] 의 컨쥬게이트를 제조하는 방법을 제공하되,

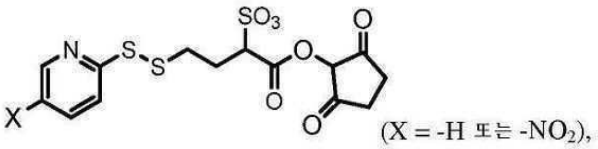
[0912] 상기 방법은 상기 CBA를 이민-함유 세포독성 화합물, 이민 반응성 시약, 및 상기 연결기를 포함하는 이작용성 가교제와 반응시켜 상기 컨쥬게이트를 형성하는 단계를 포함하며,

[0913] 상기 이민-함유 세포독성 화합물은 

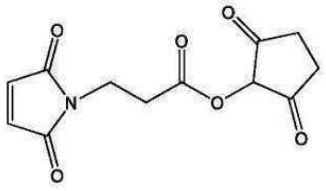
이고;



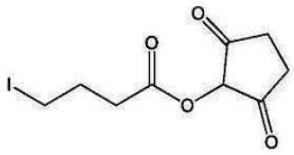
,



(X = -H 또는 -NO_2),



또는



[0914] 상기 이작용성 가교제는 각각 이며,

[0915] 상기 이민 반응성 시약은 아황산염(H_2SO_3, H_2SO_2 또는 양이온과 함께 형성된 HSO_3^-, SO_3^{2-} 혹은 HSO_2^-의 염), 메타중아황산염($H_2S_2O_5$ 또는 양이온과 함께 형성된 $S_2O_5^{2-}$의 염), 모노, 다이, 트라이 및 테트라-티오포스페이트(PO_3SH_3, $PO_2S_2H_3$, POS_3H_3, PS_4H_3 또는 양이온과 함께 형성된 PO_3S^{3-}, $PO_2S_2^{3-}$, POS_3^{3-} 혹은 PS_4^{3-}의 염), 티오포스페이트 에스터(($R^iO)_2PS(OR^i$), R^iSH, R^iSOH, R^iSO_2H, R^iSO_3H), 각종 아민류(하이드록실아민(예컨대, NH_2OH), 하이드라진(예컨대, NH_2NH_2), NH_2O-R^i, $R^{i'}NH-R^i$, NH_2-R^i), $NH_2-CO-NH_2$, $NH_2-C(=S)-NH_2$, 티오설페이트($H_2S_2O_3$ 또는 양이온과 함께 형성된 $S_2O_3^{2-}$의 염), 다이티오나이트($H_2S_2O_4$ 또는 양이온과 함께 형성된 $S_2O_4^{2-}$의 염), 포스포로다이티오에이트(P(=S)(OR^k)(SH)(OH) 또는 양이온과 함께 형성된 그의 염), 하이드록삼산($R^kC(=O)NHOH$ 또는 양이온과 함께 형성된 염), 하이드라자이드($R^kCONHNH_2$), 포름알데하이드 설폭실레이트($HOCH_2SO_2H$ 또는 $HOCH_2SO_2^-Na^+$ 등과 같은, 양이온과 함께 형성된 $HOCH_2SO_2^-$의 염), 당화 뉴클레오타이드(GDP-만노스 등), 플루다라빈 또는 이들의 혼합물로부터 선택되고, 이때, R^i 및 $R^{i'}$는 각각 독립적으로 1 내지 10개의 탄소 원자를 지닌 직쇄 혹은 분지쇄 알킬이고 $-N(R^j)_2$, $-CO_2H$, $-SO_3H$ 및 $-PO_3H$로부터 선택된 적어도 하나의 치환기로 치환되며; R^i 및 $R^{i'}$는 여기에 기재된 알킬기에 대해서 치환기로 더욱 선택적으로 치환될 수 있고; R^j는 1 내지 6개의 탄소 원자를 지닌 직쇄 혹은 분지쇄 알킬; R^k는 1 내지 10개의 탄소 원자를 지니는 직쇄, 분지쇄 혹은 환식 알킬, 알케닐 혹은 알키닐, 아릴, 헤테로사이클릴 또는 헤테로아릴이다.

[0916] 소정의 실시형태에 있어서, Y는 $-SO_3M$이고; M은 -H 또는 약제학적으로 허용가능한 양이온이다.

[0917] 소정의 실시형태에 있어서, 상기 CBA는 huMy9-6이다.

[0918] **화합물 및 컨쥬게이트의 시험관내 세포독성**

[0919] 본 발명의 방법에 의해 생성되는 세포독성 화합물 및 세포 결합-약물 컨쥬게이트는 시험관내에서 각종 암세포주의 증식을 억제하는 그들의 능력에 대해서 평가될 수 있다. 예를 들어, 인간 결장 암종 세포주 COLO 205, 횡문근육종 세포주 RH-30 및 다발성 골수종 세포주 MOLP-8 등과 같은 세포주는 이들 화합물 및 컨쥬게이트의 세포독성의 평가에 이용될 수 있다. 평가될 세포는 1 내지 5일 동안 상기 화합물 혹은 컨쥬게이트에 노출될 수 있고,

공지의 방법에 의한 직접 검정에서 세포의 생존율이 측정된다. 이어서 IC_{50}값은 검정법의 결과로부터 계산될 수 있다. 대안적으로 혹은 부가적으로, 미국 국립 암 연구소에 의해 기재된 것들과 같은 시험관내 세포주 민감도 선별(sensitivity screen)(본 명세서에 참조로 병합된 문헌[Voskoglou-Nomikos *et al.*, 2003, Clinical Cancer Res. 9: 42227-4239] 참조)은 본 발명의 방법에 의해 생성된 화합물 혹은 컨쥬게이트에 의한 치료에 대해 민감성이 있을 수 있는 암의 종류를 결정하기 위한 지침들 중 하나로서 이용된다.

[0920] 본 발명의 방법에 의해 생성된 항체-세포독성제 컨쥬게이트의 시험관내 효능 및 표적 특이성의 예는 도 17에 도시되어 있다. 모든 컨쥬게이트는 낮은 피코몰 범위의 IC_{50}을 지니는 항원 양성 암 세포에 대해 극히 세포독성이었다. 항원 음성 세포주는 동일한 컨쥬게이트에 노출된 경우 산 채로 유지된다. 인돌리노벤조다이아제핀 이량체는 비컨쥬게이트된 항체 huMy9-6(항-CD33)로 차단된 경우 160배 적은 효능인 표적 특이적 효능을 나티내고(도 17), 비컨쥬게이트된 항체 FOLR1(항폴레이트 수용체 항체)로 차단된 경우 40배 적은 효능을 나타낸다(결과는 도시되지 않음). 예를 들어, 중아황산염 부가물을 보유하는 huMy9-6-SPDB-**1f** 컨쥬게이트는 10.5pM의 IC_{50}값을 지니는 항원 양성 HL60/QC 세포를 사멸시키는 한편, 과잉의 비컨쥬게이트된 huMy9-6 항체의 첨가는 이 세포독성 효과를 저감시켜(IC_{50} = 1.69nM), 항원 특이성을 입증하고 있다(도 17A). 또한, huMy9-6-SPDB-**1f** 컨쥬게이트는 또 21pM의 IC_{50}값을 지니는 HL60/ATCC 세포주와 190pM의 IC_{50}값을 지니는 NB-4 세포주의 둘 모두에 대해서 고도로 효능이 있다(도 17B 및 도 17C).

[0921] 항체 결합에 대한 컨쥬게이션의 효과는 HL60/QC 세포주에 대한 huMy9-6-SPDB-**1f** 컨쥬게이트와 비컨쥬게이트된 huMy9-6 항체 둘 모두의 결합을 비교함으로써 측정되었다(도 18). FACS 분석은 네이키드 항체에 대한 컨쥬게이트의 결합능에 변화가 없는 것을 보였고, 이는 항체에 세포독성제의 컨쥬게이션으로 인한 결합 시 절충이 없는 것을 나타낸다.

[0922] 일례에 있어서, 세포 결합제/세포독성제 컨쥬게이트의 싱체내 효능이 측정되었다. 인간 HL60/QC 종양을 보유하고 있는 누드 마우스를 huMy9- 6-SPDB-**1f** 컨쥬게이트로 처리한 바 상당한 종양 퇴행이 다회 용량에서 관찰된 한편, 미처리된 마우스는 종양이 급속하게 성장되었다(도 19). 활성은 최대 내성 용량보다 적어도 35배 낮은 20 ㎍/kg 정도로 낮은 용량에서 관찰되었다.

[0923] 내성에 대한 이민 포화의 효과는 표 9에 표시되어 있다. 다이-이민 huFOLR1-약물1은 다회 용량에서 테스트되었고, 이들 모두에서 고도로 독성이어서 50 ㎍/kg에서 처리된 최하위 군에서 단지 생존자가 남아 있는 것이 확인되었다. 이에 대해서, 부분적으로 저감된 모노-이민 huFOLR1-약물2 및 huFOLR1-SPDB-IGN(huFOLR1-SPDB-**1f**) 컨쥬게이트는, 유의하게 개선된 내성을 지녔고 huFOLR1-SPDB-IGN(huFOLR1-SPDB-**1f**) 컨쥬게이트는 560 ㎍/kg으로 테스트된 최고 용량에서 100% 동물 생존을 보인 것이 확인되었다..

[0924] **실증예**

[0925] **실시예 1**

[0926] 2 mg/㎖에서의 인간화 My9-6 항체는 15% DMA(v/v)를 함유하는 85% PBS, pH 7.4에서 25℃에서 3시간 동안 9몰 당량의 2-NHS 에스터(화합물 **2**)로 컨쥬게이트되었고, 이어서 PBS, pH 7.4에서 G25 탈염 칼럼 상에서 정제되어 미반응 혹은 가수분해된 비컨쥬게이트된 약물을 제거하였다. 얻어진 컨쥬게이트는 10mM 히스티딘, 250mM 글라이신, 1% 수크로스를 함유하는 pH 6.5 버퍼에서 투석하였다. 컨쥬게이트 약물/항체비(DAR)는 280㎚ 및 320㎚에서 약물 및 항체의 소광 계수를 이용한 계산 및 280 및 320㎚에서 UV 흡광도에 의거한 1.4 DAR로서 결정되었다.

[0927] 컨쥬게이트는 400㎜ 나트륨 퍼클로레이트, 150mM 인산칼륨 버퍼, pH 7.0의 등용매 이동상을 이용해서 1 ㎖/분에서 TSK-겔 G300SWXL 칼럼(7.8㎜×300㎜, 5㎛ 입자 크기) 상에서의 크기 배제 크로마토그래피(Size Exclusion Chromatography: SEC)에 의해 단량체 %에 대해서 분석하였다. 단량체의 퍼센트(단량체 %) 및 응집체는 280㎚에서 모든 항체 종의 UV 흡광도를 모니터링하고 각 항체 피크의 곡선하면적(area-under-the-curve: AUC)을 측정함으로써 결정되었다. 부가적으로, 단량체와 응집체 둘 모두에 대한 2 약물의 퍼센트(%)는 320㎚ 및 280㎚에서 모든 항체 종의 UV 흡광도를 모니터링하고 각 항체 피크의 AUC를 측정함으로써 결정되었다. 1.4 DAR를 함유하는 huMy9-6-**2** 컨쥬게이트의 단량체 %는 91%였다. 단량체에 대한 % **2**는 80%였다.

[0928] 유리 상태의(비컨쥬게이트된) 약물 검정을 위하여, 컨쥬게이트는 아세톤 추출하여 단백질을 제거하고, 건조 후 이동상에 재구성하고, 모두 0.025% 아세트산을 함유하는, 20% 아세토나이트릴 및 80% 탈이온수에서 100% 아세토나이트릴까지의 선형 구배를 이용하여 1㎖/분에서 48분에 걸쳐서 VYDAC 208TP C8 역상 HPLC 칼럼(4.6×250㎜, 7 ㎛ 입자 크기) 상에 주입하였으며, 약물-메틸 에스터 표준과 비교하였다. 컨쥬게이트 중 유리 상태의 컨쥬게이

트되지 않은 약물의 퍼센트는 컨쥬게이트된 약물의 1% 미만인 것으로 결정되었다.

[0929] 1.4 약물/항체비(DAR)를 지니는 huMy9-6-2 컨쥬게이트는, 탈글라이코실화 후 질량 분광(MS)에 의해 분석하였다(도 1a). 컨쥬게이트의 MS는 최대 피크로서 비컨쥬게이트된 항체(D0)와, 보다 작은 D1 피크(1개의 연결된 약물을 지니는 항체), 그리고 2 및 3개의 연결된 약물/항체의 훨씬 작은 D2 및 D3 피크를 보였다. 컨쥬게이션의 효율은 낮았고, 컨쥬게이션 후 1.4의 컨쥬게이트 DAR을 지녔고 항체에 비해서 9배 몰 과량의 2-NHS 에스터를 보였다.

[0930] **실시예 2**

[0931] 중아황산나트륨을 이용한 2-NHS 에스터(화합물 **2**)의 컨쥬게이션에 대해서, 2-NHS 에스터(화합물 **2**)는 수중 66% DMA(다이메틸아세트아마이드) 중에서 0.9몰 당량의 중아황산나트륨(탈이온수 중 새롭게 제조된 $NaHSO_3$)으로 30분 동안 25℃에서 예비인큐베이팅하였다. 2 mg/mℓ에서의 HuMy9-6 항체는 85% PBS, pH 7.4, 15% DMA(v/v) 중 25℃에서 3시간 동안 9몰 당량의 2-NHS 에스터($NaHSO_3$ 첨가)로 컨쥬게이트시키고 나서, PBS, pH 7.4에서 G25 탈염 칼럼에 대해서 정제시켜 비반응 혹은 가수분해된 약물을 제거하였다. 컨쥬게이트는 10mM 히스티딘, 250mM 글라이신, 1% 수크로스, pH 6.5 버퍼에서 투석하였다.

[0932] 중아황산나트륨을 이용해서 제조된 huMy9-6-2 컨쥬게이트의 DAR은 280 및 320nm에서의 UV 분광광도법에 의해 측정되었고, 3.1 DAR로 계산되었다. 컨쥬게이트의 단량체 %는 95%였고, 단량체에 대한 % **2**는 91%였다. 탈글라이코실화를 수반하는 중아황산나트륨을 이용해서 제조된 컨쥬게이트의 MS는 하나의 연결된 약물을 지니는 D1의 최대 피크를 보였고, 또한 2 내지 6개의 연결된 약물/항체를 지니는 D2, D3, D4, D5, D6 피크를 보였다(도 1b).

[0933] 중아황산나트륨으로 제조된 huMy9-6-2 컨쥬게이트는 컨쥬게이트보다 3.1 DAR의 훨씬 큰 약물 내포와 중아황산나트륨 없이 제조된 1.4 DAR를 보였다. 중아황산나트륨로 제조된 3.1 DAR 컨쥬게이트의 MS는 1개 연결된 약물의 최고 D1 피크를 보였다. 이에 대해서, 중아황산나트륨 없이 제조된 1.4 DAR 컨쥬게이트의 MS는 비컨쥬게이트된 항체(D0)의 최고 피크와, 훨씬 작은 D1, D2 및 D3 연결된 약물 컨쥬게이트 피크를 보였다. 중아황산나트륨으로 제조된 huMy9-6-2 컨쥬게이트용의 단량체에 대한 약물 %는 91%였고, 이것은 중아황산나트륨 없이 제조된 huMy9-6-2 컨쥬게이트용의 단량체에 대한 약물의 경우 80%보다 높았다. 따라서, 중아황산나트륨으로 제조된 huMy9-6-2 컨쥬게이트에 대한 전체적인 컨쥬게이트 품질은 중아황산나트륨 없이 전통적인 컨쥬게이션 절차에 의한 것보다 훨씬 우수하였다.

[0934] 항체를 지닌 수종의 약물(**1**, **2**, **3** 및 **4**)의 NHS 에스터의 컨쥬게이션은 중아황산나트륨($NaHSO_3$)의 존재 하에 수행되었고, $NaHSO_3$ 없이 전통적인 컨쥬게이션 방법과 비교하였다. 그 결과는 표 16에 표시되어 있다. 모든 경우에, 컨쥬게이션 중 중아황산나트륨의 첨가는 중아황산나트륨의 첨가 없이 제조된 컨쥬게이트보다 단량체에 대한 유의하게 양호한 보다 높은 DAR 품질과 보다 높은 % 약물을 지니는 컨쥬게이트를 보였다.

[0935] 표 16. 중아황산나트륨($NaHSO_3$) 첨가 없이 혹은 첨가하여 수 개의 약물-NHS 에스터를 지니는 항체의 컨쥬게이션의 비교

$NaHSO_3$ 첨가	약물의 유형	DAR	모노머 %	모노머 상의 약물 %
-	2	1.4	91	80
+		3.0	95	91
-	3	0.5	95	35
+		2.5	95	91
-	4	1.0	90	65
+		3.8	90	84
-	1	1.1	95	40
+		2.7	92	87

[0936]

[0937] 중아황산나트륨으로 제조된 huMy9-6-**2** 컨쥬게이트는 중아황산나트륨 없이 제조된 컨쥬게이트에 대해서 유사한 시험관내 세포독성을 보였다(도 2). 따라서, 보다 높은 DAR 및 단량체에 대한 보다 높은 % 약물의 양호한 품질의 컨쥬게이트가 세포독성 효능의 어떠한 소실 없이도 중아황산나트륨을 이용해서 제조되었다. 중아황산나트륨으로 제조된 항-CD22 항체-**2** 컨쥬게이트는 중아황산나트륨 없이 제조된 컨쥬게이트에 대해서 유사한 시험관내 세포독성을 보였다(도 3).

[0938] 중아황산나트륨을 이용해서 제조한 huMy9-6-**2** 컨쥬게이트는 겔 칩 분석기를 이용해서 비환원 SDS-PAGE에 의해 분석하였다. 컨쥬게이트는 단지 무손상 항체 밴드만을 보였으며, 즉, 중쇄 및 경쇄 밴드는 관찰되지 않았는바, 이는 첨가된 중아황산나트륨이 항체 중 천연 사슬간 다이설파이드 결합의 어떠한 원치않는 환원도 일으키지 않았다고 하는 예기치 않은 이점을 보였다.

[0939] **3**, **4**, **1** 및 **5**의 2-NHS 에스터 또는 SPDB-NHS 에스터는 25℃에서 15분 내지 4시간 동안 수중 66-98% DMA(다이메틸아세트아마이드) 중에서 0.5 내지 3몰 당량의 중아황산나트륨(탈이온수 중 새롭게 제조된 $NaHSO_3$)로 예비 인큐베이션하였다. 이들 반응물 중 일부는 또한 4℃에서 하룻밤 방치하고 20시간 후에 컨쥬게이션을 위하여 이용하였다.

[0940] 중아황산나트륨으로 처리하거나 중아황산나트륨을 첨가하지 않은 DMA 중 2-NHS 에스터는, 모두 0.025% 아세트산을 함유하는, 20% 아세토나이트릴 및 80% 탈이온수에서 100%까지의 아세토나이트릴의 선형 구배를 지니는 VYDAC C8 역상 칼럼을 이용하여 1 ㎖/분에서 48분에 걸쳐서 HPLC에 의해 분석하였다. 도 4에 나타낸 바와 같이, 페어런트 2-NHS 에스터는 ~ 23분에 용리되었다. 25℃에서 수중 66% DMA에서 0.9몰 당량의 $NaHSO_3$에 의한 처리 30분 후, 2-NHS의 대부분이 설폰화된 더욱 극성 형태로 전환되었고, ~ 14분에 용리되었다. 예기치 않게, 설폰화 가수분해된 **2**의 바람직하지 않은 피크는 관찰되지 않았다. 따라서, NHS 에스터와의 반응 없이 이민 결합에 대한 첨가를 위한 중아황산나트륨의 놀랍게도 바람직한 반응이 관찰되었다.

[0941] 마찬가지로 약물 NHS 에스터는 항체와의 컨쥬게이션 전에 중아황산나트륨 이외의 이민 반응성 시약으로 처리한다. 대안적인 컨쥬게이션 접근법은 약물-NHS 에스터 및 항체의 혼합물을 중아황산나트륨 혹은 다른 이민 반응성 시약으로 처리하는 것이다.

[0942] **실시예 3**

[0943] 다이설파이드-연결된 항체-SPDB-**1** 컨쥬게이트는 합성된 1-SPDB-NHS 에스터(화합물 **1c**)를 이용해서 제조하였다. 1-SPDB-NHS 에스터는 수중 96-98% DMA에서 3몰 당량의 중아황산나트륨(수중 새롭게 제조된 $NaHSO_3$ 용액을 이용)으로 25℃에서 4 내지 5기간 동안 전처리하였다. DMA 중 중아황산나트륨-처리된 **1**-SPDB-NHS 에스터는 1 ㎖/분에서 48분 동안 0.025% 아세트산을 함유하는 20% 아세토나이트릴 및 80% 탈이온수의 선형 구배를 이용하는 VYDAC C8 역상-HPLC 칼럼을 이용해서 분석하였다. 역상 HPLC 분석은 중아황산염의 NHS 에스터와의 바람직하지 않은 반응 없이 이민 결합에 대한 중아황산염 첨가의 목적으로 하는 반응만을 보였다.

[0944] 컨쥬게이션을 위하여, 2 ㎎/㎖에서의 인간화 항체는 15% *N*,*N*-다이메틸아세트아마이드(DMA)를 함유하는 수성 버퍼인 85% PBS, pH 7.4에서 25℃에서 6시간 동안 5 내지 7몰 당량의 **1**-SPDB-NHS 에스터($NaHSO_3$로 전처리됨)와 반응시키고 나서, PBS, pH 7.4에서 G25 겔 여과 칼럼 상에서 정제시켜, 미반응 혹은 가수분해된 약물을 제거하였다. 인간화 항체-SPDB-**1** 컨쥬게이트는 10mM 히스티딘, 250mM 글라이신, 1% 수크로스, pH 6.5 버퍼 중에 투석하였다. 컨쥬게이트의 약물/항체비(DAR)는 280 및 320㎚에서의 UV 흡광도 측정에 의해 그리고 280㎚ 및 320㎚에서의 약물 및 항체의 소광 계수를 이용해서 2.2 내지 2.9인 것으로 측정되었다. 컨쥬게이트 제조 시의 단량체의 퍼센트는 SEC(크기 배제 크로마토그래피)에 의해 90%로서 결정되었다. SEC에서의 단량체 피크의 UV 흡광도에 의거해서, 또한 단량체 컨쥬게이트 피크가 연결된 약물 분자를 지닌 것이 입증되었다. 아세톤 추출 및 역상 HPLC에 의해 컨쥬게이트되지 않은 약물 %가 1% 미만인 것으로 나타났다.

[0945] 컨쥬게이션 전에 첨가된 중아황산나트륨으로 제조된 탈글라이코실화 항체-SPDB-**1** 컨쥬게이트의 MS는 중아황산나트륨 컨쥬게이션 없이 얻어진 것보다 훨씬 우수한 컨쥬게이트인 것을 나타내었다(도 5). 중아황산나트륨 없이 제조된 컨쥬게이트의 MS는 평균 1.4 **1**/Ab 그리고, 3개까지 연결된 **1** 분자를 지니는 항체 종을 지녔다(도 5A). 이에 대해서, 중아황산나트륨으로 제조된 컨쥬게이트의 MS는 평균 2.5 **1**/Ab 그리고 7개까지 연결된 **1** 분자를 지니는 항체 종을 나타내었다(도 5B).

[0946] 중아황산나트륨을 이용해서 제조한 다이설파이드-연결된 항체-SPDB-**1** 컨쥬게이트는 비환원 SDS-PAGE 겔 칩 분석에 의해 단지 무손상 항체 밴드만을 나타내었다. 겔 칩 검정은 아질런트 프로테인 230 프로테인 칩(Agilent

Protein 230 Protein Chip)을 이용해서 수행하였고, 아질런트 2300 바이오아날라이저(Agilent 2300 Bioanalyzer)를 이용해서 분석하였다. 중쇄 및 경쇄 밴드는 관찰되지 않았는 바, 이는 첨가된 중아황산나트륨이 천연 항체-사슬간 다이설파이드 결합의 원치 않는 환원을 일으키지 않았다고 하는 예기치 않은 이점을 나타내는 것이다(도 6). 중아황산나트륨을 이용해서 제조된 항체-SPDB-**1** 컨쥬게이트에서 얻어진 연결된 약물은 또한 놀랍게도 컨쥬게이트 중 다이설파이드 링커가 첨가된 중아황산나트륨에 대해서 안정하다는 것을 입증하였다.

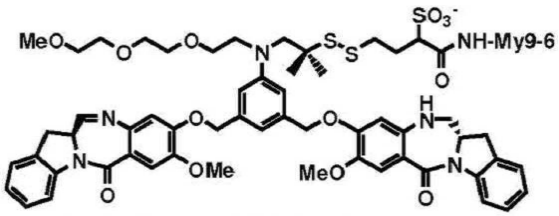
[0947] **실시예 4**

[0948] 컨쥬게이트 제조를 위하여, **1f**-SPDB-NHS 에스터(화합물 **1c**, 도 7)는 25℃에서 5시간 동안 수중 96% DMA(다이메틸아세트아마이드) 중에서 3몰 당량의 중아황산나트륨(탈이온수 중에서 새롭게 제조한 $NaHSO_3$)로 예비 인큐베이션하고 나서, 컨쥬게이션을 위하여 필요할 때까지 4℃에서 하룻밤 인큐베이션하였다. 2 내지 3 ㎎/㎖에서의 인간화 항체는 5% DMA(v/v)를 함유하는 수성 버퍼인 95% 50mM HEPES, pH 8.5에서 25℃에서 4시간 동안 중아황산나트륨(-/+ $NaHSO_3$)의 부재 혹은 존재 하에 8몰 당량의 **1f**-SPDB-NHS 에스터로 유도체화하고 나서, 이들 둘을 PBS, pH 7.4에서 G25 탈염 칼럼 상에서 정제시켜 미반응의 가수분해된 약물을 제거하였다. 컨쥬게이트는 10mM 히스티딘, 250mM 글라이신, 1% 수크로스, pH 6.5 버퍼 중에서 투석하였다. 컨쥬게이트 DAR는 280 및 320㎚에서 UV 분광광도법에 의해 측정하였다. 컨쥬게이트 중의 단량체 % 및 단량체에 대한 약물 %는 SEC에 의해 결정하였다. 컨쥬게이트 중 컨쥬게이트되지 않은(비컨쥬게이트된) 약물은 아세톤 추출 후 역상 HPLC에 의해 결정하였다. 이들 컨쥬게이션은 수개의 인간화 항체에 대해서 수행하였다.

[0949] **실시예 5**

[0950] 항체 내에 혼입된 반응성 다이설파이드 링커로 약물 티올을 컨쥬게이트하기 위하여, 8 ㎎/㎖의 인간화 mAb를 5% DMA(v/v)의 수성 버퍼인 90% PBS, pH 7.5 중에서 25℃에서 1.5시간 동안 4 내지 6몰 당량의 SPDB 헤테로이작용성 링커로 유도체화하고 나서, G25 탈염 칼럼 상에서 35mM 시트레이트, 2mM EDTA, 150mM NaCl, pH 5.5 버퍼로 정제시켜, 미반응의 가수분해된 링커를 제거하였다. LAR(링커 항체비)는 (총 항체 및 해리가능한 SPy를 측정하기 위하여) 50mM 다이티오트레이톨 없이 그리고 첨가하여 280 및 343㎚에서 UV 흡광도에 의해 측정하였다. 2 ㎎/㎖에서의 SPDB-변형된 항체는 85-90%의 50mM 인산칼륨, 50mM NaCl, pH 7.5 버퍼에서 25℃에서 2 내지 20시간 동안 2몰 당량의 중아황산나트륨-처리된 약물 티올/링커와 반응시키고 나서, PBS, pH 7.4 중에서 G25 탈염 칼럼 상에서 정제시켜 미반응의 가수분해된 약물을 제거하였다. 항체-SPDB-약물 컨쥬게이트의 DAR은 280 및 320㎚에서의 UV 흡광도에 의해 측정하고, 컨쥬게이트 중의 단량체의 퍼센트 및 단량체 상의 약물의 퍼센트는 SEC에 의해 결정한다.

[0951] **실시예 6** huMy9-6-설포-SPDB-**1**의 제조(2-단계 방법)



My9-6-설포-SPDB-1

[0952]

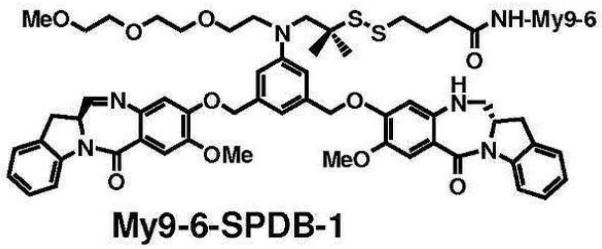
[0953] 6 ㎎/㎖ huMy9-6 항체 및 9몰 당량 설포-SPDB 링커(DMA 중 20mM 스톡)을 함유하는 반응물을 50mM EPPS 버퍼 pH 8에서 25℃에서 3시간 동안 인큐베이팅하였다. 미반응 링커는 NAP 탈염 칼럼(일러스트라 세파덱스(Illustra Sephadex) G-25 DNA급, GE Healthcare)을 이용해서 제거하고, 링커 대 항체비(LAR)는 UV-Vis(2-티오피리돈에 대해서 ε_{343nm} = 8,080 $cm^{-1}M^{-1}$)에 의해 항체 농도 및 DTT-방출 티오피리딘 농도에 의거해서 3.7인 것으로 결정되었다.

[0954] 설포-SPDB 변형된 huMy9-6은 50mM EPPS pH 8.5, 10% v/v DMA 중에서 2 ㎎/㎖로 희석시키고, 2몰 당량의 화합물 **1d**/링커(DMA 중 5mM 스톡; 7.4 당량/항체)와 25℃에서 3시간 동안 반응시켰다.

[0955] 반응 후, 컨쥬게이트를 정제시키고, 탈염 칼럼(G-25 세파덱스, 정밀 분석용, GE Healthcare)을 이용해서 pH 6.2에서 250mM 글라이신, 10mM 히스티딘, 1% 수크로스, 0.01% 트윈(Tween)-20, 50 μM 중아황산나트륨으로 버퍼 교환하였다.

[0956] 정제된 컨쥬게이트는 항체당 연결된 평균 2.9 화합물 **1** 분자(화합물 **1**에 대해서 몰 소광 계수 ε_{330nm} = 15,484 $cm^{-1}M^{-1}$ 및 ε_{280nm} = 30,115 $cm^{-1}M^{-1}$, 그리고 My9-6 항체에 대해서 ε_{280nm} = 207,000 $cm^{-1}M^{-1}$을 이용하는 UV-Vis), 97.8 단량체%(크기 배제 크로마토그래피에 의해), 1% 미만의 비컨쥬게이트된 화합물 1(아세톤 추출/역상 HPLC에 의해), 이용된 항체량에 의거한 60% 수율, 및 이용된 화합물 **1d**량에 의거한 18% 전체 수율을 지닌 것으로 판명되었다. 이 방법을 이용해서 제조한 컨쥬게이트는 컨쥬게이트 침전 없이 (교반된 세포 혹은 아미콘(Amicon) 원심 필터 장치에 의해) 3 mg/mℓ 초과까지 농축될 수 있었다.

[0957] **실시예 7** huMy9-6-SPDB-**1**의 제조



My9-6-SPDB-1

[0958]

[0959] **방법 1 (1-단계 시약 방법):**

[0960] 50mM HEPES(4-(2-하이드록시에틸)-1-피페라진 에탄설폰산) pH 8.5 버퍼 및 공용매로서의 10% v/v DMA(*N*,*N*-다이메틸아세트아마이드) 중 2 mg/mℓ huMy9-6 항체 및 7몰 당량 **1**-SPDB-NHS(90:10 DMA:물, v/v 중 5배 과잉의 중아황산나트륨으로 25℃에서 1시간, 이어서 4℃에서 하룻밤 전처리됨)를 함유하는 반응물을 25℃에서 3시간 동안 인큐베이션시켰다.

[0961] 반응 후, 컨쥬게이트를 NAP 탈염 칼럼(일러스트라 세파덱스 G-25 DNA급, GE Healthcare)을 이용해서 250mM 글라이신, 10mM 히스티딘, 1% 수크로스, 0.01% 트윈(Tween), 50μM 중아황산나트륨 조제 버퍼로 정제 및 버퍼 교환하였다. 투석은 슬라이더-a-라이저 투석 카세트(ThermoScientific 20,000 MWCO)를 이용해서 실온에서 4시간 동안 동일 버퍼에서 수행하였다.

[0962] 정제된 컨쥬게이트는 항체당 연결된 평균 4.0 화합물 **1** 분자(화합물 **1**에 대해서 몰 소광 계수 ε_{330nm} = 15,484 $cm^{-1}M^{-1}$ 및 ε_{280nm} = 30,115 $cm^{-1}M^{-1}$ 그리고 My9-6 항체에 대해서 ε_{280nm} = 207,000 $cm^{-1}M^{-1}$을 이용하는 UV-Vis), 92 단량체%(크기 배제 크로마토그래피에 의해, TSK3000, TOSOH Biosciences), 1% 미만의 비컨쥬게이트된 화합물 **1** (아세톤 추출/역상 HPLC에 의해), 이용된 항체량에 의거한 72% 수율, 이용된 **1**-SPDB-NHS량에 의거한 40% 전체 수율 및 최종 단백질 농도 1.0 mg/mℓ을 지닌 것으로 판명되었다.

[0963] **방법 2 (2-단계 방법):**

[0964] 4.8 mg/mℓ huMy9-6 항체 및 6몰 당량 SPDB 링커(에탄올 중 18.5mM 스톡)를 함유하는 반응물을 PBS pH 7.4 중에서 25℃에서 3시간 동안 인큐베이션시켰다. 미반응 링커는 NAP 탈염 칼럼(일러스트라 세파덱스 G-25 DNA급, GE Healthcare)을 이용해서 제거하고, 링커 대 항체비(LAR)는 UV-Vis(2-티오피리돈에 대해서 ε_{343nm} = 8,080 $cm^{-1}M^{-1}$)에 의해 항체 농도 및 DTT-방출 2-티오피리돈 농도에 의거해서 4.0인 것으로 결정하였다.

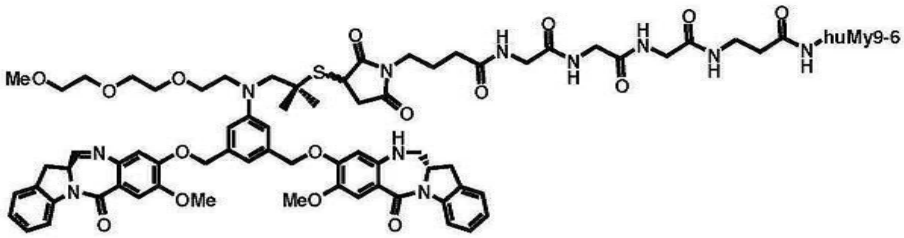
[0965] SPDB 변형된 huMy9-6은 50mM EPPS pH 8.5, 10% v/v DMA 중 2 mg/mℓ까지 희석시키고, 25℃에서 3시간 동안 1.75몰 당량의 화합물 **1d**/링커(DMA 중 5mM 스톡; 7당량/항체)와 반응시켰다.

[0966] 반응 후, 컨쥬게이트를 탈염 칼럼(일러스트라 세파덱스 G-25 DNA급, GE Healthcare)을 이용해서 pH 6.2에서 250mM 글라이신, 10mM 히스티딘, 1% 수크로스, 0.01% 트윈(Tween)-20, 50μM 중아황산나트륨으로 정제 및 버퍼 교환하였다.

[0967] 정제된 컨쥬게이트는 항체당 연결된 평균 3.8 화합물 **1** 분자(화합물 **1**에 대해서 몰 소광 계수 ε_{330nm} = 15,484 $cm^{-1}M^{-1}$ 및 ε_{280nm} = 30,115 $cm^{-1}M^{-1}$ 그리고 My9-6 항체에 대해서 ε_{280nm} = 207,000 $cm^{-1}M^{-1}$을 이용하는 UV-Vis), 91.6 단량체 %(크기 배제 크로마토그래피에 의해, TSK3000, TOSOH Biosciences), 1% 미만의 비컨쥬게이트된 화합물 **1**(아세톤 추출/역상 HPLC에 의해), 이용된 항체량에 의거한 40% 수율, 이용된 화합물 **1d**량에 의거한 22%

전체 수율 및 최종 단백질 농도 0.5 mg/mℓ를 지닌 것으로 판명되었다.

[0968] **실시예 8** huMy9-6-CX 1-1-1의 제조



[0969] **huMy9-6-CX1-1-1**

[0970] **방법 1(동소(in-situ) 1-단계 시약 방법):**

[0971] 1.9mM 화합물 **1d**, N-하이드록시숙신이미드(NHS) 및 말레이미드기를 지니는 1mM CX1-1 헤테로이작용성 링커, 및 20mM 다이아이소프로필 에틸 아민(DIPEA)을 함유하는 DMA 용액을 주위 온도에서 8분 동안 반응시켰다. 이어서, 3mM 말레이미도 프로피온산(MPA)을 첨가하여 과잉의 화합물 **1d**를 반응 중지시켰다. 1-CX1-1-NHS 반응 혼합물을 -80℃에서 동결 보존하고, 그 후, 해동 시 25℃에서 huMy9-6의 버퍼 용액(2 mg/mℓ, 100mM EPPS, pH 8.0, 10% v/v DMA); 4.8몰 당량/항체(링커 농도에 의거)에 두 부분으로 첨가하고 나서, 30분 후 4.2 당량 첨가하였다. 2시간 반응 후, 컨쥬게이트를, 탈염 칼럼(퀵-스핀 단백질(Quick-spin protein), G-25 미세 수지, Roche)을 이용해서 pH 6.2에서 250mM 글라이신, 10mM 히스티딘, 1% 수크로스, 0.01% 트윈(Tween)-20, 50μM 중아황산나트륨으로 정제 및 버퍼 교환하고, 투석 후, 최종적으로 0.22㎛ 멸균 여과를 실시하였다.

[0972] 정제된 컨쥬게이트는 항체당 연결된 평균 3.3 화합물 **1** 분자(화합물 **1**에 대해서 몰 소광 계수 ε_{330nm} = 15,484 $cm^{-1}M^{-1}$ 및 ε_{280nm} = 30,115 $cm^{-1}M^{-1}$ 그리고 My9-6 항체에 대해서 ε_{280nm} = 207,000 $cm^{-1}M^{-1}$을 이용하는 UV-Vis), 95 단량체%(크기 배제 크로마토그래피에 의해, TSK3000, TOSOH Biosciences), 1% 미만의 비컨쥬게이트된 화합물 **1**(아세톤 추출/역상 HPLC에 의해), 이용된 항체량에 의거한 45% 수율, 이용된 화합물 **1d**량에 의거한 17% 전체 수율 및 최종 단백질 농도 0.7 mg/mℓ를 지닌 것으로 판명되었다.

[0973] **방법 2 (1-단계 방법):**

[0974] huMy9-6 항체의 버퍼 용액(2 mg/mℓ, 50mM EPPS, pH 8.5, 8% v/v DMA)에 14몰 당량의 화합물 **1d**(DMA 중 5mM 스톡)를 첨가하고 나서 7몰 당량의 CX1-1 링커(에탄올 중 15mM 스톡 용액)를 첨가하고, 25℃에서 3시간 동안 인큐베이션하였다.

[0975] 반응 후, 컨쥬게이트를 탈염 칼럼(일러스트라 세파덱스 G-25 DNA급, GE Healthcare)을 이용해서 pH 6.2에서 250mM 글라이신, 10mM 히스티딘, 1% 수크로스, 0.01% 트윈(Tween)-20, 50μM 중아황산나트륨에 정제 및 버퍼 교환하고 나서, 슬라이드-a-라이저 투석 카세트(ThermoScientific 20,000 MWCO)에서 4℃에서 2회 투석을 행하였다.

[0976] 정제된 컨쥬게이트는 항체당 연결된 평균 3.4 화합물 **1** 분자(화합물 **1**에 대해서 몰 소광 계수 ε_{330nm} = 15,484 $cm^{-1}M^{-1}$ 및 ε_{280nm} = 30,115 $cm^{-1}M^{-1}$ 그리고 My9-6 항체에 대해서 ε_{280nm} = 207,000 $cm^{-1}M^{-1}$을 이용하는 UV-Vis), 90 단량체%(크기 배제 크로마토그래피에 의해, TSK3000, TOSOH Biosciences), 1% 미만의 비컨쥬게이트된 화합물 **1**(아세톤 추출/역상 HPLC에 의해), 이용된 항체량에 의거한 44% 수율, 이용된 화합물 **1d**량에 의거한 11% 전체 수율 및 최종 단백질 농도 1.48 mg/mℓ를 지닌 것으로 판명되었다.

[0977] **실시예 9** 탈글라이코실화 My9-6-SPDB-**1f**의 MS 분석

[0978] My9-6-SPDB-**1f**는, 항체 라이신에 직접 화합물 **1f**를 함유하는 NHS 에스터를 컨쥬게이팅함으로써(즉, 위에 기재된 바와 같은 1-단계 시약 방법), 또는 다이티오피리딘 변형된 항체에 화합물 **1d**를 컨쥬게이팅함으로써(즉, 위에 기재된 바와 같은 2-단계 방법) 제조되었다. 탈글라이코실화 My9-6-SPDB-**1f**의 질량 분광(MS) 분석은 이어서 상기와 같이 수행하였다.

[0979] 1-단계 시약 방법은 0-9 화합물 **1f** 변형에 의한 컨쥬게이트, 비대칭 컨쥬게이트된 약물 분포, 및 상당한 양의 비컨쥬게이트된 항체를 부여하였다. 한편, 2-단계 방법에 의해 제조한 컨쥬게이트는 0-6 화합물 **1f** 변형을 가

진 MS 프로파일, 대칭적 컨쥬게이트된 약물 분포 및 매우 적은 비컨쥬게이트된 항체를 지녔다. 도 12 참조. 두 컨쥬게이트는 UV-vis 분석에 의해 ~4의 유사한 평균 화합물 **1f**/항체비를 지녔다.

[0980] **실시예 10** My9-6-설포-SPDB-**1**의 2-단계 합성에 대한 pH 효과

[0981] 상이한 pH 조건 하에서의 2-단계 방법을 이용해서 행한 My9-6-설포-SPDB-**1f**에 대한 MS 데이터는 도 13에 도시되어 있다. 요약하면, My9-6-설포SPDB(3.7 링커/항체)는 pH 6, 7, 8 및 8.5에서 18시간 동안 3 당량의 화합물 **1d**/링커(또는 약 11.1 당량/항체)와 반응하였다. MS 데이터는 반응 pH를 증가시킴에 따라 미반응 링커의 저감(260 amu 위성 피크)을 보였다. 이와 같이 해서, pH가 My9-6-설포-SPDB-**1f** 컨쥬게이트의 합성 시 컨쥬게이션 반응에 영향을 미치는 것을 나타내었다. 구체적으로는, 8을 초과하는 pH는 화합물 **1d**가 항체 상의 설포-SPDB 링커와 충분한 반응을 하는데 요구된다.

[0982] **실시예 11** chKTI-설포-SPDB-**1**의 2-단계 합성에 대한 화합물/링커비의 효과

[0983] 도 14는 2-단계 방법을 이용해서 제조된 상이한 화합물 **1d**/링커비를 지니는 chKTI-설포-SPDB-**1**에 대한 MS 데이터를 도시한다. chKTI-설포SPDB(3.7 링커/항체)는 1.1, 1.3, 1.5 혹은 2 당량의 화합물 **1d**/링커와 25℃, pH 8.5에서 3시간 동안 반응시켰다. MS는 증가하는 당량의 화합물 **1d**/링커에 따라서 미반응 링커(260amu 위성 피크)의 감소를 보였다. 이 조건 하에서, 1.3을 초과하는 화합물 **1d**/링커비가 항체 상의 설포-SPDB 링커와 충분히 반응하는데 필요하다는 것을 나타내었다. 링커 당 1.5 이상의 화합물 **1d**의 당량을 증가시킴으로써, 항체 단편화를 유발한 반면(14 내지 19%) 1.1-1.3 화합물 **1d**/링커는 유의한 항체 단편화를 일으키지 못하였다.

[0984] **실시예 12** 항체-SPDB-약물 컨쥬게이트의 제조

[0985] 화합물 **1c**를 수중 96-98% DMA 중에서 3몰 당량의 중아황산나트륨(수중 새롭게 제조된 $NaHSO_3$ 용액을 이용해서)로 25℃에서 4 내지 5시간 동안 전처리하였다. 컨쥬게이션을 위하여, 2 mg/mℓ의 인간화 항체를, 10-15% *N,N*-다이메틸아세트아마이드(DMA)를 함유하는, 85-90% PBS, pH 7.4, 수성 버퍼, 또는 50mM HEPES, pH 8.5에서 25℃에서 6시간 동안 5 내지 7몰 당량의 화합물 **1c**($NaHSO_3$로 전처리)와 반응시키고 나서, PBS, pH 7.4 중에서의 G25 겔 여과 칼럼 상에서 정제시켜, 미반응 혹은 가수분해된 약물 화합물을 제거하였다. 인간화 항체-SPDB-약물 컨쥬게이트를 10mM 히스티딘, 250mM 글라이신, 1% 수크로스, pH 6.5 버퍼에서 투석하였다. 컨쥬게이트의 약물 항체비(DAR)는 280 및 320nm에서 UV 흡광도 측정에 의해 그리고 280nm(215,000 $M^{-1}cm^{-1}$) 및 320nm(9137 $M^{-1}cm^{-1}$)에서의 약물 및 항체의 소광 계수를 이용해서 2.2 내지 2.9인 것으로 측정되었다. 컨쥬게이트 제조시의 단량체의 퍼센트는 TSK-겔 G300SWXL 칼럼(7.8㎜×300㎜, 5㎛ 입자 크기)을 이용해서 SEC(크기 배제 크로마토그래피) 90%를 초과하는 것으로 결정되었다. SEC에서의 단량체 피크의 UV 흡광도에 의거해서, 단량체 컨쥬게이트 피크가 연결된 약물 분자를 지닌 것을 또한 입증하였다. 유리상태의(비컨쥬게이트된) 약물 검정을 위하여, 컨쥬게이트는 아세톤 추출되어 단백질을 제거하고, 건조 후, 이동상 중에 재구성하여 VYDAC 208TP C8 역상 HPLC 칼럼(4.6×250㎜, 7㎛ 입자 크기) 상에 주입하고, 표준과 비교하였다. 컨쥬게이트 중 유리 약물 화합물의 퍼센트는 컨쥬게이트된 약물 화합물의 0.5% 미만으로 결정되었다.

[0986] **인간화 Ab-SPDB-2a 컨쥬게이트의 제조:**

[0987] 8 mg/mℓ에서의 인간화 Ab는 5% DMA(v/v)를 함유하는 95% PBS, PH 7.4 중에서 25℃에서의 1.5시간 동안 SPDB 헤테로이작용성 링커의 4 내지 6몰 당량으로 유도체화되고, 이어서, 시트레이트 버퍼(2mM EDTA, 150mM NaCl을 포함하는 35mM 시트레이트 버퍼, pH 5.5) 내로의 G25 탈염 칼럼 상에서 정제시켜 미반응 링커를 제거하였다. LAR(링커 항체비)는 50mM 다이티오트레이톨의 첨가(총 항체 및 다이티오트레이톨-방출 SPy를 측정하기 위하여) 없이 그리고 첨가하여 280 및 343nm에서의 UV 흡광도를 이용해서 측정하여, 2.7 내지 4.1 LAR인 것으로 결정되었다. 2 mg/mℓ에서의 SPDB-변형 항체는 85% 시트레이트 버퍼, 15 % DMA(v/v) 중 주위 온도에서 20시간 동안 2몰 당량의 화합물 **2a**(HCl염)/연결된 SPDB와 반응시키고 나서 PBS, pH 7.4의 G25 탈염 칼럼 상에서 정제시켜, 컨쥬게이트되지 않은 약물화합물을 제거하였다. 최종 인간화 Ab-SPDB-**2a** 컨쥬게이트의 DAR은 280 및 350nm에서의 UV 분광광도법에 의해 측정하여 ~ 1.7 내지 2.1 DAR인 것으로 계산되었다. 컨쥬게이트 중 단량체 및 단량체 상의 연결된 약물 화합물의 퍼센트는 SEC(크기 배제 크로마토그래피) 칼럼을 이용해서 HPLC에 의해 결정하였다. 도 16 참조.

[0988] **실시예 13** Ab-약물 컨쥬게이트 사양(단량체 % 및 약물 부하)을 개선시키기 위한 공유결합 이민 반응물의 이용

[0989] 부가물 형성은 25℃에서 4시간 동안 90% DMSO/10% PBS pH 7.4에서 NHS-BMPS-**1**에 대한 5몰 당량의 이민 반응물로 수행하였다. 반응 혼합물을 이어서 huMy9-6 항체(4몰 당량 약물, 2 mg/mℓ, 10% v/v DMSO, 50mM HEPES

버퍼, pH 8.5, 5시간, 25℃)에 첨가하였다. 차아황산나트륨, 중아황산나트륨 혹은 메타중아황산나트륨을 이용해서 제조한 컨쥬게이트는 유사한 약물/Ab 비 및 단량체 %를 지닌 한편, 첨가제 처리하지 않고 제조한 컨쥬게이트는 매우 낮은 약물 혼입을 초래하였다.

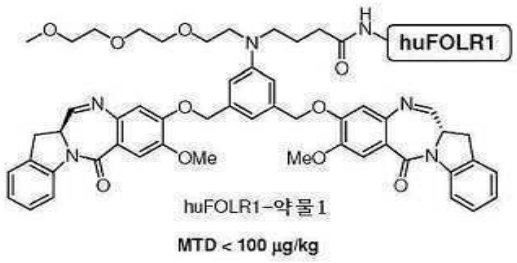
[0990] **실시예 14** huFOLR-1 컨쥬게이트의 생체내 내성 연구

[0991] huFOLR-1 컨쥬게이트의 생체내 내성은 암컷 CD-1 마우스에서 조사하였다. 동물들은 연구 개시 전에 7일 동안 관찰되어, 병이나 아픈 곳이 없는 것으로 판명되었다. 마우스들에게 중아황산염-보유 컨쥬게이트의 단일 정맥내 주입으로 투여하고, 해당 동물들은 체중 감소, 이환률 혹은 치사율에 대해서 매일 모니터링되었다. 표 9는, huFOLR1-약물1에 대해서, 컨쥬게이트가 50 μg/kg의 테스트된 최저 용량만으로 내성이 있음을 나타내었다. 이에 대해서, 두 모노-이민 컨쥬게이트인 huFOLR1-약물2 및 huFOLR1-SPDB-**1f**는 각각 198 μg/kg 미만 및 560 μg/kg 초과의 최대 내성 용량으로 더 양호하게 내성이 있는 것으로 판명되었다.

[0992] 표 9. (A) huFOLR1-약물1, (B) huFOLR1-약물2 및 (C) huFOLR1-SPDB-**1f** 컨쥬게이트에 대한 내성 비교 데이터.

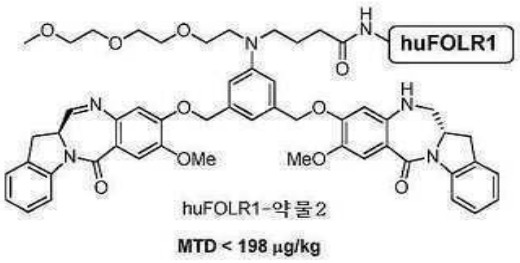
A)

용량 (μg/kg)	생존 %
50	100
100	0
200	0
300	0
400	0



B)

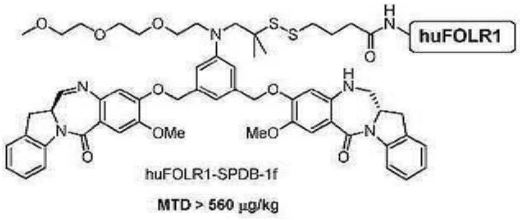
용량 (μg/kg)	생존 %
66	100
132	100
198	50
264	25



[0993]

C)

용량 (μg/kg)	생존 %
120	100
160	100
200	100
320	100
560	100



[0994]

[0995] **실시예 15** 제형 및 컨쥬게이션에서의 폴리에틸렌 글라이콜의 효과

[0996] 본 실시예는 공용매로서의 폴리에틸렌 글라이콜의 존재 하에 수행된 본 발명의 컨쥬게이션 반응이 컨쥬게이트의 침전을 보이지 않는 것과, 40% 정도로 높은(가능하게는 그보다 높은) 폴리에틸렌 글라이콜이 얻어지는 컨쥬게이트의 단량체 %의 감소 없이 이용될 수 있다(2% 다이메틸아세트아마이드의 존재 시 - 데이터는 제시되지 않음)는 것을 입증한다.

[0997] 더욱 중요하게는, 정제 동안 폴리에틸렌 글라이콜의 존재는 유의한 수율 증가를 가져온다(표 10).

[0998] 어떠한 특정 이론에도 얽매이길 원치 않지만, 본 출원인은 본 발명의 컨쥬게이트의 컨쥬게이션 동안 문제의 주된 원인들 중 하나가 컨쥬게이트의 분자 성분의 고유한 소수성인 것으로 여기고 있다. 이것은 낮은 정제된 수율과 경우에 따라 본 발명의 컨쥬게이트에 의한 비정상적인 질량 분포 프로파일을 적어도 부분적으로 설명할 수 있다.

[0999] 또한 본 발명의 컨쥬게이트의 크기 배제 크로마토그래피 동안 아이소프로판올의 첨가는 겉보기 응집물 집단을 감소시킨 것에 가치가 있다. 이 관찰은 작은 소수성 공용매가 본 발명의 약물 및 컨쥬게이트의 용해도를 증가시킬 수 있는 것을 시사한다.

[1000] 이와 같이 해서, 본 발명의 컨쥬게이션 반응, 반응 후의 정제 및/또는 형성된 컨쥬게이트의 제형은 바람직하게는 작은 소수성 공용매, 예컨대 폴리에틸렌 글라이콜(예컨대, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45%)의 존재에서 수행된다.

[1001] 항체-설포-SPDB는 3% DMA를 함유하는 수중 항체(huMy9-6)에 대한 설포-SPDB의 N-하이드록시숙신이미딜(NHS) 에스터 형태의 첨가에 의해 이미 기재된 방법에 따라서 제조되어, 3시간 동안 pH 8.5에서 버퍼링되었다. 얻어진 중간생성물(항체-설포-SPDB)은 G25 세파덱스 상에서 정제되어 과잉의 링커를 제거하였다. 항체 및 링커는 반응물의 부재 시 280㎚에서 그리고 ~ 50mM DTT의 존재 하 343㎚에서의 흡광도를 측정함으로써 UV-vis 분광법에 의해 정량하여, 컨쥬게이트된 링커로부터 2-티오피리딘 방출을 측정하였다.

[1002] 약물을 컨쥬게이트시키기 위하여, 위에서 제조된 항체-설포-SPDB를 공용매의 존재 하에 2배 몰 과잉의 화합물 **1d**와 2 ㎎/㎖ 항체에서 또한 EPPS 버퍼(최종 농도 60mM)로 pH를 8.5로 유지한 상태에서 반응시켰다. 다이메틸아세트아마이드(SAFC) 및 폴리에틸렌 글라이콜(Alfa Aesar)은 추가의 정제 없이 입수한 그대로 이용하였다. 모든 버퍼는 0.22 마이크론 필터(Corning)를 통한 통과에 의해 멸균시키고, 물은 역삼투압/탈이온화에 의해 정제시켰다. 반응물은 25℃에서 3시간 동안 인큐베이팅하고 나서, 10mM 히스티딘, 250 글라이신, 1% 수크로스, 0.01% 폴리솔베이트 20, 50㎛M 중아황산나트륨으로 이루어진 조제 버퍼 내로 일회용 G25 세파덱스 칼럼(Nap 25, GE Healthcare)을 이용해서 정제시키고 폴리에틸렌 글라이콜(v/v)의 표시된 퍼센트뿐만 아니라 pH 6.2에서 완충시켰다.

[1003] 반응 수율 및 약물 부하는 흡광 분광에 의해 결정하였다. 모든 샘플은 분석적 크기 배제 크로마토그래피에 의해 96% 초과의 단량체를 보였다.

[1004] 표 10은 반응 혼합물 혹은 제형 중 폴리에틸렌 글라이콜의 함수로서의 컨쥬게이션의 수율 %를 이하에 나타낸다. 항체-설포-SPDB-1은 pH 8.5(표시된 바와 같은 비수성 성분)에서 4시간 동안 화합물 1d를 항체-설포-SPDB와 반응시키고 나서 G25 세파덱스 상에서 정제시켜 제조하였다.

[1005] 표 10

		제형	
		모든 수성	15% 프로필렌 글라이콜
반응	0% 프로필렌 글라이콜 +10% DMA	59	79
	30% 프로필렌 글라이콜 + 2% DMA	53*	83

[1006] * 걸쭉한 백색 침전물이 정제 후 세파덱스 칼럼 상부에서 관찰되었다.

[1007] **실시예 16** 고도 반응성 4-나이트로Py-설포-SPDB 링커를 이용한 huMy9-6-설포-SPDB-**1d**의 제조

[1008] 6 ㎎/㎖ huMy9-6 항체 및 5몰 당량의 고도 반응성 *N*-숙신이미딜-4-(4-나이트로피리딜-2-다이티오)뷰타노에이트 링커(에탄올 중 20mM 스톡)를 함유하는 반응물을 50mM EPPS 버퍼 중 pH 8에서 25℃에서 3시간 동안 인큐베이팅하였다. 미반응 링커 미반응 링커는 NAP 탈염 칼럼(일러스트라 세파덱스 G-25 DNA급, GE Healthcare)을 이용해서 제거하였다. 링커 대 항체비(LAR)는 UV-Vis(2-티오-4-나이트로피리돈에 대해서 ε_{394nm} = 14205 $cm^{-1}M^{-1}$)에 의해 항체 농도 및 DTT-방출 나이트로피리딘-2-티온 농도에 의거해서 약 2.3인 것으로 결정되었다.

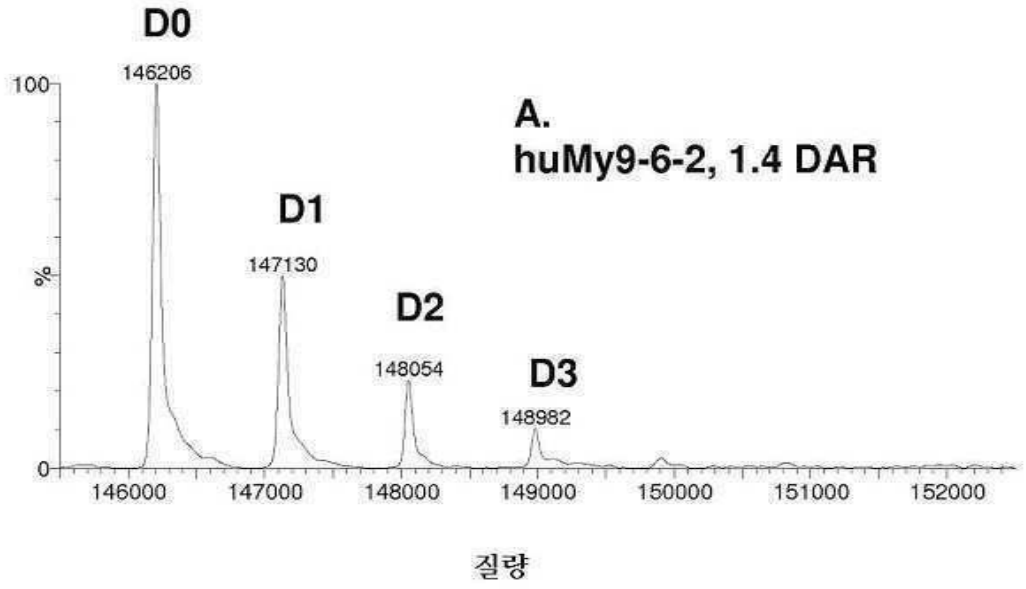
[1009] 링커 변형된 huMy9-6은 pH 8.5에서의 50mM HEPES 버퍼, 10% v/v DMA 중 2 mg/mℓ로 희석시키고, 2몰 당량의 화합물 **1d**/링커(DMA 중 5mM 스톡; 4.6 당량/항체)와 30분 동안 25℃에서 반응시켰다. 다이설파이드 교환 반응의 완료는 UV에 의한 394nm에서의 흡광도 증가를 모니터링함으로써 결정되었다. 반응 후, 컨쥬게이트는 정제시키고, 탈염 칼럼(G-25 세파덱스, 정밀 분석용, GE Healthcare)을 이용해서 pH 6.2에서 250mM 글라이신, 10mM 히스티딘, 1% 수크로스, 0.01% 트윈(Tween)-20, 50 μM 중아황산나트륨으로 버퍼 교환하였다.

[1010] 정제된 컨쥬게이트는 (**1d**에 대해서 몰 소광 계수 ε_{330nm}= 15,484 $cm^{-1}M^{-1}$ 및 ε_{280nm}= 30,115 $cm^{-1}M^{-1}$, 그리고 huMy9-6에 대해서 ε_{280nm}= 207,000 $cm^{-1}M^{-1}$)을 이용하는 UV-Vis에 의해) 항체당 연결된 분자가 평균 2.1 분자, (크기 배제 크로마토그래피에 의해) 98단량체 %, (아세톤 추출/역상 HPLC에 의해) 1% 미만의 미컨쥬게이션된 **1d**, 70% 단백질 수율 및 32% 전체 **1d** 수율이 얻어진 것이 확인되었다. 도 28 참조.

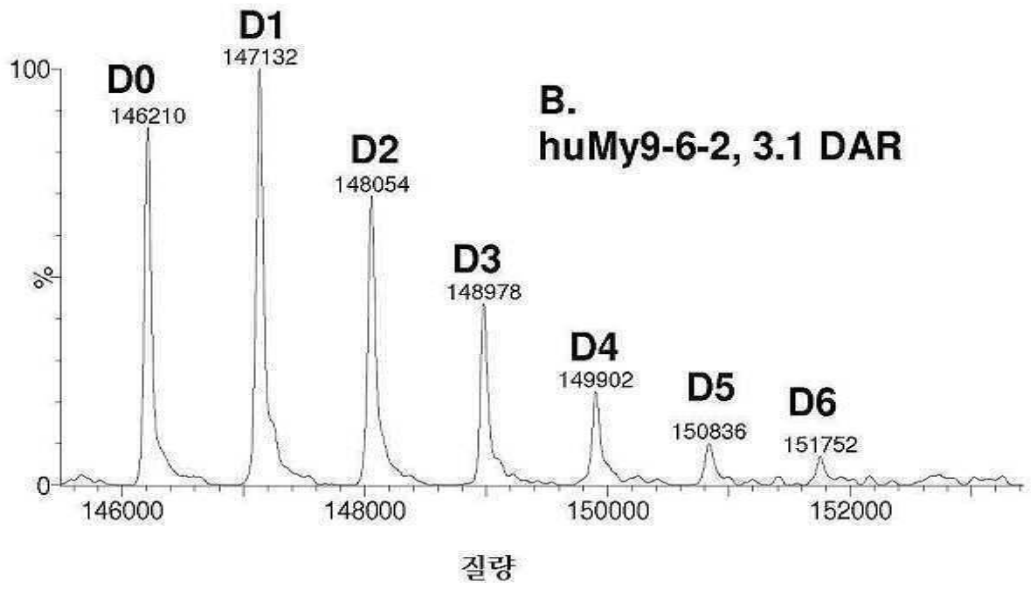
도면

도면1a

1.4 DAR (A) 및 3.1 DAR (B)를 각각 함유하는,
중아황산염 없이 그리고 이것과 함께 제조된
탈글라이코실화 huMy9-6-2 컨쥬게이트의 질량 스펙트로그램

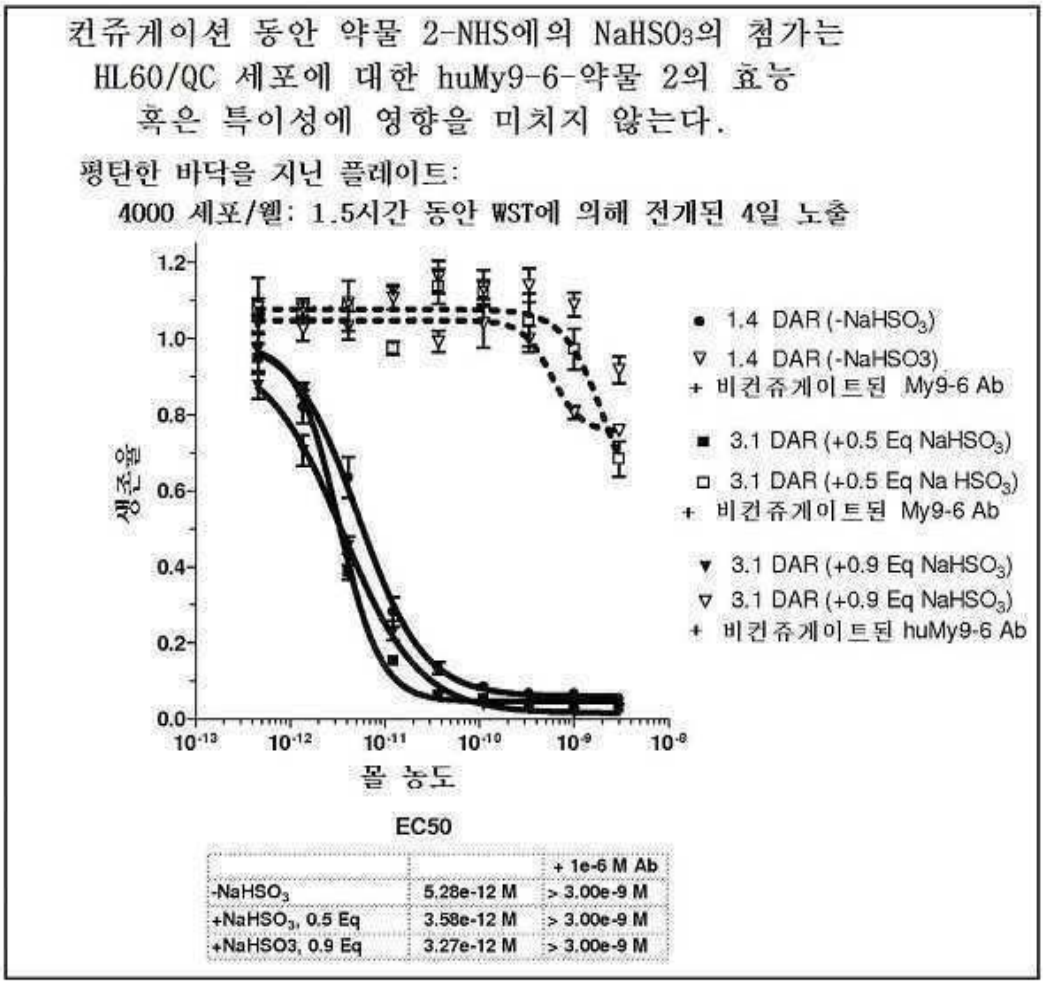


도면1b


D1
147132
100
D0
146210
B.
huMy9-6-2, 3.1 DAR
D2
148054
D3
148978
%
D4
149902
D5
150836
D6
151752
0
146000
148000
150000
152000
질량

도면2

중아황산나트륨 없이 그리고 이것과 함께 제조된 HuMy9-6-2 컨쥬게이트는 CD33-항원 발현 HL60 세포에 대해서 유사한 시험관내 세포독성을 나타낸다.



EC50

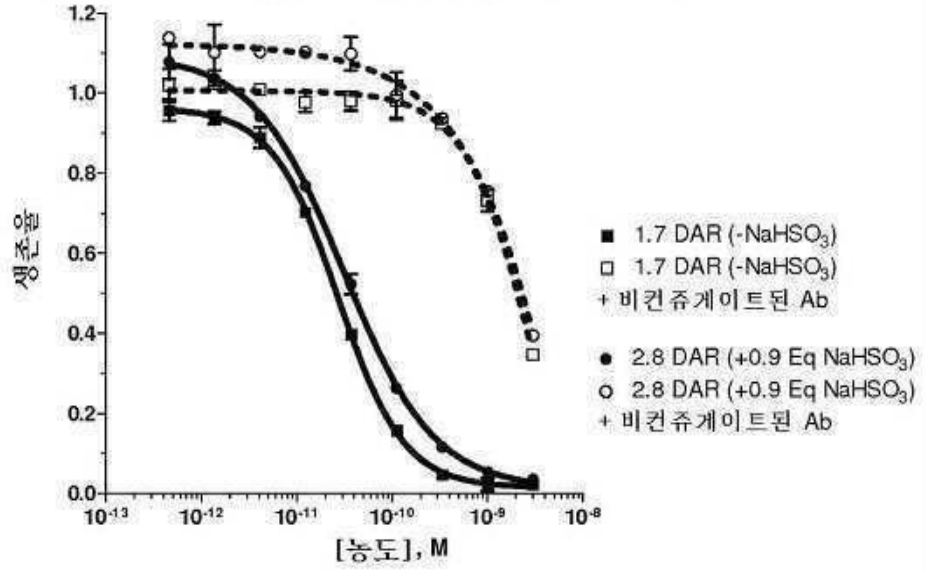
		+ 1e-6 M Ab
-$NaHSO_3$	5.28e-12 M	> 3.00e-9 M
+$NaHSO_3$, 0.5 Eq	3.58e-12 M	> 3.00e-9 M
+NaHSO3, 0.9 Eq	3.27e-12 M	> 3.00e-9 M

도면3

중아황산나트륨 없이 그리고 이것과 함께 제조된 항-CD22 Ab-2 컨쥬게이트는 CD22-항원 발현 BJAB 세포에 대한 유사한 시험관내 세포독성을 나타낸다.

컨쥬게이션 동안 약물 2-NHS에의 $NaHSO_3$의 첨가는 BJAB 세포에 대한 항-CD22 Ab-2 컨쥬게이트의 효능 혹은 특이성에 영향을 미치지 않는다.

평탄한 바닥을 지닌 플레이트:
2000 세포/웰; 3.5시간 동안 WST에 의해 전개된 4일 노출

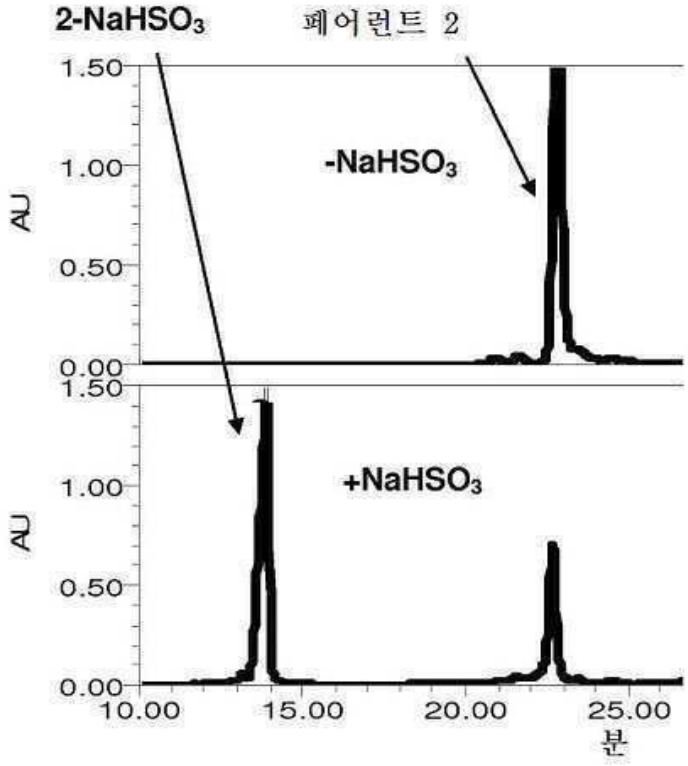


EC50

		+ Ab
-$NaHSO_3$	2.71e-11 M	2.0e-9 M
+0.9 Eq $NaHSO_3$	3.11e-11 M	2.2e-9 M

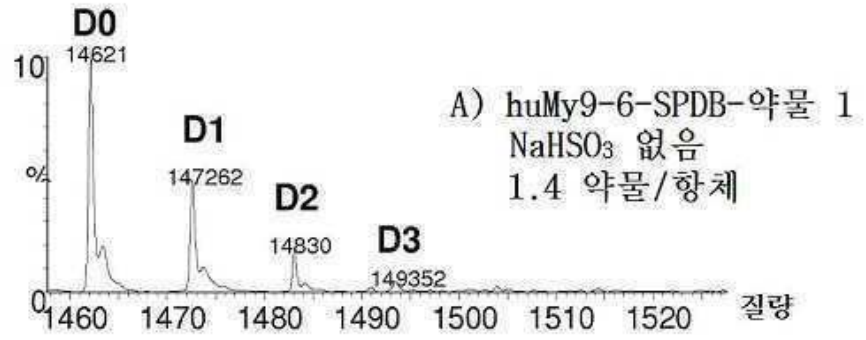
도면4

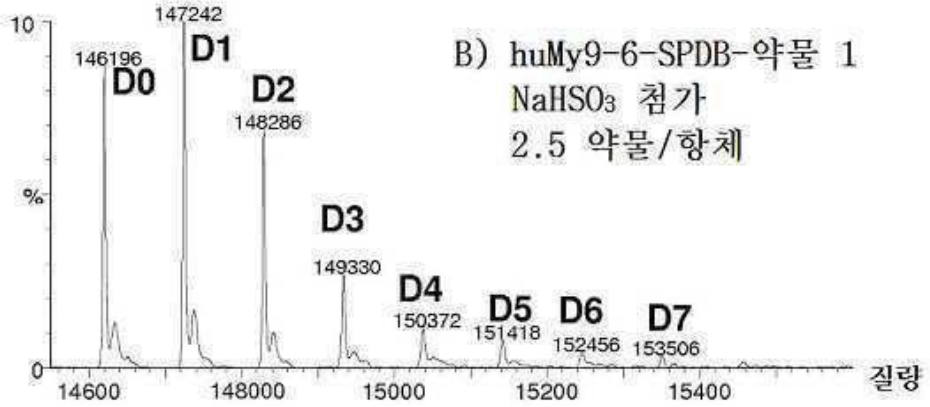
2-NHS 및 중아황산나트륨-처리된 2-NHS의 역상 HPLC 분석



도면5

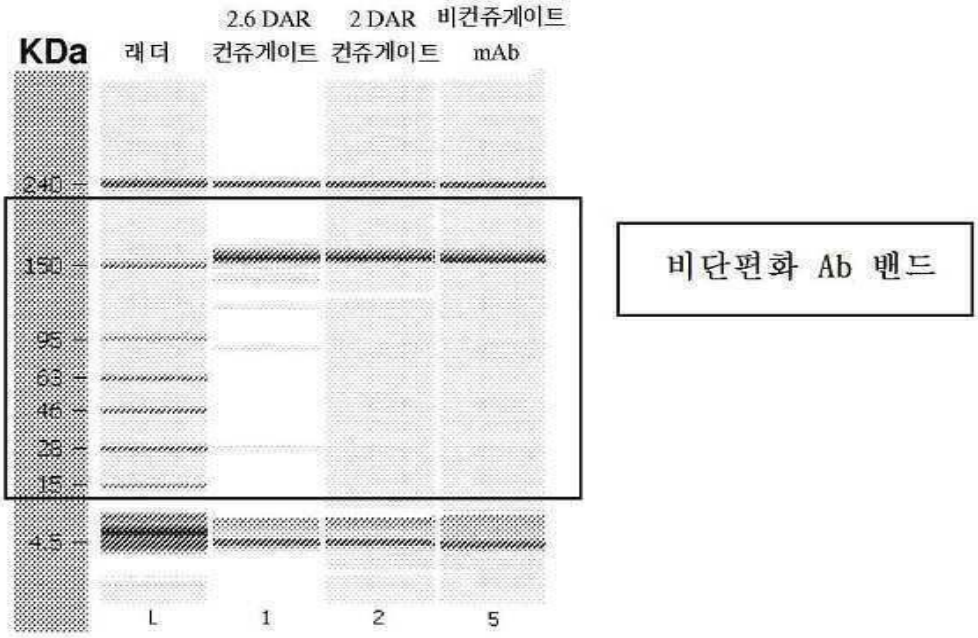
항체 당 7 몰 당량의 1-SPDBNHS-NHS를 이용해서 중아황산나트륨과 함께 그리고 이것 없이 제조된 탈글라이코실화 huMy9-6-SPDB-1의 MS 분석. A. 평균 1.4 1/Ab 및 3개까지 연결된 1 분자를 지니는 항체 종을 이용해서 중아황산나트륨 없이 제조된 컨쥬게이트. B. 평균 2.5 1/Ab 및 7개까지 연결된 약물 1분자를 지니는 항체종을 이용해서 중아황산나트륨과 함께 제조된 컨쥬게이트



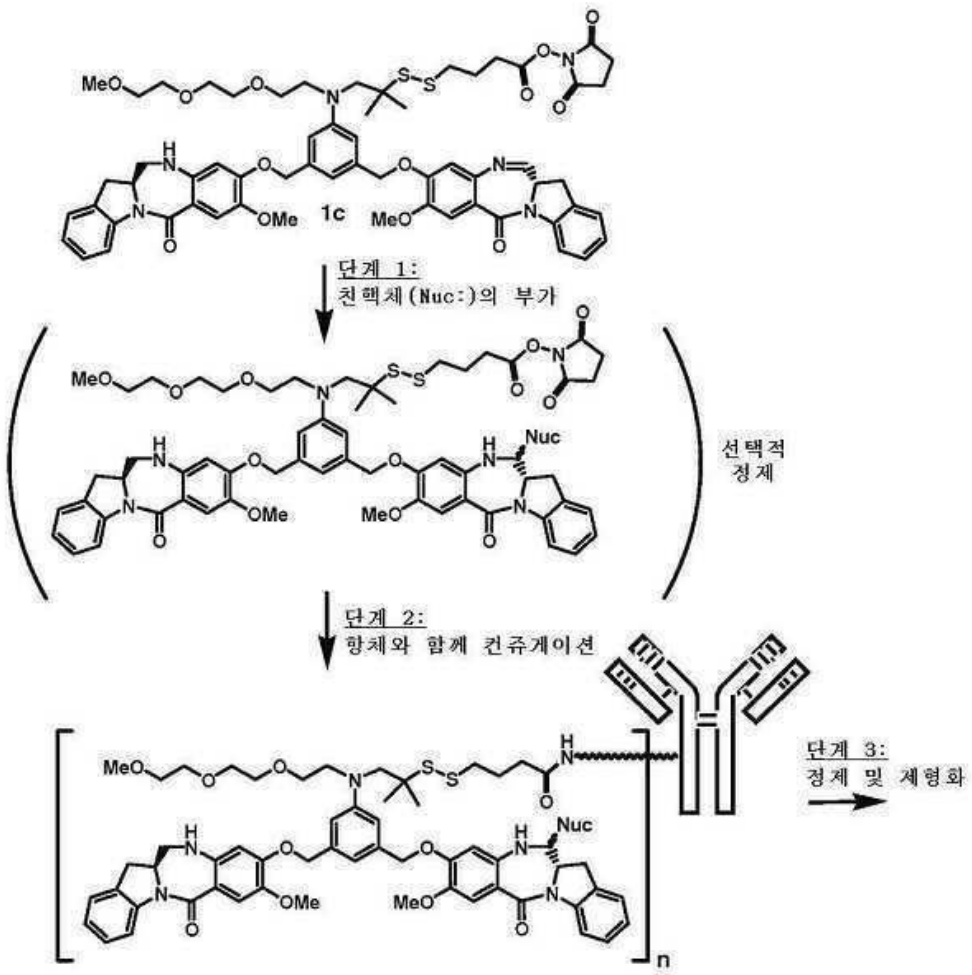


도면6

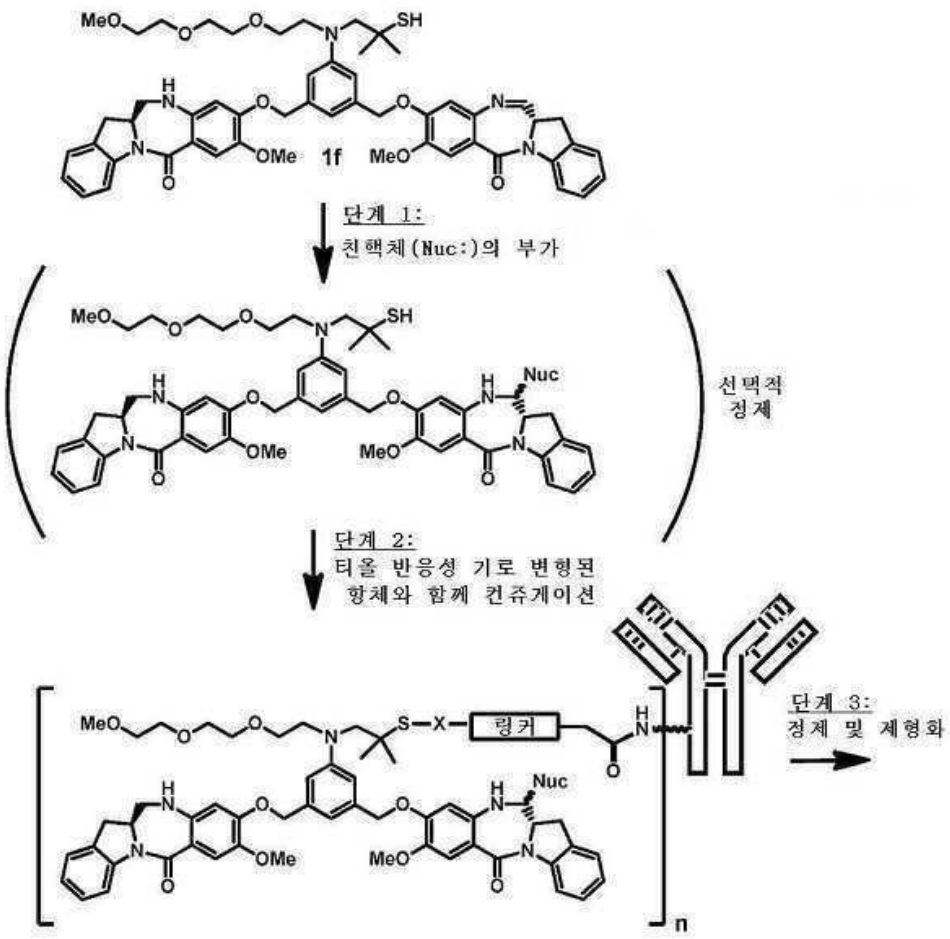
1-SPDB-NHS 컨쥬게이션 반응에서의 중아황산나트륨의 첨가가 항체의 단편화를 초래하지 않는다(비환원 SDS-PAGE; 겔 칩 분석)



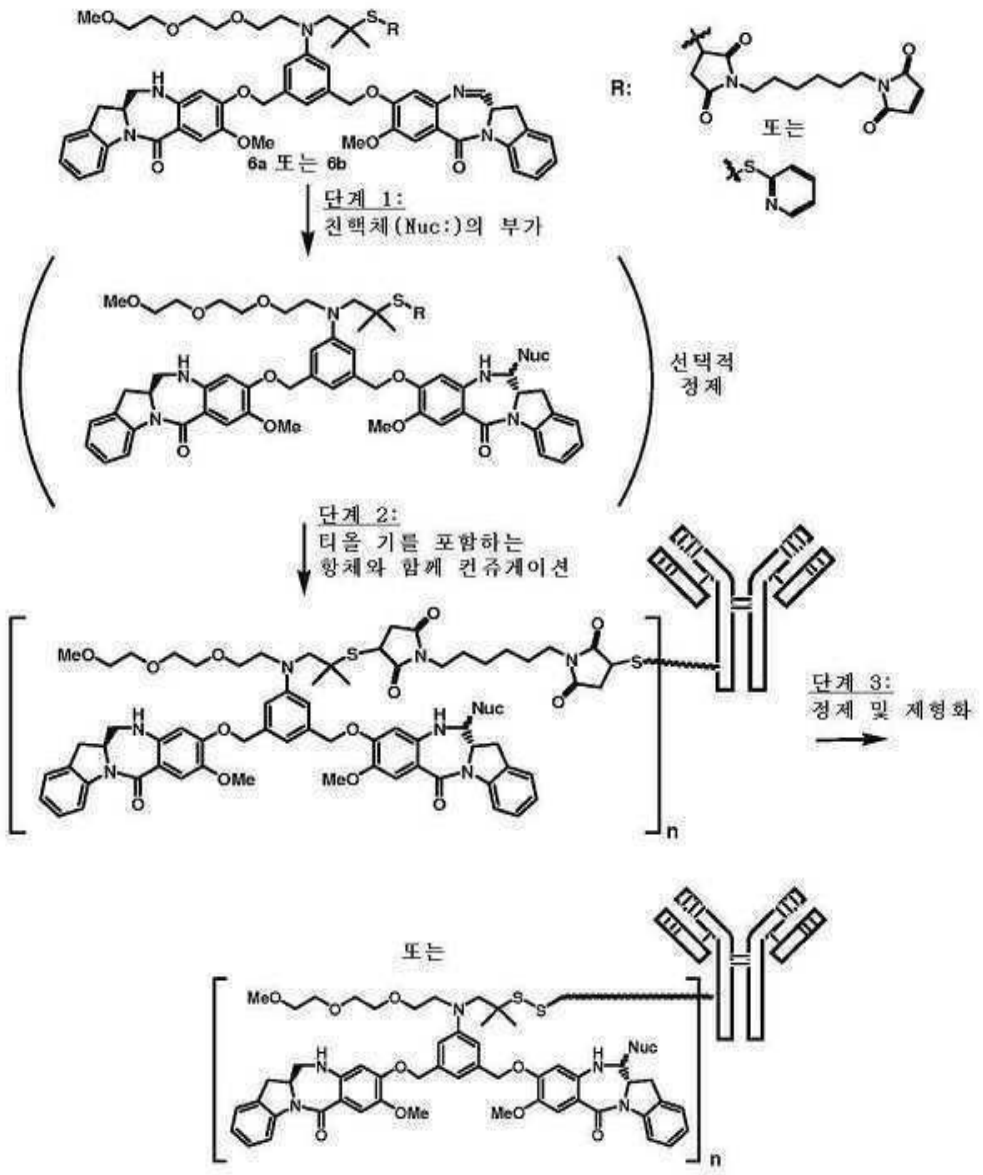
도면7



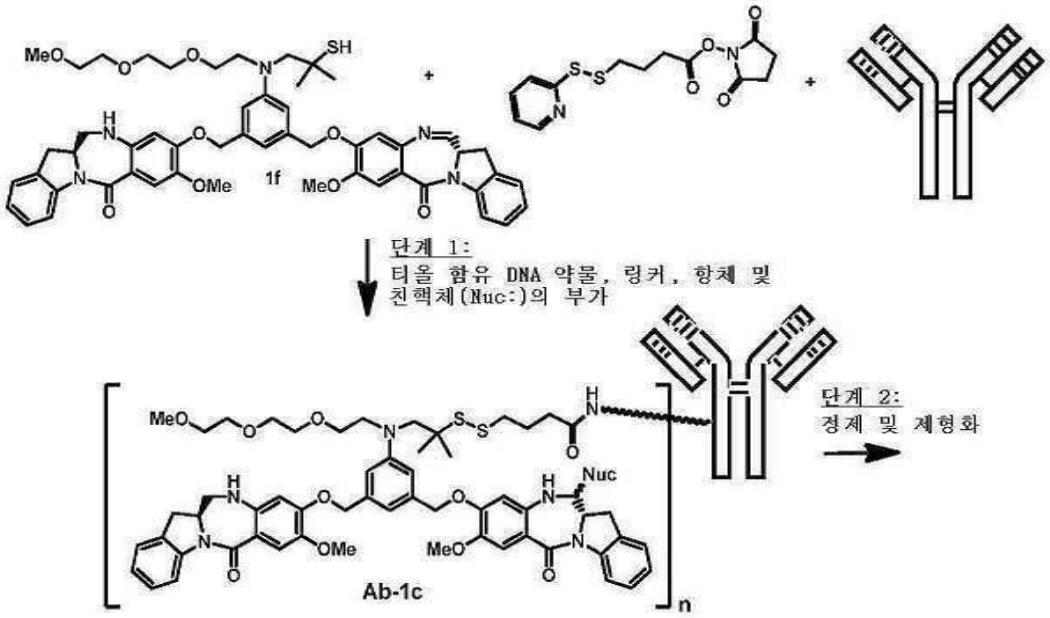
도면8


MeO
SH
1f
OMe
MeO
단계 1:
친핵체(Nuc:)의 부가
Nuc
선택적
정제
단계 2:
티올 반응성 기로 변형된
항체와 함께 컨쥬게이션
링커
단계 3:
정제 및 제형화
n

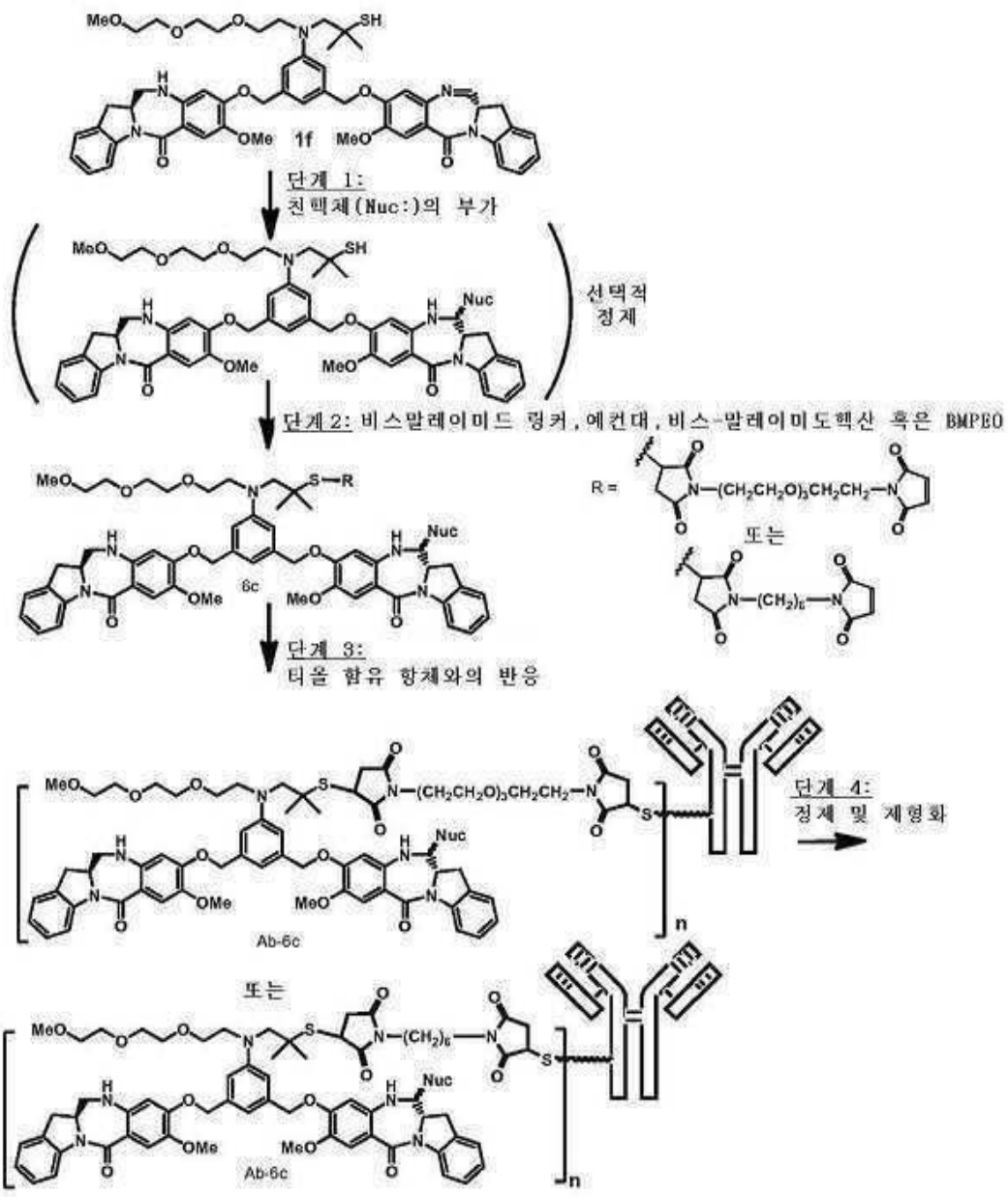
도면9


6a 또는 6b
R:
또는
단계 1:
친핵체(Nuc:)의 부가
선택적
정제
단계 2:
티올 기를 포함하는
항체와 함께 컨쥬게이션
단계 3:
정제 및 제형화
또는

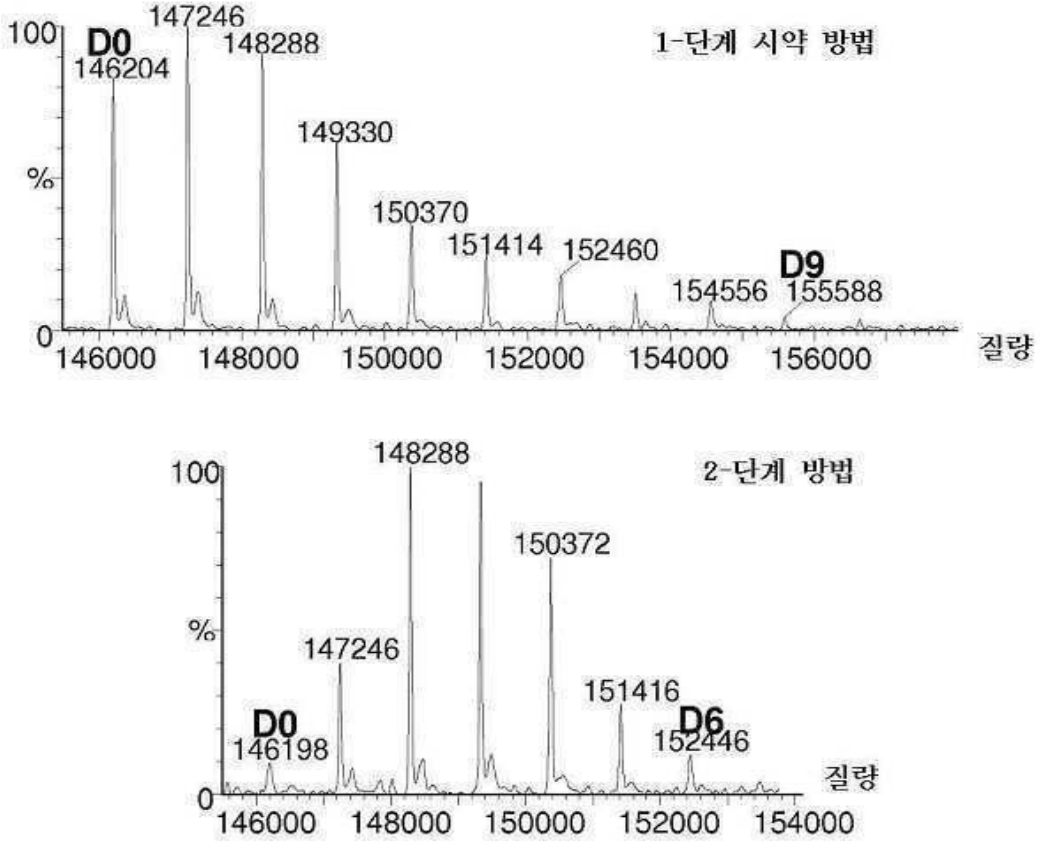
도면10


MeO
SH
1f
OMe
MeO
단계 1:
티올 함유 DNA 약물, 링커, 항체 및
친핵체(Nuc:)의 부가
Nuc
Ab-1c
n
단계 2:
정제 및 재형화

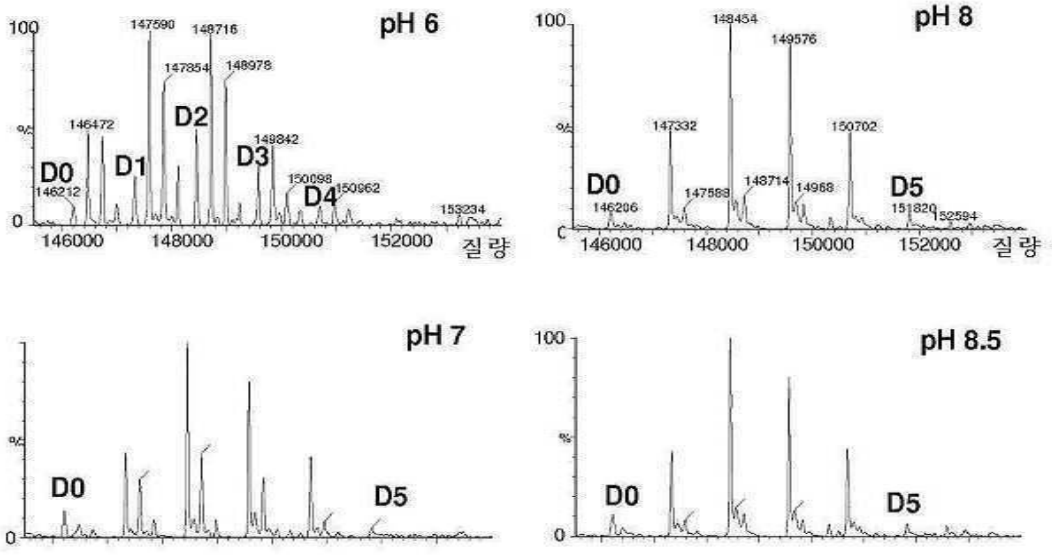
도면11


1f
단계 1:
친핵체(Nuc:)의 부가
선택적
정제
단계 2: 비스말레이미드 링커, 예컨대, 비스-말레이미도헥산 혹은 BMPEO
R =
또는
6c
단계 3:
티올 함유 항체와의 반응
Ab-6c
단계 4:
정제 및 재형화
또는
Ab-6c

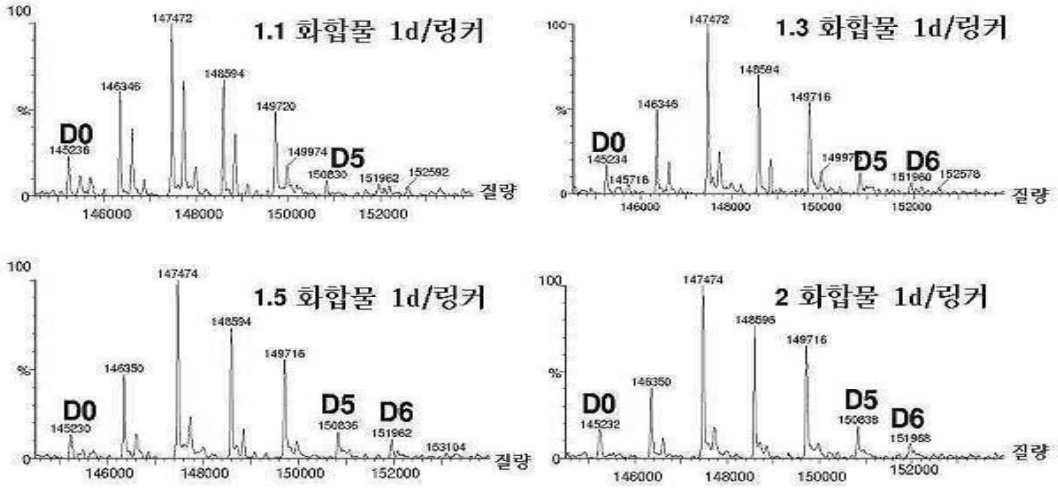
도면12


1-단계 시약 방법
100
%
0
D0
146204
147246
148288
149330
150370
151414
152460
D9
154556
155588
146000
148000
150000
152000
154000
156000
질량
2-단계 방법
148288
150372
147246
151416
D0
146198
D6
152446
질량

도면13


pH 6
D0
D1
D2
D3
D4
pH 8
D0
D5
pH 7
D0
D5
pH 8.5
D0
D5
질량

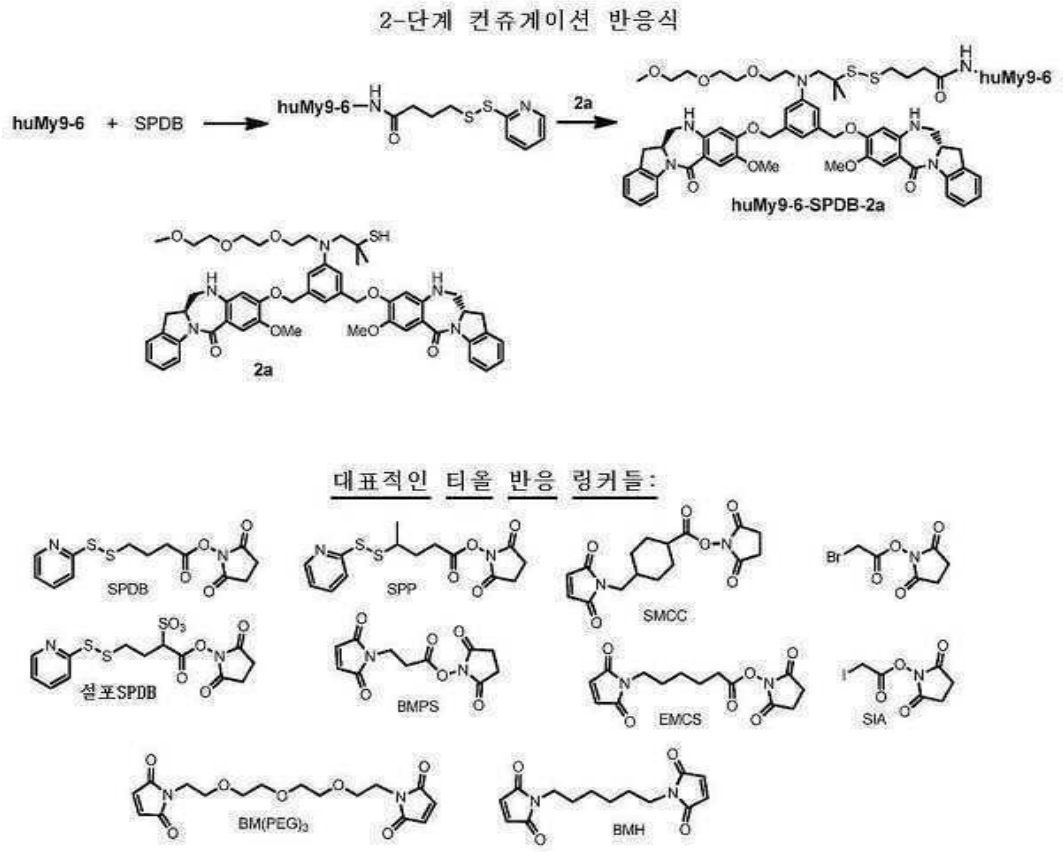
도면14



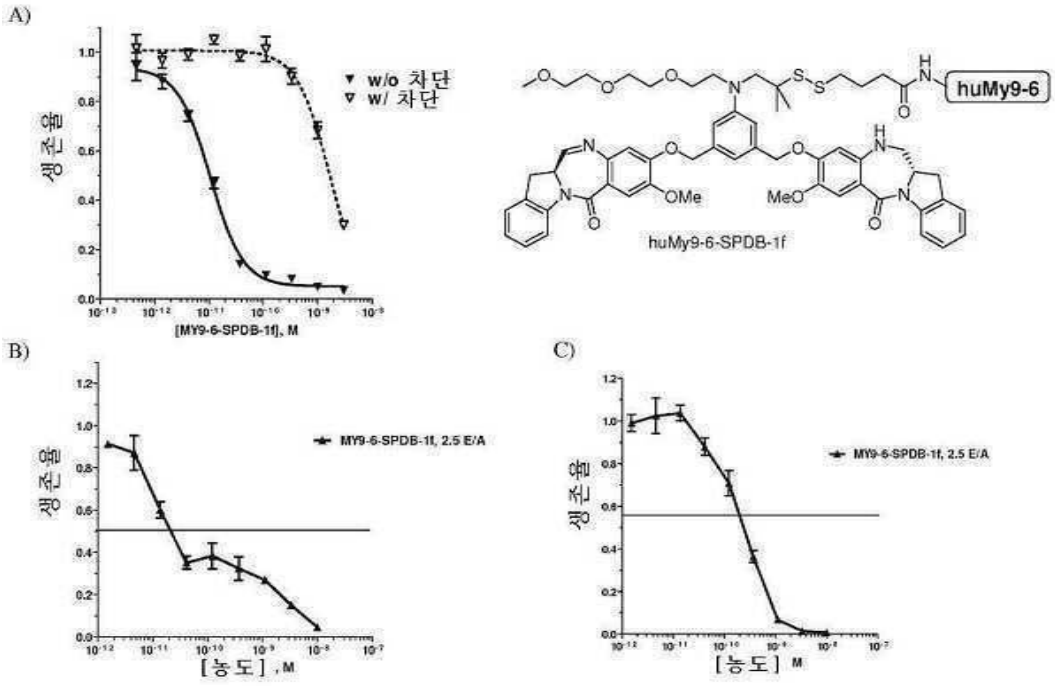
도면15

반응물	약물/Ab (UV)	단량체 % (SEC)	단량체 상의 약물 %
차아황산나트륨	2.6	88	82
중아황산나트륨	2.6	88	83
메타중아황산 나트륨	2.7	88	82
첨가제 없음	0.1	98	94

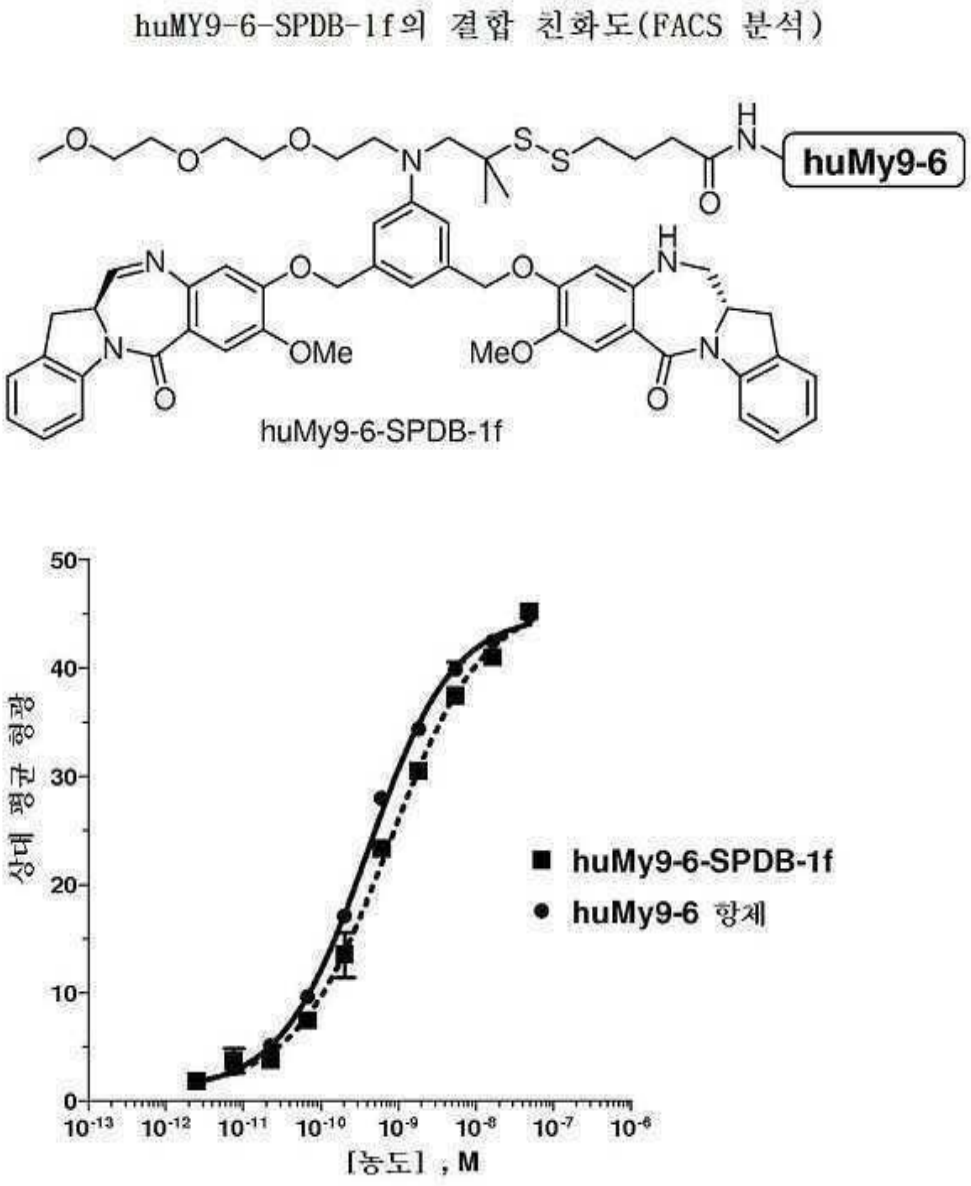
도면16


2-단계 컨쥬게이션 반응식
huMy9-6 + SPDB
huMy9-6
2a
huMy9-6-SPDB-2a
2a
대표적인 티올 반응 링커들:
SPDB
SPP
SMCC
설포SPDB
BMPS
EMCS
SIA
BM(PEG)3
BMH

도면17

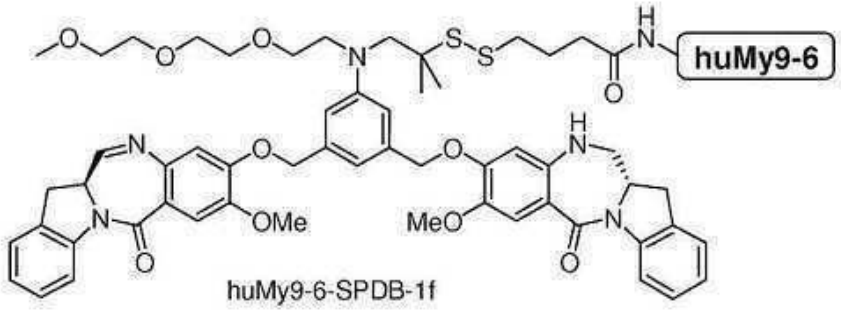

항원 결합 부위의 차단과 함께 그리고 차단 없는 (A) HL60/QC(Ag+) 세포,
(B) HL60/ATCC(Ag+) 세포 및 (C) NB-4(Ag+) 세포에 대한 huMY9-6-SPDB-1f의 향증식 활성
A)
w/o 차단
w/ 차단
생존율
[MY9-6-SPDB-1f], M
huMy9-6
huMy9-6-SPDB-1f
B)
MY9-6-SPDB-1f, 2.5 E/A
생존율
[농도], M
C)
MY9-6-SPDB-1f, 2.5 E/A
생존율
[농도] M

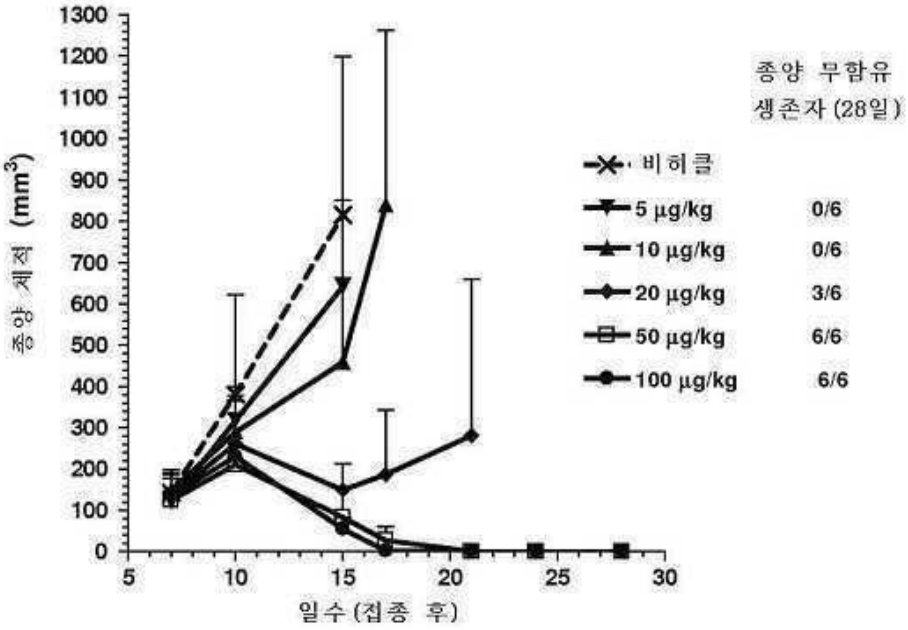
도면18


huMY9-6-SPDB-1f의 결합 친화도(FACS 분석)
huMy9-6
OMe
MeO
huMy9-6-SPDB-1f
상대 평균 형광
50
40
30
20
10
0
10-13
10-12
10-11
10-10
10-9
10-8
10-7
10-6
[농도] , M
huMy9-6-SPDB-1f
huMy9-6 항체

도면19

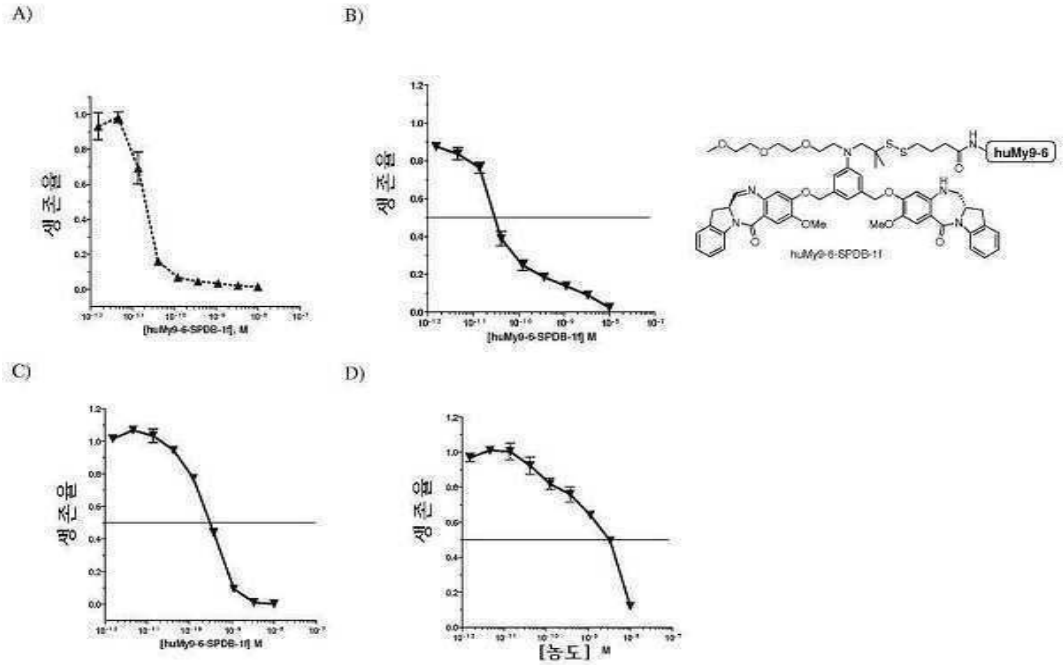
HL60/QC 종양 보유 누드 마우스에서의 huMY9-6-SPDB-1f의 생체내 효능





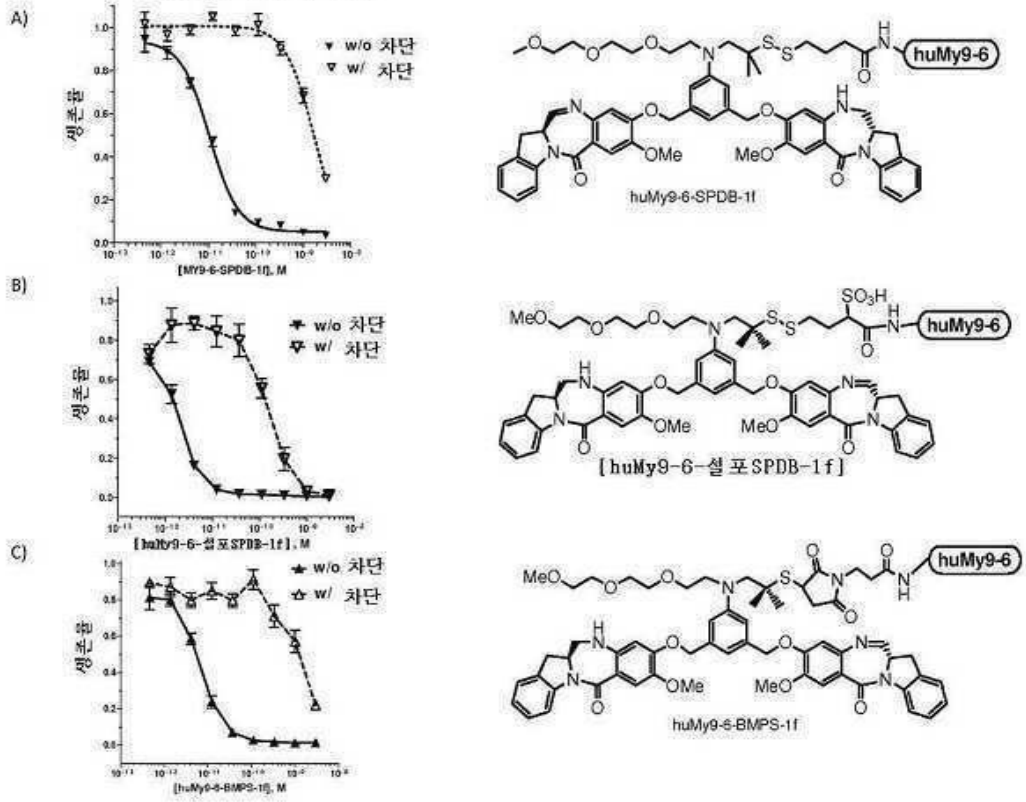
도면20

항원 양성 세포주 (A) HL60/QC 세포, (B) HL60/ATCC 세포, (C) NB-4 세포 및 (D) HEL 92.1.7 세포에 대한 huMY9-6-SPDB-1f의 항증식 활성



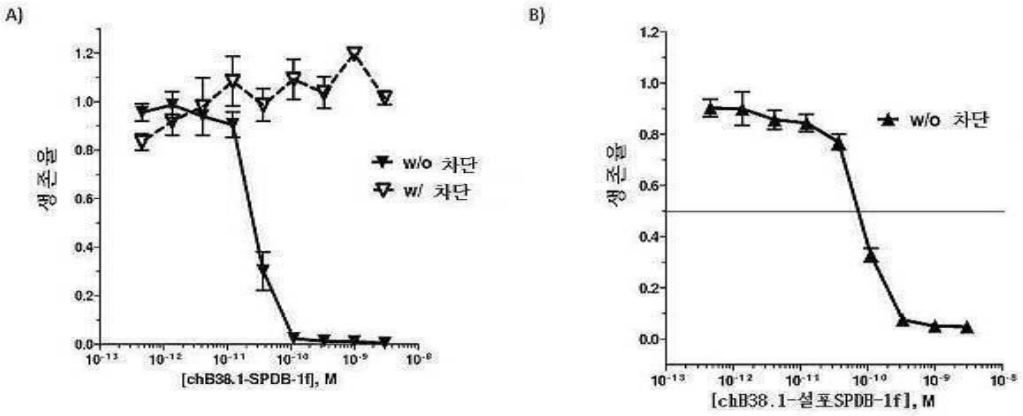
도면21

항원 결합 부위의 차단과 함께 그리고 차단 없이 HL60/QC (Ag+) 세포에 대한 (A) huMy9-6-SPDB-1f, (B) huMy9-6-설포SPDB-1f 및 (C) huMy9-6-BMPS-1f를 비교한 항증식 활성



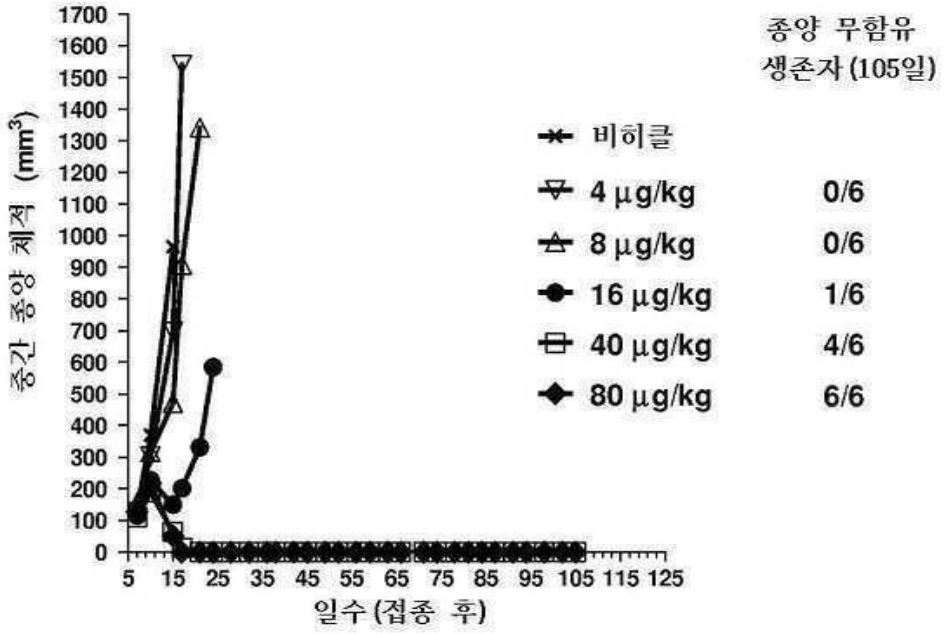
도면22

COLO205 (Ag+) 세포에 대한 (A) chB38.1-SPDB-1f 및 (B) chB38.1-설포SPDB-1f를 비교한 항증식 활성



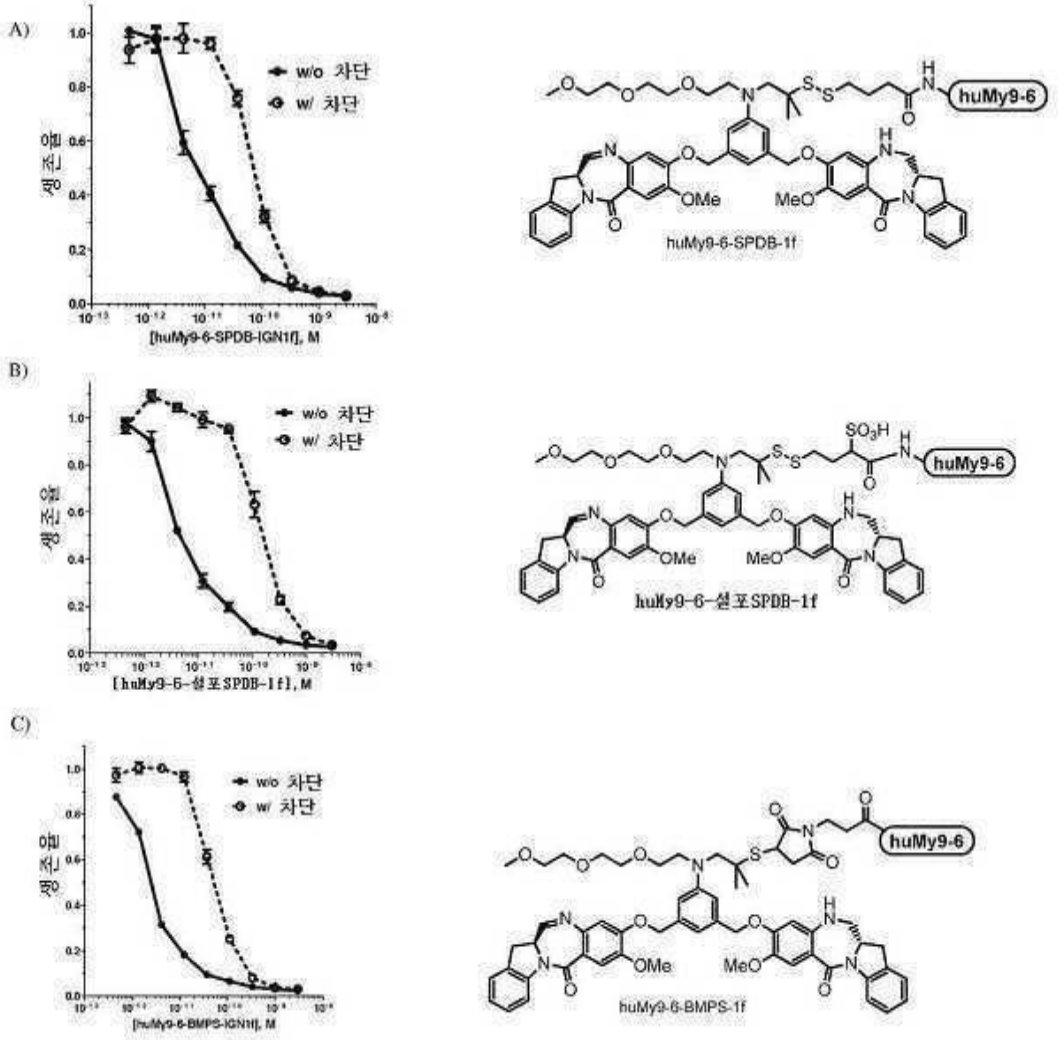
도면23

HL60/QC 보유 마우스에서의 huMy9-6-SPDB-1f의 생체내 효능



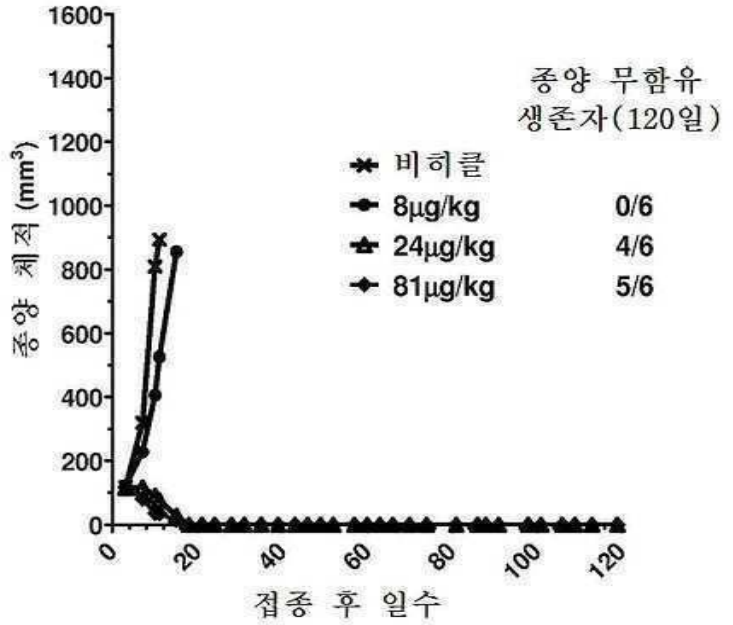
도면24

항원 결합 부위의 차단과 함께 그리고 차단없이 OCI-AML3 (Ag+) 세포에 대해서 (A) huMy9-6-SPDB-1f, (B) huMy9-6-설포SPDB-1f 및 (C) huMy9-6-BMPS-1f를 비교한 항증식 활성



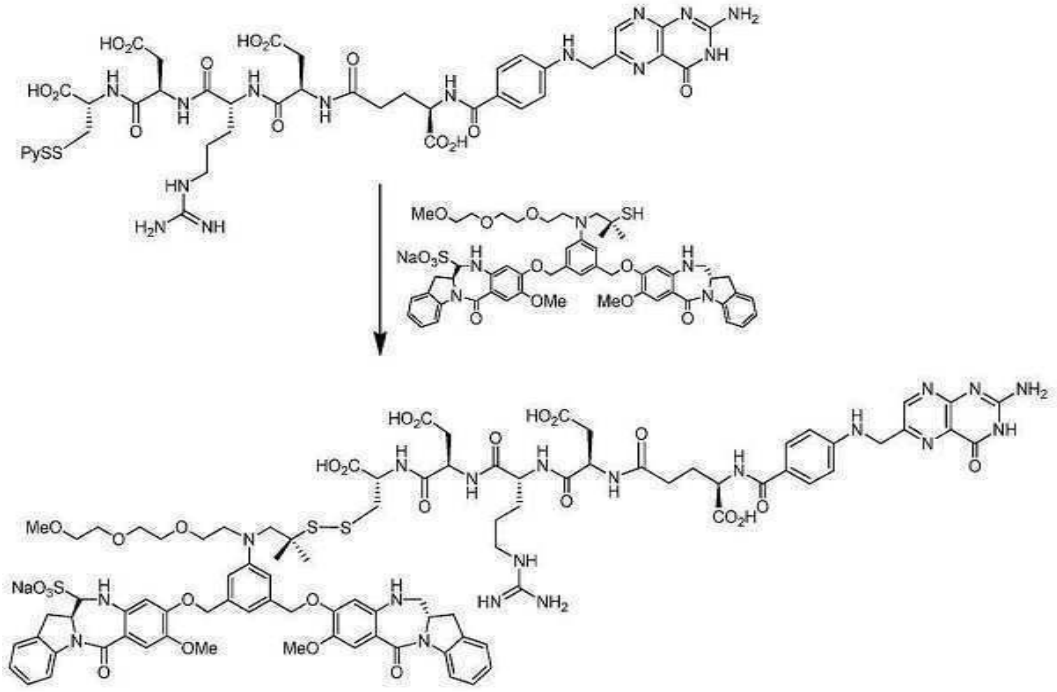
도면25

MOLM-13 종양 보유 마우스에서의 huMy9-6-BMPS-1f의 생체내 효능

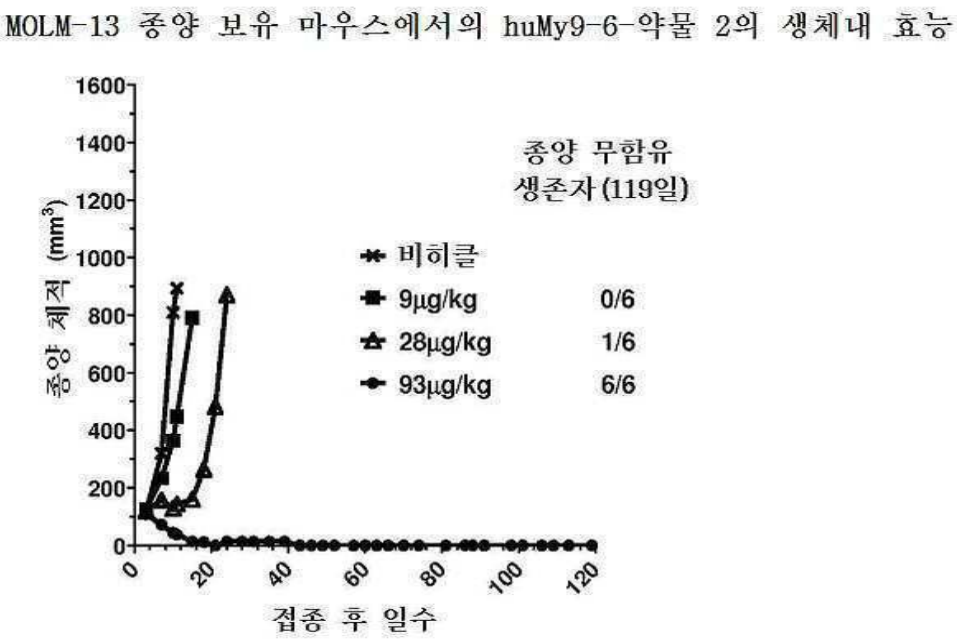


도면26

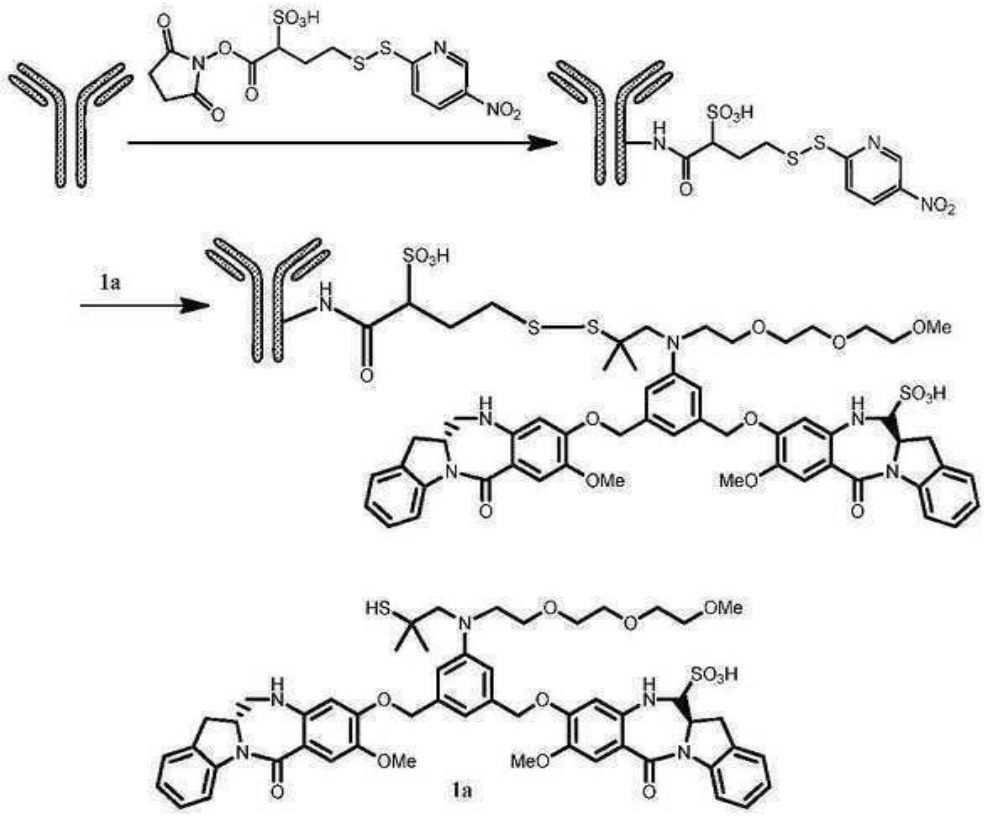
설폰화 폴레이트/세포독성 화합물 컨쥬게이트에 대한 대표적인 합성 반응식



도면27



도면28



서 열 목 록

SEQUENCE LISTING

<110> IMMUNOGEN, INC.

<120> METHODS OF PREPARATION OF CONJUGATES

<130> 121162-00320

<140><141><150> 61/483,499

<151> 2011-05-06

<150> 61/443,062

<151> 2011-02-15

<150> 61/443,092

<151> 2011-02-15

<160> 14

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
peptide

<400> 1

Gly Tyr Phe Met Asn
1 5

<210> 2

<211> 17

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
peptide

<220><221> MOD_RES

<222> (14)..(14)

<223> Lys, Gln, His or Arg

<220><221> MOD_RES

<222> (16)..(16)

<223> Gln, His, Asn or Arg

<220><221> MOD_RES

<222> (17)..(17)

<223> Gly, Glu, Thr, Ser, Ala or Val

<400> 2

Arg Ile His Pro Tyr Asp Gly Asp Thr Phe Tyr Asn Gln Xaa Phe Xaa

1 5 10 15

Xaa

<210> 3

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

peptide

<400> 3

Tyr Asp Gly Ser Arg Ala Met Asp Tyr

1 5

<210> 4

<211> 15

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

peptide

<400> 4

Lys Ala Ser Gln Ser Val Ser Phe Ala Gly Thr Ser Leu Met His

1 5 10 15

<210> 5

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

peptide

<400> 5

Arg Ala Ser Asn Leu Glu Ala

1 5

<210> 6

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide

<400> 6

Gln Gln Ser Arg Glu Tyr Pro Tyr Thr

1 5

<210> 7

<211> 17

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide

<400> 7

Arg Ile His Pro Tyr Asp Gly Asp Thr Phe Tyr Asn Gln Lys Phe Gln

1 5 10 15

Gly

<210> 8

<211> 448

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic polypeptide

<400> 8

Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Val Lys Pro Gly Ala

1 5 10 15

Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Gly Tyr

20 25 30

Phe Met Asn Trp Val Lys Gln Ser Pro Gly Gln Ser Leu Glu Trp Ile

35 40 45

Gly Arg Ile His Pro Tyr Asp Gly Asp Thr Phe Tyr Asn Gln Lys Phe

50 55 60

Gln Gly Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Lys Ser Ser Asn Thr Ala His
65 70 75 80
Met Glu Leu Leu Ser Leu Thr Ser Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95
Thr Arg Tyr Asp Gly Ser Arg Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr

100 105 110
Thr Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro
115 120 125
Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly
130 135 140
Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn
145 150 155 160
Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln

165 170 175
Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser
180 185 190
Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser
195 200 205
Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr
210 215 220
His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser

225 230 235 240
Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg
245 250 255
Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro
260 265 270
Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala
275 280 285
Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val

290 295 300
Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr

305 310 315 320

Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr

325 330 335

Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu

340 345 350

Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys

355 360 365

Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser

370 375 380

Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp

385 390 395 400

Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser

405 410 415

Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala

420 425 430

Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys

435 440 445

<210> 9

<211> 218

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic polypeptide

<400> 9

Asp Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Leu Ser Leu Ala Val Ser Leu Gly

1 5 10 15

Gln Pro Ala Ile Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gln Ser Val Ser Phe Ala

20 25 30

Gly Thr Ser Leu Met His Trp Tyr His Gln Lys Pro Gly Gln Gln Pro

35 40 45

Arg Leu Leu Ile Tyr Arg Ala Ser Asn Leu Glu Ala Gly Val Pro Asp

50 55 60

Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Lys Thr Asp Phe Thr Leu Asn Ile Ser
65 70 75 80
Pro Val Glu Ala Glu Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Arg

85 90 95
Glu Tyr Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg
100 105 110
Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln
115 120 125
Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr
130 135 140
Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser

145 150 155 160
Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr
165 170 175
Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys
180 185 190
His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro
195 200 205
Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
210 215

<210> 10
<211> 218
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
polypeptide
<400> 10
Asp Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Leu Ser Leu Ala Val Ser Leu Gly
1 5 10 15
Gln Pro Ala Ile Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gln Ser Val Ser Phe Ala
20 25 30
Gly Thr Ser Leu Met His Trp Tyr His Gln Lys Pro Gly Gln Gln Pro

35 40 45

Arg Leu Leu Ile Tyr Arg Ala Ser Asn Leu Glu Ala Gly Val Pro Asp
50 55 60
Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Lys Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser
65 70 75 80
Pro Val Glu Ala Glu Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Arg
85 90 95
Glu Tyr Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg
100 105 110

Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln
115 120 125
Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr
130 135 140
Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser
145 150 155 160
Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr
165 170 175

Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys
180 185 190
His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro
195 200 205
Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
210 215

<210> 11
<211> 118
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
polypeptide
<400> 11
Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Val Lys Pro Gly Ala

1 5 10 15

Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Gly Tyr

20 25 30

Phe Met Asn Trp Val Lys Gln Ser Pro Gly Gln Ser Leu Glu Trp Ile

35 40 45

Gly Arg Ile His Pro Tyr Asp Gly Asp Thr Phe Tyr Asn Gln Lys Phe

50 55 60

Gln Gly Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Lys Ser Ser Asn Thr Ala His

65 70 75 80

Met Glu Leu Leu Ser Leu Thr Ser Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys

85 90 95

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

100 105 110

Thr Val Thr Val Ser Ser

115

<210> 12

<211> 112

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic polypeptide

<400> 12

Asp Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Leu Ser Leu Ala Val Ser Leu Gly

1 5 10 15

Gln Pro Ala Ile Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gln Ser Val Ser Phe Ala

20 25 30

Gly Thr Ser Leu Met His Trp Tyr His Gln Lys Pro Gly Gln Gln Pro

35 40 45

Arg Leu Leu Ile Tyr Arg Ala Ser Asn Leu Glu Ala Gly Val Pro Asp

50 55 60

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

65 70 75 80

Pro Val Glu Ala Glu Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Arg
85 90 95
Glu Tyr Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg
100 105 110

<210> 13
<211> 112
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

polypeptide

<400> 13
Asp Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Leu Ser Leu Ala Val Ser Leu Gly
1 5 10 15
Gln Pro Ala Ile Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gln Ser Val Ser Phe Ala
20 25 30
Gly Thr Ser Leu Met His Trp Tyr His Gln Lys Pro Gly Gln Gln Pro
35 40 45
Arg Leu Leu Ile Tyr Arg Ala Ser Asn Leu Glu Ala Gly Val Pro Asp
50 55 60

Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Lys Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser
65 70 75 80
Pro Val Glu Ala Glu Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Arg
85 90 95
Glu Tyr Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg
100 105 110

<210> 14
<211> 4
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

peptide

<400> 14

Ala Leu Ala Leu

1