



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2018년08월27일
(11) 등록번호 10-1892411
(24) 등록일자 2018년08월21일

- (51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C07D 401/12 (2006.01) A61K 31/395 (2006.01)
A61K 31/425 (2006.01) A61K 39/395 (2006.01)
C07K 16/28 (2006.01) C07K 17/00 (2006.01)
- (52) CPC특허분류
C07D 401/12 (2013.01)
A61K 31/395 (2013.01)
- (21) 출원번호 10-2017-7021215(분할)
(22) 출원일자(국제) 2009년04월30일
심사청구일자 2017년07월27일
(85) 번역문제출일자 2017년07월27일
(65) 공개번호 10-2017-0091762
(43) 공개일자 2017년08월09일
(62) 원출원 특허 10-2010-7026849
원출원일자(국제) 2009년04월30일
심사청구일자 2014년04월30일
(86) 국제출원번호 PCT/US2009/042267
(87) 국제공개번호 WO 2009/134977
국제공개일자 2009년11월05일
(30) 우선권주장
61/049,291 2008년04월30일 미국(US)
61/147,966 2009년01월28일 미국(US)
(56) 선행기술조사문헌
US6913748 A*
US20050158370 A1*
*는 심사관에 의하여 인용된 문헌
- (73) 특허권자
이뮤노젠 아이엔씨
미국 02451-1477 메사추세츠주 월섬 윈터 스트리트 830
- (72) 발명자
차리, 라비, 브이., 제이.
미합중국 02461 매사추세츠 뉴턴 윈체스터 스트리트 174
자오, 로버트, 용신
미합중국 02420 매사추세츠 렉싱턴 도널드 스트리트 3
(뒷면에 계속)
- (74) 대리인
양영준, 김영

전체 청구항 수 : 총 18 항

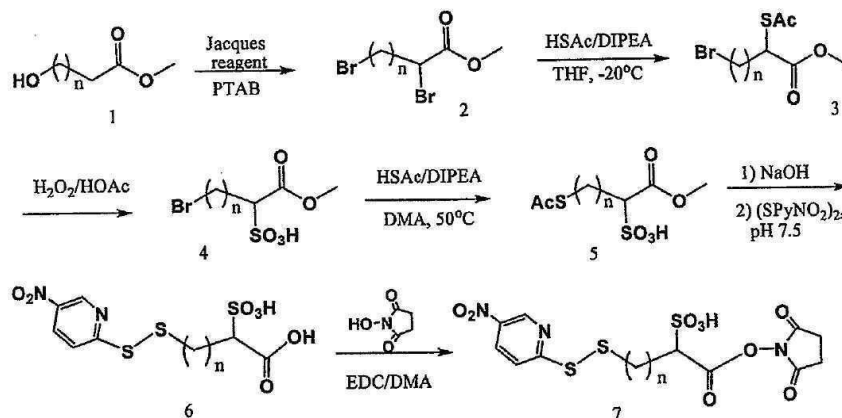
심사관 : 이민정

(54) 발명의 명칭 가교제 및 그 용도

(57) 요약

본 발명은 하전된 또는 전구-하전된 가교제 부분, 이러한 하전된 또는 전구-하전된 가교제 부분을 포함하는 세포 결합인자-약물 컨쥬게이트(cell-binding agent-drug conjugate) 및 이를 제조하는 방법에 관한 것이다.

대표도 - 도1



(52) CPC특허분류

A61K 31/425 (2013.01)

A61K 39/395 (2013.01)

C07K 16/28 (2013.01)

C07K 17/00 (2013.01)

(72) 발명자

코브턴, 엘레나

미합중국 01775 매사추세츠 스톤 일레인 스트리트 7

싱, 라제바

미합중국 01701 매사추세츠 프래밍햄 레인우드 에비뉴 40

위디슨, 웨인, 찰스

미합중국 02478 매사추세츠 벨몬트 홀덴 로드 7

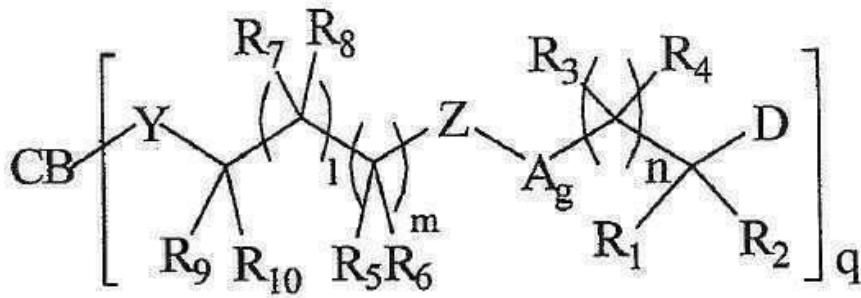
명세서

청구범위

청구항 1

하기 화학식 II의 세포 결합제-약물 컨쥬게이트를 제조하는 방법으로서,

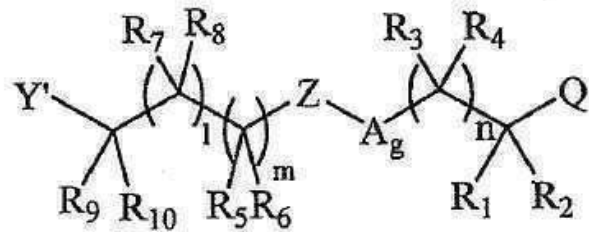
화학식 II



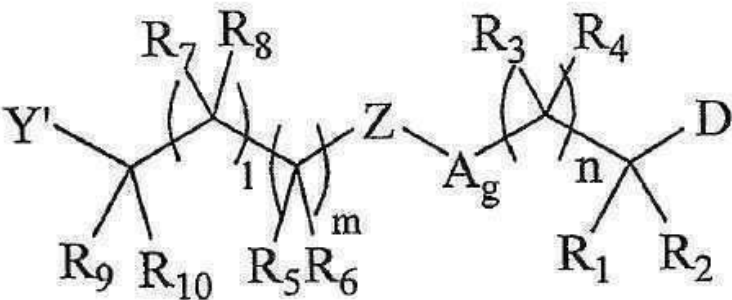
상기 방법은

a) 하기 화학식 I로 표시되는 가교제를 약물과 반응시켜, 하기 화학식 IV의 변형된 약물을 생성하는 단계:

화학식 I



화학식 IV



; 및

b) 상기 화학식 IV의 변형된 약물을 세포 결합제와 반응시켜 상기 화학식 II의 세포 결합제-약물 컨쥬게이트를 생성하는 단계를 포함하고, 여기서,

CB는 항체인 세포 결합제를 나타내고,

D는 이황화 결합 또는 티오에테르 결합에 의해 상기 항체에 연결되는 메이탄시노이드 약물을 나타내며;

R₁, R₂, R₃, R₄, R₅, R₆, R₇, R₈, R₉, 및 R₁₀은 수소이거나; R₁, R₂, R₃, R₄, R₅, R₆, R₇, R₈, R₉, 및 R₁₀ 중 하나는

하전된 치환기 SO₃⁻이고, 나머지는 수소이며;

l, m 및 n은 0 또는 1부터 4까지의 정수이고;

g는 0이며;

Z는 존재하지 않거나, F1-E1-P-E2-F2 단위로서, E1 및 E2는 동일하거나 서로 다른 C=O 또는 NR₁₄이고, 여기서 R₁₄는 수소 또는 1개-6개 탄소원자를 갖는 선형 알킬이며; P는 2-5개의 아미노산 길이의 펩타이드 단위이고, 여기서 E1 또는 E2는 상기 펩타이드의 말단 질소, 말단 탄소 또는 상기 펩타이드의 아미노산들 중 하나의 측쇄를 통해 상기 펩타이드에 연결될 수 있으며; F1 및 F2는 동일하거나 서로 다른 선택적 폴리에틸렌옥시 단위인 (OCH₂CH₂)_p로서 p는 0이고, 이때 Z가 F1-E1-P-E2-F2가 아니면 R₁, R₂, R₃, R₄, R₅, R₆, R₇, R₈, R₉, 및 R₁₀ 중 하나는 하전된 치환기 SO₃⁻이며;

Y는 카르보닐 그룹을 나타내고;

q는 1 부터 20까지의 정수를 나타내며;

Y'는 N-히드록시숙신이미드 에스테르, p-니트로페닐 에스테르, 디니트로페닐 에스테르, 및 펜타플루오로페닐 에스테르로 이루어진 군으로부터 선택되는 아민 반응제를 나타내고;

Q는 이황화 그룹 또는 말레이미도 그룹인 티올 반응제를 나타낸다.

청구항 2

삭제

청구항 3

제1항에 있어서, 상기 아민 반응제는 N-히드록시숙신이미드 에스테르인 것인, 방법.

청구항 4

삭제

청구항 5

삭제

청구항 6

삭제

청구항 7

제1항에 있어서, Z는 존재하지 않으며; R₁, R₂, R₃, R₄, R₉, 및 R₁₀ 중 하나는 SO₃⁻이고, 나머지는 수소이며; l, g 및 m은 각각 0이고; n은 1이며; Y'는 N-히드록시숙신이미드 에스테르인 것인, 방법.

청구항 8

제7항에 있어서, Q는 피리딜디티오 그룹, 니트로피리딜디티오 그룹, 또는 말레이미도 그룹이고; Y'는 N-히드록시숙신이미드 에스테르인 것인, 방법.

청구항 9

제1항에 있어서, Z는 F1-E1-P-E2-F2 단위이고, R₁, R₂, R₃, R₄, R₅, R₆, R₇, R₈, R₉, 및 R₁₀은 수소인 것인, 방법.

청구항 10

삭제

청구항 11

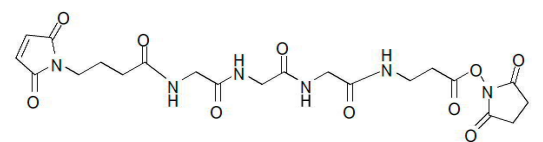
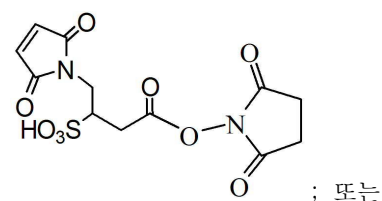
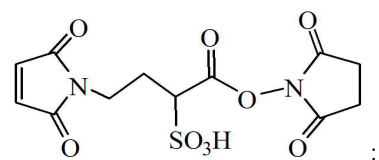
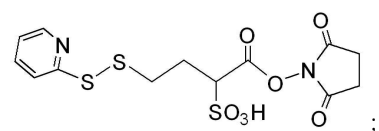
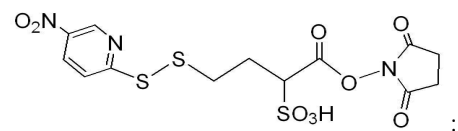
삭제

청구항 12

제9항에 있어서, P는 gly-gly-gly인 것인 방법.

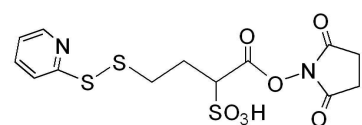
청구항 13

제1항에 있어서, 상기 가교제는 하기 식 중 하나로 표시되는 것인, 방법:



청구항 14

제13항에 있어서, 상기 가교제는 하기 식으로 표시되는 것인, 방법.



청구항 15

삭제

청구항 16

제1항에 있어서, 상기 메이탄시노이드 약물은 DM1 또는 DM4인 것인, 방법.

청구항 17

제16항에 있어서, 상기 메이탄시노이드 약물은 DM4인 것인, 방법.

청구항 18

제1항, 제3항, 제7항 내지 제9항, 제12항 내지 제14항, 제16항, 및 제17항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 항체

는 IGF-IR, CanAg, EGFR, EphA2, MUC1, MUC16, VEGF, TF, EpCAM, CD2, CD3, CD4, CD5, CD6, CD11, CD11a, CD18, CD19, CD20, CD22, CD26, CD30, CD33, CD37, CD38, CD40, CD44, CD56, CD79, CD105, CD138, EphA, EphB, EGFR, EGFRvIII, HER2/neu, HER3, 메조테린(mesothelin), 크립토(cripto), 알파v베타₃ 인테그린(integrins), 알파v베타₆ 인테그린, Apo2 및 C242 항원 중 하나 이상을 발현하는 세포; 및 인슐린 생장 인자 수용체, 표피생장인자 수용체 또는 염산 수용체를 발현하는 세포로부터 선택된 표적 세포에 결합하는 것인, 방법.

청구항 19

제18항에 있어서, 상기 항체는 단일 사슬 항체, 표적 세포에 결합하는 항체 단편, 단클론 항체, 단일 사슬 단클론 항체, 표적 세포에 결합하는 단클론 항체 단편, 키메라 항체(chimeric antibody), 표적 세포에 결합하는 키메라 항체 단편, 도메인 항체(domain antibody), 또는 표적 세포에 결합하는 도메인 항체 단편인 것인, 방법.

청구항 20

제19항에 있어서, 상기 항체는 표면 개질된 항체, 표면 개질된 단일 사슬 항체, 또는 표면 개질된 항체 단편인 것인, 방법.

청구항 21

제19항에 있어서, 상기 항체는 단클론 항체, 단일 사슬 단클론 항체, 또는 단클론 항체 단편인 것인, 방법.

청구항 22

제19항에 있어서, 상기 항체는 인간 항체, 인간화된 항체 또는 표면 개질된 항체, 인간화된 단일 사슬 항체, 또는 인간화된 항체 단편인 것인, 방법.

청구항 23

제19항에 있어서, 상기 항체는 키메라 항체, 키메라 항체 단편, 도메인 항체, 또는 도메인 항체 단편인 것인, 방법.

청구항 24

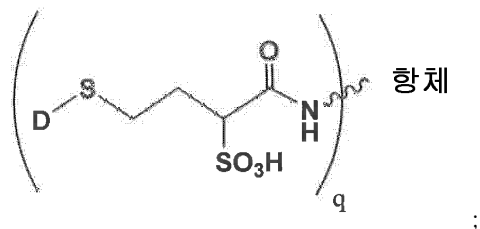
제19항에 있어서, 상기 항체는 My9-6, B4, C242, N901, DS6, CNTO 95, B-B4, 트라스투주맙(trastuzumab), 비바투주맙(bivatuzumab), 시브로투주맙(sibrotuzumab), 퍼투주맙(pertuzumab), 리톡시맙(rituximab) 또는 EpCAM, EphA2, CD38, 또는 IGF-IR에 결합하는 항체인 것인, 방법.

청구항 25

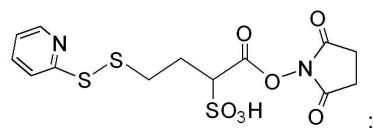
삭제

청구항 26

제1항에 있어서, 상기 세포 결합제-약물 컨쥬게이트는 하기의 식으로 표시되고:



가교제는 하기의 식으로 표시되며:



약물은 DM4인 것인 방법.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 출원은 미국특허 가출원 제61/049,291호(2008. 4. 30. 출원) 및 미국특허 가출원 제61/147,966호(2009. 1. 28. 출원)에 대한 우선권을 주장하는 출원이다.

[0002] 본 발명은 신규한 전하를 띠고 있는 가교제(이하, 하전(荷電)된 가교제라 함) 및 표적 세포에 의해 반응처리되어 하전된 부분을 제공할 수 있는 가교제를 제공하는 것에 관한 것이다. 또한, 본 발명은 세포 결합인자-약물 컨쥬게이트(cell-binding agent-drug conjugate)를 제조하는 방법에 관한 것으로서, 전술한 가교제로 세포 결합인자를 변형시킨 후 약물과 반응시키거나, 전술한 가교제로 약물을 변형시킨 후 세포결합제와 반응시켜 세포 결합인자-약물 컨쥬게이트를 제조하는 방법에 관한 것이다. 본 발명의 개선된 컨쥬게이트 제조방법은 세포 결합인자 당 연결되는 약물 분자의 수를 증가시켜 약물의 효능을 높이고 컨쥬게이트에 높은 수용성을 부여한다.

배경 기술

[0003] 이중기능(bifunctional) 변형제인 N-숙신이미딜 3-(2-피리딜디티오 프로피오네이트(N-succinimidyl 3-(2-pyridyldithio) propionate)(SPDP)는 이황화결합을 통해 2개의 단백질을 연결하는데 사용되어 왔다. 상기 변형제는 제1 단백질과 반응하여 변형 단계에서 활성화된 이황화-함유기를 도입하고, 자유로운 티올기를 포함하는 제2 단백질이 추가되어 컨쥬게이트 단계에서 2개의 단백질 사이에 이황화 결합을 형성한다. SPDP의 다양한 유도체와 이미드 화합물이 여러 문헌에 기재되어 있다(미국특허 제4,563,304호; J. Carlsson et al. 173 *Biochem. J.* 723-737 (1978); Goff D. A., Carroll, S. F. 1 *BioConjugate Chem.* 381-386 (1990); L. Delprino et al. 82 *J. Pharm. Sci.* 506-512 (1993); S. Arpicco et al., 8 *BioConjugate Chem* 327-337 (1997)).

[0004] 세포 결합인자와 매우 독성이 강한 약물과의 컨쥬게이트에 대해서 여러 문헌에 기재되어 있다(미국특허 제5,208,020호, 미국특허 제5,416,064호, 미국특허 제5,475,092호, 미국특허 제5,585,499호, 미국특허 제6,436,931호, 미국특허 제6,372,738호 및 미국특허 제6,340,701호; R.V.J. Chari et al., 52 *Cancer Res.* 127-131 (1992)). 이들 문헌에 기재된 컨쥬게이트에서 세포 결합인자는 SPDP, SPP 또는 SMCC와 같은 이중기능 작용제(bifunctional agent)에 의해 1차로 변형되어 활성 이황화물(다이설파이드) 또는 말레이미도 부분(maleimido moiety)을 도입한다. 그리고, 티올기 함유 독성 약물과의 반응으로, 단클론 항체와 같은 세포 결합인자와 약물이 이황화 결합 또는 티오에테르 결합을 통해 연결된 컨쥬게이트를 제공하게 된다.

[0005] 헤테로 이중기능 가교제(Heterobifunctional cross-linkers)로서, 니트로피리딜디티오(nitropyridyldithio), 디니트로피리딜디티오(dinitropyridyldithio), N,N-디알킬카르복사미도피리딜디티오(N,N-dialkylcarboxamidopyridyldithio) 또는 디-(N,N-디알킬카르복사미도)피리딜디티오[di-(N,N-dialkylcarboxamido) pyridyldithio] 그룹과, N-숙신이미딜 에스테르 그룹 또는 N-설포숙신이미딜 에스테르 그룹과 같은 반응성 카르복실 에스테르 그룹이 다음과 같은 문헌에 기재되어 있다(미국특허 제6,913,748호). N-설포숙신이미딜 그룹의 존재는 이들 가교제들에 대해 높은 수용성을 제공하는 것으로 주장되었다. 그러나, 세포 결합인자가 이들 가교제와 반응하면, N-설포숙신이미딜 그룹은 제거되어 변형된 세포 결합인자 및 이의 약물 컨쥬게이트 모두에서 수용성 장점은 상실된다. 세포 결합인자-약물 컨쥬게이트에서 사용된 세포독성 약물은 수용액에서 종종 드물게만 수용성을 나타내기 때문에 세포 결합인자에 충분한 수의 약물 분자를 연결하고 수용성을 유지하기가 어렵다. 또한, 희석된 용액에서 반응이 수행되어야 하는데 이는 대용량(부피)의 용액 사용 때문에 스케일 업(scale up)에 장애가 된다.

발명의 내용

해결하려는 과제

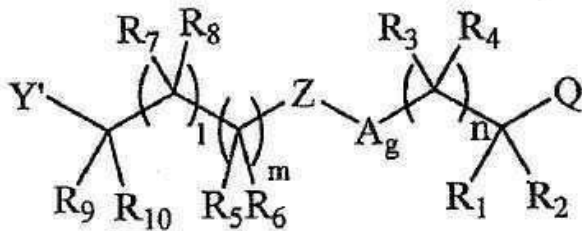
[0006] 본 발명은 세포 결합인자의 변형 및 최종 약물 컨쥬게이트에서 전하가 유지되는 하전된 링커를 제공하는데 그 목적이 있다. 보다 상세하게는 본 발명은 약물을 세포 결합인자(예를 들어, 항체)에 연결하기 위한 하전된 링커의 용도에 관한 것이다.

과제의 해결 수단

[0007] 본 발명의 일실시예에서, 하전된 링커는 세포 결합인자를 변형시키고 이를 약물에 연결하는데 사용된다. 본 발명의 다른 실시예에서, 하전된 링커는 약물을 변형시키고 이를 세포 결합인자에 연결하는데 사용된다. 본 발명의 또 다른 실시예에서, 하전된 링커는 약물과 세포 결합인자를 동시에 연결하는데 사용된다. 모든 경우에 있어서, 바람직한 결과는 약물-하전된 링커-세포 결합인자 컨쥬게이트이고 이는 $CB-(L^{\pm}-D)_q$ 의 식으로 표현되며, 여기서 CB는 세포 결합인자이고, L^{\pm} 는 하전된 링커이며, D는 약물 분자이고, q는 1 부터 20까지의 정수이다. 세포 결합인자-약물 컨쥬게이트에 있어서 링커 내에 하전된 그룹의 존재는 다음과 같은 여러가지 장점을 제공한다: i) 최종 산물의 수용성 증가; ii) 수용액에서 고농도로 작용하는 능력; iii) 세포 결합인자 분자 당 연결되는 약물 분자의 수 증가 및 약효의 향상; iv) 표적 세포 내에서 하전된 컨쥬게이트들이 유지될 수 있는 능력 및 이로 인한 높은 효능; v) 다중 약물 내성 세포로부터 하전된 약물을 배출하지 못하게 함으로써 다중 약물 내성 세포에 대한 약물 민감도 향상. 또한, 본 발명은 약물 및 세포 결합인자와 커플링될 수 있는 링커를 기술하고 있는데, 이 링커는 약물 및 세포 결합인자가 커플링되어 세포 내에서 물질대사가 되는 컨쥬게이트를 제공함으로써 하나 이상의 하전된 부분을 함유하는 약물 대사물질을 생성하게 된다. 이러한 링커를 이하에서는 전구-하전된 링커(pro-charged linkers)라고 부른다. 세포에 의한 처리 후 하전되는 링커 부분은 전구-하전된 부분(pro-charged moieties)이라고 부른다.

[0008] 본 발명의 일실시예에서, 하전된 또는 전구-하전된 가교제는 하기 화학식 I로 표시된다:

[0009] 화학식 I



[0010]

[0011] 상기 화학식 I에서 Y'는 세포 결합인자와 반응할 수 있는 작용기를 나타내고;

[0012] Q는 이황화 결합, 티오에테르 결합, 티오에스테르 결합, 펩타이드 결합, 하이드라존 결합(hydrazone bond), 에테르 결합, 에스테르 결합, 카바메이트 결합 또는 아마이드 결합을 통해 세포독성 약물과 연결될 수 있는 작용기를 나타내며;

[0013] R_1 , R_2 , R_3 , R_4 , R_5 , R_6 , R_7 , R_8 , R_9 , 및 R_{10} 은 동일하거나 서로 다른 수소, 1개-6개 탄소원자를 갖는 선형 알킬, 3개-6개 탄소원자를 갖는 분지형 또는 고리형의 알킬, 2개-6개의 탄소원자를 갖는 선형, 분지형 또는 고리형의 알케닐 또는 알키닐, SO_3^- , $X-SO_3^-$, OPO_3^{2-} , $X-OPO_3^{2-}$, PO_3^{2-} , $X-PO_3^{2-}$, CO_2^- 와 같은 음이온, 또는 질소를 포함하는 헤테로 고리, $N^+R_{11}R_{12}R_{13}$ 또는 $X-N^+R_{11}R_{12}R_{13}$ 과 같은 양이온, 또는 페닐이고;

[0014] R_{11} , R_{12} 및 R_{13} 은 동일하거나 서로 다른 수소, 1개-6개 탄소원자를 갖는 선형 알킬, 3개-6개 탄소원자를 갖는 분지형 또는 고리형의 알킬이며, X는 페닐 또는 1개-6개 탄소원자를 갖는 선형 알킬, 또는 3개-6개 탄소원자를 갖는 분지형 또는 고리형의 알킬을 나타내고;

[0015] l, m 및 n은 0 또는 1 부터 4까지의 정수이며;

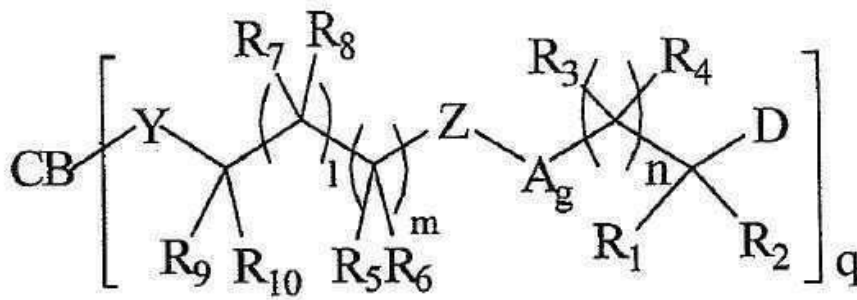
[0017] *A는 페닐 또는 치환된 페닐로서, 치환기는 1개-6개 탄소원자를 갖는 선형 알킬, 3개-6개 탄소원자를 갖는 분지형 또는 고리형의 알킬, 또는 SO_3^- , $X-SO_3^-$, OPO_3^{2-} , $X-OPO_3^{2-}$, PO_3^{2-} , $X-PO_3^{2-}$, CO_2^- 와 같은 음이온과 질소를 포함하는 헤테로 고리, $N^+R_{11}R_{12}R_{13}$ 또는 $X-N^+R_{11}R_{12}R_{13}$ 과 같은 양이온으로부터 선택된 하전된 치환기이고, X는 페닐 또는 1개-6개 탄소원자를 갖는 선형 알킬, 또는 3개-6개 탄소원자를 갖는 분지형 또는 고리형의 알킬이며, g는 0 또는 1이고;

[0018] Z는 선택적 폴리에틸렌옥시 단위인 $(OCH_2CH_2)_p$ 로서 p는 0 또는 2 부터 1000까지의 정수이거나, F1-E1-P-E2-F2 단

위로서, E1 및 E2는 동일하거나 서로 다른 C=O, O, 또는 NR₁₄이며 여기서 R₁₄는 수소, 1개-6개 탄소원자를 갖는 선형 알킬, 3개-6개 탄소원자를 갖는 분지형 또는 고리형의 알킬, 또는 2개-6개의 탄소원자를 갖는 선형, 분지형 또는 고리형의 알케닐 또는 알키닐이고; P는 2-20개의 아미노산 길이의 펩타이드 단위이고 E1 또는 E2는 상기 펩타이드의 질소 말단, 탄소 말단 또는 상기 펩타이드의 아미노산들 중 하나의 측쇄를 통해 상기 펩타이드에 연결될 수 있으며; F1 및 F2는 동일하거나 서로 다른 선택적 폴리에틸렌옥시 단위인 (OCH₂CH₂)_p로서 p는 0 또는 2 부터 1000까지의 정수이고, 이때 Z가 F1-E1-P-E2-F2가 아니면 R₁, R₂, R₃, R₄, R₅, R₆, R₇, R₈, R₉, 및 R₁₀ 중 적어도 하나는 하전된 치환기이거나, g가 1이면 A, R₁, R₂, R₃, R₄, R₅, R₆, R₇, R₈, R₉, 및 R₁₀ 중 적어도 하나는 하전된 치환기이다.

[0019] 본 발명의 다른 실시예에서, 본 발명은 세포 결합인자와 약물이 하전된 또는 전구-하전된 가교제의 양쪽 말단에서 반응한 하기 화학식 II의 세포 결합인자-약물 컨쥬게이트를 제공한다:

[0020] **화학식 II**



[0021]

[0022] 상기 화학식 II에서, CB는 세포 결합인자를 나타내고;

[0023] D는 이황화 결합, 티오에테르 결합, 티오에스테르 결합, 펩타이드 결합, 하이드라존 결합(hydrazone bond), 에테르 결합, 에스테르 결합, 카바메이트 결합 또는 아마이드 결합에 의해 상기 세포 결합인자에 연결되는 약물을 나타내며;

[0024] R₁, R₂, R₃, R₄, R₅, R₆, R₇, R₈, R₉, 및 R₁₀은 동일하거나 서로 다른 수소, 1개-6개 탄소원자를 갖는 선형 알킬, 3개-6개 탄소원자를 갖는 분지형 또는 고리형의 알킬, 2개-6개의 탄소원자를 갖는 선형, 분지형 또는 고리형의 알케닐 또는 알키닐, SO₃⁻, X-SO₃⁻, OPO₃²⁻, X-OPO₃²⁻, PO₃²⁻, X-PO₃²⁻, CO₂⁻와 같은 음이온, 또는 질소를 포함하는 헤테로 고리, N⁺R₁₁R₁₂R₁₃ 또는 X-N⁺R₁₁R₁₂R₁₃과 같은 양이온, 또는 페닐이고;

[0025] R₁₁, R₁₂ 및 R₁₃은 동일하거나 서로 다른 수소, 1개-6개 탄소원자를 갖는 선형 알킬, 3개-6개 탄소원자를 갖는 분지형 또는 고리형의 알킬이며, X는 페닐 또는 1개-6개 탄소원자를 갖는 선형 알킬, 또는 3개-6개 탄소원자를 갖는 분지형 또는 고리형의 알킬을 나타내고;

[0026] l, m 및 n은 0 또는 1 부터 4까지의 정수이며;

[0028] *A는 페닐 또는 치환된 페닐로서, 치환기는 1개-6개 탄소원자를 갖는 선형 알킬, 3개-6개 탄소원자를 갖는 분지형 또는 고리형의 알킬, 또는 SO₃⁻, X-SO₃⁻, OPO₃²⁻, X-OPO₃²⁻, PO₃²⁻, X-PO₃²⁻, CO₂⁻와 같은 음이온과 질소를 포함하는 헤테로 고리, N⁺R₁₁R₁₂R₁₃ 또는 X-N⁺R₁₁R₁₂R₁₃과 같은 양이온으로부터 선택된 하전된 치환기이고, X는 페닐 또는 1개-6개 탄소원자를 갖는 선형 알킬, 또는 3개-6개 탄소원자를 갖는 분지형 또는 고리형의 알킬이며, g는 0 또는 1이고;

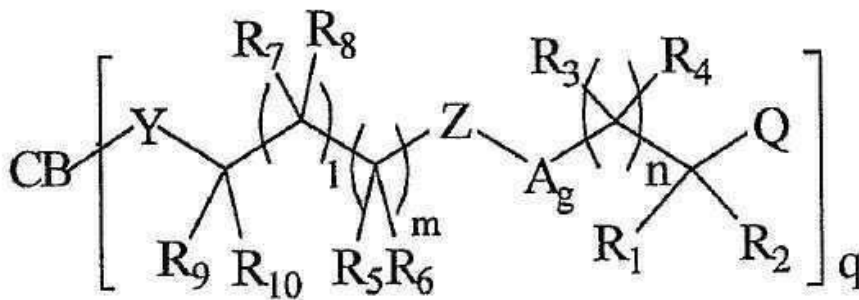
[0029] Z는 선택적 폴리에틸렌옥시 단위인 (OCH₂CH₂)_p로서 p는 0 또는 2 부터 1000까지의 정수이거나, F1-E1-P-E2-F2 단위로, E1 및 E2는 동일하거나 서로 다른 C=O, O, 또는 NR₁₄이며 여기서 R₁₄는 수소, 1개-6개 탄소원자를 갖는 선형 알킬, 3개-6개 탄소원자를 갖는 분지형 또는 고리형의 알킬, 또는 2개-6개의 탄소원자를 갖는 선형, 분지형 또는 고리형의 알케닐 또는 알키닐이고; P는 2-20개의 아미노산 길이의 펩타이드 단위이고 E1 또는 E2는 상기 펩타이드의 질소 말단, 탄소 말단 또는 상기 펩타이드의 아미노산들 중 하나의 측쇄를 통해 상기 펩타이드에

연결될 수 있으며; F1 및 F2는 동일하거나 서로 다른 선택적 폴리에틸렌옥시 단위인 $(OCH_2CH_2)_p$ 로서 p 는 0 또는 2 부터 1000까지의 정수이고, 이때 Z가 F1-E1-P-E2-F2가 아니면 $R_1, R_2, R_3, R_4, R_5, R_6, R_7, R_8, R_9$, 및 R_{10} 중 적어도 하나는 하전된 치환기이거나, g 가 1이면 A, $R_1, R_2, R_3, R_4, R_5, R_6, R_7, R_8, R_9$, 및 R_{10} 중 적어도 하나는 하전된 치환기이며;

[0030] Y는 카르보닐 그룹, 티오에테르 그룹, 아마이드 그룹, 이황화 그룹 또는 하이드라존 그룹이고; q 는 1 부터 20까지의 정수를 나타낸다.

[0031] 본 발명의 추가의 실시예에서, 본 발명은 가교제와 반응한 세포 결합인자(CB)로서 세포독성 약물과 반응할 수 있는 Q 그룹을 갖는 하기 화학식 III의 변형된 세포 결합인자를 제공한다:

[0032] 화학식 III

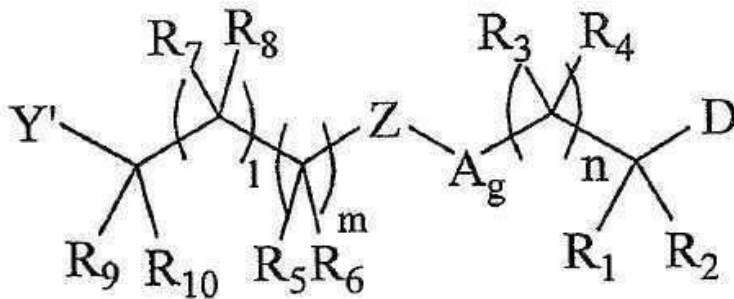


[0033]

[0034] 상기 화학식 III에서 표시된 치환기들은 전술한 화학식 I 및 화학식 II에서 정의된 바와 같다.

[0035] 본 발명의 다른 추가의 실시예에서, 본 발명은 가교제와 반응한 약물(D)로서 세포 결합인자와 반응할 수 있는 Y' 그룹을 갖는 하기 화학식 IV의 변형된 약물을 제공한다:

[0036] 화학식 IV



[0037]

[0038] 상기 화학식 IV에서 표시된 치환기들은 전술한 화학식 I 및 화학식 II에서 정의된 바와 같다.

[0039] 본 발명은 화학식 II의 세포 결합인자-약물의 컨쥬게이트를 제조하는 방법에 관한 것으로서, 상기 약물이 하전된 링커 또는 전구-하전된 링커를 통해 세포 결합인자에 연결되는 것을 특징으로 하는 제조방법에 관한 것이다.

[0040] 또한, 본 발명은 화학식 III의 변형된 세포 결합인자를 제조하는 방법에 관한 것으로서, 상기 세포 결합인자는 하전된 링커 또는 전구-하전된 링커와 반응하는 것을 특징으로 하는 제조방법에 관한 것이다.

[0041] 또한, 본 발명은 화학식 IV의 변형된 약물을 제조하는 방법에 관한 것으로서, 상기 약물은 하전된 링커 또는 전구-하전된 링커와 반응하는 것을 특징으로 하는 제조방법에 관한 것이다.

[0042] 본 발명은 컨쥬게이트 또는 그 유도체(용매 화합물(solvents), 수화물 및/또는 이의 염)와 담체(약제학적으로 허용가능한 담체)를 포함하는 조성물(예를 들어, 약학 조성물)을 포괄한다. 또한, 본 발명은 컨쥬게이트 또는 그 유도체(용매 화합물(solvents), 수화물 및/또는 이의 염)와 담체(약제학적으로 허용가능한 담체)를 포함하고, 추가로 2차 치료제를 포함하는 조성물(예를 들어, 약학 조성물)을 포괄한다. 본 발명의 조성물은 포유동물(예를 들어, 인간)의 비정상적인 세포 성장을 억제하거나 증식성 질환을 치료하는데 유용하다.

[0043] 본 발명은 컨쥬게이트 또는 그 유도체(용매 화합물(solvates), 수화물 및/또는 이의 염), 또는 이의 조성물 단독으로, 또는 2차 치료제와 함께 치료상으로 유효한 양을 포유동물에 투여하는 것을 포함하는 포유동물(예를 들어, 인간)의 비정상적인 세포 성장을 억제하거나 증식성 질환을 치료하는 방법을 포괄한다.

발명의 효과

[0044] 본 발명의 화합물, 그 유도체, 또는 컨쥬게이트 그리고 이들을 포함하는 조성물은 비정상적인 세포 성장(예를 들어, 암)에 의해 특징지어지는 질환을 치료하거나 심도를 경감시키는데 유용하다. 본 발명의 화합물 또는 컨쥬게이트의 다른 응용은 하기 열거되는 질환에 제한되는 것은 아니나, 골다공증(osteoporosis), 우울증(depression), 불안(anxiety), 스트레스(stress), 공포증(phobias), 공황(panic), 불쾌감(dysphoria), 정신질환(psychiatric disorders), 또는 통증(pain)치료에 적용가능하고, 항간질약(antiepileptics), 항균제(antibacterials), 이뇨제(diuretics), 혈압강하제(hypotensives), 혈중지질저하약(hypolipidemics) 및 항우울제(anti-depressants)에 사용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0045] 도 1은 니트로피리딜다이설파이드(nitropyridyldisulfide) 그룹과 반응성 카르복실산 에스테르를 포함하는 술폰산 함유-가교제의 합성을 도시한다. 도시된 바와 같이 히드록시알카노에이트 에스테르는 우선 디브로모알카노에이트 에스테르로 전환되고 α -브로모 치환기가 술폰산으로 전환된다.

도 2는 피리딜다이설파이드(pyridyldisulfide) 그룹과 반응성 카르복실산 에스테르를 포함하는 술폰산 함유-가교제의 합성을 도시한다.

도 3, 도 4 및 도 5는 반응성 카르복실산 에스테르와, 티오에테르 결합을 통해 연결을 가능하게 하는 말레이미도 치환기를 갖는 하전된 가교제의 다양한 합성 경로를 도시한다.

도 6 및 도 7은 피리딜다이설파이드(pyridyldisulfide) 그룹과 반응성 카르복실산 에스테르를 포함하는 포스페이트 함유-가교제의 합성을 도시한다.

도 8은 니트로피리딜다이설파이드(nitropyridyldisulfide) 그룹과 반응성 카르복실산 에스테르를 포함하는 포스페이트 함유-가교제의 합성을 도시한다.

도 9 및 도 10은 반응성 카르복실산 에스테르와, 티오에테르 결합을 통해 연결을 가능하게 하는 말레이미도 치환기를 갖는 하전된 포스페이트 함유-가교제의 다른 합성 경로를 도시한다.

도 11은 설포네이트 치환기가 분지형 알킬기에 부착된 술폰산-함유 가교제의 합성을 도시한다. 이러한 가교제는 피리딜다이설파이드 그룹과 반응성 카르복실산 에스테르를 갖는다.

도 12는 설포네이트 치환기가 분지형 알킬기에 부착된 술폰산-함유 가교제의 합성을 도시한다. 이러한 가교제는 반응성 카르복실산 에스테르와, 티오에테르 결합을 통해 연결을 가능하게 하는 말레이미도 그룹을 갖는다.

도 13은 피리딜다이설파이드 그룹과 반응성 카르복실산 에스테르를 포함하는 4차 아민-함유 가교제의 합성을 도시한다.

도 14는 반응성 카르복실산 에스테르와, 티오에테르 결합을 통해 연결을 가능하게 하는 말레이미도 그룹을 갖는 4차 아민 가교제의 합성을 도시한다.

도 15는 피리딜다이설파이드 그룹과 반응성 카르복실산 에스테르를 포함하는 술폰산-함유 가교제의 합성을 도시한다. 이들 화합물에 있어서, 설포네이트 치환기는 카르복실 에스테르에 대해 β 위치 상의 탄소 원자에 위치한다.

도 16은 피리딜다이설파이드 그룹과 반응성 카르복실산 에스테르를 포함하는 포스페이트-함유 가교제의 합성을 도시한다. 이들 화합물에 있어서, 포스페이트 치환기는 카르복실 에스테르에 대해 β 위치 상에 위치한다.

도 17, 도 18 및 도 19는 니트로피리딜다이설파이드 그룹과 반응성 카르복실산 에스테르와 함께 폴리에틸렌글리콜(PEG) 사슬을 포함하는 다양한 술폰산-함유 가교제의 합성을 도시한다.

도 20 및 도 21은 말레이미도 그룹과 반응성 카르복실산 에스테르와 함께 폴리에틸렌글리콜(PEG) 사슬을 포함하는 다양한 술폰산-함유 가교제의 합성을 도시한다.

도 22는 포스페이트 치환기가 방향족 그룹에 부착된 포스페이트-함유 가교제의 합성을 도시한다. 이러한 가교제는 반응성 카르복실산 에스테르와, 이황화 결합을 통해 연결을 가능하게 하는 니트로피리딜디티오 그룹을 갖는다.

도 23은 포스페이트 치환기가 분지형 알킬기에 부착된 포스페이트-함유 가교제의 합성을 도시한다. 이러한 가교제는 반응성 카르복실산 에스테르와, 이황화 결합을 통해 연결을 가능하게 하는 니트로피리딜디티오 그룹을 갖는다.

도 24 내지 도 31은 산 불안정성 결합(acid-labile bond)을 통해 연결을 가능하게 하는 하이드라자이드 부분(hydrazide moiety)을 도입한 술폰산-함유 가교제의 합성을 도시한다.

도 32 내지 도 36은 산 불안정성 결합(acid-labile bond)을 통해 연결을 가능하게 하는 하이드라자이드 부분(hydrazide moiety)을 도입한 포스페이트-함유 가교제의 합성을 도시한다.

도 37 및 도 38은 산 불안정성 결합(acid-labile bond)을 통해 연결을 가능하게 하는 하이드라자이드 부분(hydrazide moiety)을 도입한 4차 아민-함유 가교제의 합성을 도시한다.

도 39 내지 도 42는 폴리에틸렌글리콜(PEG)을 도입한 하전된 가교제의 합성을 도시한다.

도 43 및 도 44는 포스페이트 치환기가 방향족 잔기 또는 알킬기에 부착된 포스페이트-함유 가교제의 합성을 도시한다. 이러한 가교제는 반응성 카르복실산 에스테르와, 이황화 결합을 통해 연결을 가능하게 하는 니트로피리딜디티오 그룹을 갖는다.

도 45 내지 도 49는 반응성 카르복실산 에스테르와, 티오에테르 결합을 통해 연결을 가능하게 하는 할로아세틸(haloacetyl) 치환기를 갖는 하전된 가교제의 합성을 도시한다.

도 50은 음전하로 하전된 카르복실레이트 대사물질을 생성하는 전구-하전된 링커의 합성을 도시한다.

도 51은 약물과 단클론 항체에 링커 158을 연결한 컨쥬게이트를 도시하고, 이러한 컨쥬게이트가 표적 세포의 리소솜에서 처리되어 음전하로 하전된 카르복실레이트를 갖는 약물 함유 대사물질이 어떻게 생성되는지를 보여준다.

도 52는 양전하로 하전된 아민-함유 대사물질을 생성하는 전구-하전된 링커의 합성을 도시한다.

도 53은 약물과 단클론 항체에 전구-하전된 링커를 연결한 컨쥬게이트를 도시하고, 이러한 컨쥬게이트가 표적 세포의 리소솜에서 처리되어 양전하로 하전된 아민을 갖는 약물 대사물질이 어떻게 생성되는지를 보여준다.

도 54는 하전된 카르복실레이트 대사물질을 생성하는 전구-하전된 링커의 합성을 도시한다.

도 55는 약물과 단클론 항체에 링커 172를 연결한 컨쥬게이트를 도시하고, 이러한 컨쥬게이트가 표적 세포의 리소솜에서 처리되어 카르복실산과 리신 잔기를 갖는 약물 함유 대사물질이 어떻게 생성되는지를 보여준다.

도 56은 세포 결합인자의 변형과, 하전된 링커를 갖는 세포 결합인자-약물 컨쥬게이트의 생성에 있어서 하전된 링커의 용도를 보여준다.

도 57a, 도 57b 및 도 57c는 하전된 가교제가 도입된 세포 결합인자-약물 컨쥬게이트의 시험관 내 효능을 보여준다.

도 58은 하전된 가교제를 갖는 세포 결합인자-약물 컨쥬게이트의 시험관내 효능과 표적 선택성을 보여준다.

도 59는 하전된 가교제를 갖는 세포 결합인자-약물 컨쥬게이트의 질량 스펙트럼 결과를 보여준다.

도 60은 COLO205 세포에 대한 메이탄시노이드(maytansinoids) 부하 (E:A)를 증가시키면서 항-CanAg (huC242)-설포네이트 링커-메이탄시노이드 컨쥬게이트의 세포독성을 관찰한 그래프이다.

도 61은 다중 약물 내성 세포인 COLO205-MDR 세포에 대한 메이탄시노이드(maytansinoids) 부하 (E:A)를 증가시키면서 항-CanAg (huC242)-설포네이트 링커-메이탄시노이드 컨쥬게이트의 세포독성을 관찰한 그래프이다.

도 62는 링커에 설포네이트 그룹이 있는 경우와 없는 경우에 있어서 항-CanAg (huC242)-메이탄시노이드 컨쥬게이트의 다중 약물 내성 세포인 COLO205-MDR 세포에 대한 세포독성을 비교한 그래프이다.

도 63은 링커에 설포네이트 그룹이 있는 경우와 없는 경우에 있어서 항-EpCAM (B38.1)-메이탄시노이드 컨쥬게이트의 다중 약물 내성 세포인 COLO205-MDR 세포에 대한 세포독성을 비교한 그래프이다.

도 64는 링커에 설포네이트 그룹이 있는 경우와 없는 경우에 있어서 항-EpCAM (B38.1)-메이탄시노이드 컨쥬게이트의 다중 약물 내성 세포인 HCT15 세포에 대한 세포독성을 비교한 그래프이다.

도 65는 링커에 설포네이트 그룹이 있는 경우와 없는 경우에 있어서 항-EpCAM (B38.1)-메이탄시노이드 컨쥬게이트의 다중 약물 내성 세포인 COLO205-MDR 세포에 대한 세포독성을 비교한 그래프이다.

도 66은 항-EpCAM 항체-메이탄시노이드 컨쥬게이트의 COLO205 *mdr* 이중이식체(개체 종양)에 대한 생체 내 항-종양 활성을 나타내는 그래프이다.

도 67은 항-EpCAM 항체-메이탄시노이드 컨쥬게이트의 COLO205 이중이식체(개체 종양)에 대한 생체 내 항-종양 활성을 나타내는 그래프이다.

도 68 내지 도 70은 술폰산-함유 가교제의 합성 방법을 도시한다. 이러한 가교제는 반응성 카르복실산 에스테르와, 티오에테르 결합을 통해 결합을 가능하게 하는 말레이미도 그룹을 갖는다.

도 71은 4차 아민-함유 가교제의 합성 방법을 도시한다. 이러한 가교제는 반응성 카르복실산 에스테르와, 이황화 결합을 통해 결합을 가능하게 하는 피리딜디티오 그룹을 갖는다.

도 72a 및 도 72b는 CD-1 마우스에 각각 12.9 mg/kg 및 7.9 mg/kg의 용량으로 정맥주사되는 3.5 DM4/Ab 또는 6.4 DM4/Ab의 컨쥬게이트인 huC242 항체-설포-Ma1-[³H-표지]-DM4 컨쥬게이트의 혈장 약물 동력학을 나타내는 그래프이다. 도 72a는 투여 후 시간 대 항체 농도 (ELISA 또는 3H 카운트에 의해 측정)의 그래프이고, 도 72b는 투여 후 시간 대 메이탄시노이드(DM4)/항체(Ab) 비율의 그래프이다.

도 1 내지 도 71에 있어서, n은 0 또는 1 부터 10까지의 정수를 나타내고, m은 0 또는 1 부터 2000까지의 정수를 나타낸다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0046]

이하에서 기술되는 신규한 컨쥬게이트는 하전되거나 또는 전구-하전된 가교제를 사용한다. 몇가지 적합한 가교제 및 그 합성의 예들이 도 1 내지 도 10에 도시되어 있다. 바람직하게는, 하전되거나 또는 전구-하전된 링커는 설포네이트, 포스페이트, 카르복실 또는 4차 아민 치환기를 포함하는데, 이들은 변형된 세포 결합인자와, 세포 결합인자-약물 컨쥬게이트, 특히 단클론 항체-약물 컨쥬게이트(항체당 2-20 약물 분자가 연결된 것)의 용해도를 현저하게 향상시킨다. 전구-하전된 부분을 갖는 링커로부터 준비된 컨쥬게이트는 세포 내에서 물질대사가 이루어진 후 하나 이상의 하전된 부분을 생성한다.

[0047]

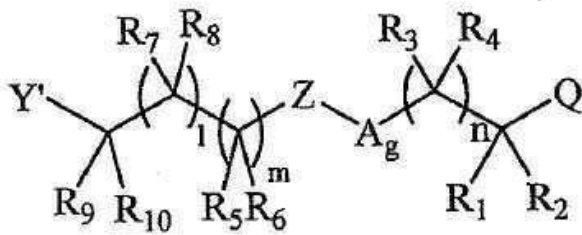
가교제(Cross-linkers)

[0048]

본 발명의 하전된 가교제의 합성 경로들은 도 1 내지 도 49에 도시되어 있다. 전구-하전된 부분을 갖는 링커들을 생성하는 합성경로들은 도 50, 도 52 및 도 54에 도시되어 있다. 도 51, 도 53 및 도 55는 각각의 전구-하전된 링커와 약물 및 단클론 항체와의 컨쥬게이트를 도시하고, 이들 컨쥬게이트가 표적 세포 내에서 물질대사가 이루어져 하전된 대사물질을 어떻게 생성하는지를 보여준다. 가교제는 3개의 요소를 포함한다: a) 하전된 치환기, 또는 전구-하전된 링커를 채택하는 컨쥬게이트가 세포 내에서 물질대사가 이루어질 때 하전되는 치환기. 하전되는 전하는 제한되는 것은 아니나 음이온으로서 카르복실레이트, 설포네이트 또는 포스페이트일 수 있고, 또는 제한되는 것은 아니나 양이온으로서 3차 아민, 4차 아민, 1차 아민 또는 질소를 함유하는 헤테로 고리일 수 있다; b) 세포 결합인자와 반응할 수 있는 그룹, 예를 들어 N-히드록시숙신이미드 에스테르(N-hydroxysuccinimide ester), 말레이미도 그룹, 할로아세틸 그룹 및 하이드라자이드일 수 있다; c) 약물과 반응할 수 있는 그룹으로서 제한되는 것은 아니나 예를 들어, 다이설파이드(disulfide), 말레이미드(maleimide), 할로아세틸(haloacetyl) 및 하이드라자이드일 수 있다. 상기 하전된 치환기 또는 전구-하전된 치환기는 본 명세서에서 설명되는 방법에 의해 도입될 수 있다. 예를 들어, 설포네이트 전하는 상업적으로 입수가능한 할로에스테르를 티오아세테이트로 우선 처리하여 티오아세틸 화합물을 생성한 후 상기 티오아세틸 그룹을 과산화수소를 이용하여 설포네이트 그룹으로 산화시켜 도입될 수 있다. 포스페이트 함유 가교제도 본 명세서에서 설명된 방법에 의해 합성될 수 있다. 우선, 원하는 반응성 그룹으로서 제한되는 것은 아니나 예를 들어 티올, 말레이미드, 할로아세틸 및 하이드라자이드가 도 6 내지 도 10에 도시된 반응에 의해 도입되고, 포스페이트 에스테르의 가수분해에 의해 포스페이트를 갖는 하전된 가교제를 얻을 수 있다. 양전하로 하전된 4차 아민 치환기는 아민과 α, β -불포화 케톤과의 반응(예를 들어 도 13 및 도 37 참조)에 의해 가교제에 도입될 수 있다. 대안으로, 하전된 아민 치환기는 아민 또는 선정된 질소 함유 헤테로 고리로 할로젠을 대체하여 도입될 수 있다.

[0049] 바람직하게는, 본 발명의 가교제는 하기 화학식 I의 화합물이다.

[0050] 화학식 I



[0051] 상기 화학식 I에서 Y'는 세포 결합인자와 반응할 수 있는 작용기를 나타내고;
 [0052]

[0053] Q는 이황화 결합, 티오에테르 결합, 티오에스테르 결합, 펩타이드 결합, 하이드라존 결합(hydrazone bond), 에테르 결합, 에스테르 결합, 카바메이트 결합 또는 아마이드 결합을 통해 약물과 연결될 수 있는 작용기를 나타내며;

[0054] R₁, R₂, R₃, R₄, R₅, R₆, R₇, R₈, R₉, 및 R₁₀은 동일하거나 서로 다른 수소, 1개-6개 탄소원자를 갖는 선형 알킬, 3개-6개 탄소원자를 갖는 분지형 또는 고리형의 알킬, 2개-6개의 탄소원자를 갖는 선형, 분지형 또는 고리형의 알케닐 또는 알키닐, SO₃⁻, X-SO₃⁻, OPO₃²⁻, X-OPO₃²⁻, PO₃²⁻, X-PO₃²⁻, CO₂⁻와 같은 음이온, 또는 질소를 포함하는 헤테로 고리, N⁺R₁₁R₁₂R₁₃ 또는 X-N⁺R₁₁R₁₂R₁₃과 같은 양이온, 또는 페닐이고;

[0055] R₁₁, R₁₂ 및 R₁₃은 동일하거나 서로 다른 수소, 1개-6개 탄소원자를 갖는 선형 알킬, 3개-6개 탄소원자를 갖는 분지형 또는 고리형의 알킬이며, X는 페닐 또는 1개-6개 탄소원자를 갖는 선형 알킬, 또는 3개-6개 탄소원자를 갖는 분지형 또는 고리형의 알킬을 나타내고;

[0056] l, m 및 n은 0 또는 1 부터 4까지의 정수이며;

[0057] A는 페닐 또는 치환된 페닐로서, 치환기는 1개-6개 탄소원자를 갖는 선형 알킬, 3개-6개 탄소원자를 갖는 분지형 또는 고리형의 알킬, 또는 SO₃⁻, X-SO₃⁻, OPO₃²⁻, X-OPO₃²⁻, PO₃²⁻, X-PO₃²⁻, CO₂⁻와 같은 음이온과 질소를 포함하는 헤테로 고리, N⁺R₁₁R₁₂R₁₃ 또는 X-N⁺R₁₁R₁₂R₁₃과 같은 양이온으로부터 선택된 하전된 치환기이고, X는 페닐 또는 1개-6개 탄소원자를 갖는 선형 알킬, 또는 3개-6개 탄소원자를 갖는 분지형 또는 고리형의 알킬이며, g는 0 또는 1이고;

[0058] Z는 선택적 폴리에틸렌옥시 단위인 (OCH₂CH₂)_p로서 p는 0 또는 2 부터 1000까지의 정수이거나, F1-E1-P-E2-F2 단위로, E1 및 E2는 동일하거나 서로 다른 C=O, O, 또는 NR₁₄이며 여기서 R₁₄는 수소, 1개-6개 탄소원자를 갖는 선형 알킬, 3개-6개 탄소원자를 갖는 분지형 또는 고리형의 알킬, 또는 2개-6개의 탄소원자를 갖는 선형, 분지형 또는 고리형의 알케닐 또는 알키닐이고; P는 2-20개의 아마노산 길이의 펩타이드 단위이고 E1 또는 E2는 상기 펩타이드의 질소 말단, 탄소 말단 또는 상기 펩타이드의 아마노산들 중 하나의 측쇄를 통해 상기 펩타이드에 연결될 수 있으며; F1 및 F2는 동일하거나 서로 다른 선택적 폴리에틸렌옥시 단위인 (OCH₂CH₂)_p로서 p는 0 또는 2 부터 1000까지의 정수이고, 이때 Z가 F1-E1-P-E2-F2가 아니면 R₁, R₂, R₃, R₄, R₅, R₆, R₇, R₈, R₉, 및 R₁₀ 중 적어도 하나는 하전된 치환기이거나, g가 1이면 A, R₁, R₂, R₃, R₄, R₅, R₆, R₇, R₈, R₉, 및 R₁₀ 중 적어도 하나는 하전된 치환기이다.

[0059] 작용기의 예로서, 세포 결합인자와 반응할 수 있는 Y'는 아민 반응제로서, 제한되는 것은 아니나 예를 들어 N-히드록시숙신이미드 에스테르, p-니트로페닐 에스테르, 디니트로페닐 에스테르(dinitrophenyl esters), 펜타플루오로페닐 에스테르를 들 수 있고, 티올 반응제로서, 제한되는 것은 아니나 예를 들어 피리디디설파이드(pyridyldisulfides), 니트로피리디디설파이드, 말레이미드, 할로아세테이트, 염화 카르복실산(carboxylic acid chlorides)을 들 수 있다.

[0060] 작용기의 예로서, 세포 독성 약물과 연결될 수 있게 하는 Q는 이황화 결합, 티오에테르 결합, 티오에스테르 결

합, 펩타이드 결합, 하이드라존 결합(hydrazone bond), 에스테르 결합, 카바메이트 결합 또는 아미드 결합을 통해 연결을 가능하게 하는 그룹을 포함한다. 이러한 작용기로서, 제한되는 것은 아니나 티올, 다이설파이드, 아미노, 카르복시, 알데히드, 말레이미도, 할로아세틸, 하이드라진, 히드록시를 들 수 있다.

[0061] 선형 알킬의 예로는 메틸, 에틸, 프로필, 부틸, 펜틸, 헥실을 들 수 있다. 3개-6개의 탄소원자를 갖는 분지형 또는 고리형 알킬의 예로는 이소프로필, 2차-부틸, 이소부틸, 3차-부틸, 펜틸, 헥실, 시클로프로필, 시클로부틸, 시클로 펜틸, 시클로헥실을 들 수 있다.

[0062] 2개-6개의 탄소 원자를 갖는 선형 알케닐의 예로는 에테닐, 프로페닐, 부테닐, 펜테닐, 헥세닐을 들 수 있다. 2개-6개의 탄소원자를 갖는 분지형 또는 고리형 알케닐의 예로는 이소부테닐, 이소펜테닐, 2-메틸-1-펜테닐, 2-메틸-2-펜테닐을 들 수 있다.

[0063] 2개-6개의 탄소원자를 갖는 선형 알키닐의 예로는 에티닐, 프로피닐, 부티닐, 펜티닐, 헥시닐을 들 수 있다. 6개까지의 탄소원자를 갖는 분지형 또는 고리형 알키닐의 예로는 3-메틸-1-부티닐, 3-메틸-1-펜티닐, 4-메틸-2-헥시닐을 들 수 있다.

[0064] 바람직한 실시예에 있어서, $R_1, R_2, R_3, R_4, R_9, R_{10}$ 중 하나는 설포네이트, 포스페이트 또는 트리알킬암모늄으로부터 선택된 하전된 치환기이고 나머지는 수소이며, l, g 및 m 은 각각 0이고, $n=1$ 이며, Q 및 Y' 는 각각 독립적으로 다이설파이드 치환기, 말레이미도 그룹, 할로아세틸 그룹 또는 N-히드록시숙신이미드 에스테르이다. 다른 바람직한 실시예에 있어서, $R_1, R_2, R_3, R_4, R_9, R_{10}$ 중 하나는 설포네이트이고, 나머지는 수소이며, l, g 및 m 은 각각 0이고, $n=1$ 이며, Q 는 다이설파이드, 말레이미도, 또는 할로아세틸 부분이고, Y' 는 말레이미도 부분 또는 N-히드록시숙신이미드 에스테르이다. 또 다른 바람직한 실시예에 있어서, $R_1, R_2, R_3, R_4, R_9, R_{10}$ 중 하나는 설포네이트이고, 나머지는 수소이며, l, g 및 m 은 각각 0이고, $n=1$ 이며, Q 는 퍼리딜디티오 또는 니트로퍼리딜디티오 그룹, 말레이미도 또는 할로아세틸 부분이고, Y' 는 N-히드록시숙신이미드 에스테르이다.

[0065] 2-디티오니트로퍼리딜 및 2-디티오-디니트로퍼리딜을 함유하는 화학식 I의 가교제의 합성은 예를 들어 도 1 및 도 2에 도시되어 있고 4-디티오니트로퍼리딜 및 4-디티오-디니트로퍼리딜을 함유하는 화학식 I의 가교제의 합성은 예를 들어 도 6에 도시되어 있다. 설포네이트 그룹을 갖는 말레이미도-함유의 하전된 화학식 I의 가교제의 합성은 도 3 내지 도 5에 도시되어 있다. 포스페이트 그룹을 갖는 말레이미도-함유의 하전된 화학식 I의 가교제의 합성은 도 9 및 도 10에 도시되어 있다. 4차 아민-함유의 하전된 화학식 I의 가교제의 합성은 도 13 및 도 14에 도시되어 있다. 폴리에틸렌글리콜-함유의 하전된 화학식 I의 가교제의 합성은 도 17 내지 도 21에 도시되어 있다. 산 불안정성 결합(acid-labile bond)을 통해 연결을 가능하게 하는 하이드라자이드 부분(hydrazide moiety)을 갖는 하전된 화학식 I의 가교제의 합성은 도 24 내지 도 36에 도시되어 있다.

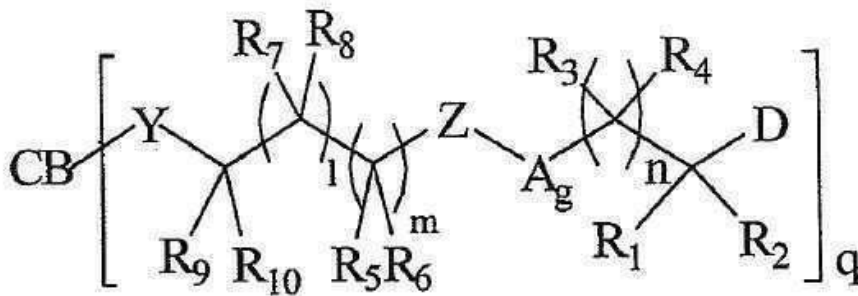
[0067] 세포 결합인자-약물 컨쥬게이트

[0068] 진술한 하전된 가교제 또는 전구-하전된 가교제를 이용하면 많은 약물 분자당 수(>6)를 도입할 수 있다. 발명을 제한하지 않는 실시예에 있어서, 도 57은 본 발명의 하전된 가교제를 이용하여 준비된 세포 결합인자-약물 컨쥬게이트가 높은 효능을 나타내는 것을 일례로서 설명하고 있다. 또한, 그 효능은 표적 선택적인데(도 58 참조), 많은 수의 약물 분자의 연결 후에도 컨쥬게이트는 표적 세포에 대해 높은 효능을 나타내는 반면에 표적이 아닌 세포에 대해서는 훨씬 적은 효능을 나타낸다. 도 59에 예시된 바와 같이, 질량 스펙트럼 분석은 약물이 하전된 가교제를 통해 세포 결합인자에 공유결합으로 연결되어 있음을 보이고 있다.

[0069] 본 발명의 컨쥬게이트는 $CB-(L^c-D)_q$ 의 식으로 표현될 수 있으며, 여기서 CB는 세포 결합인자이고, L^c 는 하전된 링커 또는 전구-하전된 링커이며, D는 약물 분자이고, q 는 1 부터 20까지의 정수이다.

[0070] 바람직하게는 본 발명의 컨쥬게이트는 하기 화학식 II를 갖는다:

[0071] 화학식 II



[0073]

*

[0074]

상기 화학식 II에서, CB는 세포 결합인자를 나타내고;

[0075]

D는 이황화 결합, 티오에테르 결합, 티오에스테르 결합, 펩타이드 결합, 하이드라존 결합(hydrazone bond), 에스테르 결합, 카바메이트 결합 또는 아마이드 결합에 의해 상기 세포 결합인자에 연결되는 약물을 나타내며;

[0076]

R_1 , R_2 , R_3 , R_4 , R_5 , R_6 , R_7 , R_8 , R_9 , 및 R_{10} 은 동일하거나 서로 다른 수소, 1개-6개 탄소원자를 갖는 선형 알킬, 3개-6개 탄소원자를 갖는 분지형 또는 고리형의 알킬, 2개-6개의 탄소원자를 갖는 선형, 분지형 또는 고리형의 알케닐 또는 알키닐, SO_3^- , $X-SO_3^-$, OPO_3^{2-} , $X-OPO_3^{2-}$, PO_3^{2-} , $X-PO_3^{2-}$, CO_2^- 와 같은 음이온, 또는 질소를 포함하는 헤테로 고리, $N^+R_{11}R_{12}R_{13}$ 또는 $X-N^+R_{11}R_{12}R_{13}$ 과 같은 양이온, 또는 페닐이고;

[0077]

R_{11} , R_{12} 및 R_{13} 은 동일하거나 서로 다른 수소, 1개-6개 탄소원자를 갖는 선형 알킬, 3개-6개 탄소원자를 갖는 분지형 또는 고리형의 알킬이며, X는 페닐 또는 1개-6개 탄소원자를 갖는 선형 알킬, 또는 3개-6개 탄소원자를 갖는 분지형 또는 고리형의 알킬을 나타내고;

[0078]

l, m 및 n은 0 또는 1 부터 4까지의 정수이며;

[0079]

A는 페닐 또는 치환된 페닐로서, 치환기는 1개-6개 탄소원자를 갖는 선형 알킬, 3개-6개 탄소원자를 갖는 분지형 또는 고리형의 알킬, 또는 SO_3^- , $X-SO_3^-$, OPO_3^{2-} , $X-OPO_3^{2-}$, PO_3^{2-} , $X-PO_3^{2-}$, CO_2^- 와 같은 음이온과 질소를 포함하는 헤테로 고리, $N^+R_{11}R_{12}R_{13}$ 또는 $X-N^+R_{11}R_{12}R_{13}$ 과 같은 양이온으로부터 선택된 하전된 치환기이고, X는 페닐 또는 1개-6개 탄소원자를 갖는 선형 알킬, 또는 3개-6개 탄소원자를 갖는 분지형 또는 고리형의 알킬이며, g는 0 또는 1이고;

[0080]

Z는 선택적 폴리에틸렌옥시 단위인 $(OCH_2CH_2)_p$ 로서 p는 0 또는 2 부터 1000까지의 정수이거나, F1-E1-P-E2-F2 단위로서, E1 및 E2는 동일하거나 서로 다른 $C=O$, O, 또는 NR_{14} 이며 여기서 R_{14} 는 수소, 1개-6개 탄소원자를 갖는 선형 알킬, 3개-6개 탄소원자를 갖는 분지형 또는 고리형의 알킬, 또는 2개-6개의 탄소원자를 갖는 선형, 분지형 또는 고리형의 알케닐 또는 알키닐이고; P는 2-20개의 아미노산 길이의 펩타이드 단위이고 E1 또는 E2는 상기 펩타이드의 질소 말단, 탄소 말단 또는 상기 펩타이드의 아미노산들 중 하나의 측쇄를 통해 상기 펩타이드에 연결될 수 있으며; F1 및 F2는 동일하거나 서로 다른 선택적 폴리에틸렌옥시 단위인 $(OCH_2CH_2)_p$ 로서 p는 0 또는 2 부터 1000까지의 정수이고, 이때 Z가 F1-E1-P-E2-F2가 아니면 R_1 , R_2 , R_3 , R_4 , R_5 , R_6 , R_7 , R_8 , R_9 , 및 R_{10} 중 적어도 하나는 하전된 치환기이거나, g가 1이면 A, R_1 , R_2 , R_3 , R_4 , R_5 , R_6 , R_7 , R_8 , R_9 , 및 R_{10} 중 적어도 하나는 하전된 치환기이며;

[0081]

Y는 카르보닐 그룹, 티오에테르 그룹, 아마이드 그룹, 이황화 그룹 또는 하이드라존 그룹이고; q는 1 부터 20까지의 정수를 나타낸다.

[0082]

하기에서 상술되는 바와 같이, 상기 약물은 수 많은 저분자 약물 중 어느 하나일 수 있는데, 본 발명을 제한하지 않는 예로서 메이탄시노이드, CC-1065 유사체, 모폴리노(morpholinos), 독소루비신(doxorubicins), 탁산(taxanes), 크립토피신(cryptophycins), 에포틸론(epothilones), 칼리케아미신(calicheamicins), 아우리스타틴(auristatins), 피롤로벤조디아제핀 다이머(pyrrolobenzodiazepine dimers)를 들 수 있다.

[0083]

바람직한 실시예에 있어서, R_1 , R_2 , R_3 , R_4 , R_9 , R_{10} 중 하나는 설포네이트, 포스페이트, 카르복실레이트 또는 트

리알킬암모늄으로부터 선택된 하전된 치환기이고 나머지는 수소이며, l , g 및 m 은 각각 0이고, $n=1$ 이며, D 는 메이탄시노이드, CC-1065 유사체 또는 피롤로벤조디아제핀 다이머이다. 다른 바람직한 실시예에 있어서, R_1 , R_2 , R_3 , R_4 , R_9 , R_{10} 중 하나는 설포네이트이고, 나머지는 수소이며, l , g 및 m 은 각각 0이고, $n=1$ 이며, D 는 이황화 결합, 티오에스테르 결합 또는 티오에테르 결합을 통해 연결되는, 메이탄시노이드, CC-1065 유사체, 또는 피롤로벤조디아제핀 다이머이다. 또 다른 바람직한 실시예에 있어서, R_1 , R_2 , R_3 , R_4 , R_9 , R_{10} 중 하나는 설포네이트이고, 나머지는 수소이며, l , g 및 m 은 각각 0이고, $n=1$ 이며, D 는 메이탄시노이드, CC-1065 유사체 또는 타산이다.

[0084] 바람직한 실시예에서, Z 가 F1-E1-P-E2-F2 단위이면 E1 및 E2는 동일하거나 서로 다른 $C=O$ 또는 NR_{14} 이며 여기서 R_{14} 는 수소, 1개-6개 탄소원자를 갖는 선형 알킬, 또는 3개-6개 탄소원자를 갖는 분지형 또는 고리형의 알킬이고, P는 2-8개의 아미노산 길이의 펩타이드 단위이고 E1 또는 E2는 상기 펩타이드의 질소 말단, 탄소 말단 또는 상기 펩타이드의 아미노산들 중 하나의 측쇄를 통해 상기 펩타이드에 연결될 수 있으며, 바람직한 아미노산 잔기는 임의의 조합이나 순서(예를 들어, gly-gly-gly 또는 ala-leu-ala-leu 등)로 사용될 수 있는 글리신(gly), 알라닌(ala), 루신(leu), 글루탐산(glu) 또는 리신(lys)이고, F1 및 F2는 동일하거나 서로 다른 선택적 폴리에틸렌옥시 단위인 $(OCH_2CH_2)_p$ 로서 p 는 0 또는 2 부터 1000까지의 정수이다.

[0085] 보다 바람직한 실시예에서, Z 가 F1-E1-P-E2-F2 단위이면 E1 및 E2는 동일하거나 서로 다른 $C=O$ 또는 NR_{14} 이며 여기서 R_{14} 는 수소, 또는 1개-6개 탄소원자를 갖는 선형 알킬이고, P는 2-5개의 아미노산 길이의 펩타이드 단위이고 E1 또는 E2는 상기 펩타이드의 질소 말단, 탄소 말단 또는 상기 펩타이드의 아미노산들 중 하나의 측쇄를 통해 상기 펩타이드에 연결될 수 있으며, F1 및 F2는 동일하거나 서로 다른 선택적 폴리에틸렌옥시 단위인 $(OCH_2CH_2)_p$ 로서 p 는 0 또는 2 부터 24까지의 정수이다.

[0086] 바람직하게는, 각각의 세포 결합인자에 결합되는 약물의 수인 q 는 1-20이고, 보다 바람직하게는 2-18이며, 보다 더 바람직하게는 2-16이고, 가장 바람직하게는 2-10이다.

[0087] 컨쥬게이트를 합성하기 위해, 세포 결합인자는 본 발명의 가교제에 의해 변형되어 반응성 다이설파이드 그룹, 말레이미도 그룹, 할로아세틸 그룹 또는 하이드라자이드 그룹을 도입할 수 있다. 이황화 결합을 통해 연결된 세포 결합인자-약물 컨쥬게이트의 합성은 변형된 세포 결합인자와 자유로운 티올기를 갖는 약물에서의 이황화 결합 간의 다이설파이드 교환에 의해 달성된다. 티오에테르를 통해 연결된 세포 결합인자-약물 컨쥬게이트의 합성은 말레이미도 또는 할로아세틸로 변형된 세포 결합인자와 자유로운 티올기를 갖는 약물의 반응에 의해 달성된다. 산 불안정성 하이드라존 연결을 갖는 컨쥬게이트의 합성은 본 발명의 기술분야에서 공지된 방법에 의해 링커에서 하이드라자이드 부분과 카르보닐 그룹의 반응에 의해 달성된다(예를 들어, P. Hamann et al., *BioConjugate Chem.*, 13; 40-46, 2002; B. Laguzza et al., *J. Med. Chem.*, 32; 548-555, 1959; P. Trail et al., *Cancer Res.*, 57; 100-105, 1997 참조).

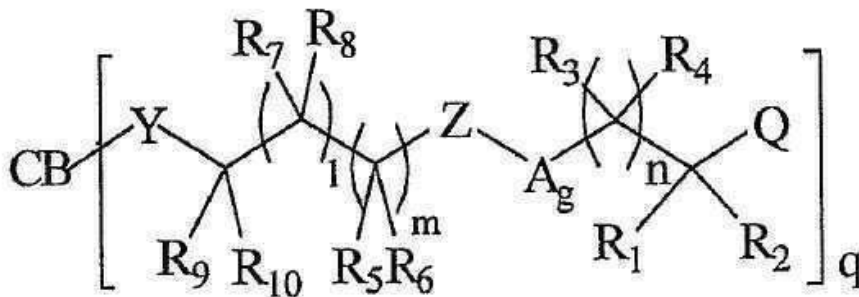
[0088] 대안으로, 상기 약물은 본 발명의 가교제에 의해 변형되어, 세포 결합인자와 반응할 수 있는 작용기를 갖는 화학식 IV의 변형된 약물로 제공될 수 있다. 예를 들어, 티올-함유 약물은 말레이미도 치환기를 갖는 하전된 화학식 I의 가교제 또는 전구-하전된 화학식 I의 가교제와 수용성 완충용액 하의 중성 pH에서 반응하여 티오에테르 연결을 통해 하전된 링커에 연결된 약물을 제공할 수 있다. 티올-함유 약물은 피리디디티오 부분을 갖는 하전된 링커와 다이설파이드 교환(disulfide exchange)을 수행하여 이황화 결합을 통해 상기 하전된 가교제에 부착된 변형된 약물을 제공할 수 있다. 히드록시기를 갖는 약물은 약한 염기 하에서 하전된 또는 전구-하전된 할로젠을 갖는 가교제와 반응하여 에테르 연결을 갖는 변형된 약물을 제공할 수 있다. 히드록시기를 갖는 약물은 디시클로헥실카르보디미드(dicyclohexylcarbodiimide)와 같은 탈수제의 존재 하에서 카르복실 그룹을 갖는 하전된 화학식 I의 가교제와 축합되어 에스테르 연결을 제공할 수 있다. 아미노 그룹을 갖는 약물은 하전된 화학식 I의 가교제 또는 전구-하전된 화학식 I의 가교제 상의 카르복실 그룹과 유사한 방식으로 축합반응을 수행하여 아마이드 결합을 제공할 수 있다.

[0089] 본 발명의 컨쥬게이트는 표준적인 생화학적 방법, 예를 들어, 세파덱스(Sephadex) G25 또는 세파크릴(Sephacryl) S300 컬럼 상에서 겔 여과, 흡착 크로마토그래피, 이온 교환 또는 투석 등을 이용하여 정제될 수 있다. 어떤 경우(예를 들어, 염산, 멜라노사이트 자극 호르몬, EGF 등)에는 세포 결합인자-약물 컨쥬게이트는 HPLC, MPLC(medium pressure column chromatography)와 같은 크로마토그래피, 또는 이온 교환에 의해 정제될 수 있다.

[0091] 변형된 세포 결합인자

[0092] 본 발명의 가교제와 반응하여 변형된 세포 결합인자는 하기 화학식 III에 의해 표시된다:

[0093] 화학식 III



[0094]

[0095] 상기 화학식 III에서 표시된 치환기들은 전술한 하전된 링커 또는 전구-하전된 링커와, 세포 결합인자-약물 컨쥬게이트에서 정의된 바와 같다.

[0096]

바람직한 실시예에 있어서, R_1 , R_2 , R_3 , R_4 , R_9 , R_{10} 중 하나는 설포네이트, 포스페이트, 카르복실 또는 트리알킬 암모늄으로부터 선택된 하전된 치환기이고 나머지는 수소이며, l , g 및 m 은 각각 0이고, $n=1$ 이며, Q 는 다이설파이드 치환기, 말레이미도 그룹, 할로아세틸 그룹 또는 N-히드록시숙신이미드 에스테르이고, Y 는 티오에테르, 아마이드 또는 다이설파이드이다. 다른 바람직한 실시예에 있어서, R_1 , R_2 , R_3 , R_4 , R_9 , R_{10} 중 하나는 설포네이트이고, 나머지는 수소이며, l , g 및 m 은 각각 0이고, $n=1$ 이며, Q 는 다이설파이드, 말레이미도, 또는 할로아세틸 부분이고, Y 는 티오에테르, 아마이드 또는 다이설파이드이다. 또 다른 바람직한 실시예에 있어서, R_1 , R_2 , R_3 , R_4 , R_9 , R_{10} 중 하나는 설포네이트이고, 나머지는 수소이며, l , g 및 m 은 각각 0이고, $n=1$ 이며, Q 는 피리딜디티오 또는 니트로피리딜디티오 그룹이고, Y 는 티오에테르, 아마이드 또는 다이설파이드이다.

[0097]

바람직한 실시예에서, Z 가 F1-E1-P-E2-F2 단위이면 E1 및 E2는 동일하거나 서로 다른 $C=O$ 또는 NR_{14} 이며 여기서 R_{14} 는 수소, 1개-6개 탄소원자를 갖는 선형 알킬, 또는 3개-6개 탄소원자를 갖는 분지형 또는 고리형의 알킬이고, P는 2-8개의 아미노산 길이의 펩타이드 단위이고 E1 또는 E2는 상기 펩타이드의 질소 말단, 탄소 말단 또는 상기 펩타이드의 아미노산들 중 하나의 측쇄를 통해 상기 펩타이드에 연결될 수 있으며, 바람직한 아미노산 잔기는 임의의 조합이나 순서(예를 들어, gly-gly-gly 또는 ala-leu-ala-leu 등)로 사용될 수 있는 글리신(gly), 알라닌(ala), 루신(leu), 글루탐산(glu) 또는 리신(lys)이고, F1 및 F2는 동일하거나 서로 다른 선택적 폴리에틸렌옥시 단위인 $(OCH_2CH_2)_p$ 로서 p 는 0 또는 2 부터 1000까지의 정수이다.

[0098]

보다 바람직한 실시예에서, Z 가 F1-E1-P-E2-F2 단위이면 E1 및 E2는 동일하거나 서로 다른 $C=O$ 또는 NR_{14} 이며 여기서 R_{14} 는 수소, 또는 1개-6개 탄소원자를 갖는 선형 알킬이고, P는 2-5개의 아미노산 길이의 펩타이드 단위이고 E1 또는 E2는 상기 펩타이드의 질소 말단, 탄소 말단 또는 상기 펩타이드의 아미노산들 중 하나의 측쇄를 통해 상기 펩타이드에 연결될 수 있으며, F1 및 F2는 동일하거나 서로 다른 선택적 폴리에틸렌옥시 단위인 $(OCH_2CH_2)_p$ 로서 p 는 0 또는 2 부터 24까지의 정수이다.

[0099]

변형된 세포 결합인자는 다른 가교제에 대한 공지된 방법들을 이용하여 하전된 가교제와 세포 결합인자를 반응시켜 준비될 수 있다(미국특허 제6,340,701 B1호, 미국특허 제5,846,545호, 미국특허 제5,585,499호, 미국특허 제5,475,092호, 미국특허 제5,414,064호, 미국특허 제5,208,020호 및 미국특허 제4,563,304호; R.V.J. Chari et al. *Cancer Research* 52, 127-131, 1992; R.V.J. Chari et al. *Cancer Research* 55, 4079-4084, 1995; J. Carlsson et al. 173 *Biochem. J.* (1978) 723-737(1978); Goff, D. A., Carroll, S. F. 1 *BioConjugate Chem.* 381-386 (1990); L. Delprino et al. 82 *J. Pharm. Sci.* 506-512 (1993); S. Arpicco et al., 8 *BioConjugate Chem* 327-337 (1997)). 유리하게는, 본 가교제 그룹은 수용성이거나 수용액에서 용해도를 유지하기 위해 단지 적은 퍼센트의 유기용매를 요구하므로, 세포 결합인자와 가교제 사이의 반응은 수용액에서 수행될 수 있다. 가교제는 수용성 완충용액, 선택적으로 물과 섞이는 적은 양(통상 < 10부피%)의 극성 유기용매, 예를 들어, 메탄올, 에탄올 및 프로판올과 같은 여러 알콜류, 디메틸 포름아미드, 디메틸 아세트아미드 또는 디메틸설폭사이드

를 포함하는 완충용액에 고농도, 예를 들어 1-100 mM로 용해될 수 있고, 이 용액의 분취액은 세포 결합인자의 완충 수용액에 첨가된다. 분취액은 세포 결합인자 당 1-10개의 가교 그룹, 바람직하게는 1-5개의 가교 그룹을 도입하는 용액양이 적절한데, 첨가되는 부피는 세포 결합인자 용액 부피의 10%, 바람직하게는 5% 그리고 가장 바람직하게는 0-3%를 초과하여서는 아니된다. 세포 결합인자의 수용액은 pH 6 내지 pH 9 사이, 바람직하게는 pH 6.5 내지 pH 7.5 사이에서 완충되고, 이러한 pH 범위 유지를 위해 유용한 비-친핵성 완충용액 염을 포함할 수 있다. 전형적인 완충용액은 포스페이트, 트리에탄올아민.HCl, HEPES 및 MOPS 완충용액을 포함하고, 이들은 추가적인 성분으로서 수크로즈 및 염, 예를 들어 NaCl을 포함할 수 있다. 가교제 첨가 후 반응은 4℃ 내지 40℃의 온도, 바람직하기로는 대기 온도에서 인큐베이션된다. 반응의 진행은 495nm 또는 다른 적절한 파장에서 흡광도의 증가를 측정함으로써 모니터링될 수 있다. 반응이 완료된 후, 변형된 세포 결합인자의 분리가 통상의 방법으로 수행되는데, 예를 들어, 겔 여과 크로마토그래피 또는 흡착 크로마토그래피를 이용하여 수행될 수 있다.

[0100] 변형의 정도는 방출된 니트로피리딘 티온(nitropyridine thione), 디니트로피리딘 디티온, 카르복사미도피리딘 디티온(carboxamidopyridine dithione) 또는 디카르복사미도피리딘 디티온 그룹의 흡광도를 측정하여 평가될 수 있다. 본 발명을 제한하지 않는 실시예에서, 도 56은 세포 결합인자인 C242 항체가 본 발명의 설폰네이트 가교제로 변형된 결과를 도시하고 있다. 링커/항체(L/A) 도입 시간 경과에 따라 연결된 약물/항체(D/A)의 양이 도시되어 있다. 본 명세서에서 기술되는 하전된 가교제 또는 전구-하전된 가교제는 적합한 치환기를 갖는 세포 결합인자와 반응할 수 있는 광범위한 작용기를 갖는다. 예를 들어, 아미노 또는 히드록시 치환기를 갖는 세포 결합인자는 N-히드록시숙신이미드 에스테르를 갖는 가교제와 반응할 수 있고, 티올 치환기를 갖는 세포 결합인자는 말레이미도 그룹 또는 할로아세틸 그룹을 갖는 가교제와 반응할 수 있다. 또한, 카르보닐 치환기를 갖는 세포 결합인자는 하이드라자이드를 갖는 가교제와 반응할 수 있다. 본 발명의 기술분야의 당업자라면 세포 결합인자에 있을 수 있는 작용기의 알려진 반응성에 기초하여 어떤 가교제를 사용할지를 즉각 결정할 수 있을 것이다.

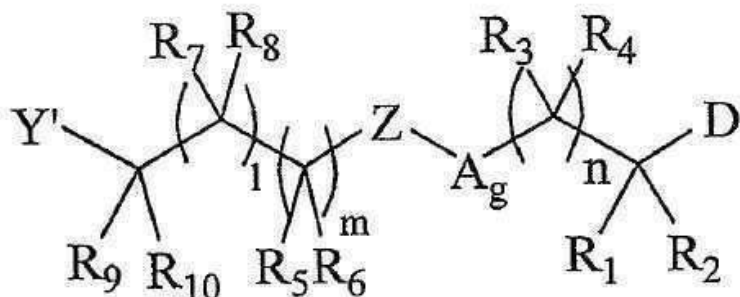
[0101] 양전하를 갖는 가교제(예를 들어, 도 71의 화합물 214)는 pH 5 내지 pH 9 하의 수용성 완충용액, 선택적으로 유기용매(1 내지 20% 디메틸아세트아미드 또는 에탄올)을 포함하는 수용성 완충용액에서 세포 결합인자와 직접 반응하여 양전하 및 티올기를 갖는 변형된 세포 결합인자를 제공할 수 있다. 세포 결합인자의 티올기는 말레이미도, 할로아세트아미도 또는 활성 다이설파이드(예를 들어, 피리딜디티오, 니트로피리딜디티오 그룹)를 갖는 세포 독성 약물과 반응하여 컨쥬게이트를 제공할 수 있다. 이러한 컨쥬게이트는 전술한 바와 같은 방법에 의해 정제된다.

[0102] 대안으로, 양전하 및 반응성 에스테르를 갖는 가교제(예를 들어, 도 71의 화합물 216)는 세포 결합인자와 직접 반응하여(예를 들어 리신 아미노기를 통해) 양전하 및 활성 다이설파이드를 도입할 수 있다. 전술한 바와 같이 티올기를 포함하는 세포독성 약물과의 반응은 양전하를 갖는 컨쥬게이트를 제공할 수 있게 한다.

[0104] 변형된 세포독성 약물

[0105] 본 발명의 가교제와의 반응에 의해 변형된 세포독성 약물은 하기 화학식 IV로 표시된다:

[0106] 화학식 IV



[0107]

[0108] 상기 화학식 IV에서 표시된 치환기들은 전술한 하전된 링커 또는 전구-하전된 링커와, 세포 결합인자-약물 컨쥬게이트에서 정의된 바와 같다.

[0109] 바람직한 실시예에 있어서, R₁, R₂, R₃, R₄, R₉, R₁₀ 중 하나는 설폰네이트, 포스페이트, 카르복실 또는 트리알킬암모늄으로부터 선택된 하전된 치환기이고 나머지는 수소이며, l, g 및 m은 각각 0이고, n=1이며, Y'는 다이설파이드 치환기, 말레이미도 그룹, 할로아세틸 그룹 또는 N-히드록시숙신이미드 에스테르이다. 다른 바람직한

실시예에 있어서, R_1 , R_2 , R_3 , R_4 , R_9 , R_{10} 중 하나는 설포네이트이고, 나머지는 수소이며, l , g 및 m 은 각각 0이고, $n=1$ 이며, Y' 는 말레이미도 그룹 또는 N-히드록시숙신이미드 에스테르이다. 또 다른 바람직한 실시예에 있어서, R_1 , R_2 , R_3 , R_4 , R_9 , R_{10} 중 하나는 설포네이트이고, 나머지는 수소이며, l , g 및 m 은 각각 0이고, $n=1$ 이며, Y' 는 N-히드록시숙신이미드 에스테르이다.

[0110] 바람직한 실시예에서, Z가 F1-E1-P-E2-F2 단위이면 E1 및 E2는 동일하거나 서로 다른 $C=O$ 또는 NR_{14} 이며 여기서 R_{14} 는 수소, 1개-6개 탄소원자를 갖는 선형 알킬, 또는 3개-6개 탄소원자를 갖는 분지형 또는 고리형의 알킬이고, P는 2-8개의 아미노산 길이의 펩타이드 단위이고 E1 또는 E2는 상기 펩타이드의 질소 말단, 탄소 말단 또는 상기 펩타이드의 아미노산들 중 하나의 측쇄를 통해 상기 펩타이드에 연결될 수 있으며, 바람직한 아미노산 잔기는 임의의 조합이나 순서(예를 들어, gly-gly-gly 또는 ala-leu-ala-leu 등)로 사용될 수 있는 글리신(gly), 알라닌(ala), 루신(leu), 글루탐산(glu) 또는 리신(lys)이고, F1 및 F2는 동일하거나 서로 다른 선택적 폴리에틸렌옥시 단위인 $(OCH_2CH_2)_p$ 로서 p 는 0 또는 2 부터 1000까지의 정수이다.

[0111] 보다 바람직한 실시예에서, Z가 F1-E1-P-E2-F2 단위이면 E1 및 E2는 동일하거나 서로 다른 $C=O$ 또는 NR_{14} 이며 여기서 R_{14} 는 수소, 또는 1개-6개 탄소원자를 갖는 선형 알킬이고, P는 2-5개의 아미노산 길이의 펩타이드 단위이고 E1 또는 E2는 상기 펩타이드의 질소 말단, 탄소 말단 또는 상기 펩타이드의 아미노산들 중 하나의 측쇄를 통해 상기 펩타이드에 연결될 수 있으며, F1 및 F2는 동일하거나 서로 다른 선택적 폴리에틸렌옥시 단위인 $(OCH_2CH_2)_p$ 로서 p 는 0 또는 2 부터 24까지의 정수이다.

[0112] 변형된 약물은 본 발명의 가교제와 반응시켜 세포 결합인자와 반응할 수 있는 작용기를 갖는 변형된 화학식 IV의 약물을 제공하여 준비할 수 있다. 예를 들어, 티올-함유 약물은 말레이미도 치환기를 갖는 하전된 화학식 I의 가교제 또는 전구-하전된 화학식 I의 가교제와 수용성 완충용액 하의 중성 pH에서 반응하여 티오에테르 연결을 통해 하전된 링커 또는 전구-하전된 링커에 연결된 약물을 제공할 수 있다. 티올-함유 약물은 피리딘디티오부분을 갖는 하전된 링커 또는 전구-하전된 링커와 다이설파이드 교환(disulfide exchange)을 수행하여 이황화 결합을 통해 상기 하전된 가교제 또는 전구-하전된 가교제에 부착된 변형된 약물을 제공할 수 있다. 히드록시기를 갖는 약물은 약한 염기 하에서 할로젠을 갖는 하전된 가교제와 반응하여 에테르 연결을 갖는 변형된 약물을 제공할 수 있다. 히드록시기를 함유하는 약물은 디시클로헥실카르보디미드(dicyclohexylcarbodiimide)와 같은 탈수제의 존재 하에서 카르복실 그룹을 갖는 하전된 화학식 I의 가교제와 축합되어 에스테르 연결을 제공할 수 있다. 아미노 그룹을 포함하는 약물은 하전된 화학식 I의 가교제 또는 전구-하전된 화학식 I의 가교제 상의 카르복실 그룹과 유사한 방식으로 축합반응을 수행하여 아마이드 결합을 제공할 수 있다. 변형된 약물은 실리카겔 또는 알루미늄 상에서의 칼럼 크로마토그래피, 결정화, 예비적 박층 크로마토그래피(preparatory thin layer chromatography), 이온교환 크로마토그래피 또는 HPLC와 같은 표준적인 방법들에 의해 정제될 수 있다.

[0114] 세포 결합인자(Cell-binding Agents)

[0115] 본 발명의 컨쥬게이트 및 변형된 세포 결합인자를 구성하는 세포 결합인자는 현재까지 알려진 어떤 종류일 수 있으며, 펩타이드 및 비-펩타이드를 포함한다. 세포 결합인자는 특이적 또는 비특이적 방식으로 세포와 결합할 수 있는 어떠한 화합물일 수 있다. 일반적으로, 이는 항체(특히, 단클론 항체 및 항체 단편), 아드넥틴(adnectins)(미국공개특허 제20070082365호), 인터페론(interferons), 림포카인(lymphokines), 호르몬(hormones), 성장인자(growth factors), 비타민, 양분 전송 분자(nutrient-transport molecules)(예를 들어, 트랜스페린(transferrin)), 또는 그 밖의 세포 결합 분자나 물질일 수 있다.

[0116] 세포 결합인자가 항체(예를 들어 쥐 항체, 인간 항체, 인간화된 항체, 표면이 개질된 항체 또는 키메라 항체 또는 당업자에게 알려진 그 밖의 항체 등)이면, 이는 폴리펩타이드로서 트랜스메브레인 분자(예를 들어, 리셉터) 또는 성장인자와 같은 리간드일 수 있는 항원에 결합한다. 예시적인 항원으로서, 레닌(renin)과 같은 분자; 인간 성장 호르몬 및 소 성장 호르몬을 포함하는 성장호르몬; 성장 호르몬 방출 인자; 부갑상선 호르몬(parathyroid hormone); 갑상선 자극 호르몬; 리포단백질; α -1-항 트립신; 인슐린 A-사슬; 인슐린 B-사슬; 프로인슐린(proinsulin); 여포 자극 호르몬; 칼시토닌; 황체 형성 호르몬; 글루카곤; 팩터 vmc, 팩터 IX, 티슈 팩터(TF) 및 폰빌레브란트인자(von Willebrands factor)와 같은 응고인자; 단백질 C와 같은 항-응고 인자; 심방 나트륨이뇨성인자(atrial natriuretic factor); 폐 표면활성 물질(lung surfactant); 우로키나아제(urokinase), 인간 오줌 또는 t-PA(tissue-type plasminogen activator)와 같은 플라스미노겐 활성화 인자; 봄베신(bombesin); 트롬빈; 조혈성장인자(hemopoietic growth factor); TNF- α 및 TNF- β (tumor necrosis

factor- α , β); 엔케팔리나아제(enkephalinase); RANTES (통상적인 T-세포 발현 및 분비 활성화에 대해 조절); 인간 대식세포 염증 단백질(MIP-1- α); 인간 혈청 알부민과 같은 혈청 알부민; 뮐러관억제물질(Muellerian-inhibiting substance); 렐락신(relaxin) A-사슬; 렐락신 B-사슬; 프로렐락신(prorelaxin); 마우스 성선자극호르몬(gonadotropin)-연관 펩타이드; 베타라타마제와 같은 미생물 단백질; DNase; IgE; CTLA-4와 같은 세포독성 T-임파구 연관 항원(CTLA); 인히빈(inhibin); 액티빈(activin); VEGF(vascular endothelial growth factor); 호르몬 또는 성장 인자 수용체; 단백질 A 또는 D; 류머티즘 인자 (rheumatoid factors); BDNF(bone-derived neurotrophic factor), 뉴로트로핀(neurotrophin)-3, -4, -5, 또는 -6 (NT-3, NT4, NT-5, 또는 NT-6), 또는 NGF- β 와 같은 신경성장인자와 같은 신경영양인자; PDGF(platelet-derived growth factor); aFGF 및 bFGF와 같은 섬유아세포 증식인자; EGF(epidermal growth factor); TGF-알파와, TGF- β 1, TGF- β 2, TGF- β 3, TGF- β 4 또는 TGF- β 5를 포함하는 TGF-베타와 같은 TGF(transforming growth factor); IGF-I 및 IGF-II(insulin-like growth factor-I 및 II); des(1-3)-IGF-I (즉 IGF-I), IGF 결합 단백질, EpCAM, GD3, FLT3, PSMA, PSCA, MUC1, MUC16, STEAP, CEA, TENB2, EphA 수용체, EphB 수용체, 엽산 수용체, 메조테린(mesothelin), 크립토(cripto), 알파_v베타₆, 인테그린(integrins), VEGF, VEGFR, 트랜스페린 수용체, IRTA1, IRTA2, IRTA3, IRTA4, IRTA5; CD2, CD3, CD4, CD5, CD6, CD8, CD11, CD14, CD19, CD20, CD21, CD22, CD23, 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 하나 이상의 종양-연관 항원 또는 세포 표면 수용체에 결합하는 항체(미국공개특허 제20080171040호 또는 미국공개특허 제20080305044호에 개시된 것)와 같은 CD 단백질; 에리트로포이에틴(erythropoietin); 골유도성 인자(osteoinductive factors); 항체 독소(immunotoxins); BMP(bone morphogenetic protein); 인터페론-알파, 베타, 감마와 같은 인터페론; M-CSF, GM-CSF 및 G-CSF와 같은 CSF(colony stimulating factors); IL-1 내지 IL-10과 같은 인터루킨; 과산화물제거효소(superoxide dismutase); T-세포 수용체; 표면 막 단백질(surface membrane proteins); 붕괴촉진인자(decay accelerating factor); HIV 엔벨로프 일부와 같은 바이러스성 항원; 수송 단백질(transport proteins); 귀소 수용체(homing receptors); 어드레신(addressins); 조절 단백질(regulatory proteins); CD11a, CD11b, CD11c, CD18, ICAM, VLA-4, EpCAM 및 VCAM과 같은 인테그린; HER2, HER3 또는 HER4 수용체와 같은 종양 연관 항원; 및 상기 폴리펩타이드의 단편을 들 수 있다.

[0117] 또한, 본 발명에 의해 포괄되는 항체들에 대한 바람직한 항원들로는 CD3, CD4, CD8, CD19, CD20, CD34 및 CD46과 같은 CD 단백질; EGF 수용체, HER2, HER3 또는 HER4 수용체와 같은 ErbB 수용체 패밀리 중 일원; LFA-1, Mac1, p150.95, VLA-4, ICAM-1, VCAM, EpCAM, 알파₄/베타₇ 인테그린, 및 알파 또는 베타 서브유닛을 포함하는 알파_v/베타₃ 인테그린(예를 들어, 항-CD11a, 항-CD18 또는 항-CD11b 항체들)과 같은 세포부착분자(cell adhesion molecules); VEGF와 같은 성장 인자; TF(tissue factor); TGF- β ; 알파 인터페론(α -IFN); IL-8과 같은 인터루킨; IgE; 혈액형항원(blood group antigens) Apo2; 사멸 수용체(death receptor); flk2/flt3 수용체; OB(obesity) 수용체; mpl 수용체; CTLA-4; 단백질 C 등을 들 수 있다. 사용가능한 바람직한 항체들로서, CD2, CD3, CD4, CD5, CD6, CD11, CD19, CD20, CD22, CD26, CD30, CD33, CD37, CD38, CD40, CD44, CD56, CD79, CD105, CD138, EphA 수용체(예를 들어, EphA2 수용체), EphB 수용체, EGFr, EGFRvIII, HER2, HER3, 트라스투주맵(trastuzumab), 퍼투주맵(pertuzumab), 메조테린(mesothelin), 크립토(cripto), 알파_v베타₆, 인테그린, VEGF, VEGFR, 엽산 수용체(예를 들어, FOLR1), 트랜스페린 수용체, GD3, EpCAM에 대한 항체들, 또는 미국공개특허 제20080171040호 또는 미국공개특허 제20080305044호에 개시된 하나 이상의 종양-연관 항원 또는 세포 표면 수용체에 결합하는 항체를 들 수 있으며 이들은 본 명세서에 참고문헌으로서 통합된다.

[0118] 사용될 수 있는 세포 결합인자의 추가 예로서는 다음과 같은 것이 있다:

[0119] - 표면 개질된 항체 (미국특허 제5,639,641호);

[0120] - 인간화된 또는 완전히 인간의 항체로서 제한되는 것은 아니나 huMy9-6, huB4, huC242, huN901, DS6, CD38, IGF-IR, CNTO 95, B-B4, 트라스투주맵(trastuzumab), 퍼투주맵(pertuzumab), 비바투주맵(bivatuzumab), 시브로투주맵(sibrotuzumab) 및 리톡시맵(rituximab)(예를 들어, 미국특허 제5,639,641호, 미국특허 제5,665,357호 및 미국특허 제7,342,110호, 미국가출원 제60/424,332호, 국제공개특허 WO 02/16,401호, 미국공개특허 제20060045877호, 미국공개특허 제20060127407호, 미국공개특허 제20050118183호, Pedersen et al., (1994) *J. Mol. Biol.* 235, 959-973, Roguska et al., (1994) *Proceedings of the National Academy of Sciences*, Vol 91, 969-973, *supra*, Colomer et al., *Cancer Invest.*, 19: 49-56 (2001), Heider et al., *Eur. J. Cancer*, 31A: 2385-2391 (1995), Welt et al., *J. Clin. Oncol.*, 12: 1193-1203 (1994), 그리고 Maloney et al.,

Blood, 90: 2188-2195 (1997) 참조); 및

- [0121] - sFv, Fab, Fab' 및 F(ab')₂와 같은 항체의 에피통 결합 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)).
- [0122] 다른 세포결합 단백질 및 폴리펩타이드를 포함하는 추가의 세포 결합인자로서 제한되는 것은 아니나 아래와 같은 것들이 예시된다:
- [0123] - 앵키린 반복 단백질(Ankyrin repeat proteins) (DARPs; Zahnd et al., *J. Biol. Chem.*, 281, 46, 35167-35175, (2006); Binz, H.K., Amstutz, P. & Pluckthun, A. (2005) *Nature Biotechnology*, 23, 1257-1268) 또는 앵키린-유사 반복 단백질 또는 하기 문헌에 기재된 합성 펩타이드(미국공개특허 제20070238667호; 미국특허 제7,101,675호, 국제공개특허 WO/2007/147213호 및 국제공개특허 WO/2007/062466호);
- [0124] - 인터페론(예를 들어, 알파, 베타, 감마);
- [0125] - IL-2, IL-3, IL-4, IL-6와 같은 림포카인;
- [0126] - 호르몬으로서, 예를 들어 인슐린, TRH(갑상선 자극 호르몬 방출 호르몬), MSH(멜라닌 세포 자극 호르몬), 안드로젠 및 에스트로젠과 같은 스테로이드 호르몬;
- [0127] - 엽산과 같은 비타민;
- [0128] - EGF, TGF- α , G-CSF, M-CSF 및 GM-CSF와 같은 성장인자 및 콜로니 자극인자(colony stimulating factor)(Burgess, *Immunology Today* 5:155-158 (1984)); 및
- [0129] - 트랜스페린(O'Keefe et al. *J. Biol. Chem.* 260:932-937 (1985)).
- [0131] 단클론 항체 기술은 단클론 항체 형태의 매우 특이적인 세포결합인자의 제조를 가능하게 한다. 특히, 본 기술분야에서 잘 알려진 것이 마우스, 래트, 햄스터 또는 기타 다른 포유류를 본래의 표적 세포, 표적 세포로부터 분리된 항원, 전체 바이러스(whole virus), 전체 바이러스를 약화시킨 것, 바이러스 외피 단백질과 같은 바이러스 단백질로 면역화시켜 생산되는 단클론 항체의 제조기술이다. 감작된 인간 세포도 사용될 수 있다. 단클론 항체의 다른 제조 기술은 sFv (단일 사슬 가변 영역), 특히 인간의 sFv의 파아지 라이브러리를 사용하는 것이다(예를 들어, Griffiths et al., 미국특허 제5,885,793호; McCafferty et al., WO 92/01047; Liming et al., WO 99/06587 참조).
- [0132] 적절한 세포결합인자의 선택은 표적이 되는 특정 세포집단에 좌우되나, 일반적으로 적절한 형태가 입수가능하다면 단클론 항체 및 이의 에피통 결합 단편이 선호된다.
- [0133] 예를 들어, 단클론 항체 My9는 AML(Acute Myeloid Leukemia) 세포에서 발견된 CD33 항원에 특이적인 쥐의 IgG_{2a} 항체이고(Roy et al. *Blood* 77:2404-2412 (1991)), AML 환자를 치료하기 위해 사용될 수 있다. 유사하게, 단클론 항체 항-B4는 B 세포 상의 CD19 항원에 결합하는 쥐의 IgG₁이고(Nadler et al, *J. Immunol.* 131:244-250 (1983)), 표적 세포가 B 세포이거나 비호지킨림프종(non-Hodgkin's lymphoma) 또는 만성 림프구성 백혈병(chronic lymphoblastic leukemia)에서와 같이 상기 항원을 발현하는 질환 세포인 경우에 사용될 수 있다. 유사하게, 항체 N901은 폐암종의 작은 세포 상 그리고 신경내분비 유래의 다른 종양 세포 상에서 발견된 CD56에 결합하는 쥐의 단클론 항체 IgG₁이고(Roy et al. *J. Nat. Cancer Inst.* 88:1136-1145 (1996)), C242 항체는 CanAg 항원에 결합하고, 퍼트주맵(pertuzumab), 트라스투주맵(trastuzumab)은 HER2/neu에 결합하며, 항-EGF 수용체 항체가 있다.
- [0134] 또한, 골수 세포에 결합하는 GM-CSF는 급성 골수성 백혈병 세포에 대한 세포 결합인자로서 사용될 수 있다. 활성화된 T-세포에 결합하는 IL-2는 이식거부 반응 방지, 이식편대 숙주 질환의 방지(graft-versus-host disease) 및 급성 T-세포 백혈병 치료에 사용될 수 있다. 멜라닌 세포에 결합하는 MSH는 흑색종 치료에 사용될 수 있다. 난소암이나 기타 암에서 발현되는 엽산 수용체(folate receptor)를 표적으로 하는 엽산 또한 적합한 세포 결합인자이다.
- [0135] 유방암 및 고환암은 세포 결합인자로서 각각 에스트로젠(또는 에스트로젠 유사체) 또는 안드로젠(또는 안드로젠 유사체)을 사용하여 성공적으로 표적화될 수 있다.

[0137] **약물**

[0138] 본 발명에서 사용될 수 있는 약물은 화학치료제를 포함한다. "화학치료제"는 암 치료에 유용한 화합물이다. 화학치료제의 예로서, 티오테과 및 시클로포스파미드(cyclophosphamide)(CYTOXANTM)와 같은 알킬화제(alkylating agents); 부설판, 임프로설판(improsulfan) 및 피포설판(piposulfan)과 같은 알킬 설포네이트; 벤조포다(benzodopa), 카르보콘(carboquone), 메투르포다(meturedopa) 및 우레포다(uredopa)와 같은 아지리딘; 알트레타민(altretamine), 트리에틸렌멜라민(triethylenemelamine), 트리에틸렌포스포아미드(triethylenephosphoramidate), 트리에틸렌티오포스포아미드(triethylenethiophosphoramidate) 및 트리메틸로멜라민(trimethylolomelamine)을 포함하는 메틸멜라민(methylmelamines) 및 에틸렌이민; 아세토게닌(acetogenins) (특히 부라타신(bullatacin) 및 부라타시논(bullatacinone)); 캄토테신 (합성 유사체인 토포테칸 포함); 브리오스타틴; 칼리스타틴(callystatin); CC-1065 (이것의 아도제레신(adozelesin), 카르제레신(carzelesin) 및 비제레신(bizelesin) 합성 유사체 포함); 크립토파이신 (특히 크립토파이신 1 및 크립토파이신 8); 돌라스타틴(dolastatin); 듀오카르마이신(duocarmycin) (합성 유사체인 KW-2189 및 CBI-TMI 포함); 엘류테로빈(eleutherobin); 판크라티스타틴(pancratistatin); 살코딕틴(sarcodictyin); 스폰기스타틴(spongistatin); 클로람부실(chlorambucil), 클로나파진(chlornaphazine), 클로포스파미드(cholophosphamide), 에스트라머스틴(estrarnustine), 이포스파미드(ifosfamide), 메클로레타민(mechlorethamine), 메클로레타민 옥사이드 하이드로클로라이드(mechlorethamine oxide hydrochloride), 멜파란(melphalan), 노베티킨(novembichin), 페네스테린(phenesterine), 프레드니머스틴(prednimustine), 트로포스파미드(trofosfamide), 우라실 머스타드(uracil mustard)와 같은 니트로젠 머스타드(nitrogen mustards); 카무스틴(carmustine), 클로로조토신(chlorozotocin), 포트머스틴(fotemustine), 로머스틴(lomustine), 니머스틴(nimustine), 라니머스틴(ranimustine)과 같은 니트로소우레아(nitrosureas); 엔다이인 항생제(enediynes antibiotics)(예를 들어, 칼리키아마이신(calicheamicin), 특히 칼리키아마이신-감마 1 및 칼리키아마이신 세타 I; Angew Chem Intl. Ed. Engl. 33:183-186 (1994) 참조; 다인마이신 A를 포함하는 다인마이신(dynemicin); 에스페라마이신(esperamicin); 네오카르지노스타틴 발색단(neocarzinostatin chromophore) 및 연관된 색소단백질 엔다이인 항생제 발색단(chromoprotein enediyne antibiotic chromomophores)), 아크라시노마이신(aclacinomysins), 악티노마이신(actinomycin), 아우트라마이신(authramycin), 아자세린(azaserine), 블레오마이신(bleomycins), 캅티노마이신(cactinomycin), 카라비신(carabycin), 카미노마이신(carminomycin), 카르지노필린(carzinophilin)과 같은 항생제; 크로모마이신(chromomycins), 닥티노마이신(dactinomycin), 다우노루비신(daunorubicin), 데토루비신(detorubicin), 6-디아조-5-옥소-L-노르루신, 독소루비신(모폴리노-독소루비신, 시아노모폴리노-독소루비신, 2-피롤리노-독소루비신 및 데옥시독소루비신 포함), 에피루비신(epirubicin), 에소루비신(esorubicin), 이다루비신(idarubicin), 마르셀로마이신(marcellomycin), 니토마이신(nitomycins), 마이코페놀산 (mycophenolic acid), 노갈라마이신(nogalamycin), 올리보마이신(olivomycins), 페프로마이신(peplomycin), 포트피로마이신(potfiromycin), 퓨로마이신(puromycin), 쿼라마이신(quelamycin), 로도루비신(rodorubicin), 스트렙토니그린(streptonigrin), 스트렙토조신(streptozocin), 튜베르시딘(tubercidin), 우베니멕스(ubenimex), 지노스타틴(zinostatin), 조루비신(zorubicin); 메토티렉세이트 (methotrexate) 및 5-플루오로우라실(5-FU)과 같은 항-대사제(anti-metabolites); 데노프테린(denopterin), 메토티렉세이트, 프테로프테린(pteropterin), 트리메트렉세이트(trimetrexate)와 같은 엽산 유사체; 플루다라빈(fludarabine), 6-머캅토피린, 티아미피린(thiamiprine), 티오구아닌(thioguanine)과 같은 퓨린 유사체; 안시타빈(ancitabine), 아자시타딘(azacitidine), 6-아자유리딘(6-azauridine), 카르모푸르(carmofur), 시타라빈(cytarabine), 디데옥시유리딘(dideoxyuridine), 독시플루리딘(doxifluridine), 에노시타빈(enocitabine), 플록수리딘(floxuridine), 5-FU와 같은 피리미딘 유사체; 칼루스테론(calusterone), 드로모스타논 프로피오네이트(dromostanolone propionate), 에피티오스타놀(epitiostanol), 메피티오스탄(mepitiostane), 테스트락톤(testolactone)과 같은 안드로겐; 아미노글루티미드(aminogluthetamide), 미토탄(mitotane), 트릴로스탄(trilostane)과 같은 항-아드레날(anti-adrenals); 프로리닉산(frolic acid)과 같은 엽산 보충제(folic acid replenisher); 아세글라톤(aceglatone); 알도포스파미드 글리코사이드(aldophosphamide glycoside); 아미노레불린산(aminolevulinic acid); 암사크린(amsacrine); 베스트라부실(bestrabucil); 비산트렌(bisantrene); 에다트렉세이트(edatraxate); 데포파민(defofamine); 데메콜친(demecolcine); 디아지큐온(diaziquone); 엘포미틴(elfomithine); 엘립티늄 아세테이트(elliptinium acetate); 에포틸론(epothilone); 에토글루시드(etoglucid); 갈륨 질산염(gallium nitrate); 히드록시우레아(hydroxyurea); 렌티난(lentinan); 로니다민(lonidamine); 메이탄시네(maytansine) 및 안사미토신(ansamitocins)과 같은 메이탄시노이드; 미토구아존(mitoguazone); 마이토잔트론(mitoxantrone); 모피다몰(mopidamol); 니트라크린(nitracrine); 펜토스타틴(pentostatin); 페나메트(phenamet); 피라루비신

(pirarubicin); 포도필린산(podophyllinic acid); 2-에틸하드라자이드(2-ethylhydrazide); 프로카르바진(procarbazine); PSK[®]; 라조산(razoxane); 리족신(rhizoxin); 시조피란(sizofiran); 스피로게르마늄(spirogermanium); 테누아존산(tenuazonic acid); 트리아지큐온(triaziquone); 2,2',2"-트리클로로트리에틸아민; 트리코테센(trichothecenes) (특히 T-2 독신, 베라쿠린 A(verracurin A), 로리딘 A(roridin A) 및 안구이딘(anguidine)); 우레탄(urethan); 빈데신(vindesine); 다카바진(dacarbazine); 만노머스틴(mannomustine); 미토브로니톨(mitobronitol); 미토락톨(mitolactol); 피포브로만(pipobroman); 가시토신(gacytosine); 아라비노시드(arabinoside)("Ara-C"); 시클로포스파미드(cyclophosphamide); 티오테파(thiotepa); 탁소이드(taxoids), 예를 들어 파클리탁셀(paclitaxel) (TAXOL[®], Bristol-Myers Squibb Oncology, Princeton, N.J.) 및 독세탁셀(doxetaxel) (TAXOTERE[®], Rhone-Poulenc Rorer, Antony, France); 클로람부실(chlorambucil); 젬시타빈(gemcitabine); 6-티오구아닌(6-thioguanine); 머캅토피린; 메토티렉세이트; 시스플라틴(cisplatin) 및 카보플라틴(carboplatin)과 같은 백금 유사체; 빈블라스틴(vinblastine); 백금(platinum); 에토포시드(etoposide)(VP-16); 이포스파마이드(ifosfamide); 미토마이신 C; 미토잔트론(mitoxantrone); 빈크리스틴(vincristine); 비노렐빈(vinorelbine); 나벨빈(navelbine); 노반트론(novantrone); 테니포시드(teniposide); 다우노마이신(daunomycin); 아미노프테린(aminopterin); 젤로다(xeloda); 이반드로네이트(ibandronate); CPT-11; 토포아이소머라제 저해제(topoisomerase inhibitor) RFS 2000; DMFO(difluoromethylomithine); 레티노산(retinoic acid); 카페시타빈(capecitabine); 그리고 전술한 약물들의 약제학적으로 허용가능한 염, 산 또는 유도체를 들 수 있다.

[0139] 또한, 상기 약물에는 종양에 대한 호르몬의 작용을 조절하거나 저해하는 항-호르몬제가 포함되는데, 그 예로서 타목시펜(tamoxifen), 라록시펜(raloxifene), 아로마타제(aromatase) 저해 4(5)-이미다졸, 4-히드록시타목시펜(4-hydroxytamoxifen), 트리옥시펜(trioxifene), 케옥시펜(keoxifene), LY117018, 오나프리스톤(onapristone) 및 토레미펜(toremifene)(화레스톤(Fareston))과 같은 항-에스트로겐; 플루타미드(flutamide), 니루타미드(nilutamide), 비카루타미드(bicalutamide), 류프롤리드(leuprolide) 및 고세렐린(goserelin)과 같은 항-안드로겐; siRNA; 그리고 전술한 약물들의 약제학적으로 허용가능한 염, 산 또는 유도체를 들 수 있다. 본 발명에 사용될 수 있는 다른 화학치료제로는 미국공개특허 제20080171040호 또는 미국공개특허 제20080305044호에 개시된 것들을 들 수 있고, 이들은 본 명세서에 참고문헌으로서 통합된다.

[0140] 바람직한 실시예에서, 화학치료 약물은 저분자 약물일 필요가 있다. "저분자 약물"이란 용어는 유기 화합물, 무기 화합물 또는 유기금속화합물을 언급하기 위해 본 명세서에서 광범위하게 사용되는데, 이들은 예를 들어 분자량 100 내지 1500, 보다 적합하게는 분자량 120 내지 1200, 바람직하게는 분자량 200 내지 1000 그리고 전형적으로는 분자량 1000 미만을 가질 수 있다. 본 발명의 저분자 약물은 분자량 1000 미만을 갖는 올리고펩타이드 및 다른 생리활성물질(biomolecules)을 포함한다. 저분자 약물은 국제공개공보 W005058367A2호, 유럽특허출원 제85901495호 및 제8590319호 그리고 미국특허 제4,956,303호 등에 잘 설명되어 있고 그 전체 내용은 참고문헌으로서 본 명세서에 통합된다.

[0141] 바람직한 저분자 약물은 세포 결합인자에 연결을 가능하게 하는 것이다. 본 발명은 공지의 약물 뿐만아니라 알려질 약물도 포함한다. 특히 바람직한 저분자 약물은 세포독성제를 포함한다.

[0142] 세포 독성제는 티올 부분을 포함하고, 세포를 사멸시키거나 일부의 경우에는 세포 생존을 감소시키는 화합물일 수 있다.

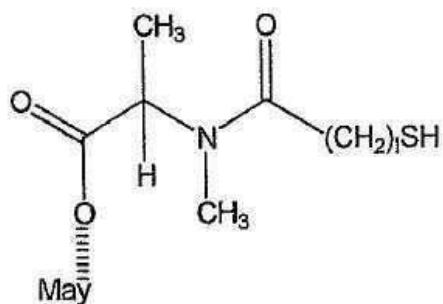
[0143] 바람직한 세포 독성제는 메이탄시노이드 화합물, 탄산 화합물, CC-1065 화합물, 다우노루비신(daunorubicin) 화합물 및 독소루비신 화합물, 피롤로벤조디아제핀 다이머(pyrrolobenzodiazepine dimers), 칼리키아마이신(calicheamicins)이다. 아우리스타틴(Auristatins) 및 그 유사체와 유도체 중 일부에 대해서는 후술한다.

[0144] 또한, 반드시 저분자일 필요가 없는 다른 세포 독성제, 예를 들어 siRNA와 같은 물질도 본 발명의 보호범위에 포괄된다. 예를 들어, siRNA는 올리고뉴클레오타이드의 변형을 위해 일반적으로 사용되는 방법에 의해 본 발명의 가교체에 연결될 수 있다(예를 들어, 미국공개특허 제20050107325호 및 제20070213292호 참조). 따라서, 3' 또는 5'-포스포라미디트(phosphoramidite) 형태의 siRNA는 히드록시 작용기를 갖는 가교체의 한쪽 말단과 반응하여 siRNA와 가교체 사이의 에스테르 결합을 제공하게 된다. 유사하게, siRNA 포스포라미디트와 아미노기 말단을 가진 가교체와의 반응은 아민을 통해 가교체를 siRNA에 연결하게 된다. siRNA는 아래와 같은 문헌에 상세히 설명되어 있으며, 이들 문헌은 그 전체 내용이 본 명세서에 참고문헌으로 통합된다(미국공개특허 제20070275465호, 제20070213292호, 제20070185050호, 제20070161595호, 제20070054279호, 제20060287260호,

제20060035254호, 제20060008822호, 제20050288244호 및 제20050176667호).

- [0146] **메이탄시노이드**
- [0147] 본 발명에 사용될 수 있는 메이탄시노이드는 본 발명의 기술분야에서 잘 알려진 약물이며 공지된 방법에 따라 천연물로부터 분리되거나 합성될 수 있다.
- [0148] 적합한 메이탄시노이드의 예로서 메이탄시놀과 이의 유사체를 포함한다. 메이탄시놀의 유사체의 예는 변형된 방향족 고리를 갖는 유사체와 다른 위치에서의 변형을 갖는 유사체를 포함한다.
- [0149] 변형된 방향족 고리를 갖는 적합한 메이탄시놀 유사체의 특징에는 다음과 같다:
- [0150] (1) C-19-데클로로(dechloro)(미국특허 제4,256,746호) (안사미토신 P2(ansamytocin P2)의 LAH 환원에 의해 제조);
- [0151] (2) C-20-히드록시 (또는 C-20-데메틸(demethyl)) +/-C-19-데클로로 (미국특허 제4,361,650호 및 제4,307,016호) (스트렙토마이세스(*Streptomyces*) 또는 악티노마이세스(*Actinomyces*)를 이용한 탈메틸화, 또는 LAH를 이용한 탈염소화에 의해 제조); 및
- [0152] (3) C-20-데메톡시(demethoxy), C-20-아실옥시(-OCOR), +/-데클로로 (미국특허 제4,294,757호) (아실 클로라이드를 이용한 아실화에 의해 제조).
- [0153] 다른 위치에서 변형을 갖는 적합한 메이탄시놀 유사체의 특징에는 다음과 같다:
- [0154] (1) C-9-SH(미국특허 제4,424,219호) (H_2S 또는 P_2S_5 와 메이탄시놀의 반응에 의해 제조);
- [0155] (2) C-14-알콕시메틸(데메톡시/ CH_2OR) (미국특허 제4,331,598호);
- [0156] (3) C-14-히드록시메틸 또는 아실옥시메틸(acyloxymethyl) (CH_2OH 또는 CH_2OAc) (미국특허 제4,450,254호) (*Nocardia*로부터 준비);
- [0157] (4) C-15-히드록시/아실옥시(미국특허 제4,364,866호) (스트렙토마이세스(*Streptomyces*)에 의한 메이탄시놀의 전환에 의해 제조);
- [0158] (5) C-15-메톡시 (미국특허 제4,313,946호 및 제4,315,929호) (*Trewia nudiflora*로부터 분리);
- [0159] (6) C-18-N-데메틸(demethyl)(미국특허 제4,362,663호 및 제4,322,348호) (스트렙토마이세스(*Streptomyces*)에 의한 메이탄시놀의 탈메틸화에 의해 제조); 및
- [0160] (7) 4,5-데옥시(deoxy) (미국특허 제4,371,533호) (메이탄시놀의 티타늄 트리클로라이드(titanium trichloride)/LAH 환원에 의해 제조).
- [0161] 본 발명에 유용한 티올 함유 메이탄시노이드의 합성은 미국특허 제 5,208,020호, 제5,416,064호 및 미국공개특허 제20040235840호에 상세히 기재되어 있다.
- [0162] C-3 위치, C-14 위치, C-15 위치 또는 C-20 위치에서 티올 부분을 갖는 메이탄시노이드가 유용할 것으로 기대된다. C-3 위치가 선호되며, 특히 메이탄시놀의 C-3 위치가 선호된다. 또한, N-메틸-알라닌-함유 C-3 티올 부분을 갖는 메이탄시노이드, N-메틸-시스테인-함유 C-3 티올 부분을 갖는 메이탄시노이드 및 이들 각각의 유사체가 선호된다.
- [0163] 본 발명에 유용한 N-메틸-알라닌-함유 C-3 티올 부분을 갖는 메이탄시노이드유도체의 특징에는 다음과 같은 화학식 M1, M2, M3, M6 및 M7로 표현된다.

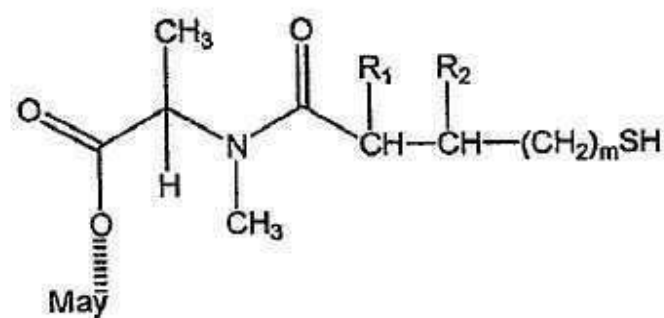
[0165] 화학식 M1



[0166]

[0167] 상기 화학식 M1에서 l은 1 부터 10까지의 정수이고, may는 메이탄시노이드이다.

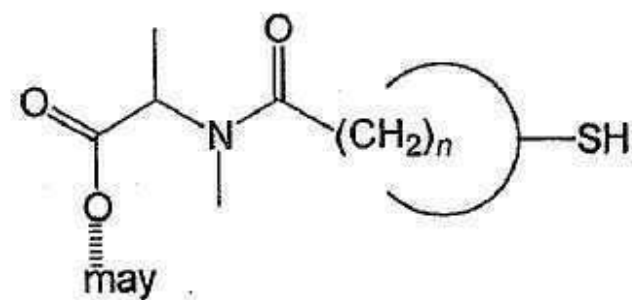
[0169] 화학식 M2



[0170]

[0171] 상기 화학식 M2에서 R₁ 및 R₂는 동일하거나 서로 다른 수소, CH₃ 또는 CH₂CH₃이고; m은 0, 1, 2 또는 3이며; may는 메이탄시노이드이다.

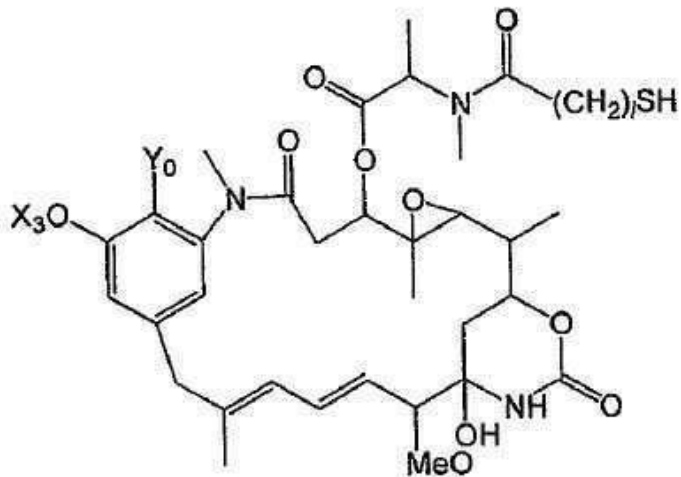
[0173] 화학식 M3



[0174]

[0175] 상기 화학식 M3에서 n은 3 부터 8까지의 정수이고, may는 메이탄시노이드이다.

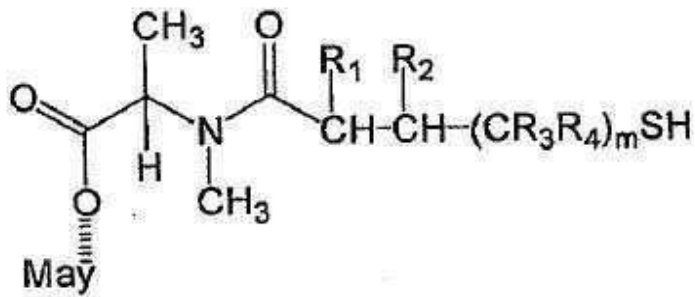
[0177] 화학식 M6



[0178]

[0179] 상기 화학식 M6에서 l은 1, 2 또는 3이고; Y₀ is Cl 또는 H이며; X₃는 H 또는 CH₃이다.

[0181] 화학식 M7

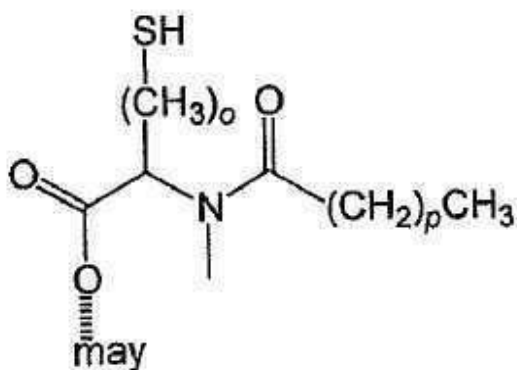


[0182]

[0183] 상기 화학식 M7에서 R₁, R₂, R₃, R₄는 동일하거나 서로 다른 H, CH₃ 또는 CH₂CH₃이고; m은 0, 1, 2 또는 3이며; may는 메이탄시노이드이다.

[0185] N-메틸-시스테인-함유 C-3 티올 부분을 갖는 메이탄시노이드 유도체의 특징예는 다음과 같은 화학식 M4 및 M5로 표현된다.

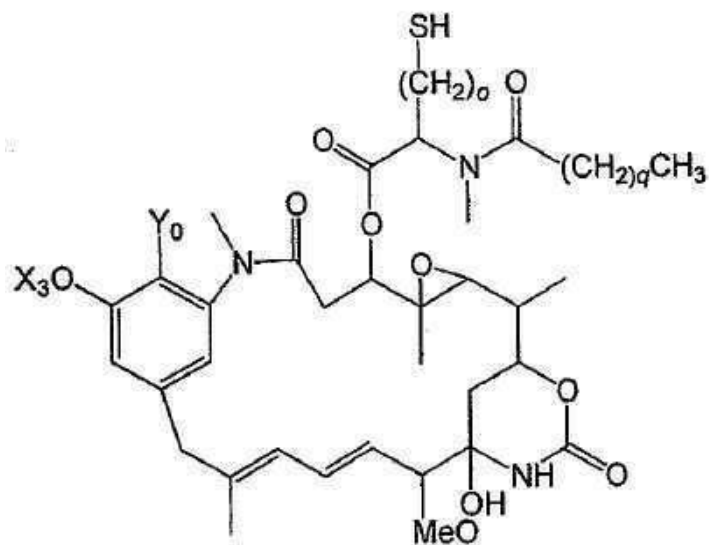
[0187] 화학식 M4



[0188]

[0189] 상기 화학식 M4에서 o는 1, 2 또는 3이고; p는 0 내지 10까지의 정수이며; may는 메이탄시노이드이다.

[0191] 화학식 M5



[0192]

[0193] 상기 화학식 M5에서 o는 1, 2 또는 3이고; q는 0 내지 10까지의 정수이며; Y₀는 Cl 또는 H이고; X₃는 H 또는 CH₃이다.

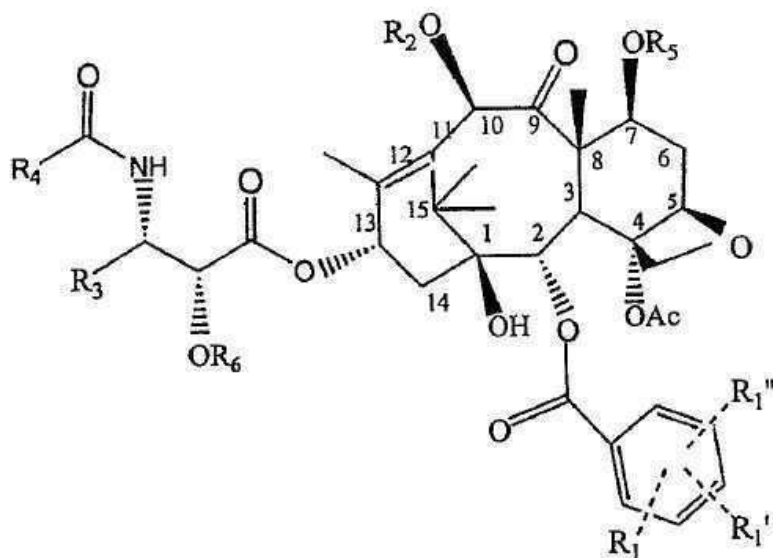
[0195] 바람직한 메이탄시노이드는 미국특허 제5,208,020호, 제5,416,064호, 제6,333,410호, 제6,441,163호, 제6,716,821호, RE39,151 및 제7,276,497호에 기술된 것이다.

[0197] 탁산(Taxanes)

[0198] 또한 본 발명에 따른 세포 독성제는 탁산일 수 있다.

[0199] 본 발명에서 사용될 수 있는 탁산은 티올 부분을 포함하도록 변형되었다. 본 발명에 유용한 일부 탁산은 하기 화학식 T1을 갖는다.

[0200] 화학식 T1



[0201]

[0202] 이들 새로운 탁산의 4가지 예가 하기에 기술된다.

[0203] 실시예 (1), (2), (3) 및 (4)에 있어서, R₁, R₁' 및 R₁''는 동일하거나 서로 다른 수소, 또는 F, NO₂, CN, Cl, CHF₂, 또는 CF₃와 같은 전자끄는 기(electron withdrawing group) 또는 -OCH₃, -OCH₂CH₃, -NR₇R₈, -OR₉와 같은 전자주는 기(electron donating group)이고, 여기서, R₇과 R₈은 동일하거나 서로 다른 1개-10개의 탄소원자를 갖는 선형, 분지형 또는 고리형 알킬기, 또는 단순한 또는 치환된 1개-10개의 탄소원자를 갖는 아릴이다. 바람직

하계는, R_7 과 R_8 의 탄소원자의 수는 1개-4개이다. 또한, 바람직하게는 R_7 과 R_8 은 동일하다. 바람직한 $-NR_7R_8$ 그룹의 예로는 디메틸 아미노, 디에틸 아미노, 디프로필 아미노 및 디부틸 아미노를 들 수 있고, 이때 부틸 부분은 1차 부틸, 2차 부틸, 3차 부틸 또는 이소부틸 중 어느 것일 수 있다. R_9 는 1개-10개 탄소원자를 갖는 선형, 분지형 또는 고리형 알킬이다.

[0204] R_1 은 바람직하게는 OCH_3 , F, NO_2 , 또는 CF_3 이다.

[0205] 또한, 바람직하게는 R_1 은 메타 위치에 있고, R_1' 및 R_1'' 는 H 또는 OCH_3 이다.

[0206] 실시예 (1), (2) 및 (4)에 있어서, R_2 는 수소, 헤테로 고리, 탄소원자 1개-10개를 갖는 선형, 분지형 또는 고리형 에스테르, 또는 헤테로 고리, 탄소원자 1개-10개를 갖는 선형, 분지형 또는 고리형 에테르, 또는 $-CONR_{10}R_{11}$ 의 카바메이트이고, 여기서 R_{10} 과 R_{11} 은 동일하거나 서로 다른 수소, 1개-6개의 탄소원자를 갖는 선형 알킬, 3개-10개의 탄소원자를 갖는 분지형 또는 고리형 알킬, 또는 6개-10개의 탄소원자를 갖는 단순한 또는 치환된 아릴이다. 에스테르의 경우, 바람직한 예는 $-COCH_2CH_3$ 및 $-COCH_2CH_2CH_3$ 를 포함한다. 에테르의 경우, 바람직한 예는 $-CH_2CH_3$ 및 $-CH_2CH_2CH_3$ 를 포함한다. 카바메이트의 경우, 바람직한 예는 $-CONHCH_2CH_3$, $-CONHCH_2CH_2CH_3$, $-CO$ -모르폴리노, $-CO$ -피페라지노, $-CO$ -피페리디노 또는 $-CO$ -N-메틸피페라지노를 포함한다.

[0207] 실시예 (3)에서, R_2 는 티올 함유 부분이다.

[0208] 실시예 (1), (3) 및 (4)에서, R_3 는 아릴 또는 1개-10개의 탄소원자를 갖는 선형, 분지형 또는 고리형 알킬이고, 바람직하게는 $-CH_2CH(CH_3)_2$ 이다.

[0209] 실시예 (2)에서 R_3 는 $-CH=C(CH_3)_2$ 이다.

[0210] 4개의 실시예 모두에서, R_4 는 $-OC(CH_3)_3$ 또는 $-C_6H_5$ 이다.

[0211] 실시예 (1) 및 (2)에서, R_5 는 티올 함유 부분이고, R_6 는 실시예 (1), (2) 및 (4)에 대한 R_2 에 대해서 상기에서 정의한 바와 동일한 정의를 갖는다.

[0212] 실시예 (3)에서, R_5 와 R_6 은 동일하거나 서로 다르며, 실시예 (1), (2) 및 (4)에 대한 R_2 에 대해서 상기에서 정의한 바와 동일한 정의를 갖는다.

[0213] 실시예 (4)에서 R_5 는 실시예 (1), (2) 및 (4)에 대한 R_2 에 대해서 상기에서 정의한 바와 동일한 정의를 갖고 R_6 는 티올 부분이다.

[0214] 티올 함유 부분을 도입하기에 바람직한 위치는 R_2 및 R_3 이고, 가장 바람직하기로는 R_2 이다.

[0215] 티올 부분을 운반하는 측쇄는 선형 또는 분지형, 방향족, 또는 헤테로 고리일 수 있다. 본 발명의 기술 분야의 당업자라면 적합한 측쇄를 용이하게 결정할 수 있다. 이들 티올 부분의 특정예로는 $-(CH_2)_nSH$, $-CO(CH_2)_nSH$, $-(CH_2)_nCH(CH_3)SH$, $-CO(CH_2)_nCH(CH_3)SH$, $-(CH_2)_nC(CH_3)_2SH$, $-CO(CH_2)_nC(CH_3)_2SH$, $-CONR_{12}(CH_2)_nSH$, $-CONR_{12}(CH_2)_nCH(CH_3)SH$, 또는 $-CONR_{12}(CH_2)_nC(CH_3)_2SH$, $-CO$ -모르폴리노-XSH, $-CO$ -피페라지노-XSH, $-CO$ -피페리디노-XSH 및 $-CO$ -N-메틸피페라지노-XSH를 들 수 있고, 여기서 X는 1개-10개 탄소원자를 갖는 선형 알킬 또는 분지형 알킬이다.

[0216] R_{12} 는 1개-10개의 탄소원자를 갖는 선형 알킬, 분지형 알킬 또는 고리형 알킬, 또는 1개-10개의 탄소원자를 갖는 단순한 또는 치환된 아릴, 또는 헤테로 고리이고, 수소일 수 있으며, n은 0 부터 10까지의 정수이다.

[0217] 선형 알킬의 예로는 메틸, 에틸, 프로필, 부틸, 펜틸 및 헥실을 들 수 있다.

[0218] 분지형 알킬의 예로는 이소프로필, 이소부틸, 2차 부틸, 3차 부틸, 이소펜틸 및 1-에틸-프로필을 들 수 있다.

[0219] 고리형 알킬의 예로는 시클로프로필, 시클로부틸, 시클로펜틸 및 시클로헥실을 들 수 있다.

[0220] 단순한 아릴의 예로는 페닐과 나프틸을 들 수 있다.

- [0221] 치환된 아릴의 예로는 알킬기, Cl, Br, F와 같은 할로젠, 니트로기, 아미노기, 술폰산 그룹, 카르복실산 그룹, 히드록시기 또는 알콕시기로 치환된 전술한 바와 같은 아릴을 들 수 있다.
- [0222] 헤테로 고리의 예로는 헤테로 원자가 O, N 및 S로부터 선택된 화합물로서, 모르폴리노, 피페리디노, 피페라지노, N-메틸피페라지노, 피롤릴(pyrrolyl), 피리딜(pyridyl), 푸릴(furyl) 및 티오펜(thiophene)을 들 수 있다.
- [0223] 티올 부분을 갖는 타산은 공지된 방법에 따라 합성될 수 있다. 합성을 위한 출발물질은 상업적으로 입수가능한 10-데아세틸바카틴III(10-deacetylbaicatin III)이다. 다양한 치환기를 도입하는 화학적 방법은 여러 문헌에 기재되어 있다(Ojima et al, *J. Med. Chem.* 39:3889-3896 (1996); Ojima et al., *J. Med. Chem.* 40:267-278 (1997); Ojima et al., *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 96:4256-4261 (1999); 미국특허 제5,475,011호 및 미국특허 제 5,811,452호).
- [0224] 페닐 고리 상의 치환기 R₁ 및 치환기 R₂의 위치는 원하는 독성을 갖는 화합물이 얻어질 때까지 가변될 수 있다. 또한, 페닐 고리 상의 치환의 정도는 원하는 독성을 달성하기 위해 가변될 수 있다. 즉, 페닐 고리는 원하는 독성을 달성하는 다른 수단을 제공하는 하나 이상의 치환기를 가질 수 있다(예를 들어, 페닐 고리의 1개 치환, 2개 치환 또는 3개 치환). 본 발명의 기술분야의 당업자라면 단지 통상적인 실험을 이용하여 R₁에 대한 적합한 화학기 또는 적합한 위치를 결정할 수 있다.
- [0225] 예를 들어, 메타 위치에 전자끄는기가 있는 경우에는 독성 효능을 증가시키는 반면에, 파라 위치에 치환되는 경우에는 원래 타산에 비해 효능의 증가가 기대되지 않는다. 전형적으로 서로 다른 위치(오르토, 메타 및 파라)에 서의 치환기를 갖는 몇몇 대표적인 타산들이 최초로 제조되어 시험관내 독성에 대해 평가될 것이다.
- [0226] 티올 부분은 이미 히드록시기가 존재하는 위치들 중 하나에 도입될 수 있다. 다양한 히드록시기를 보호하고 원하는 하나와 반응하는 것에 관한 화학적 내용은 이미 기술되었다(예를 들어, 상기에서 언급된 참조문헌들 참조). 치환기는 자유로운 히드록시기를 다이설파이드-함유 에테르, 다이설파이드-함유 에스테르 또는 다이설파이드-함유 카바메이트로 단순히 전환함으로써 도입된다. 이러한 변형은 다음과 같이 달성된다. 앞서 언급한 문헌인 Ojima et al.(1999)에 기술된 바와 같이, -40℃에서 테트라하이드로퓨란 내에서 상업적으로 입수가능한 리튬헥사메틸다이실라제인(lithium hexamethyldisilazane)(1.2 당량)으로 처리하면 상기 히드록시기에서 프로톤이 제거된다. 그런 다음, 얻어진 알콕사이드 음이온은 과량의 디할로 화합물(예를 들어, 디브로모에탄)과 반응시켜 할로 에테르를 수득한다. 할로젠을 티올로 대체하면(포타슘 티오아세테이트와 반응시키고 약한 염기 또는 히드록실아민으로 처리함) 원하는 티올-함유 타산이 얻어진다.
- [0227] 대안으로, 상기 히드록시기는 3-브로모프로피오닐 클로라이드와 같은 아실 할라이드와 반응시켜 직접 에스테르 화합물으로써 브로모 에스테르를 얻을 수 있다. 포타슘 티오아세테이트로 처리하고 전술한 추가 처리과정을 통해 브로모 그룹이 대체되어 티올-함유 타산 에스테르를 얻게 된다. 바람직한 탁소이드(taxoids)는 미국특허 제 6,340,701호, 제6,372,738호, 제6,436,931호, 제6,596,757호, 제6,706,708호, 제7,008,942호, 제7,217,819호 및 제7,276,499호에 기술되어 있다.
- [0229] **CC-1065 유사체**
- [0230] 본 발명에 따른 세포 독성제는 CC-1065 유사체일 수 있다.
- [0231] 본 발명에 따르면, CC-1065 유사체는 A 서브유닛(subunit)을 포함하고, B 또는 B-C 서브유닛을 포함한다. A 서브유닛은 천연의 폐쇄형 시클로프로필 형태 또는 개방형 클로로메틸 형태인 CPI 유닛(시클로프로파피롤로인돌 유닛; cyclopropapyrroloindole unit), 또는 폐쇄형 시클로프로필 형태 또는 개방형 클로로메틸 형태인 밀접하게 관련된 CBI 유닛(시클로프로필벤즈인돌 유닛; cyclopropylbenzindole unit)이다. CC-1065 유사체의 B 서브유닛 및 C 서브유닛은 매우 유사하고, 2-카르복시-인돌 및 2-카르복시-벤조퓨란 유도체이다. 활성을 위해, CC-1065 유도체는 적어도 하나의 2-카르복시-인돌 서브유닛 또는 2-카르복시-벤조퓨란 서브유닛을 필요로 하며, 2개의 서브유닛(B-C 서브유닛)이 보다 강한 효능을 준다. 또한, 발표된 천연 CC-1065 및 이의 유사체로부터 명확히 알 수 있는 바와 같이(예를 들어, Warpehoski et al, *J. Med. Chem.* 31:590-603 (1988), D. Boger et al., *J. Org. Chem.*;66; 6654-6661, 2001; 미국특허 제5,739,350호, 제6,060,608호 및 제6,310,209호), B 서브유닛과 C 서브유닛은 인돌 또는 벤조퓨란 고리 상의 다른 위치에서 서로 다른 치환기를 운반할 수 있다.
- [0232] 티올 부분을 포함하는 CC-1065 유사체는 하기 화학식 A-1{CPI (시클로프로필 형태)}, 화학식 A-2 {CPI (클로로메틸 형태)}, 화학식 A-3 {CBI (시클로프로필 형태)} 및 화학식 A-4 {CBI (클로로메틸 형태)}의 A 서브유닛들

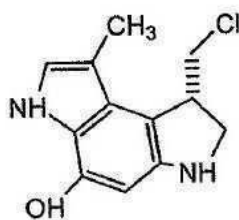
중 어느 하나일 수 있고, 이러한 A 서브유닛의 피롤 부분의 2차 아미노 그룹으로부터 화학식 F-1의 B 서브유닛, 또는 화학식 F-3 또는 화학식 F-7의 B-C 서브유닛의 C-2 카르복시 그룹으로의 아마이드 결합으로 통해 공유결합으로 연결된다.

[0234]

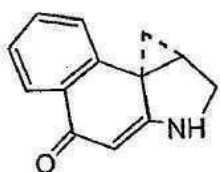
A 서브유닛들



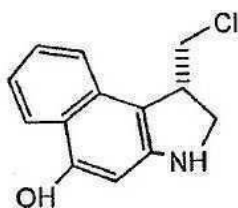
화학식 A-1



화학식 A-2



화학식 A-3

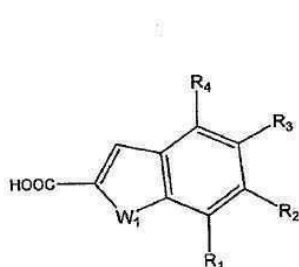


화학식 A-4

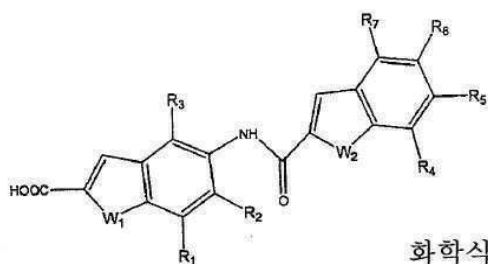
[0235]

[0237]

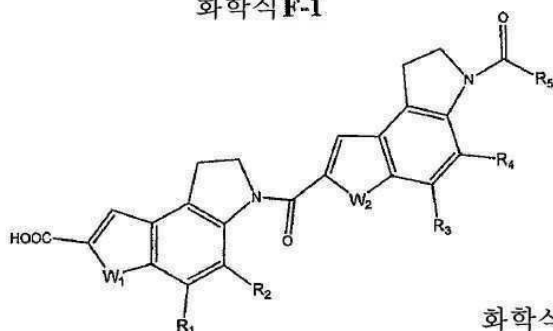
B 서브유닛 및 공유적으로 결합된 B 및 C 서브유닛들



화학식 F-1



화학식 F-3



화학식 F-7

[0238]

[0239]

상기 식에서, 각각의 W_1 및 W_2 는 동일하거나 서로 다를 수 있고, 산소 또는 NH일 수 있으며; 화학식 F-1에서 있어서 R_4 는 티올 부분이고, 화학식 F-3에서 R 중의 하나 또는 R_4 는 티올 부분이며, 화학식 F-7에서, R' 중의 하나 또는 R_4 는 티올을 포함하는 부분이고; R 또는 R'이 티올 부분일 때, 서로 동일하거나 다를 수 있는 R_1 부터 R_6 는 수소, C_1 - C_3 의 선형 알킬, 메톡시, 히드록시, 1차 아미노, 2차 아미노, 3차 아미노, 또는 아마이드이며; R_4 가 티올 부분일 때, 서로 동일하거나 다를 수 있는 R, R_1 , R_2 , R_3 , R_4 , R_5 및 R_6 은 수소, C_1 - C_3 의 선형 알킬, 메톡시, 히드록시, 1차 아미노, 2차 아미노, 3차 아미노, 또는 아마이드이고 R'은 NH_2 , 알킬, O-알킬, 1차 아미노, 2차 아미노, 3차 아미노, 또는 아마이드이다. 또한, A-2 및 A-4 서브유닛에서 염소 원자는 다른 적합한 할로겐으로 대체될 수 있다.

[0240]

바람직한 실시예에서, R 및 R'은 티올 부분이고 R_1 및 R_2 는 각각 수소이다. 다른 바람직한 실시예에서, R 및 R'은 티올 부분이고, R_1 부터 R_6 은 각각 수소이다.

[0241] 특히 바람직한 실시예에서, R 또는 R₄는 -NHCO(CH₂)₁SH, -NHCOC₆H₄(CH₂)₁SH, 또는 -O(CH₂)₁SH, 그리고 R'은 -(CH₂)₁SH, -NH(CH₂)₁SH 또는 -O(CH₂)₁SH이고 여기서 1은 1 부터 10까지의 정수이다.

[0242] 1차 아민의 예로는 메틸 아민, 에틸 아민 및 이소프로필 아민을 들 수 있다.

[0243] 2차 아민의 예로는 디메틸 아민, 디에틸 아민 및 에틸프로필 아민을 들 수 있다.

[0244] 3차 아민의 예로는 트리메틸 아민, 트리에틸 아민 및 에틸-이소프로필-메틸 아민을 들 수 있다.

[0245] 아미도 그룹의 예로는 N-메틸아세트아미도, N-메틸-프로피온아미도, N-아세트아미도 및 N-프로피온아미도를 들 수 있다.

[0246] R'로 표시되는 알킬의 예로는 R'이 연결 그룹(linking group)이 아닐 경우, C₁-C₅ 선형 또는 분지형 알킬을 들 수 있다.

[0247] R'로 표시되는 O-알킬의 예로는 R'이 연결 그룹(linking group)이 아닐 경우, 알킬 부분이 C₁-C₅ 선형 또는 분지형 알킬인 화합물을 들 수 있다.

[0248] 전술한 CC-1065 유사체들은 천연물로부터 분리되거나 하기 문헌들의 제조 방법, 즉, 후속 변형, 합성 과정 또는 이들의 조합을 이용하여 합성될 수 있다 (예를 들어, 미국특허 제5,475,092호, 제5,585,499호 및 제5,846,545호 참조). 바람직한 CC-1065 유사체는 미국특허 제5,475,092호, 제5,595,499호, 제5,846,545호, 제6,534,660호, 제6,586,618호, 제6,756,397호 및 제7,049,316호에 기술된 것이다.

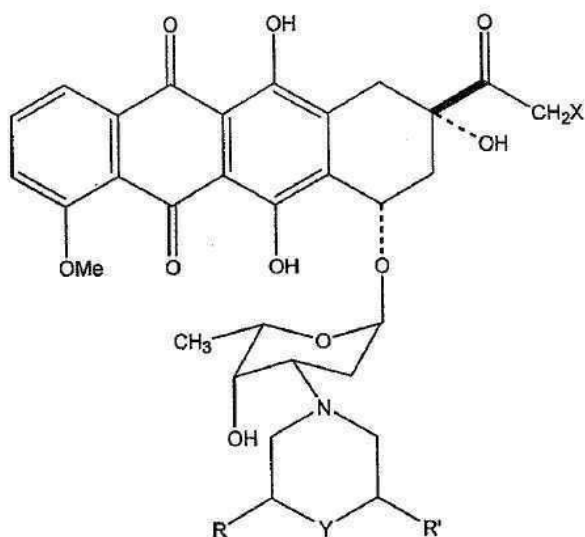
[0250] 다우노루비신/독소루비신 유사체

[0251] 또한, 본 발명에 따른 세포 독성제는 다우노루비신 유사체와 독소루비신 유사체일 수 있다.

[0252] 본 발명의 다우노루비신 유사체와 독소루비신 유사체는 티올 부분을 포함하도록 변형될 수 있다.

[0253] 본 발명에 유용한 변형된 다우노루비신/독소루비신 유사체는 하기 화학식 D1을 갖는다.

[0254] 화학식 D1



[0255]

[0256] 상기 화학식 D1에서 X는 수소 또는 OH이고; Y는 산소 또는 NR₂이고, 여기서 R₂는 1개-5개의 탄소원자를 갖는 선형 또는 분지형 알킬이며;

[0257] R은 티올 부분, 수소, 또는 1개-5개의 탄소원자를 갖는 선형 또는 분지형 알킬이고; R'은 티올 부분, 수소, 또는 -OR₁이고, 여기서 R₁은 1개-5개의 탄소원자를 갖는 선형 또는 분지형 알킬이며, 이때 R과 R'는 동시에 티올 부분이 아니다.

[0258] 바람직한 실시예에서, NR₂는 NCH₃이다. 다른 바람직한 실시예에서, R'은 -O이다.

- [0259] 특히 바람직한 실시예에서, 티올 부분은 $-(CH_2)_nSH$, $-O(CH_2)_nSH$, $-(CH_2)_nCH(CH_3)SH$, $-O(CH_2)_nCH(CH_3)SH$, $-(CH_2)_nC(CH_3)_2SH$, 또는 $-O(CH_2)_nC(CH_3)_2SH$ 이고, 여기서 n 은 0 부터 10까지의 정수이다.
- [0260] R , R_1 및 R_2 로 표시되는 1개-5개의 탄소원자를 갖는 선형 또는 분지형 알킬은 메틸, 에틸, n -프로필, 이소프로필, n -부틸, 이소부틸, 2차-부틸, 3차-부틸, 및 펜틸을 포함하고, 8개의 이성질체 배열(isomeric arrangement) 중 어느 것일 수 있다.
- [0261] R_1 및 R_2 는 바람직하게는 메틸이다.
- [0262] 선형 알킬의 예로는 메틸, 에틸, 프로필, 부틸, 펜틸 및 헥실을 들 수 있다.
- [0263] 분지형 알킬의 예로는 이소프로필, 이소부틸, 2차-부틸, 3차-부틸, 이소펜틸 및 1-에틸-프로필을 들 수 있다.
- [0264] R 또는 R' 가 연결 그룹이 아닐 경우, 그 위치에서의 치환기는 원하는 독성 화합물이 얻어질 때까지 가변될 수 있다. 강한 독성은 배양된 암세포를 72 시간 동안 노출시킬 때 IC_{50} 값이 1×10^{-12} 내지 1×10^{-9} M 범위에 있을 경우로 정의된다. 전술한 바와 같이 대표적인 치환기의 예는 수소, 알킬 및 0-알킬이다. 본 발명의 기술분야의 당업자라면 통상적인 실험만으로도 R 및 R' 에 대해 적합한 화학기를 결정할 수 있을 것이다.
- [0265] 예를 들어, 메틸 및 메톡시 치환기는 세포 독성 효능을 증가시키는 반면에, 수소는 원래의 다우노루비신 유사체에 비해 독성 효능을 증가시킬 것으로 기대되지 않는다. 다른 위치에서의 치환기들은 최초 제조되어 시험관 내 세포독성 시험을 위해 평가될 것이다.
- [0266] 본 발명의 변형된 독소루비신/다우노루비신 유사체는 국제공개특허 WO 01/38318호에 기술된 티올 부분을 갖는다. 변형된 독소루비신/다우노루비신 유사체는 공지의 방법에 따라 제조될 수 있다(예를 들어, 미국특허 제 5,146,064호 참조).
- [0267] 아우리스타틴(Auristatin)은 아우리스타틴 E, 아우리스타틴 EB (AEB), 아우리스타틴 EFP (AEFP), 모노메틸 아우리스타틴 E (MMAE) 및 하기 문헌들에 기재된 것들을 포함한다(미국특허 제 5,635,483호, *Int. J. Oncol.* 15:367-72(1999); *Molecular Cancer Therapeutics*, vol.3, No.8, pp.921-932 (2004); 미국특허출원 제 11/134826호, 미국공개특허 제 20060074008호 및 제 2006022925호).
- [0268] 본 발명에 따른 세포 독성제는 본 발명의 기술분야에 공지된 피롤로벤조디아제핀 다이머(pyrrolobenzodiazepine dimers)를 포함한다(미국특허 제 7,049,311호, 제 7,067,511호, 제 6,951,853호, 제 7,189,710호, 제 6,884,799호 및 제 6,660,856).
- [0270] **유사체들과 유도체들**
- [0271] 세포 독성제 분야의 당업자라면 본 명세서에 기술된 각각의 세포 독성제는 최종 화합물이 출발 화합물의 특이도 및/활성을 여전히 유지하는 방식으로 변형될 수 있음을 용이하게 이해할 것이다. 또한, 당업자라면 이들 화합물의 많은 수가 본 명세서에 기술된 세포 독성제 대신 사용될 수 있음을 이해할 것이다. 따라서, 본 발명의 세포 독성제는 본 명세서에 기술된 화합물들의 유사체 및 유도체를 포함한다.
- [0273] **치료 용도**
- [0274] 또한, 본 발명의 세포 결합인자-약물 컨쥬게이트(예를 들어, 이뮤노컨쥬게이트)는 다른 화학치료제와 조합하여 사용될 수 있다. 이러한 화학치료제는 이미 설명한 바가 있고 미국특허 제 7,303,749호에 기술되어 있다.
- [0275] 본 발명의 세포 결합인자-약물 컨쥬게이트(예를 들어, 이뮤노컨쥬게이트)는 시험관 내, 생체 내(in vivo) 및/또는 생체 외(ex vivo) 방식으로 투여되어 환자를 치료하고/하거나 선택된 세포 집단의 성장을 조절하기 위해 사용될 수 있다. 사용가능한 예로는 폐암, 혈액암, 혈장암, 유방암, 결장암, 전립선암, 신장암, 췌장암, 뇌종양, 뼈암, 난소암, 고환암 및 임파선암; 전신 루푸스, 류마티스 관절염, 다발성 경화증과 같은 자가면역 질환; 신장 이식거부, 간 이식거부, 폐 이식거부, 심장 이식거부, 골수 이식거부와 같은 이식거부; GVHD 질환; CMV 감염, HIV 감염, AIDS 감염과 같은 바이러스 감염; 그리고 람블편모충증(giardiasis), 아메바증(amoebiasis), 주혈흡충병(schistosomiasis) 등의 기생충 감염 및 다른 감염을 포함한다. 바람직하게는 본 발명의 이뮤노컨쥬게이트 및 화학치료제는 예를 들어, 혈액암, 혈장암, 폐암, 유방암, 결장암, 전립선암, 신장암, 췌장암, 뇌종양, 뼈암, 난소암, 고환암 및 임파선암, 보다 바람직하게는 폐암, 결장암, 전립선암, 혈장암, 혈액암 등을 포함하는 암 환자의 암 치료 및/또는 암세포의 성장 조절을 위해 시험관 내, 생체 내(in vivo) 및/또는 생체 외(ex vivo) 방식

으로 투여된다.

- [0276] "선택된 세포 집단의 성장을 조절한다"라는 표현은 선택된 세포 집단(예를 들어, MOLP-8 세포, OPM2 세포, H929 세포 등과 같은 다발성 골수종 세포 집단(multiple myeloma cell populations))이 증식하는 것을 방지하는 것; 보다 많은 수의 세포로 분열하는 것 방지; 예를 들어 처치되지 않은 세포에 비해 세포 분열의 증가 속도를 감소시키는 것; 선택된 세포 집단을 사멸시키는 것; 및/또는 선택된 세포 집단(예를 들어 암세포)이 전이되는 것을 방지하는 것을 포함한다. 선택된 세포 집단의 생장은 시험관 내, 생체 내 또는 생체 외에서 조절될 수 있다.
- [0277] 본 발명의 방법에 있어서, 세포 결합인자-약물 컨쥬게이트(예를 들어, 이뮤노컨쥬게이트)는 시험관 내, 생체 내 또는 생체 외 방식으로 투여될 수 있다. 세포 결합인자-약물 컨쥬게이트(예를 들어, 이뮤노컨쥬게이트)는 약제학적으로 적합한 담체, 희석제 및/또는 부형제(excipient)와 함께 사용될 수 있는데, 이들은 잘 알려진 것으로서 임상 상황이 허용하는 바에 따라 당업자에 의해 결정될 수 있다. 적절한 담체, 희석제 및/또는 부형제의 예로서는 (1) 약 1-25 mg/ml의 인간 혈청 알부민을 포함하는 돌베코(Dulbecco) 인산완충식염수(약 pH 6.5), (2) 0.9% 생리식염수 (0.9% w/v NaCl), 및 (3) 5% (w/v) 텍스트로스를 포함한다.
- [0278] 본 명세서에 설명된 화합물과 조성물은 적합한 형태, 바람직하기로는 비경구투여 방식으로, 보다 바람직하기로는 정맥 내 투여 방식으로 투여될 수 있다. 비경구 투여의 경우, 상기 화합물과 조성물은 수용성 또는 비수용성 멸균 용액, 현탁액 또는 에멀션일 수 있다. 프로필렌 글리콜, 식물성 기름, 에틸 올레산염과 같은 주사가능한 유기 에스테르가 용매 또는 비히클로서 사용될 수 있다. 또한, 상기 조성물은 면역증강제(adjuvants), 유화제 또는 분산제를 포함할 수 있다.
- [0279] 또한, 상기 조성물은 멸균수 또는 다른 주사가능한 멸균 매체에서 용해되거나 분산될 수 있는 멸균의 고형 조성물일 수 있다.
- [0280] 본 명세서에 기술된 세포 결합인자-약물 컨쥬게이트(예를 들어, 이뮤노컨쥬게이트)의 "치료유효량"은 선택된 세포 집단의 성장 조절 및/또는 환자의 질환 치료를 위한 용량 용법(dosage regimen)을 말하는 것으로서, 환자의 나이, 체중, 성별, 식이 및 의학적 상태, 질병의 정도, 투여 경로, 그리고 사용된 특정 화합물의 활성, 효능, 약동학적 및 독성학적 프로파일과 같은 약리학적 고려 등을 포함한 다양한 요소에 따라 선택된다. 또한, "치료유효량"은 Physicians Desk Reference 2004와 같은 표준 의학 서적을 참조하여 결정될 수 있다. 환자는 바람직하게는 동물, 보다 바람직하게는 포유동물, 가장 바람직하게는 인간이다. 환자는 남성 또는 여성일 수 있고, 유아, 어린이 또는 성인일 수 있다.
- [0281] 상기 세포 결합인자-약물 컨쥬게이트(예를 들어, 이뮤노컨쥬게이트) 투여의 적합한 프로토콜의 예는 다음과 같다. 상기 컨쥬게이트는 약 5일간 하루 단위로 주어질 수 있는데 약 5일 동안 매일 정맥 볼루스(i.v. bolus)로 투여되거나 약 5일 동안 지속적으로 주입될 수 있다.
- [0282] 대안으로, 상기 컨쥬게이트는 6주 또는 그 이상 동안 1주 당 한번 투여될 수 있다. 또 다른 방법으로 상기 컨쥬게이트는 2주 또는 3주 마다 한번씩 투여될 수 있다. 볼루스 용량(Bolus doses)은 인간혈청알부민 약 5-10 ml가 첨가된 정상 생리적 식염수 약 50-400 ml로 주어진다. 지속적 주입은 24시간을 기준으로 인간혈청알부민 약 25-50 ml가 첨가된 정상 생리적 식염수 약 250-500 ml로 주어진다. 1회 투여량은 약 10pg-1000 mg/kg이 될 것이다 (정맥 내 투여)(약 100 ng-100 mg/kg 범위).
- [0283] 처치 후 약 1주 내지 4주가 된 시점에서 환자는 2차 처치를 받는다. 투여 경로, 부형제, 희석제, 1회 투여량 및 시간과 관련한 특정한 임상적 프로토콜은 임상 상황이 허용하는 바에 따라 숙련된 의사에 의해 결정될 수 있다.
- [0284] 또한, 본 발명은 하나 이상의 이뮤노컨쥬게이트 및 하나 이상의 화학치료제를 포함하는 본 발명의 약제학적 화합물 및/또는 조성물의 한가지 이상의 성분으로 채워져 있는 하나 이상의 용기를 포함하는 약제학적 키트를 제공한다. 또한, 이러한 키트는 예를 들어 다른 화합물 및/또는 조성물, 상기 화합물 및/또는 조성물을 투여하는 장치, 그리고 약제학적 제품 또는 생물학적 제품의 제조, 사용 또는 판매를 규제하는 정부 기관에 의해 규정된 형태의 활자화된 지시서를 포함할 수 있다.
- [0285] 또한, 상기 화합물 및 컨쥬게이트(예를 들어, 이뮤노컨쥬게이트)는 비정상적인 세포 성장에 의해 특징화되는 질환(예를 들어, 암)의 심각한 정도를 치료하거나 완화하는데 유용한 의약 제조를 위해 사용될 수 있다.
- [0286] 암 치료법 및 투여량, 투여 경로 그리고 추천되는 사용법은 본 발명이 속한 기술분야에서 알려져 있고 이는 PDR(Physician's Desk Reference)와 같은 문헌에 기술되어 있다. 상기 PDR은 다양한 암의 치료에 있어 사용되는 약제의 투여량을 설명하고 있다. 전술한 화학치료제 및 치료학적으로 유효한 컨쥬게이트의 용량 용법 및 투

여량은 치료대상이 되는 특정 암, 질병의 정도 및 당업자인 의사에게 익숙한 다른 요소들에 의존하며, 의사에 의해 결정될 수 있다. 예를 들어 PDR 2006년도 판은 택소티어(Taxotere)(p. 2947 참조)가 튜불린 디폴리머라이제이션(tubulin depolymerization) 저해제이고, 독소루비신(p 786 참조), 독실(Doxil)(p 3302 참조) 및 옥살리프라틴(oxaliplatin)(p 2908 참조)은 DNA 작용제이며, 이리노테칼(Irinotecal) (p. 2602 참조)은 토포아이스머라제 I 저해제이고, 에르비투스(Erbitux)(p 937 참조) 및 타세바(Tarceva)(p 2470 참조)는 EGFR(epidermal growth factor receptor)과 상호작용하는 것을 개시하고 있다. 상기 PDR의 내용은 명백하게 그 전체 내용이 본 명세서에 참고문헌으로 통합된다. 당업자라면 상기 PDR을 검토하고 하기의 파라미터들을 이용하여 화학적 치료제 및 컨쥬케이트의 용량 용법 및 투여량을 결정할 수 있고 이는 본 발명의 가르침에 따라 사용될 수 있다.

[0287] 상기 파라미터들은 다음과 같은 것을 포함한다:

[0288] 1. 포괄적인 인덱스(Comprehensive index)

[0289] a) 제조업자에 의한 것

[0290] b) 제품 (회사에 의한 것 또는 상표명으로 된 약물명)

[0291] c) 카테고리 인덱스(Category index) (예를 들어, "항-히스타민", "DNA 알킬화제" 타산류 등)

[0292] d) 제네릭/화학 인덱스(Generic/chemical index) (비-상표인 보통명칭의 약물명)

[0293] 2. 의약의 색채 이미지

[0294] 3. FDA 레이블과 일치하는 제품 정보

[0295] a) 화학 정보

[0296] b) 기능/작용

[0297] c) 표시(Indications) 및 사용 금지 사유(Contraindications)

[0298] d) 시험 연구(Trial research), 부작용(side effects), 경고(warnings)

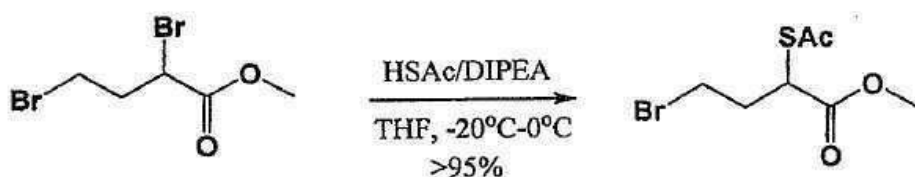
[0299] 상기에서 언급하고 이후 실시예들에서 언급되는 모든 참고문헌들은 명백히 그 전체 내용이 본 명세서에 참고문헌으로 통합된다.

[0301] 실시예

[0302] 본 발명은 본 발명을 한정하지 않는 실시예를 참조하여 설명된다. 달리 특별히 언급되지 않는 한, 모든 퍼센트와 비율은 부피비이다.

[0304] 실시예 1: 재료 및 방법

[0305] 메틸 2-(아세틸티오)-4-브로모부타노에트

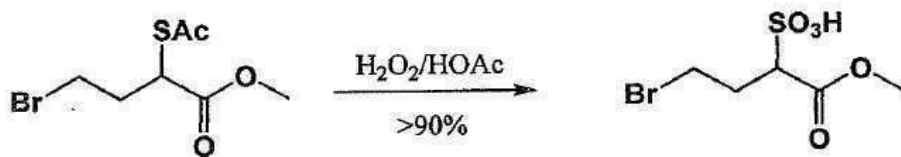


[0306]

[0307] 20℃에서 100 ml 드라이 THF 내의 메틸 2,4-디브로모부타노에트 10.0g (38.4 mmol)을 8.5 ml (48.9 mmol) DIPEA 내의 2.75 ml (38.5 mmol) 티오아세트산과 50 ml 드라이 THF의 혼합물에 1.5 시간 동안 적가하면서 첨가하였다. 아르곤 하에서 -20℃에서 하룻밤 동안, 0℃에서 2시간 동안 교반한 후, 혼합물을 농축하고, EtAc/헥산으로 희석하며, 1.0 M NaH₂PO₄로 세척하고 MgSO₄ 상에서 건조하며, 여과, 증발처리 및 SiO₂ 크로마토그래피 정제를 하여(1:12에서 1:10 EtAc/헥산) 표기의 화합물 9.5 g (96%)을 수득하였다.

[0308] ¹H NMR (CDCl₃) 4.38 (1H, t, J = 7.1Hz), 3.74 (s, 3H), 3.40 (m, 2H), 2.57~2.47 (m, 1H), 2.37 (s, 3H), 2.36~2.21 (m, 1H); ¹³C NMR 193.24, 171.36, 53.15, 44.45, 34.67, 30.46, 29.46; MS m/z+ 276.9 (M+Na), 278.9 (M+2+Na)

[0310] 4-브로모-1-메톡시-1-옥소부탄-2-술폰산

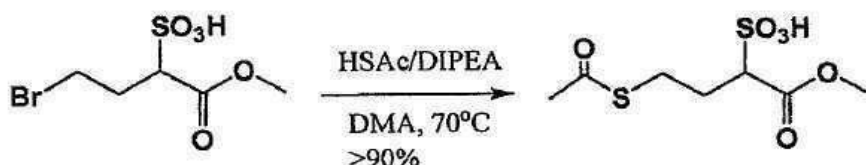


[0311]

[0312] 80 ml 아세트산 내의 메틸 2-(아세틸티오)-4-브로모부타노에이트 9.2 g (36.3 mmol)을 40 ml 과산화수소(물 내에 35% 존재)에 첨가하였다. 상기 혼합물을 하룻밤 동안 교반하고 증발처리하며, 물로 희석하고 NaHCO₃로 중성화하며 1:1 헥산/EtAc으로 세척하였다. 수용액을 증발처리한 후 메탄올에 용해하고 농축한 후 메탄올/톨루엔으로 결정화하여 표기의 화합물 8.6 g (90% 수율)을 수득하였다.

[0313] m.p.= 288~293℃(decomp); ¹H NMR (D₂O) 4.12 (dd, 1H, J=4.8, 9.3 Hz), 3.83 (s, 3H), 3.64 (m, 1H), 3.53 (m, 1H), 2.54 (m, 2H); ¹³C NMR 172.16, 66.73, 55.66, 33.39, 32.70; MS m/z-260.8 (M-1).

[0315] 4-(아세틸티오)-1-메톡시-1-옥소부탄-2-술폰산

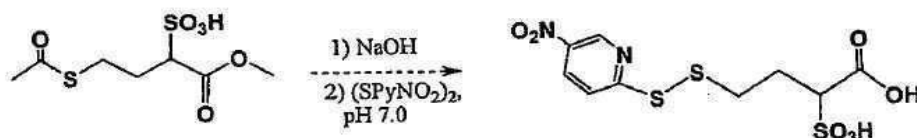


[0316]

[0317] 100 ml THF 내의 4-브로모-1-메톡시-1-옥소부탄-2-술폰산 5.0 g (19.2 mmol)을 100 ml THF 내의 9.0 ml DIPEA 및 3.0 ml 티오아세트산에 첨가하였다. 상기 혼합물은 하룻밤 동안 교반되고 70℃에서 1시간 동안 환류된 후, 증발처리되고 NaHCO₃에 의해 pH 7로 중성화된 후 3×100 ml의 물과 함께 공동-증발처리되었다. 상기 혼합물을 메탄올에 재용해하였고 셀라이트(celite)를 통해 여과하고 농축한 후 CH₃OH/CH₂Cl₂/HCOOH(37.5:250:1 내지 50:250:1)로 용리되는 SiO₂ 크로마토그래피에 의해 정제하여 표기의 화합물 4.4 g (90% 수율)을 수득하였다.

[0318] ¹H NMR(D₂O) 3.95 (dd, 1H, J= 4.1, 10.3 Hz), 3.83 (s, 3H), 3.74 (m, 2H), 3.22 (dd, 2H, J=7.4, 14.9 Hz), 2.39 (s, 3H); ¹³C NMR 203.88, 172.91, 67.32, 56.17, 29.04, 20.61; MS m/z- 254.8 (M-H)

[0320] 4-((5-니트로피리딘-2-일)디설파닐)-2-설포부탄산

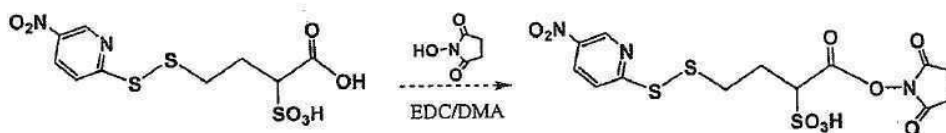


[0321]

[0322] 100 ml 물 내의 4-(아세틸티오)-1-메톡시-1-옥소부탄-2-술폰산 3.0 g (11.7 mmol)을 50 ml의 3M NaOH에 첨가하였다. 아르곤 하에서 3시간 동안 교반한 후, 상기 혼합물을 아르곤 하에서 1M H₂PO₄에 의해 pH 7.2로 중성화하였다. 상기 혼합물을 200 ml DMA 내의 10.0 g (32.2 mmol) 1,2-비스(5-니트로피리딘-2-일)디설파닐 용액에 적가하면서 첨가하였다. 아르곤 하에서 4시간 동안 교반한 후, 상기 혼합물을 농축하였고, 물로 희석하며 여과하고 증발처리한 후, 물/메탄올 (95:5)로 용리되는 C-18 4.0 × 20 cm 컬럼으로 정제하여 표기의 화합물 3.1 g (75% 수율)을 수득하였다.

[0323] m.p.= 288~291℃(decomp.) ¹H NMR (DMF-d₇) 9.29 (d, 1H, J=2.2 Hz), 8.63 (dd, 1H, J=2.7, 8.9 Hz), 8.17 (d, 1H, J=8.9 Hz), 3.73 (t, 1H, J = 7.2 Hz), 3.22~3.17 (m, 1H), 3.15~3.10 (m, 1H), 2.41~2.33 (m, 2H); ¹³C NMR 170.92, 169.10, 146.04, 143.67, 133.65, 120.72, 64.22, 37.82, 29.26; MS m/z-352.8 (M-H).

[0325] 1-(2,5-디옥소피롤리딘-1-일 옥시)-4-((5-니트로피리딘-2-일)디설파닐)-1-옥소부탄-2-술폰산

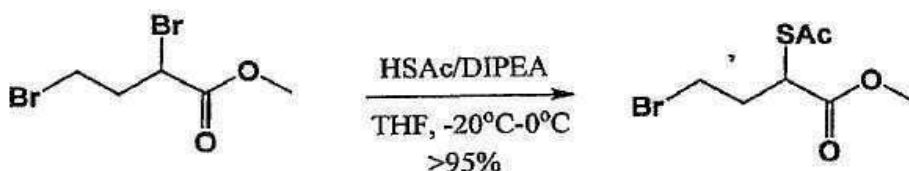


[0326]

[0327] 15ml DMA 내의 220 mg (0.62 mmol) 4-((5-니트로피리딘-2-일)디설파닐)-2- 설포부탄산을 130 mg (1.13 mmol) NHS 및 480 mg (2.50 mmol) EDC에 첨가하였다. 상기 혼합물을 아르곤 하에서 하룻밤 동안 교반한 후 증발처리하였고 $\text{CH}_2\text{CH}_2/\text{CH}_3\text{OH}/\text{HCOOH}$ (10000:1000:1에서 10000:1500:1)로 용리되는 SiO_2 크로마토그래피 상에서 정제하여 표기 화합물 227 mg (82% 수율)을 수득하였다.

[0328] ^1H NMR ($\text{DMSO}-d_6$) 9.25 (d, 1H, $J=5.2$ Hz), 8.57 (dd, 1H, $J=2.5, 8.9$ Hz), 8.04 (t, 1H, $J=8.0 + 8.9$ Hz), 3.86 (dd, 1H, $J=4.9, 9.7$ Hz), 3.13~3.12 (m, 2H), 2.76 (s, 4H), 2.36~2.30 (m, 1H), 2.25~2.21 (m, 1H); ^{13}C NMR 166.96, 165.01, 144.93, 142.26, 132.63, 119.61, 61.00, 35.03, 29.30, 25.39; MS m/z^- 449.8 (M-H).

[0330] 메틸 2-(아세틸티오)-4-브로모부타노에트

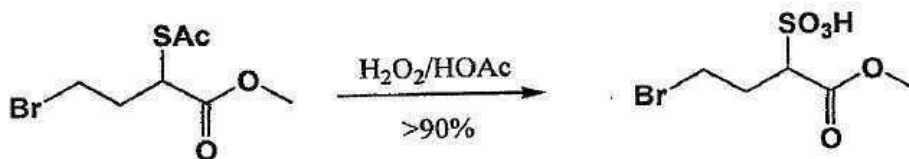


[0331]

[0332] -20°C 에서 100 ml 드라이 THF 내의 10.0 g (38.4 mmol) 메틸 2,4-디브로모부타노에트를 8.5 ml (48.9 mmol) DIPEA 내의 2.75 ml (38.5 mmol) 티오아세트산과 50 ml 드라이 THF의 혼합물에 1.5 시간 동안 적가하면서 첨가하였다. 아르곤 하에서 -20°C 에서 하룻밤 동안, 0°C 에서 2시간 동안 교반한 후, 혼합물을 농축하고, EtAc/헥산으로 희석하며, 1.0 M NaH_2PO_4 로 세척하고 MgSO_4 상에서 건조하며, 여과, 증발처리 및 SiO_2 크로마토그래피 정제를 하여(1:12에서 1:10 EtAc/헥산) 표기의 화합물 9.5 g (96%)을 수득하였다.

[0333] ^1H NMR (CDCl_3) 4.38 (1H, t, $J=7.1\text{Hz}$), 3.74 (s, 3H), 3.40 (m, 2H), 2.57~2.47 (m, 1H), 2.37 (s, 3H), 2.36~2.21 (m, 1H); ^{13}C NMR 193.24, 171.36, 53.15, 44.45, 34.67, 30.46, 29.46; MS m/z^+ 276.9 (M+Na), 278.9 (M+2+Na)

[0335] 4-브로모-1-메톡시-1-옥소부탄-2-술폰산

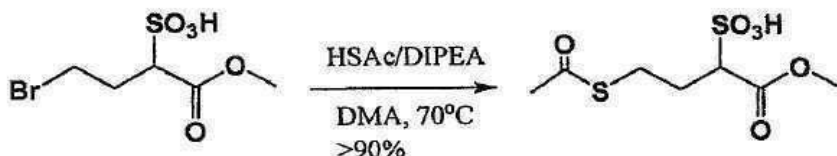


[0336]

[0337] 80 ml 아세트산 내의 메틸 2-(아세틸티오)-4-브로모부타노에이트 9.2 g (36.3 mmol)을 40 ml 과산화수소(물 내에 35% 존재)에 첨가하였다. 상기 혼합물을 하룻밤 동안 교반하고 증발처리하며, 물로 희석하고 NaHCO_3 로 중성화하며 1:1 헥산/EtAc으로 세척하였다. 수용액을 증발처리한 후 메탄올에 용해하고 농축한 후 메탄올/톨루엔으로 결정화하여 표기의 화합물 8.6 g (90% 수율)을 수득하였다.

[0338] m.p.= $288\sim 293^\circ\text{C}$ (decomp); ^1H NMR (D_2O) 4.12 (dd, 1H, $J=4.8, 9.3$ Hz), 3.83 (s, 3H), 3.64 (m, 1H), 3.53 (m, 1H), 2.54 (m, 2H); ^{13}C NMR 172.16, 66.73, 55.66, 33.39, 32.70; MS m/z^- 260.8 (M-1).

[0340] 4-(아세틸티오)-1-메톡시-1-옥소부탄-2-술폰산

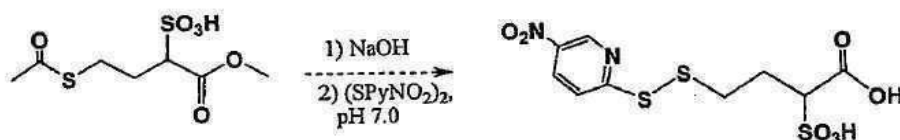


[0341]

[0342] 100 ml THF 내의 4-브로모-1-메톡시-1-옥소부탄-2-술폰산 5.0 g (19.2 mmol)을 100 ml THF 내의 9.0 ml DIPEA 및 3.0 ml 티오아세트산에 첨가하였다. 상기 혼합물은 하룻밤 동안 교반되고 70°C에서 1시간 동안 환류된 후, 증발처리되고 NaHCO₃에 의해 pH 7로 중성화된 후 3×100 ml의 물과 함께 공동-증발처리되었다. 상기 혼합물을 메탄올에 재용해하였고 셀라이트(celite)를 통해 여과하고 농축한 후 CH₃OH/CH₂Cl₂/HCOOH(37.5:250:1 내지 50:250:1)로 용리되는 SiO₂ 크로마토그래피에 의해 정제하여 표기의 화합물 4.4 g (90% 수율)을 수득하였다.

[0343] ¹H NMR(D₂O) 3.95 (dd, 1H, J= 4.1, 10.3 Hz), 3.83 (s, 3H), 3.74 (m, 2H), 3.22 (dd, 2H, J=7.4, 14.9 Hz), 2.39 (s, 3H); ¹³C NMR 203.88, 172.91, 67.32, 56.17, 29.04, 20.61; MS m/z- 254.8 (M-H)

[0345] 4-((5-니트로피리딘-2-일)디설파닐)-2-설포부탄산

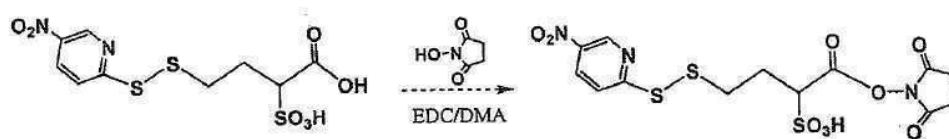


[0346]

[0347] 100 ml 물 내의 4-(아세틸티오)-1-메톡시-1-옥소부탄-2-술폰산 3.0 g (11.7 mmol)을 50 ml의 3M NaOH에 첨가하였다. 아르곤 하에서 3시간 동안 교반한 후, 상기 혼합물을 아르곤 하에서 1M H₂PO₄에 의해 pH 7.2로 중성화하였다. 상기 혼합물을 200 ml DMA 내의 10.0 g (32.2 mmol) 1,2-비스(5-니트로피리딘-2-일)디설파닐 용액에 적가하면서 첨가하였다. 아르곤 하에서 4시간 동안 교반한 후, 상기 혼합물을 농축하였고, 물로 희석하며 여과하고 증발처리한 후, 물/메탄올 (95:5)로 용리되는 C-18 4.0 × 20 cm 컬럼으로 정제하여 표기의 화합물 3.1 g (75% 수율)을 수득하였다.

[0348] m.p.= 288~291°C(decomp.) ¹H NMR (DMF-d₇) 9.29 (d, 1H, J=2.2 Hz), 8.63 (dd, 1H, J=2.7, 8.9 Hz), 8.17 (d, 1H, J=8.9 Hz), 3.73 (t, 1H, J = 7.2 Hz), 3.22~3.17 (m, 1H), 3.15~3.10 (m, 1H), 2.41~2.33 (m, 2H); ¹³C NMR 170.92, 169.10, 146.04, 143.67, 133.65, 120.72, 64.22, 37.82, 29.26; MS m/z-352.8 (M-H).

[0350] 1-(2,5-디옥소피롤리딘-1-일 옥시)-4-((5-니트로피리딘-2-일)디설파닐)-1-옥소부탄-2-술폰산

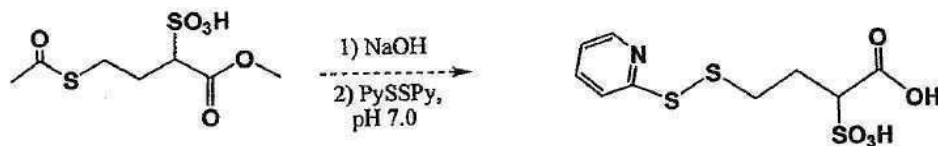


[0351]

[0352] 15ml DMA 내의 220 mg (0.62 mmol) 4-((5-니트로피리딘-2-일)디설파닐)-2- 설포부탄산을 130 mg (1.13 mmol) NHS 및 480 mg (2.50 mmol) EDC에 첨가하였다. 상기 혼합물을 아르곤 하에서 하룻밤 동안 교반한 후 증발처리하였고 CH₂CH₂/CH₃OH/HCOOH (10000:1000:1에서 10000:1500:1)로 용리되는 SiO₂ 크로마토그래피 상에서 정제하여 표기 화합물 227 mg (82% 수율)을 수득하였다.

[0353] ¹H NMR (DMSO-d₆) 9.25 (d, 1H, J=5.2 Hz), 8.57 (dd, 1H, J=2.5, 8.9 Hz), 8.04 (t, 1H, J=8.0 + 8.9 Hz), 3.86 (dd, 1H, J=4.9, 9.7 Hz), 3.13~3.12 (m, 2H), 2.76 (s, 4H), 2.36~2.30 (m, 1H), 2.25~2.21 (m, 1H); ¹³C NMR 166.96, 165.01, 144.93, 142.26, 132.63, 119.61, 61.00, 35.03, 29.30, 25.39; MS m/z- 449.8 (M-H).

[0355] 4-(피리딘-2-일 디설파닐)-2-설포부탄산

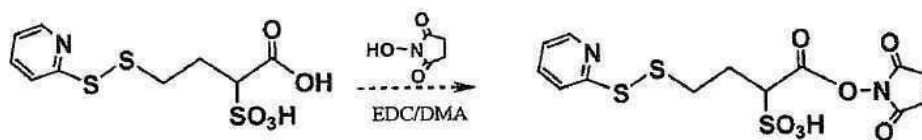


[0356]

[0357] 100 ml의 0.5M NaOH 용액에 1.5 g (5.85 mmol) 4-(아세틸티오)-1-메톡시-1-옥소부탄-2-술포산을 첨가하였다. 아르곤 하에서 3시간 동안 교반한 후, 상기 혼합물은 ~50 ml로 농축되었고, 아르곤 하에서 1M H₂PO₄에 의해 pH 7.2로 중성화되었다. 상기 혼합물은 60 ml DMA 내의 4.0 g (18.1 mmol) 2,2'-디티오디피리딘 용액에 적가하면서 첨가되었다. 아르곤 하에서 4시간 동안 교반한 후, 상기 혼합물을 농축하였고, 물로 희석하고 여과하며 증발 처리하였고 물/메탄올(99:1에서 90:10)로 용리되는 C-18 4.0 × 20 cm 컬럼으로 정제하여 표기의 화합물 1.32 g (73% 수율)을 수득하였다.

[0358] ¹H NMR (DMF-d₇) 8.39 (dd, 1H, J=3.5, 4.8 Hz), 7.86 (m, 2H), 7.25 (m, 1H), 3.59 (dd, 1H, J=5.2, 9.4 Hz), 2.90 (m, 2H), 2.28 (m, 2H); ¹³C NMR 172.60, 159.16, 148.93, 138.09, 121.03, 119.38, 67.49, 36.39, 28.66; MS m/z- 307.8 (M-H).

[0360] 1-(2,5-디옥소피롤리딘-1-일 옥시)-1-옥소-4-(피리딘-2-일 디설파닐)부탄-2-술포산

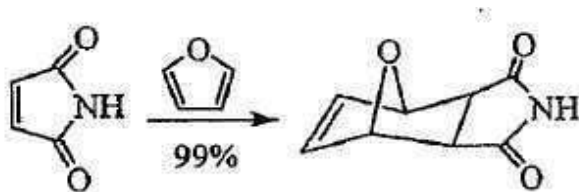


[0361]

[0362] 50ml DMA 내의 680 mg (2.20 mmol) 4-(피리딘-2-일 디설파닐)-2-설포부탄산을 300 mg (2.60 mmol) NHS 및 800 mg (4.16 mmol) EDC에 첨가하였다. 상기 혼합물을 아르곤 하에서 하룻밤 동안 교반한 후 증발처리하였고 CH₂CH₂/CH₃OH/HCOOH (10000:1000:1에서 10000:1500:1)로 용리되는 SiO₂ 크로마토그래피 상에서 정제하여 표기 화합물 720 mg (80% 수율)을 수득하였다.

[0363] ¹H NMR (DMSO-d₆) 8.40 (dd, 1H, J=3.5, 4.7 Hz), 7.85 (m, 2H), 7.24 (m, 1H), 3.58 (dd, 1H, J=5.1, 9.4 Hz), 2.94~2.90 (m, 2H), 2.74 (s, 4H), 2.31~2.27 (m, 2H); ¹³C NMR 168.16, 161.11, 147.91, 139.22, 121.63, 119.31, 66.80, 36.30, 28.36, 25.42; MS m/z- 404.9 (M-H).

[0365] 3, 6-엔독소-Δ(델타)-테트라히드로프탈라이드(tetrahydrophthalide)

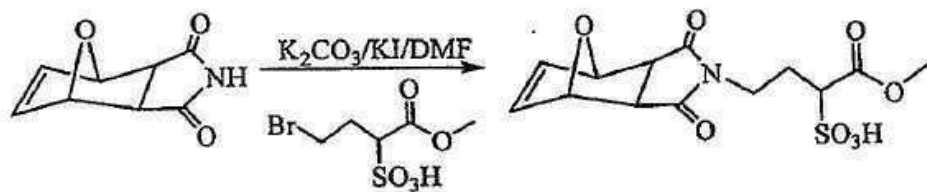


[0366]

[0367] 에틸에테르 (200 ml) 내의 말레이미드 (5.0 g, 51.5 mmol)에 퓨란(furan) (5.5 ml, 75.6 mmol)이 첨가되었다. 상기 혼합물은 1L의 오토클레이브 용기(autoclave bomb) 내에서 100℃로 8시간 동안 가열되었다. 상기 용기는 실온으로 냉각되었고, 용기 내부 고형분은 메탄올로 행귀져 농축되었고 에틸 아세테이트/헥산 내에서 결정화되어 표기 화합물 8.4 g (99%)이 수득되었다.

[0368] ¹H NMR (DMF-d₇): 11.08 (s, 1H) (NH), 6.60 (m, 2H), 5.16 (m, 2H), 2.95 (m, 2H), ¹³C NMR 178.84, 137.69, 82.00, 49.92. MS m/z+ 188.4 (MW + Na).

[0370] 메틸 4-N-(3, 6-엔독소-Δ(델타)-테트라히드로프탈리도-2-설포-부티레이트



[0371]

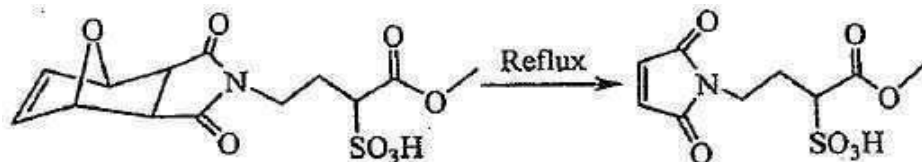
[0372] DMA (20ml) 내의 3, 6-엔독소-델타-테트라히드로프탈라이드 (0.80 g, 4.85 mmol)에 K_2CO_3 (1.4 g, 10.13 mmol) 및 KI (0.19 g, 1.14 mmol)가 첨가되었다. 아르곤 하에서 1시간 동안 교반한 후, DMA (10 ml) 내의 메틸 4-브로모-2-설포-부티레이트(0.98 g, 3.77 mmol)가 첨가되었다. 상기 혼합물은 아르곤 하에서 하룻밤 동안 교반되었고, 증발처리되어 메탄올 내의 1% HAc에서 재용해되고 여과되었으며 증발처리된 후 $CH_3OH/CH_2Cl_2/HAc$ (1:5:0.01에서 1:4:0.01)로 용리되는 SiO_2 크로마토그래피에 의해 정제되어 표기의 화합물 0.98 g(75%)이 수득되었다.

[0373]

1H NMR (DMF- d_7): 6.59 (m, 2H), 5.16 (dd, 2H, $J=0.8, 7.8$ Hz), 3.65-3.63 (m, 3H), 3.47 (m, 2H), 3.01 (s, 3H), 2.83 (m, 2H). ^{13}C NMR 172.94, 162.86, 137.68, 81.98, 52.39, 49.91, 48.58, 36.01, 21.97. MS m/z - 343.9 (MW - H).

[0375]

메틸 4-N-말레이미도-2-설포-부티레이트



[0376]

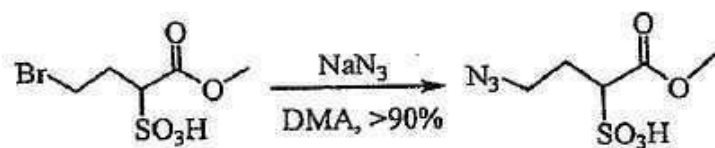
[0377] 개방되고 둥근 바닥을 가진 플라스크 내에서 메틸 4-N-(3, 6-엔독소-델타- 테트라히드로프탈리도)-2-설포-부티레이트 (0.30 g, 0.87 mmol)를 pH 7.0인 20 ml의 1:1 DMA/100 mM NaH_2PO_4 에 넣어 120 ~ 140℃에서 4시간 동안 가열하였다. 반응 시간 동안에 5×10 ml의 물이 점진적으로 첨가되어 전체 반응 부피가 약 15 ml로 유지되도록 하였다. 상기 혼합물은 건조한 상태로 농축되었고 $CH_3OH/CH_2Cl_2/HAc$ (1:5:0.01에서 1:4:0.01)로 용리되는 SiO_2 크로마토그래피에 의해 정제되어 표기의 화합물 0.230 g (95%)이 수득되었다.

[0378]

1H NMR (DMF- d_7): 6.60 (s, 2H), 4.06 (d, 1H), 3.60 (m, 3H), 3.47 (m, 2H), 2.43 (m, 2H); ^{13}C NMR 171.59, 164.96, 136.10, 66.20, 51.71, 34.82, 22.10. MS m/z - 276.6 (MW - H).

[0380]

메틸 4-아지도-2-설포-부티레이트



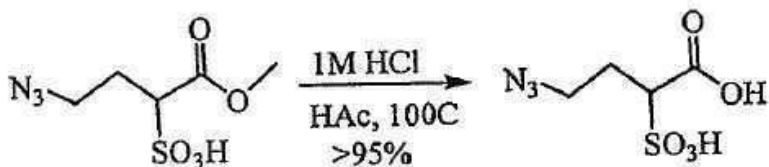
[0381]

[0382] DMF (50 ml) 내에서 메틸 4-브로모-2-설포-부티레이트 (1.07 g, 4.11 mmol) 및 소듐 아자이드(sodium azide)가 하룻밤 동안 교반되었다. 상기 혼합물은 증발처리되었고 $CH_3OH/CH_2Cl_2/HAc$ (1:5:0.01)로 용리되는 SiO_2 크로마토그래피에 의해 정제되었으며 CH_3OH /톨루엔/헥산에 의해 결정화되어 표기의 화합물 1.00 g (95%)이 수득되었다.

[0384]

*m.p = 267-272 °C(decomp). 1H NMR (DMF- d_7): 12.06 (br, 1H), 3.65 (s, 3H), 3.59 (dd, 1H, $J=5.4, 8.9$ Hz), 3.47 (m, 2H), 2.24 (m, 2H). ^{13}C NMR 171.10, 64.29, 52.24, 50.64, 21.35. ESI MS m/z + 267.9 (M+2Na-H), m/z - 222.0 (M-H). HRMS m/z - ($C_5H_9N_3O_5S-H$): 계산값(calcd) 222.0185, 측정값(found) 222.0179.

[0386] 4-아지도-2-설폰-부티르산

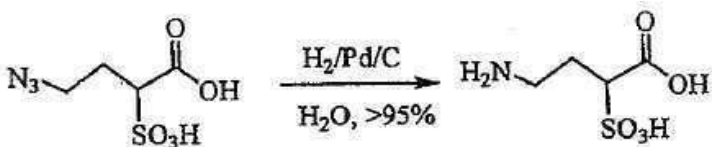


[0387]

[0388] 메틸 4-아지도-2-설폰-부티레이트(1.00 g, 4.08 mmol)가 HCl (50 ml, 1.0 M) 및 HAC (5 ml)의 혼합물 내에서 100°C에서 8 시간 동안 가열되었다. 상기 혼합물은 증발처리되었고 3 × 50 ml의 물과 함께 공동-증발처리되었으며 물/아세톤으로 결정화되어 표기의 화합물 1.0 g (99%)이 수득되었다.

[0389] ^1H NMR (DMF- d_7): 3.60 (m, 2H), 3.52 (m, 1H), 2.24 (m, 2H). ^{13}C NMR 170.96, 63.04, 50.66, 29.12. ESI MS m/z- 207.7 (MW-H); HRMS m/z- ($\text{C}_4\text{H}_7\text{N}_3\text{O}_5\text{S-H}$); 계산값(calcd) 208.0028, 측정값(found) 208.0021.

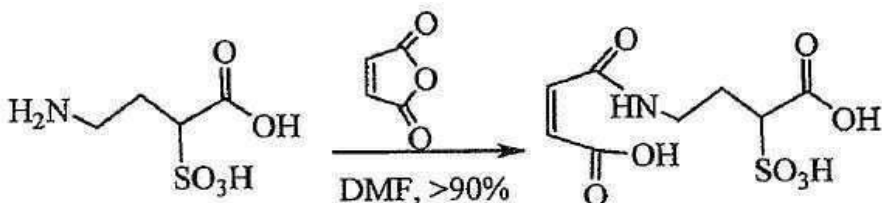
[0391] 4-아미노-2-설폰-부티르산



[0392]

[0393] 4-아지도-2-설폰-부티르산 (500 mg, 2.40 mmol), 물 (20 ml) 및 Pd/C (110 mg, 10% Pd, 50% 물 기초)를 250 ml의 수소화 셰이킹 병(hydrogenation shaking bottle)에 위치시켰다. 병 내의 공기가 진공에 의해 빨려 나간 후 20 psi의 수소가 병에 들어갔다. 상기 혼합물을 8시간 동안 흔들고 셀라이트를 통해 여과하였으며, DMF로 세척하고, 증발처리하였으며 드라이 DMF와 함께 공동-증발처리하여 표기의 화합물 476 mg (91% HCl 염)을 수득하였다. ESI MS m/z- 181.8 (MW -H). 본 생성물은 추가의 정제없이 바로 사용되었다.

[0395] (Z)-4-(3-카르복시-3-설폰프로필아미노)-4-옥소부트-2-엔산(oxobut-enoic acid

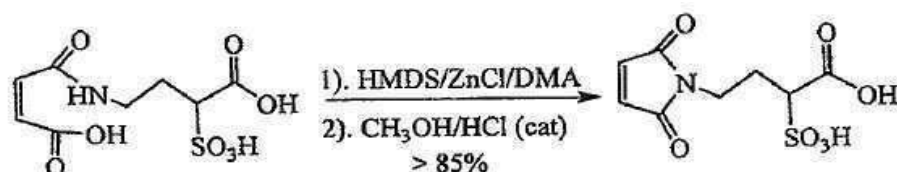


[0396]

[0397] 드라이 DMF (20 ml) 내의 4-아미노-2-설폰-부트르산, HCl 염(476 mg, 2.16 mmol)에 말레인산무수물(maleic anhydride)(232 mg, 2.36 mmol)이 첨가되었다. 상기 혼합물은 아르곤 하에서 하룻밤 동안 교반되었고, 증발처리된 후 셀프-팩(self packed) c-18, $\phi 1.0 \times 25$ cm 칼럼 상에서 정제되었으며 물로 용리되었다. 목표산물을 포함하는 분획들을 모아 증발처리하고 물/아세톤으로 결정화하여 표기의 화합물 552 mg (91%)을 수득하였다.

[0398] ^1H NMR (DMF- d_7): 9.70 (br, 1H), 6.73 (d, 1H, J=12.8 Hz), 6.32 (d, 1H, J= 12.8 Hz), 3.69 (m, 1H), 3.47 (m, 2H), 2.27 (m, 2H). ^{13}C NMR 171.47, 167.32, 165.87, 135.44, 133.07, 63.82, 39.13, 27.62. ESI MS m/z- 279.8 (MW -H); HRMS m/z- ($\text{C}_8\text{H}_{11}\text{NO}_8\text{S-H}$): 계산값(calcd) 280.0127, 측정값(found) 280.0121.

[0400] 4-N-말레이미도-2-설폰-부탄산

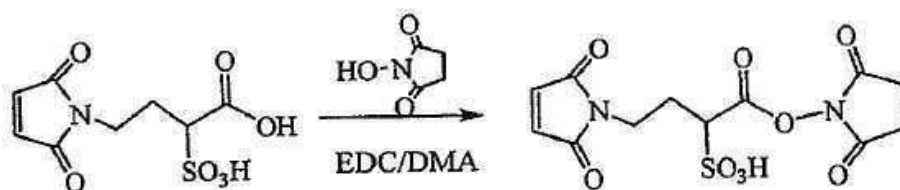


[0401]

[0402] (Z)-4-(3-카르복시-3-설포프로필아미노)-4-옥소부트-2-엔산 (310 mg, 1.10 mmol)을 드라이 DMA (5 ml) 및 드라이 톨루엔 (20 ml)의 혼합물 내에서 가열하였다. 온도가 80℃에 도달한 후, HMDS(hexamethyldisilazane) (1.40 ml, 6.71 mmol) 및 $ZnCl_2$ (1.85 ml, 1.0 M (디에틸 에테르에서임), 1.85 mmol)가 첨가되었다. 상기 혼합물을 115~125℃까지 연속적으로 가열하였고, 딘-스탁 트랩(Dean-Stark trap)을 통해 톨루엔을 회수하였다. 반응 혼합물은 120℃에서 6시간 동안 환류되었다. 이러한 동안에 2×20 ml의 드라이 톨루엔이 첨가되어 상기 반응혼합물의 부피가 약 8~10 ml로 유지되도록 하였다. 그런 다음, 상기 혼합물을 냉각하고 1 ml의 HCl (conc)/ CH_3OH (1:10)를 첨가하며 증발처리 후 $CH_3OH/CH_2Cl_2/HAc$ (1:5:0.01에서 1:4:0.01)로 용리되는 SiO_2 크로마토그래피 상에서 정제하여 표기의 화합물 260mg (92%)을 수득하였다.

[0403] 1H NMR (DMF- d_7): 10.83(br, 1H), 6.95 (s, 2H), 1H, J= 12.8 Hz), 3.65 (m, 1H), 3.54 (m, 2H), 2.27 (m, 2H). ^{13}C NMR 173.61, 172.04, 135.47, 64.18, 37.1, 27.89. ESI MS m/z- 261.8 (MW -H). HRMS m/z- ($C_8H_9NO_7S$ -H): 계산값(calcd) 262.0021, 측정값(found) 262.0027.

[0405] **숙신이미딜 4-N-말레이미도-2-설포-부티레이트**



[0406]

[0407] DMA (10 ml) 내의 4-N-말레이미도-2-설포-부탄산 (260 mg, 0.99 mmol)이 NHS (220 mg, 1.91 mmol) 및 EDC (500 mg, 2.60 mmol)에 첨가되었다. 상기 혼합물은 아르곤 하에서 하룻밤 동안 교반되었고, 증발처리 후 $CH_2CH_2/CH_3OH/HAc$ (10000:1000:1에서 10000:2000:1)로 용리되는 SiO_2 크로마토그래피 상에서 정제되었으며 DMA/EtAc/헥산으로 결정화하여 표기의 화합물 285 mg (81% 수율)이 수득되었다.

[0408] 1H NMR (DMF- d_7) 6.99 (s, 1H), 3.83 (m, 1H), 3.64 (m, 2H), 2.75 (s, 4H), 2.34 (m, 2H); ^{13}C NMR 171.97, 171.82, 166.64, 135.58, 62.00, 36.66, 26.62; ESI MS m/z- 358.9 (M-H); HRMS m/z- ($C_{12}H_{12}N_2O_9S$ -H): 계산값(calcd) 359.0185, 측정값(found) 359.0178

[0410] **(E)-메틸 4-아지도부트(azidobut)-2-에노에이트(enoate)**



[0411]

[0412] -20℃에서 100 ml DMF 내의 NaN_3 (2.80 g, 43.01 mmol) 용액에 메틸 4-브로모크로토네이트(bromocrotonate)(5.00 ml, 85%, 36.10 mmol)를 첨가하였다. -20℃에서 30분 동안 교반한 후, 혼합물을 0℃에서 4시간 동안 교반하였고 증발처리하였으며, EtAc/헥산(1:1)으로 현탁하였고, 여과, 증발처리 및 EtAc/헥산(1:25에서 1:10)으로 용리되는 SiO_2 컬럼 상에서 크로마토그래피 정제를 수행하여 표기의 화합물 4.08 g (80%)을 수득하였다.

[0413] 1H NMR ($CDCl_3$) 6.88 (m, 1H), 6.06 (ddd, 1H, J= 1.7, 3.4, 15.6 Hz), 3.97 (dd, 2H, J= 1.2, 4.96 Hz), 3.73 (s, 3H); ^{13}C NMR 166.23, 140.86, 123.49, 51.95, 51.36; ESI MS m/z+ 182.5 (M+ Na + H_2O); HRMS m/z+ ($C_5H_7N_3O_2$ + H_2O + Na): 계산값(calcd) 182.0542, 측정값(found) 182.0548.

[0415] 메틸 3-(아세틸티오)-4-아지도부타노에이트

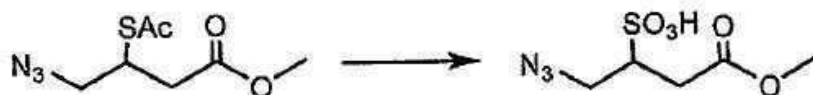


[0416]

[0417] 0℃에서 60 ml THF 내의 (E)-메틸 4-아지도부트-2-에노에이트 (4.00g, 28.37 mmol) 용액을 60 ml THF 내의 티오아세트산 (3.0 ml, 42.09 mmol) 및 DIPEA (8.0 ml, 45.92 mmol)의 혼합물에 20분 동안 첨가하였다. 0℃에서 1시간 동안 교반한 후, 상기 혼합물을 실온에서 하룻밤 동안 교반하고 증발처리한 후 CH₂Cl₂에 재용해시켰으며 NaHCO₃(sat.), 1M NaH₂PO₄/NaCl(sat.)(pH 4)로 각각 세척하였으며 MgSO₄ 상에서 건조시켰고, 여과, 증발처리 및 EtAc/헥산(1:8에서 1:4)으로 용리되는 SiO₂ 컬럼 상에서 크로마토그래피 정제를 수행하여 표기의 화합물 4.98 g (81%)을 수득하였다.

[0418] ¹H NMR (CDCl₃) 3.66 (m, 1H), 3.62 (s, 3H), 3.40 (dd, 1H, J = 7.5, 12.7 Hz), 3.31 (m, 1H), 2.78 (m, 1H), 2.60 (m, 1H), 2.32 (s, 3H); ¹³C NMR (DMF-d₇) 192.20, 172.48, 56.56, 53.60, 51.31, 34.58, 30.56; ESI MS m/z+ 240.0 (M+ Na), 255.9 (M+ K); HRMS m/z+ (C₇H₁₁N₃O₃S+ Na): 계산값(calcd) 240.0419, 측정값(found) 240.0415.

[0420] 아지도-4-메톡시-4-옥소부탄-2-술폰산



[0421]

[0422] 75 ml의 아세트산 내의 메틸 3-(아세틸티오)-4-아지도부타노에이트 (4.00 g, 18.43 mmol)에 25 ml의 H₂O₂(30%)가 첨가되었다. 상기 혼합물은 하룻밤 동안 교반되었고 증발처리되었으며 EtOH/톨루엔과 함께 공동-증발처리된 후 CH₃OH/CH₂Cl₂/HAc (100:800:1에서 100:500:1)로 용리되는 SiO₂ 크로마토그래피 상에서 정제되어 표기의 화합물 3.85 g (93%)이 수득되었다.

[0423] ¹H NMR (CD₃OD) 3.78 (dd, 1H, J = 5.0, 12.7 Hz), 3.62 (s, 3H), 3.44 (dd, 1H, J = 7.5, 12.7 Hz), 3.33 (m, 1H), 2.84 (dd, 1H, J = 5.6, 16.5 Hz), 2.57 (dd, 1H, J = 7.5, 16.5 Hz); ¹³C NMR (DMF-d₇) 173.37, 57.31, 52.54, 52.49, 34.51; ESI MS m/z- 221.7 (M+ H).

[0425] 4-아지도-3-설포부탄산



[0426]

[0427] 150 ml의 1.0 M HCl 내의 아지도-4-메톡시-4-옥소부탄-2-술폰산 (3.80 g, 17.04 mmol)에 8.0 ml HAc이 첨가되었다. 상기 혼합물은 120℃에서 하룻밤 동안 환류되었고, 증발처리되었으며, 물, EtOH, EtOH/톨루엔 각각과 함께 공동-증발처리되었고 CH₃OH/CH₂Cl₂/HAc (100:500:1에서 100:400:1)로 용리되는 SiO₂ 크로마토그래피 상에서 정제되어 표기의 화합물 3.02 g (85%)이 수득되었다.

[0428] ¹H NMR (CD₃OD) 3.77 (dd, 1H, J = 5.1, 12.8 Hz), 3.45 (dd, 1H, J = 7.0, 12.8 Hz), 3.31 (m, 1H), 2.86 (dd, 1H, J = 4.7, 16.7 Hz), 2.51 (dd, 1H, J = 8.4, 16.7 Hz); ¹³C NMR (DMF-d₇) 173.98, 67.50, 59.78, 27.82; ESI MS m/z- 207.7 (M-H).

[0430] 4-아미노-3-설포부탄산



[0431]

[0432]

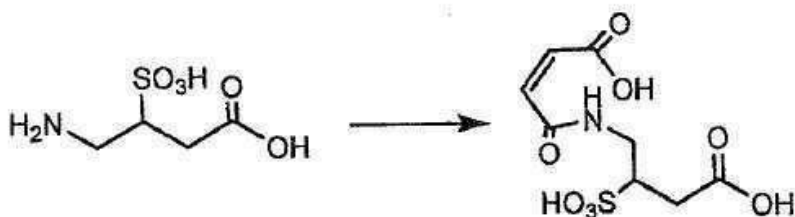
500 ml 용량의 수소화 병(hydrogenation bottle)에 4-아지도-3-설포부탄산 (3.00 g, 14.35 mmol), 150 ml 메탄올 및 0.32 g Pd/C (10% Pd, 50% wet)가 첨가되었다. 병에서 공기를 빼낸 후 30 psi의 H₂가 들어가고 혼합물을 하룻밤 동안 흔든 후 셀라이트를 통해 여과하였고, 증발처리 및 드라이 EtOH와의 공동-증발처리에 의해 표기의 화합물 약 2.50 g (95%)을 수득하였다.

[0433]

¹H NMR (CD₃OD) 3.24 (m, 1H), 3.17 (m, 1H), 2.90 (dd, 1H, J= 2.6, 16.5 Hz), 2.33 (dd, 1H, J= 10.1, 16.5 Hz), ESI MS m/z- 181.60 (M-H). 얻어진 화합물은 불안정하여 추가의 정제없이 바로 사용되었다.

[0435]

(Z)-4-(3-카르복시-2-설포프로필아미노)-4-옥소부트-2-엔산



[0436]

[0437]

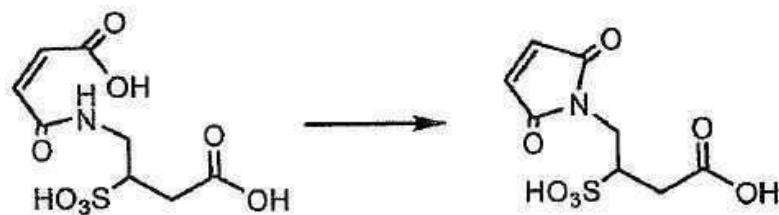
100 ml DMA 내의 4-아미노-3-설포부탄산(~ 2.50 g, 13.66 mmol) 용액에 말레산 무수물(1.48 g, 15.10 mmol)이 첨가되었고, 혼합물은 하룻밤 동안 교반되었으며 증발처리된 후 물 내의 1% HAc로 용리되는 C-18 컬럼 (2 × 30 cm) 상에서 정제되었고 MeOH/아세톤/톨루엔으로 결정화되어 표기의 화합물 3.34 g (83%)이 수득되었다.

[0438]

¹H NMR (CD₃OD) 6.33 (d, 1H, J= 12.6 Hz), 6.10 (d, 1H, J= 12.6 Hz), 3.64 (dd, 1H, J= 5.8, 14.0 Hz), 3.54 (m, 1H), 3.30 (m, 1H), 2.78 (dd, 1H, J= 4.9, 16.8 Hz), 2.39 (m, 1H); ¹³C NMR 173.52, 168.68, 167.98, 135.59, 127.79, 57.31, 40.56, 34.52; ESI MS m/z- 279.7 (M-H).

[0440]

4-(2,5-디옥소-2,5-디히드로-1H-피롤-1-일)-3-설포부탄산



[0441]

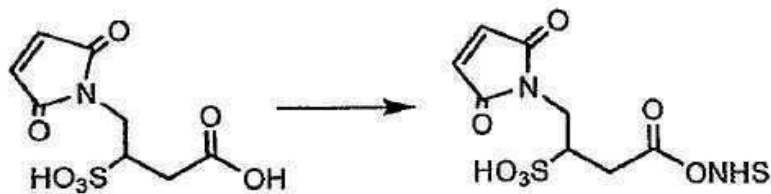
[0442]

(Z)-4-(3-카르복시-2-설포프로필아미노)-4-옥소부트-2-엔산 (450 mg, 1.60 mmol)을 10 ml의 드라이 DMA 및 50 ml의 드라이 톨루엔 혼합물 내에서 가열하였다. 온도가 80℃에 이른 후에 HMDS (hexamethyldisilazane, 1.80 ml, 8.63 mmol) 및 ZnCl₂ (3.2 ml, 1.0 M (디에틸에테르에서임))가 첨가되었다. 상기 혼합물을 지속적으로 가열하여 115~125℃에 이르게 하고 톨루엔을 딥-스타크-트랩(Dean-Stark trap)을 통해 회수하였다. 반응 혼합물은 120℃에서 6시간 동안 환류되었다. 이러한 동안에 2 × 20 ml의 드라이 톨루엔이 첨가되어 상기 반응혼합물의 부피가 약 8~10 ml로 유지되도록 하였다. 그런 다음, 상기 혼합물을 냉각하고 1 ml의 HCl (conc)/CH₃OH(1:10)를 첨가하며 증발처리 후 CH₃OH/CH₂Cl₂/HAc (1:5:0.01)로 용리되는 SiO₂ 크로마토그래피 상에서 정제하여 표기의 화합물 315 mg (75%)을 수득하였다.

[0443]

¹H NMR (DMF-d₇) 6.96 (s, 2H), 4.04 (dd, 1H, J= 4.3, 13.8 Hz), 3.47 (m, 1H), 3.23 (dd, 1H, J= 7.4, 14.7Hz), 2.99 (dd, 1H, J= 3.3, 16.8 Hz), 2.35 (dd, 1H, J= 8.1, 16.9 Hz); ¹³C NMR 173.58, 172.18, 135.54, 54.61, 40.24, 32.43, ESI MS m/z- 261.70 (M-H).

[0444] 1-(2,5-디옥소-2,5-디히드로-1H-피롤-1-일)-4-(2,5-디옥소피롤리딘-1-일 옥소)-4-옥소부탄-2-술폰산

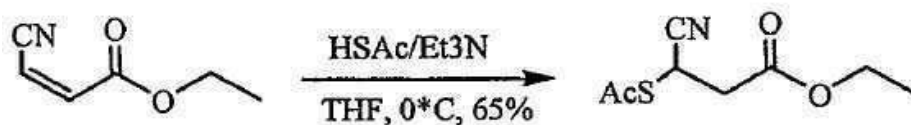


[0445]

[0446] 4-(2,5-디옥소-2,5-디히드로-1H-피롤-1-일)-3-설포부탄산 (110 mg, 0.418 mmol), EDC (240 mg, 1.25 mmol) 및 N-히드록시숙신이미드 (58 mg, 0.504 mmol)를 10 ml DMA 내에서 하룻밤 동안 교반하였고, 증발처리하였으며 CH₃OH/CH₂Cl₂/HAc (100:900:1에서 100:600:1)로 용리되는 SiO₂ 크로마토그래피 상에서 정제하여 표기의 화합물 112 mg (75%)을 수득하였다.

[0447] ¹H NMR (DMF-d₇) 6.93 (s, 2H), 4.06 (dd, 1H, J= 4.8, 13.1 Hz), 3.80 (dd, 1H, J= 10.7, 13.9 Hz), 3.35 (dd, 1H J= 3.3, 17.8 Hz), 3.25 (m, 1H), 3.10 (dd, 1H, J= 2.2, 16.4 Hz), 2.87 (m, 4H); ¹³C NMR 172.27, 170.88, 169.29, 135.55, 55.28, 40.22, 32.69, 26.66; ESI MS m/z- 261.70 (M-H).

[0449] 에틸 3-(아세틸티오)-3-시아노프로파노에이트(cyanopropanoate)



[0450]

[0451] -20°C에서 80 ml THF 내의 (Z)-에틸 3-시아노아크릴레이트 (5.01 g, 40.00 mmol)를 20 ml THF 내의 티올 아세트산 (5.0 ml, 70.15 mmol) 및 DIPEA (16.0 ml, 92.03 mmol)의 용액에 30분간 첨가하였다. 반응은 -20°C에서 4 시간 동안 유지되었고 그런 다음 실온에서 하룻밤 동안 유지되었다. 상기 혼합물은 농축되고 CH₂Cl₂로 희석되었으며 포화된 NaHCO₃로 세척되었고, MgSO₄ 상에서 건조 후 여과, 증발처리 및 SiO₂ 크로마토그래피(1:4 EtAc/헥산)에 의한 정제를 수행하여 표기의 화합물 5.22 g (65%)를 수득하였다.

[0452] R_f =0.25 (1:4 EtAc/헥산; ¹H NMR (CDCl₃), 4.44 (m, 1H), 4.11 (dd, 2H, J= 7.1, 14.3 Hz), 3.38 (m, 1H), 3.15 (m, 1H), 2.17 (s, 3H), 1.19 (t, 3H, J= 7.2 Hz); ¹³C NMR 194.12, 173.21, 119.82, 61.35, 33.52, 30.08, 14.62; MS m/z+ 225.9 (MW + Na), m/z- 201.7 (MW-H).

[0454] 시아노-3-에톡시-3-옥소프로판-1-술폰산



[0455]

[0456] 아세트산(40 ml) 내의 에틸 3-(아세틸티오)-3-시아노프로파노에이트 (2.00g, 9.95 mmol)를 H₂O₂ (12 ml, 30%)에 첨가하였다. 상기 혼합물을 하룻밤 동안 교반하고 증발처리한 후 메탄올/디클로로메탄/아세트산 (1:8:0.01에서 1:5:0.01)으로 용리되는 실리카 겔 크로마토그래피 상에서 정제하여 표기의 화합물 1.72 g (84%)을 수득하였다.

[0457] ¹H NMR (DMSO), 4.63 (m, 1H), 4.12 (dd, 2H, J= 7.1, 14.3 Hz), 3.27 (m, 1H), 3.05 (m, 1H), 1.28 (t, 3H, J= 7.2 Hz); ¹³C NMR 173.15, 113.85, 61.38, 48.32, 26.33, 14.15; MS m/z- 205.7 (MW-H).

[0459] 1-(tert-부톡시카르보닐아미노)-4-에톡시-4-옥소부탄-2-술폰산

[0460]

[0461]



수소화 병(hydrogenation bottle) 내에 시아노-3-에톡시-3-옥소프로판-1-술폰산 (2.50 g, 12.06 mmol), 에탄올 (80 ml), 여과된 신선한 레이니니켈(fresh filtered Raney Nickel) (0.40 g) 및 BOC 무수화물 (3.30 g, 15.12 mmol)을 첨가하였다. 상기 병 내의 공기가 진공에 의해 빨려 나간 후 20 psi의 수소가 병에 들어갔다. 상기 병을 하룻밤 동안 흔들고 셀라이트로 여과한 후 증발처리하였고, 메탄올/디클로로메탄/아세트산(1:6:0.01)으로 용리되는 실리카 겔 크로마토그래피 상에서 정제하여 표기의 화합물 3.18 g (85%)을 수득하였다.

[0463]

^1H NMR (DMSO), 6.82 (s, 1H), 4.26 (m, 1H), 4.11 (dd, 2H, $J = 7.1, 14.3$ Hz), 3.53 (dd, 1H, $J = 4.2, 13.4$ Hz), 3.36 (m, 1H), 2.86 (m, 1H), 2.51 (m, 1H), 1.38 (s, 9H), 1.22 (t, 3H, $J = 7.2$ Hz); ^{13}C NMR 173.35, 155.72, 80.44, 62.05, 52.55, 41.61, 34.50, 28.85, 14.52; MS m/z - 309.8 (MW-H).

[0465]

4-(tert-부톡시카르보닐아미노)-3-설포부탄산

[0466]

[0467]



THF/H₂O (1:2, 60 ml) 혼합물 내의 1-(tert-부톡시카르보닐아미노)-4-에톡시-4-옥소부탄-2-술폰산(402 mg, 1.29 mmol)에 리튬 하이드록사이드 모노하이드레이트(lithium hydroxide monohydrate)(2.0 g, 47.6 mmol)가 첨가되었다. 상기 혼합물을 아르곤 하에서 하룻밤 동안 교반하였고, 농축한 후 100% 물 내지 물로 희석된 10% 메탄올로 용리되는 C-18 컬럼 (2 × 30 cm) 상에서 정제하여 표기의 화합물 328 mg (90%)을 수득하였다.

[0468]

^1H NMR (DMSO), 6.78 (s, 1H), 4.03 (m, 1H), 3.57 (dd, 1H, $J = 4.2, 13.4$ Hz), 3.41 (m, 1H), 2.89 (m, 1H), 2.61 (m, 1H), 1.39 (s, 9H); ^{13}C NMR 174.21, 155.82, 79.85, 59.95, 42.06, 32.52, 28.88, 14.55; ESI MS 281.8 (M-H).

[0470]

(Z)-4-(3-카르복시-2-설포프로필아미노)-4-옥소부트-2-엔산

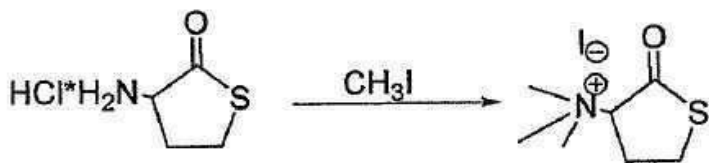
[0471]

[0472]



4-(tert-부톡시카르보닐아미노)-3-설포부탄산 (321 mg, 1.13 mmol)을 HCl(conc)/디옥산 (1:4, 15 ml) 혼합물에서 30분간 교반하였고 증발처리한 후 EtOH/톨루엔 (1:1, 4 × 20 ml)과 함께 공동-증발처리하여 건조한 상태로 하였다. 이러한 건조된 물질을 말레산 무수물(121 mg, 1.23 mmol) 및 DMA (20 ml)에 첨가하였고 혼합물을 하룻밤 동안 교반하였으며, 증발처리하고 물로 용리되는 C-18 컬럼을 통과시킨 후 EtOH/헥산으로 결정화하여 표기의 화합물 263 mg (83%)을 수득하였다. ESI MS 279.8 (M-H). NMR 데이터는 4-아지도-3-설포부탄산에 의한 루트를 통한 경우와 같다.

[0474] N,N,N-트리메틸-2-옥소테트라히드로티오펜-3-아미늄(aminium)



[0475]

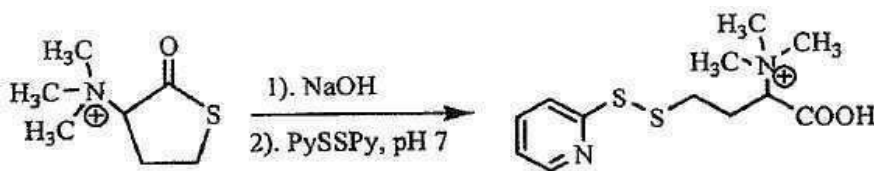
[0476] 3-아미노디히드록티오펜-2(3H)-온 하이드로클로라이드 (6.00 g, 39.1 mmol), 탄산수소나트륨(sodium bicarbonate) (3.28 g, 39.1 mmol) 및 아이오도메탄(iodomethane) (13 mL, 209 mmol)을 드라이 메탄올 (100 ml)에서 하룻밤 동안 교반하였고, 셀라이트를 통해 여과하였으며 증발처리하였고 MeOH/CH₂Cl₂/HAc(1:5:0.01)로 용리되는 SiO₂ 컬럼 상에서 정제한 후 EtOH/헥산으로 결정화하여 표기의 화합물 5.25 g (84%)을 수득하였다.

[0477]

mp 228-231°C. ¹H NMR (CD₃OD) 4.27 (m, 1H), 3.25 (s, 9H), 2.56-2.47 (m, 2H), 2.34 (m, 1H), 2.26 (m, 1H); ¹³C NMR 168.97, 75.06, 53.25, 30.85, 16.46; ESI MS m/z+ 160.0 (M+).

[0479]

1-카르복시-N,N,N-트리메틸-3-(피리딘-2-일 디설파닐)프로판-1-아미늄



[0480]

[0481] N,N,N-트리메틸-2-옥소테트라히드로티오펜-3-아미늄 아세테이트 (2 g, 9.13 mmol)를 75 ml의 1M NaOH (75 ml H₂O 내의 3 g NaOH)에서 45분 동안 교반하였고 4M H₃PO₄로 중성화하여 pH 7.4가 되도록 하고 농축한 후 200 ml MeOH 내의 1,2-디(피리딘-2-일)디설파닐 (11 g, 49.9 mmol)에 첨가하였다. 상기 혼합물은 하룻밤 동안 교반되었고 EtAc로 추출되었다. 수용액은 증발처리되었고 MeOH로 현탁되었으며 여과된 염을 증발처리하고 물/메탄올 (100% 물부터 20% 메탄올/물)로 용리되는 C-18 컬럼 (2 cm × 30 cm) 상에서 정제하여 표기의 화합물 2.6 g (75%)을 수득하였다. ESI MS m/z+ 309.1 (M +Na-H).

[0483]

1. 설포 링커로 항체의 변형(개질)

[0484]

huC242는 8 mg/mL의 항체와 물배로 15배인 과량의 설포 링커 (DMA내의 ~30mM 보관용 용액)에 의해 설포 링커로 변형된다. 반응은 100 mM NaPi, DMA (5% v/v)를 갖는 pH8.0 완충용액에서 25°C에서 15분, 30분, 120분 및 200 분 간 수행된다. 변형된 huC242는 50 mM NaPi, 50 mM NaCl 및 2 mM EDTA (pH6.5)로 G25 컬럼 상에서 정제되고 과량의 설포 링커는 제거된다.

[0486]

2. 방출가능한 스파이-NO₂(Spy-NO₂) 및 변형된 huC242 항체 농도의 측정

[0487]

분석 및 스펙트럼 측정은 실온에서 100 mM NaPi (pH7.5) 하에서 수행되었다. huC242 항체 1 몰당 방출되는 스파이-NO₂의 몰비는 샘플의 A₂₈₀ 측정 및 DTT (샘플 ml 당 1M DTT 50μl) 추가 후 샘플의 A₃₉₄에서의 증가로 계산되었다. DTT-방출된 2-머캅토피리딘의 농도는 14,205 M⁻¹cm⁻¹의 ε 394 nm를 이용하여 계산된다. 그리고 나서, 항체의 농도는 DTT 추가 전에 측정된 전체 A₂₈₀ 수치로부터 280nm에서의 스파이-NO₂의 흡광도 기여분 (DTT 처리 후 A₃₉₄ nm × 3344/14205)를 뺀 후 217,560 M⁻¹cm⁻¹의 ε 280 nm를 이용하여 계산될 수 있다. 그런 다음 스파이-NO₂:항체의 몰 비율이 계산될 수 있다. huC242의 mg/mL (g/L) 농도는 147,000 g/몰의 분자량을 이용하여 계산된다.

[0489]

3. 컨쥬게이트 반응

[0490]

변형된 huC242는 스파이-NO₂에 대해 1.7배 몰 과량의 DM4 (DM4 보관용 용액의 SH 농도에 기초)와 반응시켰다. 반응은 50 mM NaPi, 50 mM NaCl, 2 mM EDTA (pH6.5) 및 DMA (5% v/v) 내의 2.5 mg/mL 항체 농도로 수행된다. DM4의 첨가 후, 반응은 25°C에서 ~20 시간 동안 지속적으로 유지되었다. 최종 컨쥬게이트는 10 mM 히스티딘,

130 mM 글리신, 5% 수크로즈(pH 5.5)로 G25 컬럼 상에서 정제되었고 과량의 DM4 약물은 제거되었다.

4. huC242 및 DM4 농도의 계산

huC242 및 DM4는 모두 각 성분을 각각 측정하는 2개의 파장, 즉 280 nm 및 252 nm에서 흡수한다. huC242의 280 nm에서의 흡광계수(extinction coefficient)는 217,560이고, DM4의 경우는 5180 M⁻¹이다. huC242 및 DM4의 252 nm/280 nm 흡광도 비율은 각각 0.368 및 5.05이다. 농도는 다음과 같은 수식에 의해 계산되었다.

$$C_D = \frac{A_{252} - 0.368A_{280}}{24692.4} \quad C_{Ab} = \frac{A_{280} - 5180C_D}{217,560}$$

결과들

변형 시간	L/A	D/A	모노머 비율	자유 약물 %
15분	5.0	4.1	96.7%	N/D*
30분	6.1	5.4	96.2%	<1%
120분	6.6	6.8	95.7%	<1%
200분	6.6	6.3	95.9%	<1%

C242-설폰-DM4 링커 적정(titration)

링커 과량	L:A	DM4 xs	D:A	mg/mL Ab	μg/mL DM4	% 모노머	% 자유 약물
5	2.4	1.7	1.9	0.83	8.2	95	0
10	4.1	1.7	3.3	0.83	14.4	94	0
15	5.6	1.7	4.6	0.82	20.0	93	0
20	7.3	1.7	6.0	0.82	25.8	91	0
25	9.1	1.3	6.6	0.79	27.7	92	0.6
30	10.4	1.3	7.6	0.68	27.5	94	1.1
35	12.2	1.3	8.2	0.67	26.7	95	1.6

컨쥬게이트 프로토콜:

변형은 pH 8.0에서 완충 용액 A 및 5% DMA 하에서 90 동안 실온에서 수행되었고 항체 농도는 7 mg/ml이었다. 변형된 항체는 완충 용액 A (pH 6.5)을 이용하여 NAP 컬럼에 의해 정제되었다. 컨쥬게이트는 완충 용액 A (pH 6.5)하에서 5-10% DMA로 실온에서 하룻밤 동안 하강시켰다. 링커에 대한 약물의 비율은 첨가된 전체 약물에 의존하되, 1.3 내지 1.7의 범위였다.

실시예 2: 컨쥬게이트 합성

SPP 또는 SSNPP 링커는 대략 10 mM의 농도로 에탄올에 용해되었다. 항체는 완충 용액 A(50 mM KPi, 50 mM NaCl, 2 mM EDTA, pH 6.5)으로 투석되었다. 링커 반응을 위해, 8 mg/ml의 항체와 7 당량의 링커가 첨가되었고 이때 5% (v/v) 에탄올 존재 하에서 교반되었다. 반응은 대기 온도에서 90 분 동안 진행하도록 수행되었다. 반응하지 않은 링커는 pH 6.5의 완충 용액 A 또는 100 mM NaCl을 포함하는 150 mM 인산 칼륨 완충 용액 (pH 7.4)으로 평형화된 세파덱스 G25 컬럼(Sephadex G25 column)을 이용하여 세파덱스 G25 겔 여과에 의해 항체로부터 제거되었다. SPP 링커의 경우, 변형의 정도는 50 mM DTT를 이용한 피리딘-2-티온의 방출 및 하기 기술하는 바와 같이 343 nm에서의 흡광도 측정에 의해 평가되었다(자유 피리딘-2-티온의 경우 $\epsilon_{343} = 8080 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$). SSNPP의 경우, 변형은 325 nm에서의 흡광도에 의해 직접 평가되었다(항체에 연결된 4-니트로피리딘-2-디티오 그룹의 경우 $\epsilon_{325} = 10,964 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$). 컨쥬게이트 반응을 위해, 티올-함유 약물 (DM1 또는 DC4)이 대략 10 mM의 농도에서 DMA (N,N-디메틸아세트아미드)에 용해되었다. 상기 약물(항체 당 링커 분자 수에 비해 0.8-1.7 배 몰 과량)이 완충 용액 A (pH 6.5 또는 pH 7.4)(DMA 최종 농도 3% (v/v))내에서 천천히 저으면서 2.5 mg/ml 농도의 항체

에 첨가되었다. 상기 반응은 지시된 시간 동안 대기온도에서 진행되었다. 약물-컨쥬게이트 항체는 완충 용액 B(PBS, pH 6.5)로 평형화된 세파텍스 G25 컬럼을 이용하여 정제되었다. DML의 경우, 항체에 대한 약물 컨쥬게이션의 정도는 아래에 기술된 바와 같이 컨쥬게이트의 A_{252} 및 A_{280} 을 측정하여 평가되었다. 유사한 접근법이 DC4에 대해서도 사용되었다 (아래 참조).

[0506] 방출성 피리딘-2-티온 및 SPP-변형된 항체의 항체 농도의 측정

[0507] 항체 1몰 당 방출되는 피리딘-2-티온의 몰 비율은 샘플의 A_{280} 측정 및 DTT (샘플 ml 당 1M DTT $50\mu\ell$) 추가 후 샘플의 A_{343} 에서의 증가로 계산되었다. DTT-방출된 피리딘-2-티온의 농도는 $8080 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ 의 ϵ 343 nm를 이용하여 계산된다. 그리고 나서, 항체의 농도는 DTT 추가 전에 측정된 전체 $A_{280\text{nm}}$ 수치로부터 280nm에서의 피리딘-2-티온의 흡광도 기여분 (DTT 처리 후 $A_{343 \text{ nm}} \times 5100/8080$)를 뺀 후 $194,712 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ 의 ϵ 280 nm를 이용하여 계산할 수 있다. 그런 다음 피리딘-2-티온:항체의 몰 비율이 계산될 수 있다. 항체의 mg/mL (g/L) 농도는 147,000 g/몰의 분자량을 이용하여 계산된다.

[0509] 항체 연결된 5-니트로피리딘-2-디티오 그룹과 SSNPP-변형된 항체의 항체 농도의 측정

[0510] 항체 1몰당 연결된 4-니트로피리딘-2-디티오 그룹의 몰 비율은 DTT 처리 없이 샘플의 A_{280} 및 A_{325} 을 측정하여 계산된다. 항체 결합된 4-니트로피리딘-2-디티오 그룹의 수는 $10,964 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ 의 ϵ 325 nm를 이용하여 계산된다. 그리고 나서, 항체의 농도는 측정된 전체 $A_{280\text{nm}}$ 수치로부터 280nm($A_{325 \text{ nm}} \times 3344/10964$)에서의 5-니트로피리딘-2-디티오의 흡광도 기여분을 뺀 후 $194,712 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ 의 ϵ 280 nm를 이용하여 계산할 수 있다. 그런 다음 4-니트로피리딘-2-디티오:항체의 몰 비율이 계산될 수 있다. 항체의 mg/mL (g/L) 농도는 147,000 g/몰의 분자량을 이용하여 계산된다.

[0512] 항체-DM1의 항체 및 DM1 성분 농도의 계산

[0513] 항체 및 DM1은 모두 각 성분을 각각 측정하는 2개의 파장, 즉 280 nm 및 252 nm에서 흡수한다. 상기 성분들은 각 파장에서 각 성분의 기여도를 고려한 하기 수식을 이용하여 정량화된다(C_{Ab} 는 Ab(항체)의 몰 농도이고, C_D 는 DM1의 몰 농도):

[0514] 1) 전체 $A_{280} = 194,712C_{Ab} + 5,700C_D$

[0515] 2) 전체 $A_{252} = (194,712 \times 0.37)C_{Ab} + (4.7 \times 5,700) C_D$

[0516] 각 식은 C_{Ab} 에 대해 아래와 같이 정리된다:

[0517]
$$1a) C_{Ab} = \frac{A_{280} - 5,700C_D}{194,712}$$

[0518]
$$2a) C_{Ab} = \frac{A_{252} - 26,790C_D}{72,043}$$

[0519] 등식(식 1a = 식 2a)이 성립되어 C_D 에 대한 식이 아래와 같이 성립된다:

[0520]
$$C_D = \frac{A_{252} - 0.37A_{280}}{24,681}$$

[0521] 일단 C_D 가 계산되면, 이 값은 상기 식 1a 또는 식 2a에 있어서 C_{Ab} 값을 구하는데 사용된다. 그런 다음 DM1:항체의 비율이 계산될 수 있다. 항체의 mg/mL (g/L) 농도는 147,000 g/몰의 분자량을 이용하여 계산되고, DM1의 농도는 736.5 g/몰(연결된 DM1)의 분자량을 이용하여 계산된다.

[0523] SSNPP에 의한 다이설파이드 교환 효율 증가

[0524] 표 1에 도시된 바와 같이, 컨쥬게이트의 효율은 가교제로서 SPP를 사용한 반응에 비해 SSNPP를 사용한 경우 반응이 향상된다. 백분율 효율은 항체 당 DM1 값을 항체 당 링커로 나눈 비율에 100을 곱해 계산되었다. SSNPP를 이용한 N901 항체의 컨쥬게이트는 pH 6.5 및 pH 7.4 모두에서 93%의 가교효율을 보였다. 반면, SPP를 이용한 N901 항체의 컨쥬게이트 효율은 pH 6.5에서 70%, pH 7.4에서 77%를 보였다. SSNPP에 의해 증가된 효율은 항체에 대한 표적 DM1의 비가 감소된 수의 링커 분자로 변형된 항체를 사용하여 달성될 수 있음을 보여준다. 실제, 유사한 항체에 대한 약물 비율(4.3)이 SSNPP를 이용하여 항체 당 도입된 4.2 (5-니트로피리딜-2-디티오)-그룹을 가진 항체 준비물과의 최종 컨쥬게이트에서 달성된 반면에 SPP를 이용하여 항체 당 도입된 5.6 (피리딜-2-디티오)-그룹을 가진 항체 준비물은 그러하지 아니하였다(표 2 참조). 따라서, 이러한 조건 하에서 견줄만한 컨쥬게이션 결과를 얻기 위해 필요한 약물의 양은 SPP-변형된 항체 보다 SSNPP-변형된 항체의 경우가 25% 낮았다. SSNPP에 의해 증가된 효율의 추가적 잠재적 이점은 컨쥬게이션 반응에서 DM1의 물 과량의 감소된 사용일 수 있다. 0.8-1.7 배 과량의 약물 당량 범위에서의 컨쥬게이션 반응 후 항체 당 DM1의 비고는 SSNPP 가교제를 이용하면 1.1 배 물 과량으로 100% 컨쥬게이션을 달성하기에 충분함을 보여준다(도 7). SSNPP 또는 SPP에 의해 변형된 항체와 DM1 반응에 대한 시간 비교는 예를 들어, 도 8에 도시되어 있다. 각 경우에 있어서, 통합된 링커 1몰 당 1.1 배 물 과량의 DM1으로 항체가 처리되었다. SSNPP-변형된 항체와의 반응이 SPP-변형된 항체의 경우 보다 상당히 빠르다(도 8). 더욱이 SPP를 사용하여 유사한 효율을 달성하기 위해서는 1.7 배의 물 과량이 충분하지 않다. 1) 낮은 물 과량의 DM1 사용과 2) 항체 당 적은 링커수를 사용할 수 있는 점은 SPP 대신에 가교제로서 SSNPP를 사용할 때 항체에 대한 타겟 DM1을 달성하는데 요구되는 약물의 양을 50% 만크거나 감소시키는 것을 가능하게 한다.

[0525] SSNPP를 사용한 컨쥬게이션의 증가된 효율은 컨쥬게이트의 모노머 특성이나 항체 컨쥬게이트와 연관된 컨쥬게이션되지 않은 자유 약물 양에 있어서의 타협 없이 달성된다. SEC 분석은 모노머, 이량체, 삼량체 또는 그 이상의 분자량의 집합체의 양을 결정하는데 사용된다. 표 1에 도시된 바와 같이, 90% 이상의 모노머라는 전형적 결과는 어느 링커에서도 얻어졌다. 컨쥬게이트되지 않은 약물의 수준은 컨쥬게이트 샘플에 대한 역상 HPLC 분석(reverse phase HPLC analysis)에 의해 측정되었다. 어느 반응의 경우에도 자유 약물의 백분율은 2% 미만이었다. 또한, 빠른 컨쥬게이션 반응은 SPP에 비해 SSNPP의 경우 빠른 시간 내에 달성가능하고(미국특허 제 6,913,748호), 이는 컨쥬게이션 반응에 필요한 유기용매에 연장된 노출에 민감한 일부 항체들의 손실을 감소시킬 수 있다. 또한, 짧은 반응시간은 컨쥬게이션 반응 동안에 일어나는 경쟁적인 부수 반응인 DM1 이량체화로 인한 약물 손실을 감소시킨다. 추가로 수율에서의 증가와 감소된 부수 반응은 DM1 요구를 감소시키는데 기여한다.

[0526] 또한, SSNPP를 이용할 때 컨쥬게이션의 향상된 속도와 효율은 항체에 다른 약물을 컨쥬게이션할 때에도 관찰되었고 이는 새로운 링커제(가교제)의 광범위한 적용성을 시사한다. N901 항체를 DNA-알킬화 약물, DC4, CC-1065 유사체와 컨쥬게이션할 때 SSNPP를 사용한 경우의 컨쥬게이션 효율과 SPP를 사용한 경우의 컨쥬게이션 효율이 예를 들어 표 3에 도시되어 있다. 2시간까지 SSNPP 가교제는 반응을 완료하는 반면에, SPP 가교제는 2시간까지 단지 73% 완료율을 나타내고 2시간을 상당히 초과한 경우에 상당한 약물 도입을 나타낸다(18시간 후 91%). 오히려 훨씬 연장된 반응시간만이 100% 완료율을 달성하게 할 수 있다.

[0528] 표 1. DM1과 N901 항체 컨쥬게이트에 있어서 SSNPP 및 SPP 링커의 비교(컨쥬게이션은 링커 당 1.7배의 물 과량의 DM1을 사용하고 지시된 pH에서 2시간 동안 실시)

링커	pH	링커/항체	DM1/Ab	% 효율	% 자유 약물	SEC 분석			
						모노머	이량체	삼량체	HMW
SSNPP	7.4	4.1	3.8	93	0.8	91.9	6.3	0.6	0.1
SPP	7.4	5.6	4.3	77	1.8	93.6	4.9	0.4	0.2
SSNPP	6.5	4.0	3.7	93	0.9	-	-	-	-
SPP	6.5	6.6	4.6	70	1.9	-	-	-	-

[0529]

[0530] 표 2. 링커로서 SSNPP를 사용하는 경우 항체에 대한 표적 DM1의 비율을 달성하는데 요구되는 항체에 대해 감소된 링커의 수(컨쥬게이션은 링커 당 1.1배의 물 과량의 DM1을 사용하여 pH 7.4에서 2시간 동안 실시)

링커	링커/항체	DM1/Ab(항체)
SSNPP	4.2	4.3
SPP	5.6	4.3

[0531]

[0532]

표 3.DC4와 N901 항체 컨쥬게이트에 있어서 SSNPP 및 SPP 링커의 비교(컨쥬게이션은 링커 당 1.4배의 몰 과량의 DC4를 사용하고 pH 7.4에서 지시된 시간 동안 실시)

링커	시간(hour)	링커/항체	DC4/Ab	% 효율
SSNPP	2	4.2	4.3	102
SSNPP	18	4.2	4.1	98
SPP	2	5.6	4.1	73
SPP	18	5.6	5.1	91

[0533]

[0535]

실시예 3: 술폰산기를 포함하는 티오에테르(비-절단성) 및 다이설파이드 링커들에 의해 연결된 항체와 메이탄시노이드 컨쥬게이트의 시험관내 세포독성 평가

[0536]

술폰산기를 포함하는 티오에테르 및 다이설파이드 링커들에 의해 연결된 항체-메이탄시노이드 컨쥬게이트의 세포독성 효과는 상기 컨쥬게이트와 암세포를 4-5일 동안 연속적으로 인큐베이션시킨 후 WST-8 세포 생존율 어세이를 이용하여 전형적으로 평가되었다. 항원-발현 암세포(웰 당 ~1000-5000개 세포)를 우태아 혈청을 포함하는 통상의 생장 배지가 있는 96-웰 플레이트에서 대략 5일 동안 인큐베이션하였고, 이때 항체-메이탄시노이드 컨쥬게이트 농도를 다양하게 변화시키면서 첨가하여 인큐베이션하였다. 그런 다음, WST-8 시약을 첨가하고 ~2-5 시간 후에 450nm에서 플레이트 흡광도를 측정하였다. 생존 분획을 컨쥬게이트 농도에 대해 그래프화하여 컨쥬게이트의 IC₅₀ 값(50% 세포 사멸 농도)을 결정하였다.

[0537]

도 60 및 도 61은 술폰산기를 포함하는 다이설파이드 결합된 링커에 의한 항-CanAg(huC242)-메이탄시노이드 컨쥬게이트(huC242-설폰-SPDB-DM4)(6.0에서 7.6 메이탄시노이드/항체)의 CanAg-양성 COLO205 및 COLO205-MDR 세포들에 대한 세포독성 향상을 3.3 메이탄시노이드/항체의 컨쥬게이트에 대해 비교도시하고 있다. 높은 메이탄시노이드 결합 부하량을 갖는 컨쥬게이트의 효능은 항체에 대한 8개까지의 메이탄시노이드 분자 결합이 표적 COLO205 세포에 대한 컨쥬게이트 결합에 영향을 주지 않았음을 나타낸다.

[0538]

도 62는 유사한 메이탄시노이드 결합 부하량을 갖는 항-CanAg 항체-메이탄시노이드 컨쥬게이트의 CanAg 항원-양성 COLO205-MDR 세포에 대한 세포독성 활성을 도시하고 있다. 다이설파이드 링커에서의 술폰산기의 존재는 상기 다중 약물 내성 세포에 대해 컨쥬게이트 효능을 유의적으로 향상시켰다. 술폰산기가 연결된 컨쥬게이트의 향상된 효능은 새로운 발견이고 치료적인 측면에서 잠재적인 응용가능성을 강력히 시사한다.

[0539]

도 63은 유사한 메이탄시노이드 결합 부하량을 갖는 항-EpCAM 항체-메이탄시노이드 컨쥬게이트의 EpCAM 항원-양성 COLO205-MDR 세포에 대한 세포독성 활성을 도시하고 있다. 다이설파이드 링커에서의 술폰산기의 존재는 상기 다중 약물 내성 세포에 대해 컨쥬게이트 효능을 유의적으로 향상시켰다. 술폰산기가 연결된 컨쥬게이트의 향상된 효능은 새로운 발견이고 치료적인 측면에서 잠재적인 응용가능성을 강력히 시사한다.

[0540]

도 64는 유사한 메이탄시노이드 결합 부하량을 갖는 항-EpCAM 항체-메이탄시노이드 컨쥬게이트의 EpCAM 항원-양성 HCT 세포에 대한 세포독성 활성을 도시하고 있다. 다이설파이드 링커에서의 술폰산기의 존재는 상기 다중 약물 내성 세포에 대해 컨쥬게이트 효능을 유의적으로 향상시켰다. 술폰산기가 연결된 컨쥬게이트의 향상된 효능은 새로운 발견이고 치료적인 측면에서 잠재적인 응용가능성을 강력히 시사한다.

[0541]

도 65는 유사한 메이탄시노이드 결합 부하량을 갖는 항-EpCAM 항체-메이탄시노이드 컨쥬게이트의 EpCAM 항원-양성 COLO205-MDR 세포에 대한 세포독성 활성을 도시하고 있다. 티오에테르 링커에서의 술폰산기의 존재는 상기 다중 약물 내성 세포에 대해 컨쥬게이트 효능을 유의적으로 향상시켰다. 술폰산기가 연결된 컨쥬게이트의 향상된 효능은 새로운 발견이고 치료적인 측면에서 잠재적인 응용가능성을 강력히 시사한다.

[0543] 실시예 4: 항-EpCAM-메이탄시노이드 컨쥬게이트인 B38.1-SPDB-DM4 및 B38.1-설폰-SPDB-DM4의 결장암, COLO205 및 COLO205-MDR, 이종이식체(xenografts)에 대한 생체 내(in vivo)에서의 항-종양 활성 비교

[0544] B38.1-SPDB-DM4 및 B38.1-설폰-SPDB-DM4 컨쥬게이트의 항-종양 효과가 인간의 결장암종, COLO205 및 COLO205-MDR의 이종이식 모델(P-당단백질이 과발현되도록 조작됨)에서 평가되었다. 세포들이 SCID 마우스의 오른쪽 어깨 부위에 피하 주사되었다. 종양의 용적이 대략 200 mm³ 크기에 도달하였을 때 마우스들을 종양 용적에 의해 임의로 분류하고 3가지 그룹으로 나눴다. 각 그룹은 단일의 정맥 볼루스 투여 방식에 의해 B38.1-SPDB-DM4 (10 mg 컨쥬게이트 단백질/kg), B38.1-설폰-SPDB-DM4 (10 mg 컨쥬게이트 단백질/kg) 또는 인산염 완충 생리적 식염수 (비히클 대조군)가 투여되었다. 종양 성장이 주 2회 종양 크기 측정에 의해 관찰되었다. 종양크기는 길이 × 너비 × 높이 × 1/2의 공식에 의해 계산되었다.

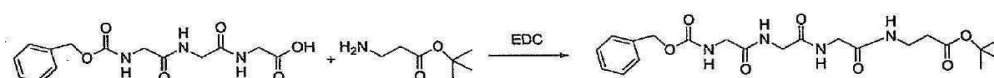
[0546] *개별적인 COLO205-MDR 종양의 용적 변화는 도 66에 도시되어 있다. 컨쥬게이트 처치는 유의적인 종양 성장 지연을 가져왔다. B38.1-설폰-SPDB-DM4는 인간의 대장암 이종이식 모델에서 B38.1-SPDB-DM4 보다 더 효과적이었다.

[0547] 개별적인 COLO205 종양의 용적 변화는 도 67에 도시되어 있다. 컨쥬게이트 처치는 유의적인 종양 성장 지연을 가져왔다. B38.1-설폰-SPDB-DM4으로 처리된 6마리 중 2마리는 완전한 종양 축소를 나타냈다. 따라서, B38.1-설폰-SPDB-DM4는 본 모델에서 B38.1-SPDB-DM4 보다 더 효과적이었다.

[0549] 실시예 5: 전구-하전된 링커(CX1-1)의 합성:

[0550] Z-Gly-Gly-Gly-β-Ala-OtBu

[0551]

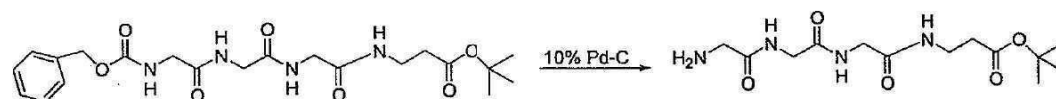


[0552] 1.3 g (4.0 mmol) Z-Gly-Gly-Gly-OH, 0.583 g (4.0 mmol) 3차-부틸-3-아미노프로피오네이트, 0.651 g (4.25 mmol) 히드록시벤조트리아졸 및 0.81 g (4.23 mmol) N-(3-디메틸아미노프로필)-N'-에틸카르보디이미드 하이드로클로라이드를 50 mL 플라스크에 넣고 질소 분위가 하에서 20 mL의 디메틸포름아미드에서 마그네틱 바를 이용하여 교반하면서 용해시켰다. 3 시간 후, 반응 혼합물은 5.0 cm × 25 cm C18 컬럼을 이용한 역상 HPLC에 의해 5 mL 분량으로 정제되었다. 상기 컬럼에서 0.3 % 포름산 및 5% 아세토니트릴을 포함하는 탈이온수로 10분간 100 mL/분의 속도로 용리과정이 수행되었고 이어서 5% 아세토니트릴에서 90% 아세토니트릴까지의 선형 구배를 15분간 적용하였다. 생성물 분획들 (19분의 체류시간)이 합쳐지고 진공 하에서 로터리 증발에 의해 용매가 제거되어 표기의 화합물 1.35 g (75%)을 수득하였다.

[0553] ¹H NMR (d₆-DMSO) 8.16 (t, J= 5.2 Hz, 1H), 8.10 (t, J= 5.2 Hz, 1H), 7.82 (t, J= 5.2 Hz, 1H), 7.25-7.4 (m, 5H), 5.04 (s, 2H), 3.74 (d, J= 5.6 Hz, 2H), 3.67 (t, J= 6.4 Hz, 4H), 3.25 (q, J= 6.1 Hz, 2H), 2.35 (t, J= 6.8 Hz, 2H), 1.39 (s, 9H). ¹³C NMR (d₆-DMSO) 170.45, 169.61, 169.00, 168.63, 156.49, 136.94, 128.30, 127.76, 127.69, 79.89, 65.51, 43.56, 42.10, 41.90, 34.89, 34.78, 27.70. HRMS (M +Na⁺): 계산값 (Calc.) 473.2012, 측정값(found) 473.1995.

[0555] H-Gly-Gly-Gly-β-Ala-OtBu

[0556]

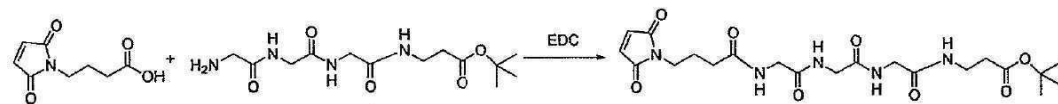


[0557] 1.3 g (2.89 mmol) Z-Gly-Gly-Gly-β-Ala-OtBu를 250 mL의 파르 셰이커 플라스크(parr shaker flask)에 담긴 80 mL의 메탄올:탈이온수(95:5)에 용해시켰고, 상기 플라스크에는 탄소 상의 10% 팔라듐 0.12 g이 첨가되었다. 상기 플라스크는 7시간 동안 수소 분위기 (42 PSI) 하에서 흔들어졌다. 혼합물은 셀라이트 필터를 통해 진공 여과되었고, 여과물은 진공 하에서 로터리 증발(rotary evaporation)에 의해 농축되어 표기의 화합물 0.88 g (96%)이 수득되었다.

[0558] ¹H NMR (d₆-DMSO) 8.12 (t, J= 1.6Hz 2H), 8.08 (t, J=1.6 Hz, 1H), 3.75 (s,2H), 3.64 (d, J= 5.9 2H), 3.28

(bs, 2H), 3.24 (q, J= 6.0 Hz, 2H), 3.13 (s, 2H), 2.35 (t, J= 6.8 Hz, 2H), 1.39 (s, 9H). ^{13}C NMR (d_6 -DMSO) 173.38, 170.46, 169.18, 168.70, 79.89, 44.65, 41.95, 34.88, 34.78, 27.71. HRMS ($\text{M} + \text{H}^+$): 계산값 (Calc.) 317.1825, 측정값(found) 317.1801

[0560] **Mal-Gaba-Gly-Gly-Gly- β -Ala-OtBu**

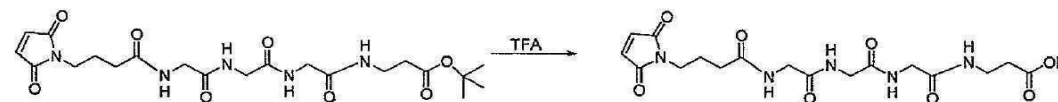


[0561]

[0562] 513 mg (2.8 mmol)의 4-(2,5-디옥소-2,5-디히드로-1H-피롤-1-일)부탄산, 800 mg (0.2.8 mmol) 3차-부틸 3-(2-(2-(2-아미노아세트아미도)아세트아미도)아세트아미도)프로파노에이트 및 583 mg (3.0 mmol) N-(3-디메틸아미노프로필)-N'-에틸카르보디이미드 하이드로클로라이드를 12 mL의 디메틸 포름아미드에 용해시켰고 3시간 동안 교반하였다. 반응 혼합물은 4개로 등분하여 5.0 cm \times 25 cm C18 컬럼을 이용한 역상 HPLC에 의해 정제되었다. 상기 컬럼에서 0.3 % 포름산 및 5% 아세트니트릴을 포함하는 탈이온수로 10분간 100 mL/분의 속도로 용리과정이 수행되었고 이어서 5% 아세트니트릴에서 33% 아세트니트릴까지의 선형 구배를 13분간 적용하였다. 생성물 분획들 (21분의 체류시간)이 합쳐지고 진공 하에서 로터리 증발에 의해 용매가 제거되어 표기의 화합물 832 mg (62 %)을 수득하였다.

[0563] ^1H NMR (d_6 -DMSO) 8.10-8.16 (m, 2H), 8.07 (t, J= 4.8 Hz, 1H), 7.0-7.15(m, 1H), 3.747 (t, J= 6.0 Hz, 3H), 3.64 (d, J= 5.6 Hz, 2H), 3.41 (t, J= 6.8, 2H), 3.1-3.33 (m, 1H), 3.19-3.26 (m, 2H), 2.348 (t, J= 6.8, 2H), 2.132 (t, J= 7.2 Hz, 2H), 1.67-1.76 (m, 2H), 1.39 (s, 9H). ^{13}C NMR (d_6 -DMSO) 171.80, 170.98, 170.39, 169.48, 168.96, 168.56, 134.37, 79.83, 42.05, 41.83, 37.38, 34.82, 34.71, 32.26, 27.83, 23.95. HRMS ($\text{M} + \text{Na}^+$): 계산값(Calc.) 504.2070, 측정값(found) 504.2046

[0565] **Mal-Gaba-Gly-Gly-Gly- β -Ala-OH**

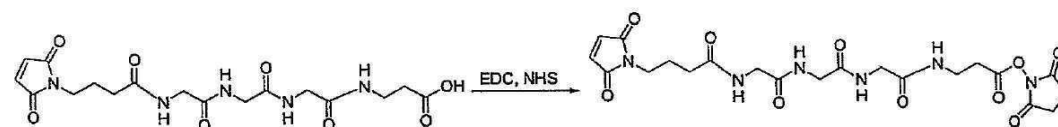


[0566]

[0567] 820 mg (1.7 mmol) Mal-Gaba-Gly-Gly-Gly- β -Ala-OtBu는 9.0 mL의 트리플루오로아세트산:탈이온수(95:5)에 용해되었고, 3시간 동안 마그네틱 바를 이용하여 교반되었다. 용매를 진공 하에서 로터리 증발에 의해 제거하여 표기의 화합물 730 mg (100%)을 수득하였다.

[0568] ^1H NMR (d_6 -DMSO) 12.1 (bs, 1H), 8.05-8.20 (m, 3H), 7.82 (t, J= 6.0 Hz, 1H), 7.00 (s, 2H), 3.71 (t, J= 6.0 Hz, 4H), 3.65 (d, J= 6.0 Hz, 2H), 3.41 (t, J= 7.2 Hz, 2H), 3.26 (q, J= 5.6 Hz, 2H), 2.38 (t, J= 7.2 Hz, 2H), 2.14 (q, J= 8.0 Hz, 2H), 1.67-1.77 (m, 2H). ^{13}C NMR (d_6 -DMSO) 172.70, 171.83, 171.01, 169.50, 168.99, 168.51, 134.38, 42.07, 41.84, 36.75, 34.70, 33.69, 32.28, 23.97 HRMS ($\text{M} + \text{Na}^+$): 계산값 (Calc.) 448.1444, 측정값(found) 448.1465

[0570] **Mal-Gaba-Gly-Gly-Gly- β -Ala-ONHS (CX1-1)**



[0571]

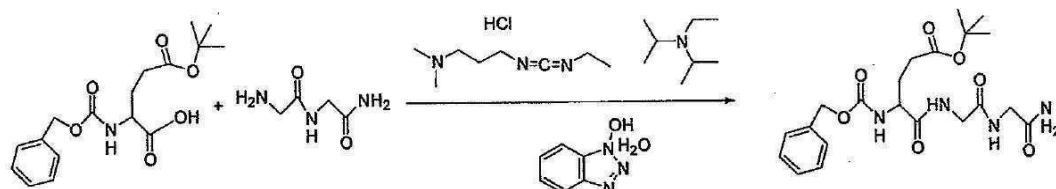
[0572] 76 mg (0.18 mmol) Mal-Gaba-Gly-Gly-Gly- β -Ala-OH, 72 mg (0.376 mmol) N-(3-디메틸아미노프로필)-N'-에틸카르보디이미드 하이드로클로라이드 및 66 mg (0.575 mmol) N-히드록시숙신이미드를 마그네틱 바를 이용한 교반으로 1.0 mL의 디메틸포름아미드에 용해시켰다. 2 시간 후, 반응 혼합물은 2개로 등분하여 1.9 cm \times 10 cm C8 컬럼을 이용한 역상 HPLC에 의해 정제되었다. 상기 컬럼에서 0.3 % 포름산 및 5% 1,4-디옥산을 포함하는 탈이온수

로 3분간 18 mL/분의 속도로 용리과정이 수행되었고 이어서 5% 1,4-디옥산에서 30% 1,4-디옥산까지의 선형 구배를 15분간 적용하였다. 생성물 분획들 (6.5분의 체류시간)이 플라스크에서 합쳐지고 즉시 드라이 아이스 아세톤 배스에서 냉동되었다. 대기온도에서 동결건조에 의해 용매가 제거되어 표기의 화합물 40 mg (42%)이 수득되었다.

[0573] ^1H NMR (d_6 -DMSO) 8.08-8.11 (m, 3H), 7.99 (t, J = 6.4 Hz, 1H), 7.00 (s, 2H), 3.6-3.75 (m, 6H), 3.0-3.2 (m, 4H), 2.84 (s, 4H), 2.13 (t, J = 7.6 Hz), 1.83-1.93 (m, 2H), 1.69-1.72 (m, 2H). HRMS ($M + \text{Na}^+$): 계산값(Calc.) 545.1608, 측정값(found) 545.1638

[0575] Z-Glu(OtBu)-Gly-Gly-NH₂

[0576]

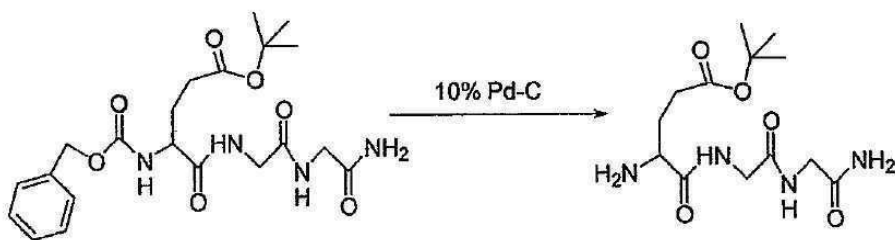


[0577] 40 mL 디메틸 포름아미드가 2.52 g (7.47 mmol) Z-Glu(OtBu)-OH, 1.3 g (8.49 mmol) 히드록시벤조트리아졸, 1.3 g (7.76 mmol) H-Gly-GlyNH₂, 및 1.52 g (7.93 mmol) N-(3-디메틸아미노프로필)-N'-에틸카르보디이미드 하이드로클로라이드에 첨가되었다. 2.5 mL (14.3 mmol) 디이소프로필 에틸 아민이 첨가되었고 반응 혼합물은 하룻밤 동안 교반되었다. 반응 혼합물은 3개로 등분하여 준비된 5.0 cm × 25 cm C18 HPLC 컬럼 상에서 직접 주입에 의해 정제되었다. 상기 컬럼에서 0.3 % 포름산 및 5% 아세토니트릴을 포함하는 탈이온수로 10분간 100 mL/분의 속도로 용리과정이 수행되었고 이어서 5% 아세토니트릴에서 90% 아세토니트릴까지의 선형 구배를 15분간 적용하였다. 생성물 분획들 (18분 내지 20분의 체류시간)이 합쳐지고 진공 하에서 로터리 증발에 의해 용매가 제거되어 표기의 화합물 2.9 g (83%)을 수득하였다.

[0578] ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ 7.79-7.68 (m, 1H), 7.64 (s, 1H), 7.27 (q, J = 4.9, 5H), 6.90 (s, 1H), 6.42 (s, 1H), 6.35 (d, J = 6.8, 1H), 5.08 (d, J = 12.0, 1H), 4.98 (d, J = 12.2, 1H), 4.20 (dd, J = 12.9, 7.6, 1H), 3.84-3.95 (m, 2H), 3.83 (d, J = 5.0, 2H), 2.42-2.19 (m, 2H), 2.07 (d, J = 6.9, 1H), 1.96-1.83 (m, 1H), 1.39 (s, 9H). ^{13}C NMR (101 MHz, DMSO) δ 171.79, 171.65, 170.82, 168.87, 163.04, 156.08, 136.86, 128.31, 127.74, 79.64, 65.58, 53.96, 42.17, 41.81, 31.25, 27.73, 27.01.

[0580] H-Glu(OtBu)-Gly-Gly-NH₂

[0581]

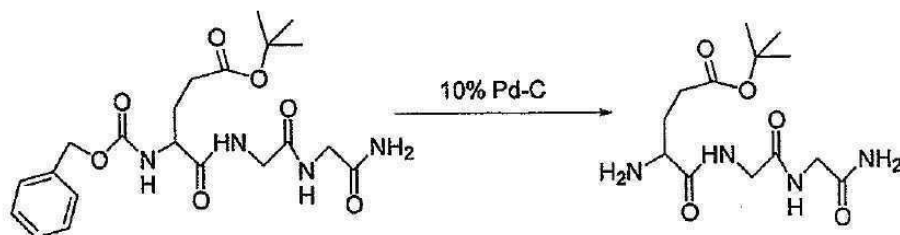


[0582] 940 mg (2.09 mmol) Z-Glu(OtBu)-Gly-GlyNH₂를 250 mL의 유리 파르 수소화 플라스크(PARR hydrogenation shaker flask)에 담긴 40 mL의 메탄올:탈이온수(95:5)에 용해시켰고, 상기 플라스크에는 탄소 상의 10% 팔라듐 222 mg이 첨가되었다. 상기 플라스크는 4시간 동안 수소 분위기 (40 PSI) 하에서 흔들어지면서 내용물에 대한 수소화가 이루어졌다. 혼합물은 셀라이트 필터를 통해 진공 여과되었고, 용매는 로터리 증발(rotary evaporation)에 의해 여과물로부터 제거되어 표기의 화합물 640 mg (94%)이 수득되었다.

[0583] ^1H NMR (400 MHz, DMSO) δ 4.03 (s, 1H), 3.75 (d, J = 3.3, 2H), 3.63 (s, 2H), 3.30-3.22 (m, J = 3.6, 1H), 3.14-3.10 (m, 1H), 2.27 (t, J = 7.9, 2H), 1.84 (td, J = 13.6, 7.4, 1H), 1.63 (td, J = 15.0, 7.5, 1H), 1.39 (s, 9H). ^{13}C NMR (101 MHz, MeOD) δ 176.53, 174.24, 172.00, 170.32, 81.82, 55.21, 43.64, 43.16,

40.44, 32.31, 30.45, 28.41. HRMS ($M + H^+$): 계산값(Calc.) 317.1825, 측정값(found) 317.1800.

[0585] E001008-28 Mal-Gaba-Glu(OtBu)-Gly-Gly-NH₂

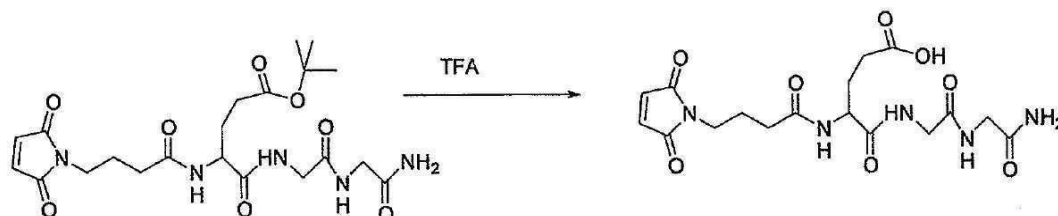


[0586]

[0587] 603 mg (1.9 mmol) H-Glu(OtBu)-Gly-Gly-NH₂, 372 mg (2.03 mmol) Mal-Gaba-OH 및 430 mg (2.24 mmol) N-(3-디메틸아미노프로필)-N'-에틸카르보디이미드 하이드로클로라이드를 4.5 mL의 디메틸 포름아미드 및 800 μ L 디클로로메탄에 용해시켰다. 반응 혼합물을 대기온도에서 3시간 동안 교반하였다. 반응 혼합물은 2개로 등분하여 준비된 5 cm \times 25 cm C18 HPLC 컬럼 상에서 직접 주입에 의해 정제되었다. 상기 컬럼에서 0.3 % 포름산 및 5% 아세트니트릴을 포함하는 탈이온수로 10분간 100 mL/분의 속도로 용리과정이 수행되었고 이어서 5% 아세트니트릴에서 90% 아세트니트릴까지의 선형 구배를 15분간 적용하였다. 생성물 분획들 (17.4분 내지 19.2분의 체류시간)이 합쳐지고 진공 하에서 로터리 증발에 의해 용매가 제거되어 표기의 화합물 2.9 g (83%)이 수득되었다.

[0588] ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 8.16 (t, J= 5.7, 1H), 8.06 (d, J= 7.4, 1H), 7.99 (t, J= 5.8, 1H), 7.19 (s, 1H), 7.06 (s, 2H), 4.18 (dd, J= 13.4, 7.9, 1H), 3.70 (d, J= 5.7, 2H), 3.62 (d, J= 5.8, 2H), 3.42-3.37 (m, 2H), 2.23 (t, J= 8.0, 2H), 2.12 (dd, J= 8.1, 6.4, 2H), 1.87 (dt, J= 14.2, 7.9, 1H), 1.70 (dt, J= 13.7, 6.8, 2H), 1.38 (s, 9H). ¹³C NMR (101 MHz, DMSO) δ 173.12, 171.77, 171.65, 171.03, 170.79, 168.89, 134.43, 79.62, 52.02, 42.14, 41.81, 36.80, 32.29, 31.22, 27.73, 26.95, 24.02. HRMS ($M + Na^+$): 계산값(Calc.) 504.2070, 측정값(found) 504.2053.

[0590] Mal-Gaba-Glu(OH)-Gly-Gly-NH₂

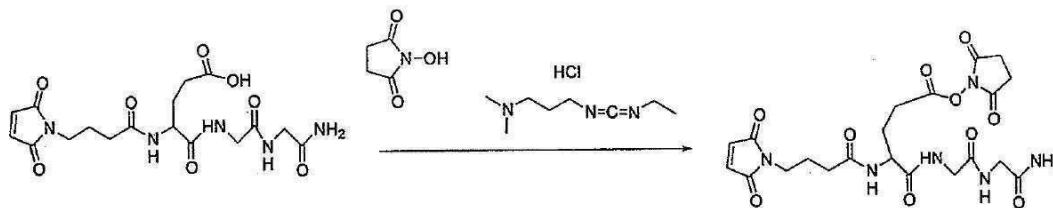


[0591]

[0592] 105 mg (0.218 mmol) Mal-Gaba-Glu(OtBu)-Gly-Gly-NH₂가 5 mL의 트리플루오로아세트산:탈이온수(95:5)에 용해되었고, 2시간 동안 마그네틱 바를 이용하여 교반되었다. 용매는 로터리 증발에 의해 제거되었고, 남은 물질을 취해 6 mL 아세트니트릴+1.5 mL 톨루엔에 넣어 현탁액으로 만들었다. 용매가 진공 하에서 로터리 증발에 의해 현탁액에서 제거되어 표기의 화합물 92 mg (100%)이 수득되었다.

[0593] ¹H NMR (400 MHz, DMSO) δ 6.99 (s, 2H), 4.18 (dd, J= 8.2, 5.7, 1H), 3.70 (s, 2H), 3.61 (s, 2H), 3.40 (t, J= 6.8, 2H), 2.26 (t, J= 7.8, 2H), 2.19-2.05 (m, 2H), 1.90 (dt, J= 13.7, 7.4, 1H), 1.73 (dt, J= 14.2, 7.5, 3H). ¹³C NMR (101 MHz, DMSO) δ 173.76, 171.72, 170.99, 170.70, 168.81, 134.37, 52.00, 41.97, 41.63, 36.75, 32.19, 29.95, 26.79, 23.93.

[0595] Mal-Gaba-Glu(OH)-Gly-Gly-NH₂

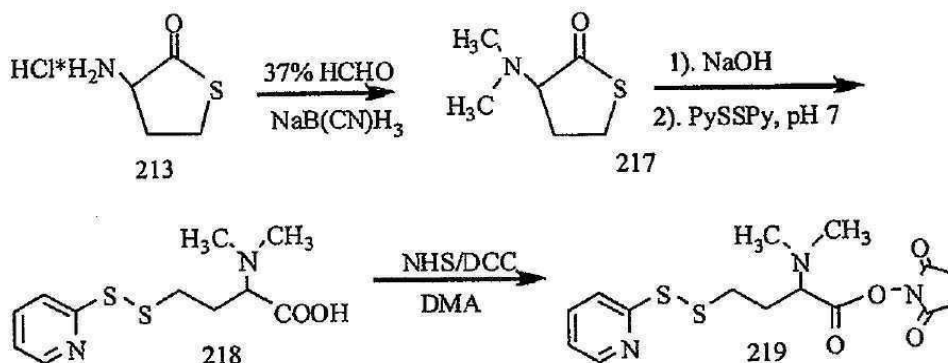


[0596]

[0597] 94 mg (0.22 mmol) Mal-Gaba-Glu(OH)-Gly-Gly-NH₂, 75 mg (0.65 mmol) N-히드록시숙신이미드 및 110 mg (0.57 mmol) N-(3-디메틸아미노프로필)-N'-에틸카르보디이미드 하이드로클로라이드를 3시간 동안 1 mL의 디메틸 포름아미드 내에서 마그네틱 바로 교반하였다. 미가공 반응 혼합물은 3개로 등분하여 1.9 cm × 10 cm C8 컬럼 상에서 직접 주입에 의해 정제되었다. 상기 컬럼에서 0.3 % 포름산 및 5% 1,4-디옥산을 포함하는 탈이온수로 3분간 18 mL/분의 속도로 용리과정이 수행되었고 이어서 5% 1,4-디옥산에서 30% 1,4-디옥산까지의 선형 구배를 18분간 적용하였다. 생성물 분획들 (7.3분의 체류시간)이 플라스크에서 합쳐지고 즉시 드라이 아이스/아세톤 배스에서 냉동되었다. 합쳐진 냉동 물질은 동결건조되었고, 표기의 화합물 80 mg (70 %)이 수득되었다.

[0598] ¹H NMR (400 MHz, DMSO) δ 8.20 (t, J= 5.4, 1H), 8.13 (d, J= 7.3, 1H), 8.03 (t, J= 5.6, 1H), 7.21 (s, 1H), 7.06 (s, 1H), 7.01 (s, 2H), 4.29 (dd, J=13.7, 6.5, 1H), 3.84-3.69 (m, 2H), 3.63 (d, J= 5.7, 2H), 3.57 (s, 2H), 3.41 (t, J= 6.8, 2H), 2.81 (s, 3H), 2.78-2.69 (m, 2H), 2.15 (dd, J= 9.1, 6.2, 1H), 2.10-1.95 (m, 1H), 1.88 (dt, J= 17.0, 7.5, 1H), 1.73 (dd, J= 14.0, 6.9, 2H). HRMS (M+Na⁺): 계산값(Calc.) 545.1608, 측정값(found) 545.1627.

[0599] 실시예 6: 양전하로 하전된 링커의 합성



[0600]

[0601] 3-(디메틸아미노)디히드로티오펜2(3H)-온 (217).

[0602] 메탄올 내의 포름알데히드(3 mL, 40.3 mmol) 및 3-아미노디히드로티오펜-2(3H)-온 하이드로클로라이드 (213) (1.0 g, 6.51 mmol)가 1 시간 동안 5회에 나누어서 소듐 시아노보론하이드라이드(0.409 g, 6.51 mmol)에 첨가되었다. 2 시간 동안 교반된 후, 혼합물은 증발처리되었고 EtAc에 재용해되었으며 1M NaH₂PO₄로 세척되었고, MgSO₄ 상에서 건조되었으며 여과 및 농축 후 MeOH/DCM (1:30)로 용리되는 SiO₂ 컬럼에 의해 정제되어 표기의 화합물 0.812 g (86%)이 수득되었다.

[0603] ¹H NMR (CDCl₃) 3.49 (dd, 1H, J= 6.3, 12.1 Hz), 3.24 (m, 2H), 2.42 (s, 6H), 2.38 (m, 1H), 2.21 (m, 1H); ¹³C NMR 206.58, 73.24, 41.62, 27.47, 25.51; ESI MS m/z+146.0 (M + H⁺), 168.0 (M + Na).

[0605] 2-(디메틸아미노)-4-(피리딘-2-일 디설파닐)부탄산 (218).

[0606] 3-(디메틸아미노)디히드로티오펜-2(3H)-온 (217) (0.95 g, 6.54 mmol)을 30분 동안 15 mL의 0.5 M NaOH 및 10 mL의 메탄올 용액에서 교반한 후, H₃PO₄로 중성화하여 pH 7.2로 만들었고, 50 mL 메탄올 내의 1,2-디(피리딘-2-일)디설파닐 (5.76 g, 26.2 mmol)을 첨가하였다. 혼합물을 하룻밤 동안 교반하였고, 농축하였으며, EtAc로 세척한 후 수용액을 0.01% 포름산 내의 5% 메탄올로부터 0.01% 포름산 내의 30% 메탄올로 용리되는 C-18 컬럼 상에 로

당하여 표기의 화합물 (368 mg, 20.65 % 수율)을 수득하였다.

[0607] ^1H NMR (CDCl_3/OD) 8.31 (dd, 1H, $J = 0.7, 4.7$ Hz), 7.77 (m, 2H), 7.15 (dd, 1H, $J = 0.8, 5.8$ Hz), 3.22 (m, 1H), 2.85 (m, 2H), 2.51 (s, 6H), 2.05 (m, 2H); ^{13}C NMR 175.00, 161.28, 150.46, 139.40, 122.60, 121.49, 71.20, 42.46, 36.29, 29.88; ESI MS m/z 272.9 (M + H), 295.0 (M+Na).

[0609] **2,5-디옥소피롤리딘-1-일 2-(디메틸아미노)-4-(피리딘-2-일 디설파닐)부타노에이트 (219)**

[0610] 2-(디메틸아미노)-4-(피리딘-2-일 디설파닐)부탄산(218) (92 mg, 0.338 mmol), 1-히드록시피롤리딘-2,5-디온 (65 mg, 0.565 mmol) 및 EDC (185 mg, 0.965 mmol)을 50°C에서 하룻밤 동안 3 ml의 DMA 내에서 교반하였다. 혼합물은 증발처리 후 1:10부터 1:4의 메탄올/ CH_2Cl_2 로 용리되는 SiO_2 컬럼 상에서 정제되어 표기의 화합물 43 mg (35%)이 수득되었다.

[0611] ^1H NMR (CDCl_3/OD) 8.40 (m, 1H), 7.83 (m, 2H), 7.22 (m, 1H), 3.34 (m, 1H), 2.82 (m, 2H), 2.75 (s, 4H), 2.66 (s, 6H), 1.98 (m, 2H); ^{13}C NMR 177.21, 161.78, 161.12, 150.68, 139.37, 122.70, 121.66, 70.80, 44.16, 43.15, 36.06, 27.38; ESI MS m/z 369.2 (M + H).

[0613] **실시예 7: huMv9-6-CX1-1-DM1 전구-하전된 링커 컨쥬게이트의 준비**

[0614] 다음과 같은 보관용 용액이 사용되었다: (1) DMA 내의 39.6 mM DM1; (2) DMA 내의 17.8 mM CX1-1 링커 용액; (3) 2 mM EDTA를 갖는 200 mM 숙신네이트 완충용액 (pH 5.0). 항체에 대해 8, 12 또는 16 당량의 링커를 포함하는 반응 혼합물이 90% 인산염 완충용액(pH 6.5)/10% DMA 내의 4 mg/ml의 항체 용액에 첨가되었다. 그리고 25 °C, pH 5.0에서 2시간 동안 반응시켰고, DM1과의 반응이 이어졌다.

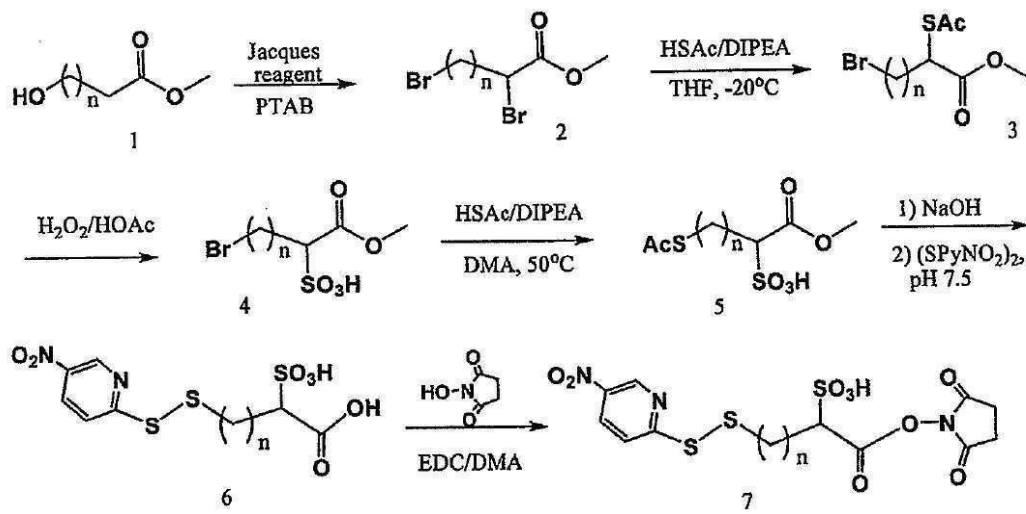
[0615] 항체 컨쥬게이트는 PBS(pH 7.4)로 평형화된 G25 컬럼을 이용하여 과량의 저분자 반응물로부터 분리되었다. 정제된 컨쥬게이트는 25°C에서 2시간 동안 유지시켜 불안정한 약물 연결들이 가수분해되도록 한 후 PBS 내에서의 하룻밤 동안의 투석 그리고 10 mM 히스티딘/130 mM 글리신 완충용액(pH 5.5) (1x o/n) 처리에 의해 자유 약물로부터 추가로 정제하였다. 투석된 컨쥬게이트 0.2 μm 필터를 이용하여 여과되었고 UV/Vis에 의해 분석하여 252 및 280 nm에서의 메이탄시노이드 및 항체에 대해 알려진 흡광계수(extinction coefficient)를 이용하여 항체 당 메이탄시노이드 수를 계산하였다. 회수율은 ~70%였고, 각 컨쥬게이트에 대해 측정된 항체 당 메이탄시노이드의 수는 사용된 과량의 링커에 의존하여 3.7 내지 6.8이었다.

[0617] **실시예 8: 생체내 약물동력학**

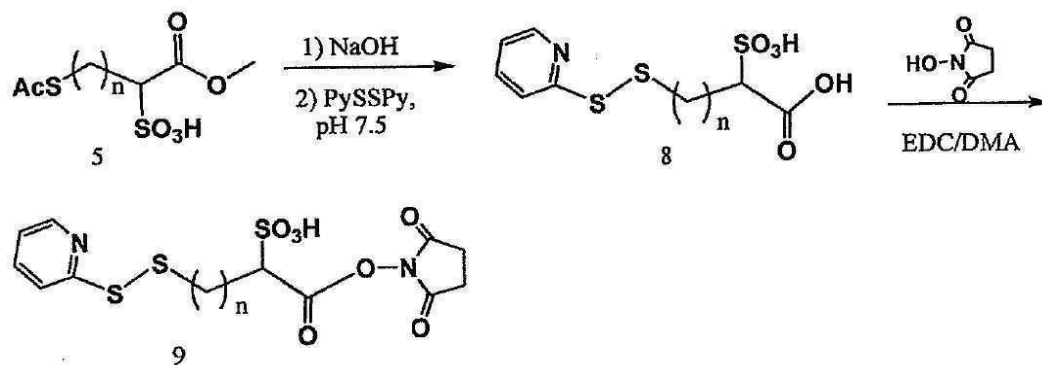
[0618] CD-1 마우스에서 ^3H -표지된-DM4을 갖는 인간화된 항체 C242의 하전된 설포-말(Sulfo-Mal) 링커 컨쥬게이트의 혈장 약물동력학이 항체 ELISA 및 ^3H -카운팅에 의해 분석되었다 (도 72). 3.5 및 6.4 D/A를 갖는 항체-Sulfo-Mal- ^3H -DM4 컨쥬게이트는 각각 정맥 내로 12.9 및 7.9 mg/kg (항체 투여량 기준)의 양으로 투여되었다. 혈장 샘플의 항체 값은 ELISA (염소의 항-huIgG 항체를 이용한 포획 및 당나귀의 항-huIgG 항체-HRP(horseradish peroxidase)컨쥬게이트를 이용한 검출에 기초) 및 3H-카운팅 (섬광 카운팅)에 의해 측정되었다. 도 72a는 ELISA 및 ^3H -카운팅에 의한 컨쥬게이트 농도에 대한 2개의 측정에 있어서 각 컨쥬게이트에 대해 유사한 값을 보여준다. 3.5 및 6.4 D/A 항체-Sulfo-Mal-DM4 컨쥬게이트 모두 4주간 양호한 혈장 안정성을 보여주었고, 반감기가 각각 대략 14.9일 및 9.7일이었다. 이러한 반감기는 컨쥬게이트되지 않은 항체의 반감기인 대략 11.8일과 유사한 것이었다. 2개의 항체-Sulfo-Mal-DM4 컨쥬게이트의 DM4/항체 비율(최초 3.5 및 6.4 D/A)은 혈장 순환에 있어서 4주간 안정적이었고 비교적 높은 6.4 D/A 부하량에서도 고른 것으로 나타났다(도 72b). Sulfo-Mal-연결된 huC242 항체-Sulfo-Mal-DM4 컨쥬게이트(3.5 D/A 부하량)는 12.9 mg/kg으로 투여된 경우 반감기가 14.9일 ($\text{AUC} = 38449 \text{ hr} \cdot \mu\text{g/mL}$)이었고, 이에 비해 SMCC-연결된 huC242 항체-SMCC-DM1 컨쥬게이트(4.2 D/A 부하량)는 12 mg/kg으로 투여된 경우 반감기가 12.6일($\text{AUC} = 25910 \text{ hr} \cdot \mu\text{g/mL}$)이었다. 따라서, Sulfo-Mal-연결된 컨쥬게이트가 SMCC 컨쥬게이트에 비해 훨씬 향상된 효능을 나타내었다(도 38b).

도면

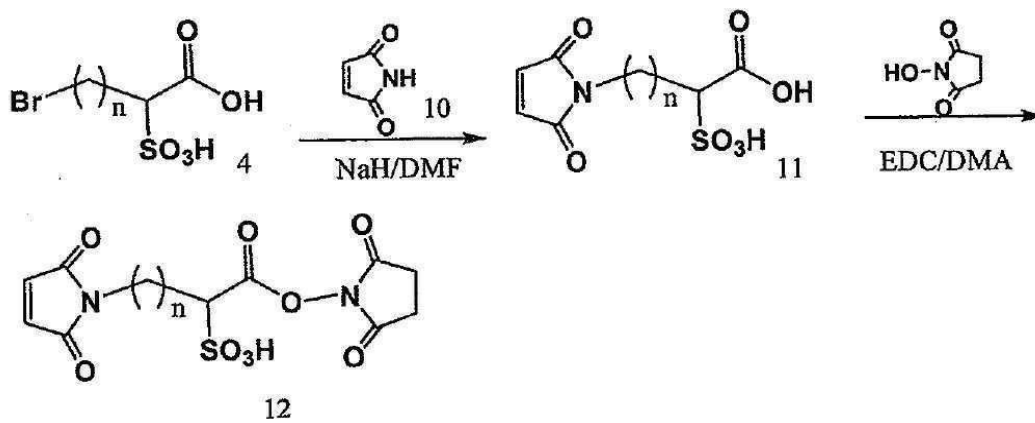
도면1



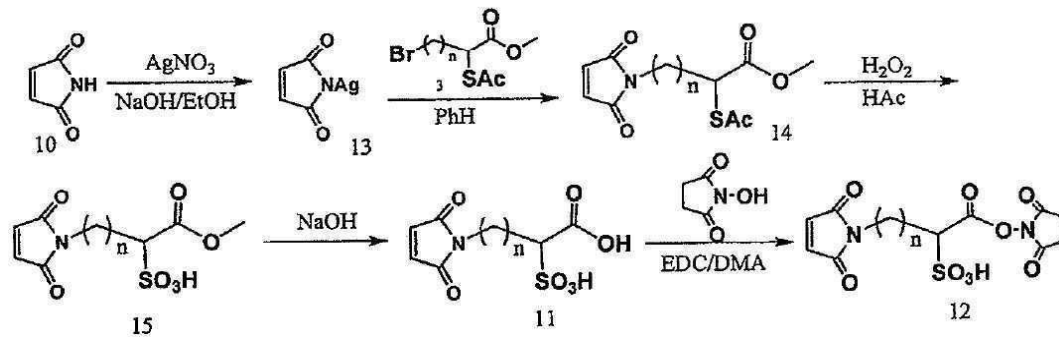
도면2



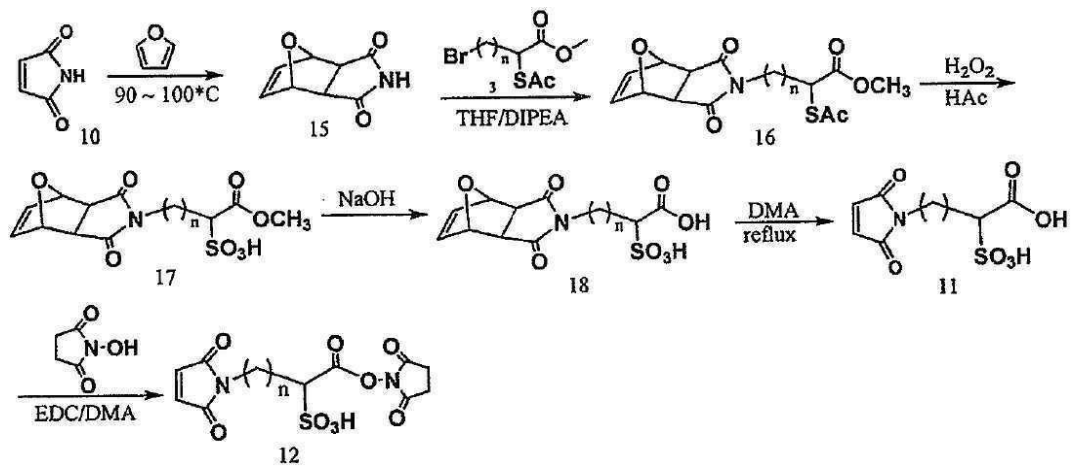
도면3



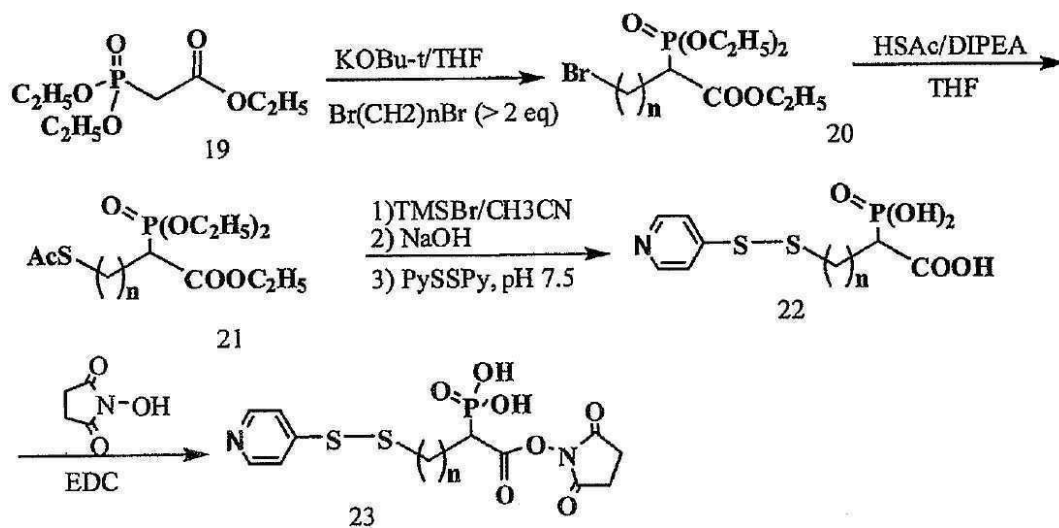
도면4



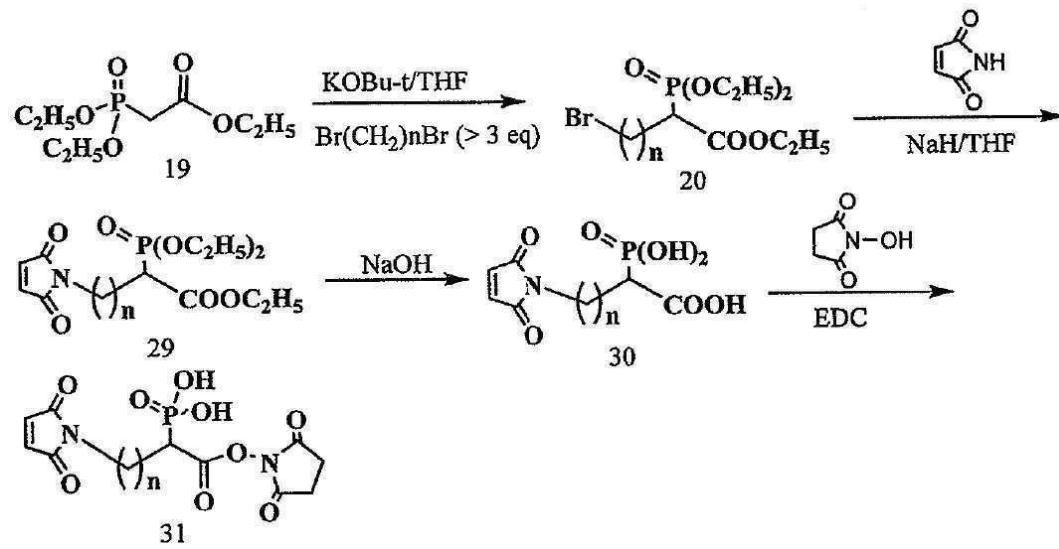
도면5



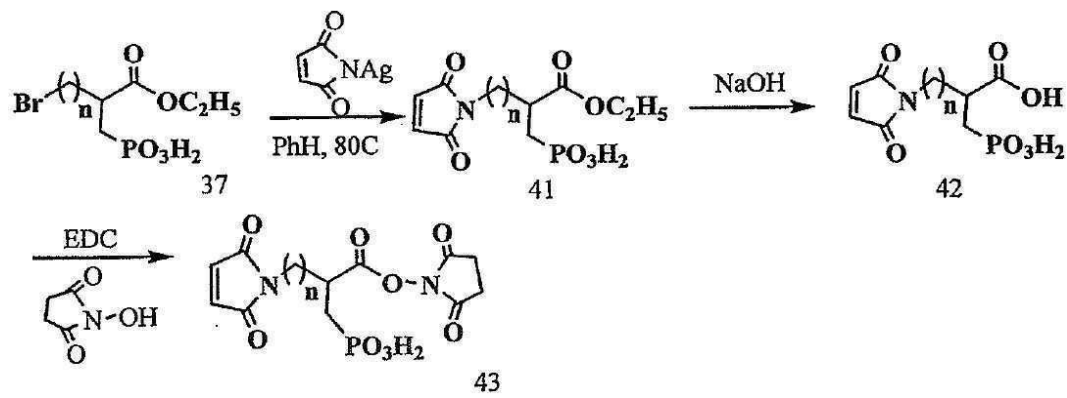
도면6



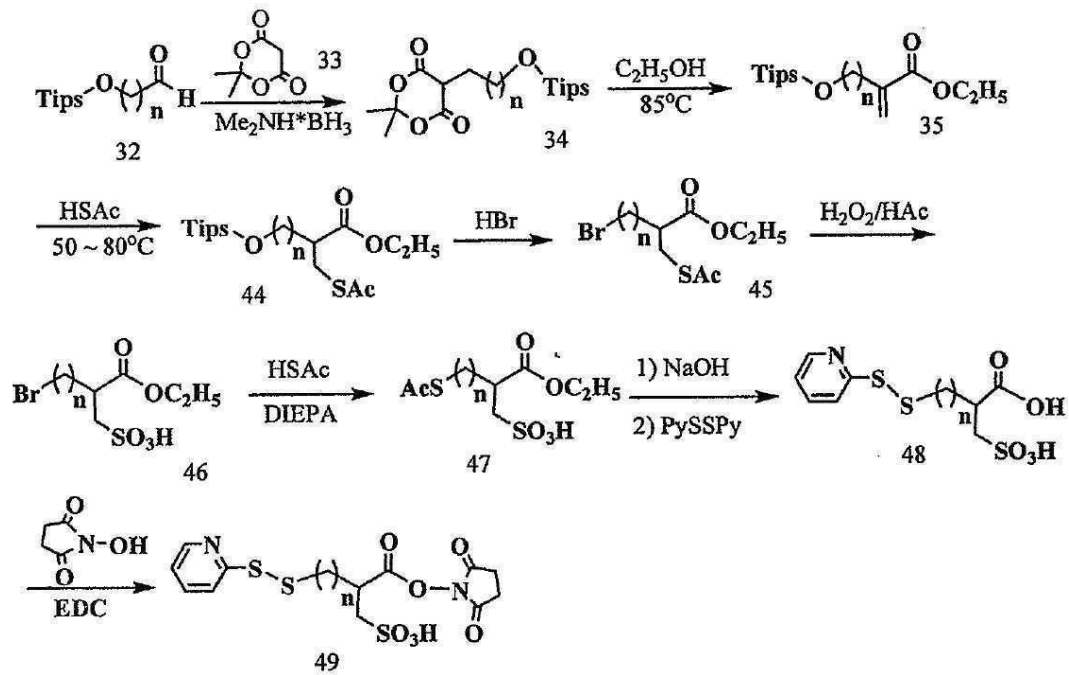
도면9



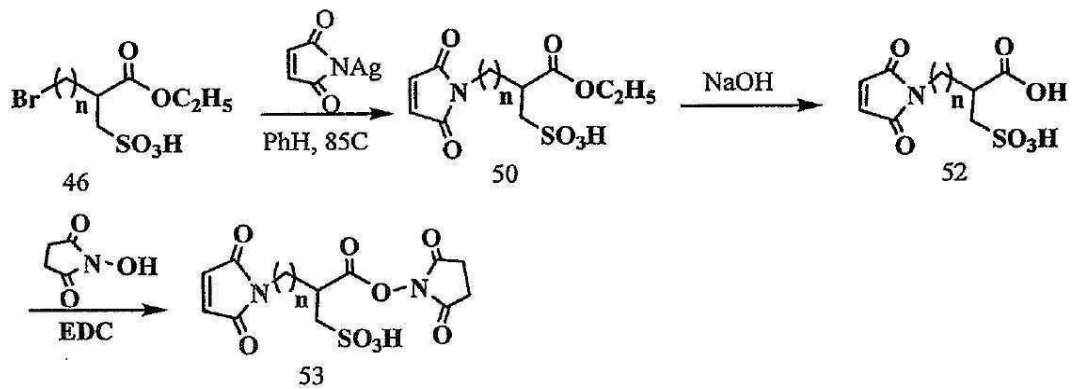
도면10



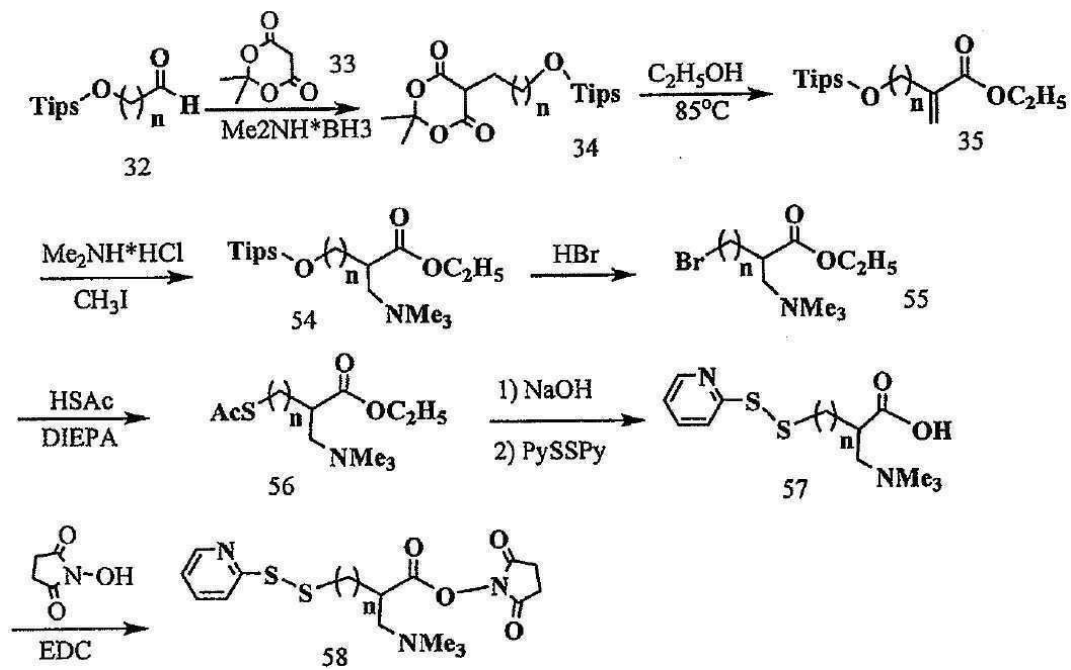
도면11



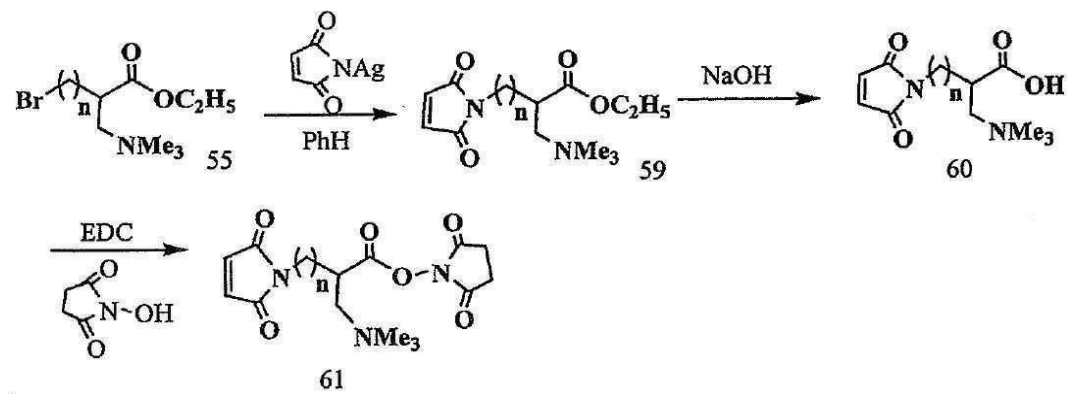
도면12



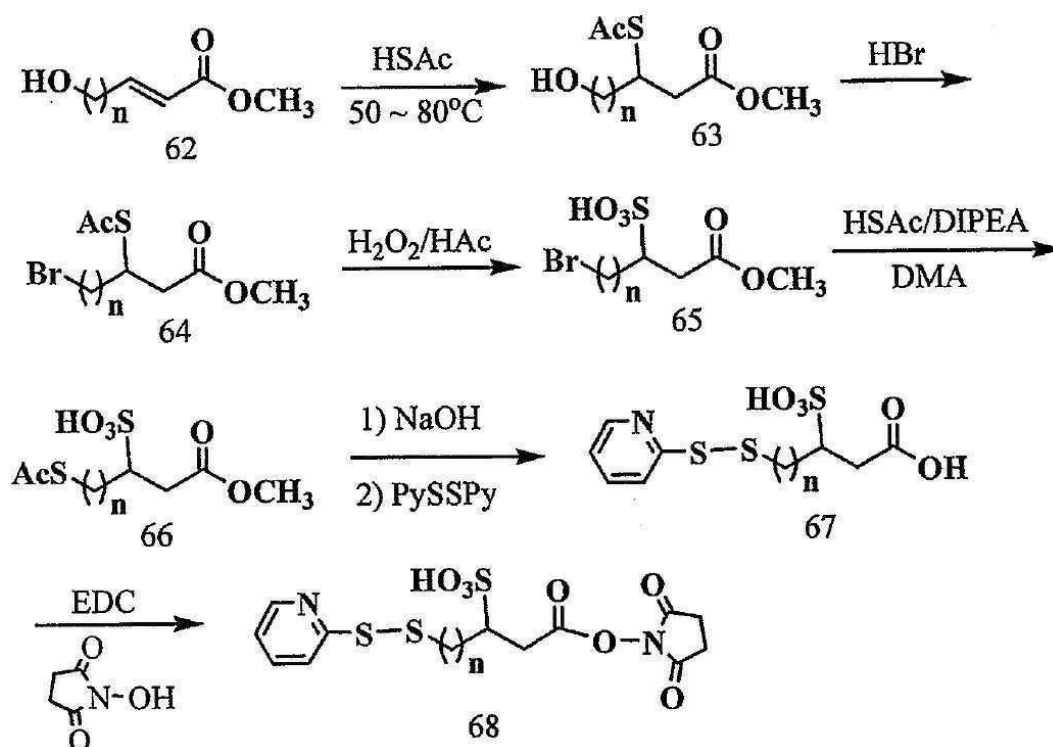
도면13



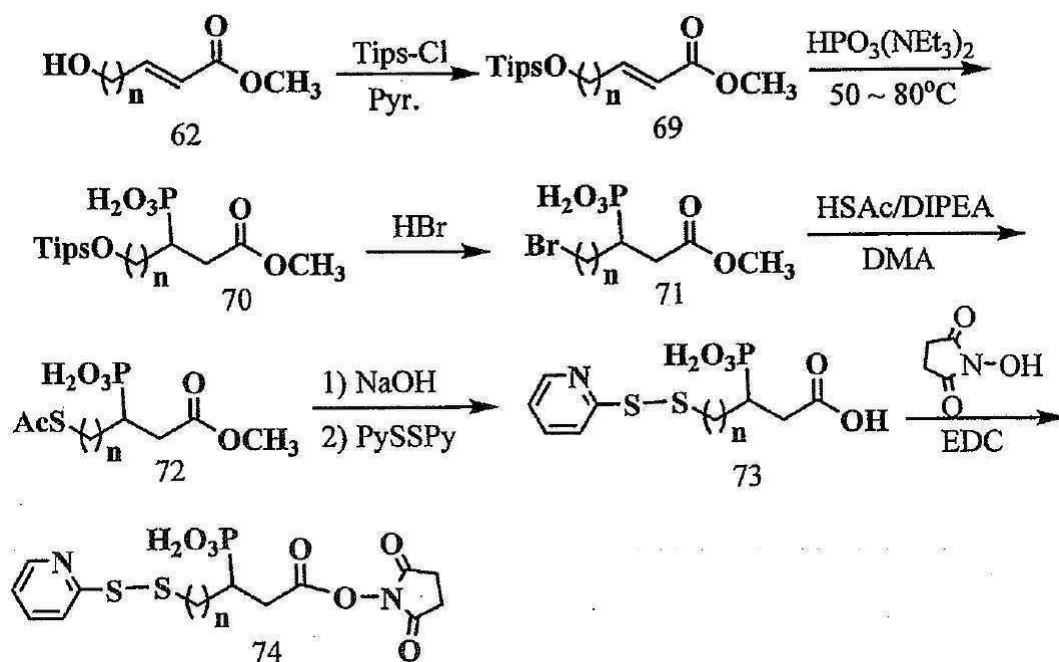
도면14



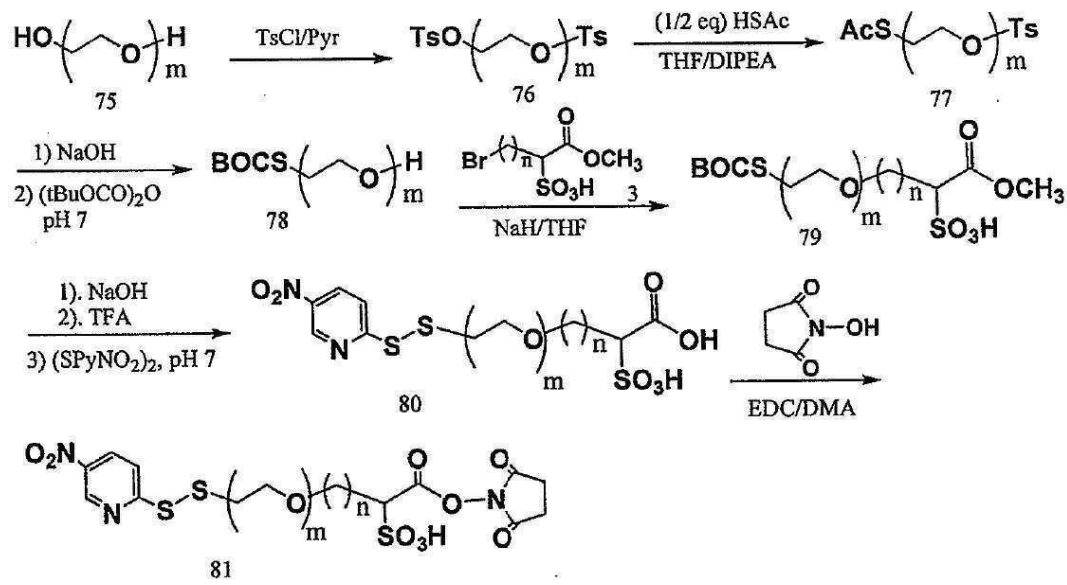
도면15



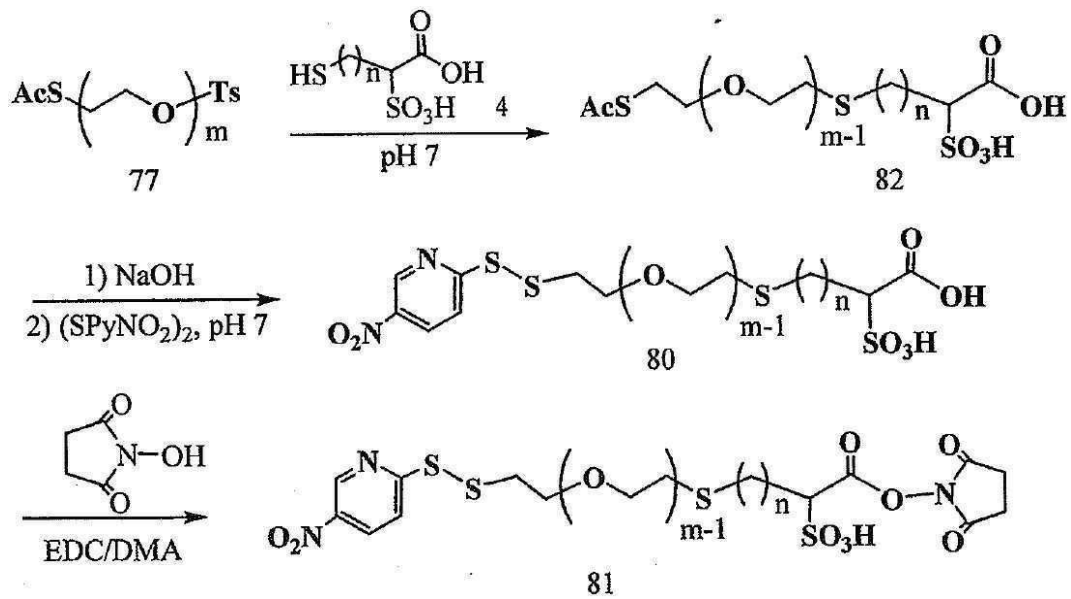
도면16



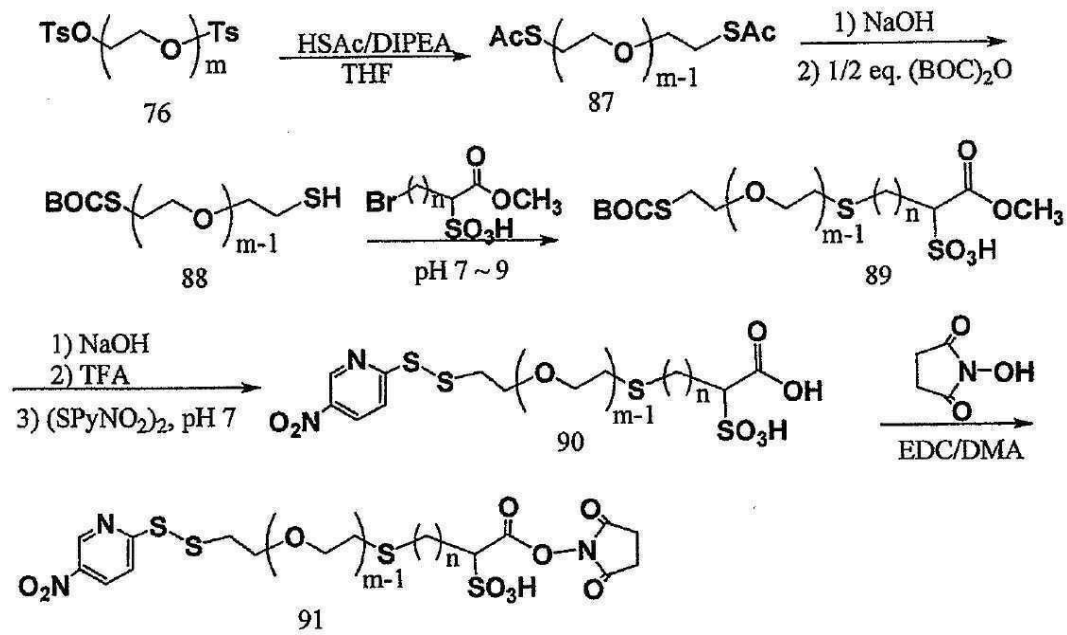
도면17



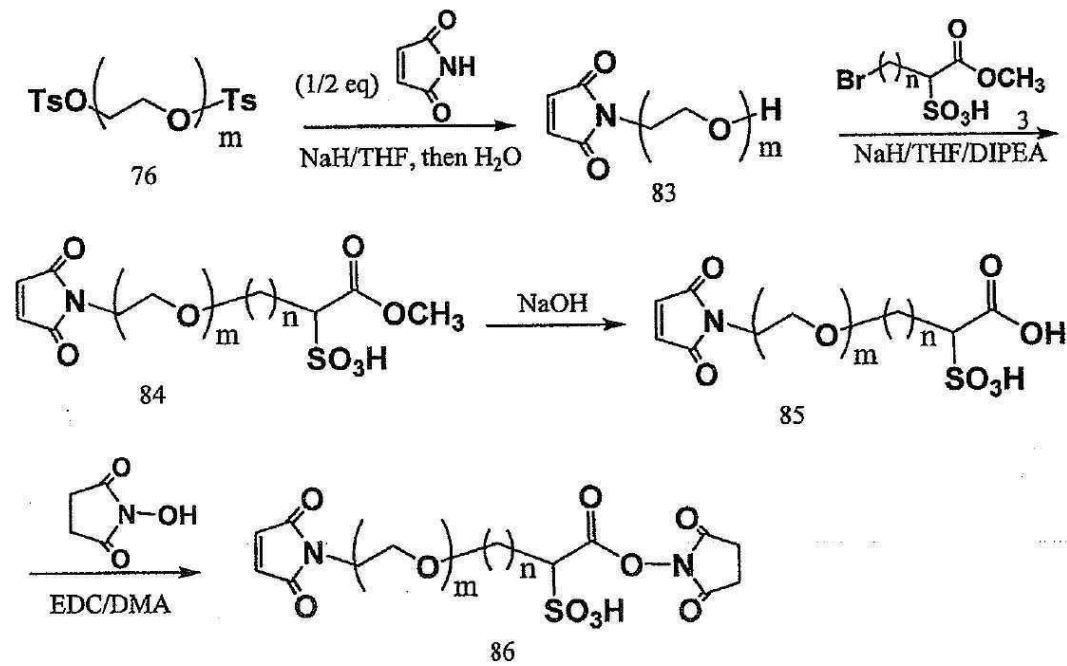
도면18



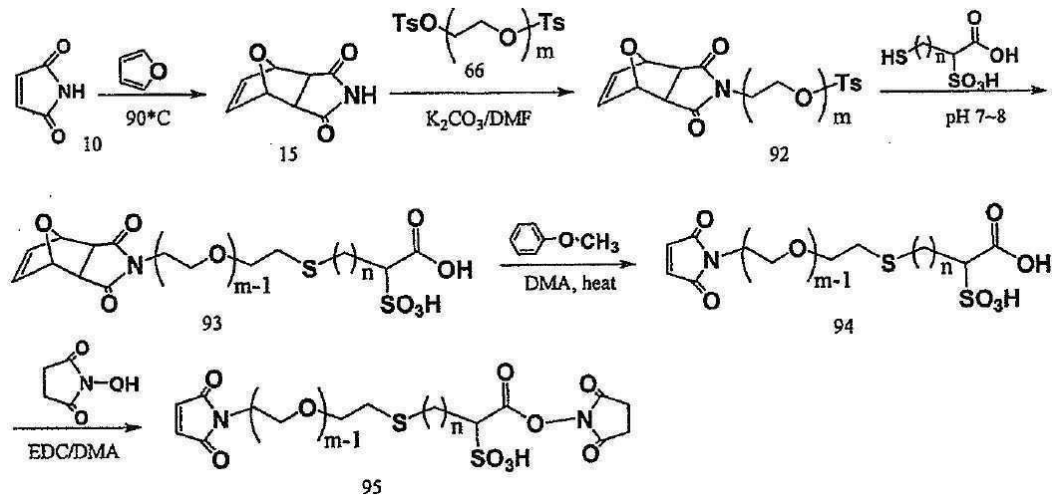
도면19



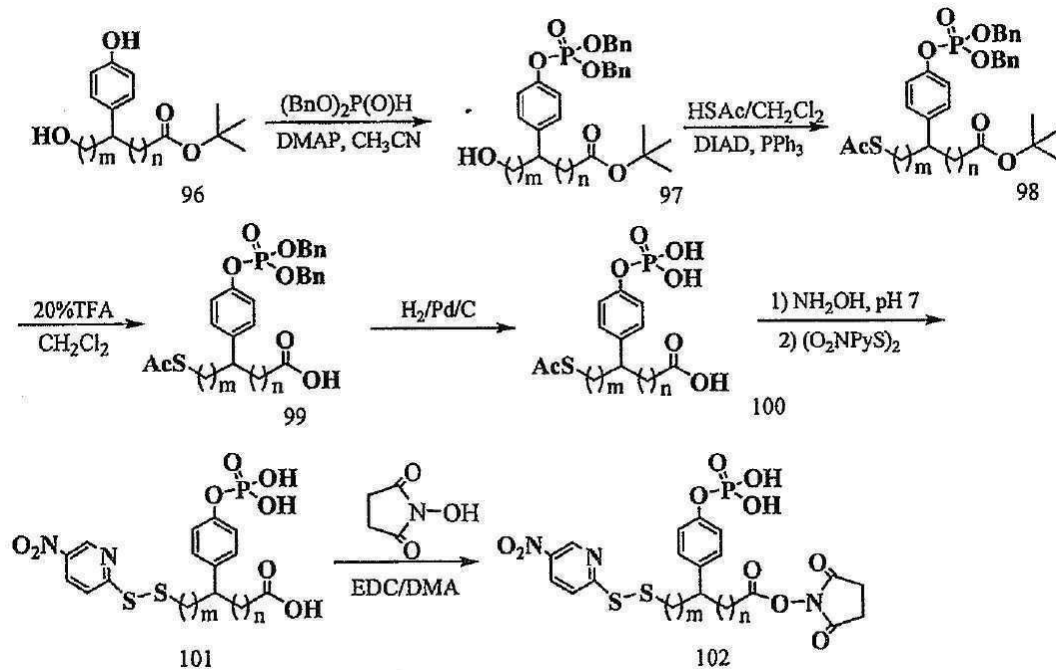
도면20



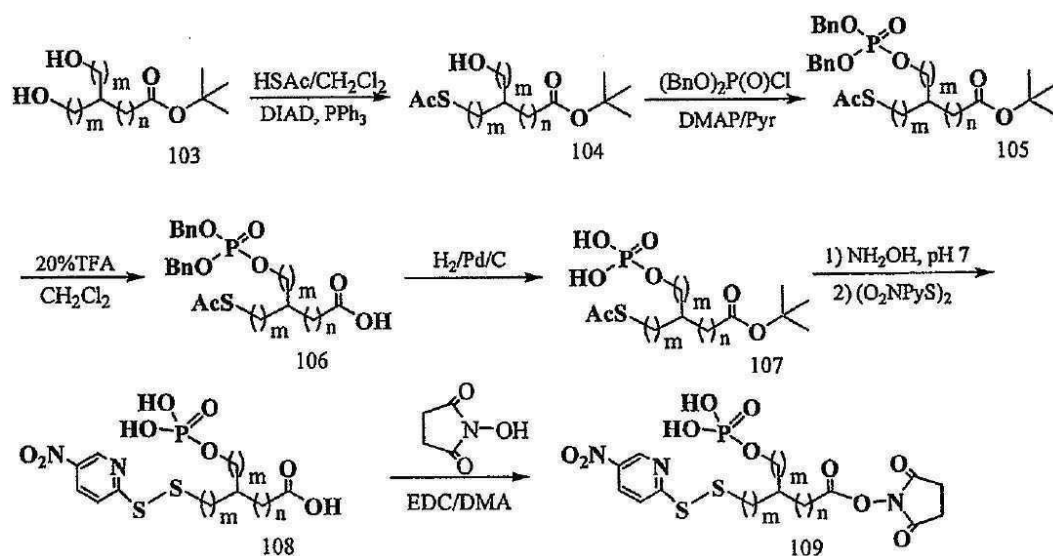
도면21



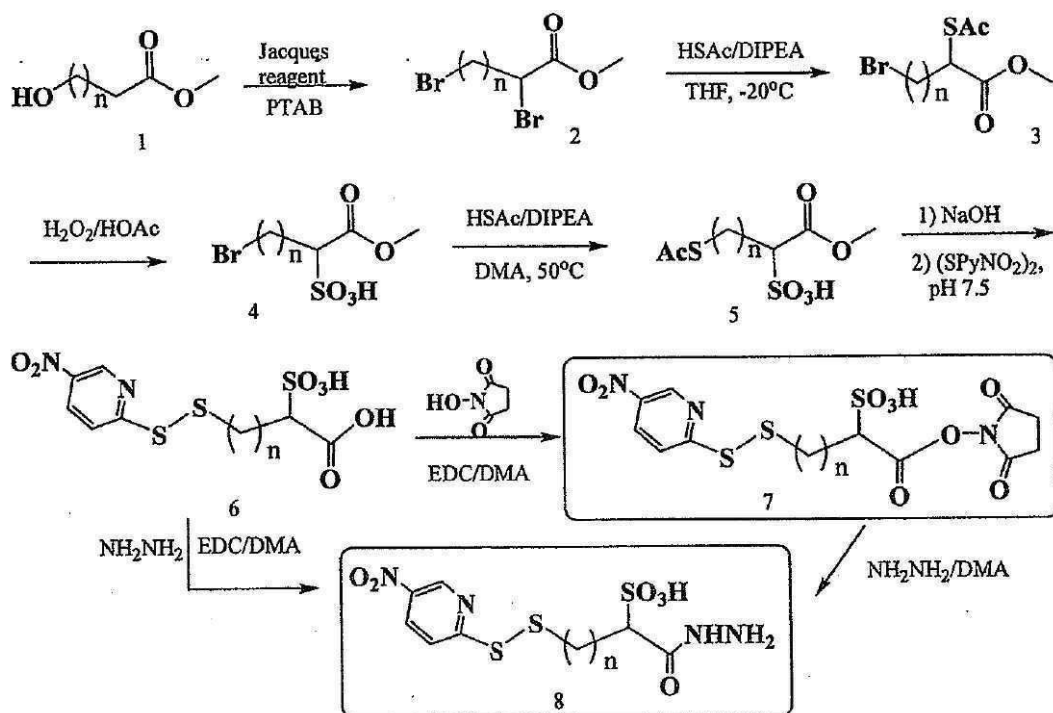
도면22



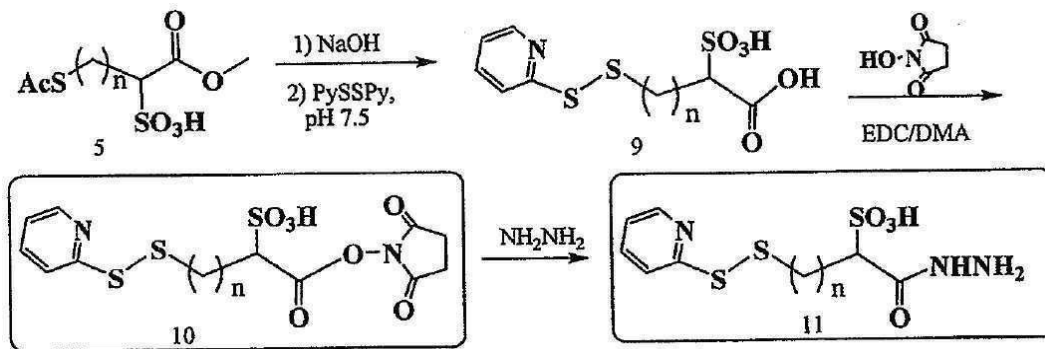
도면23



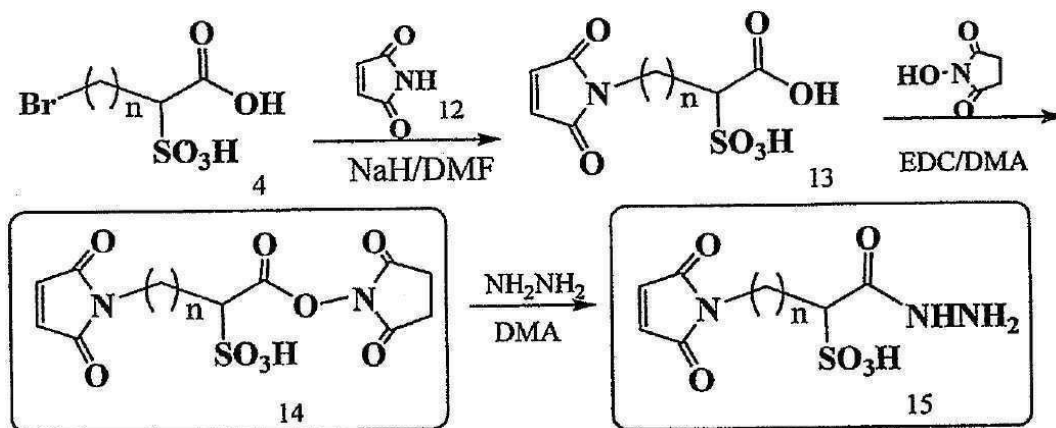
도면24



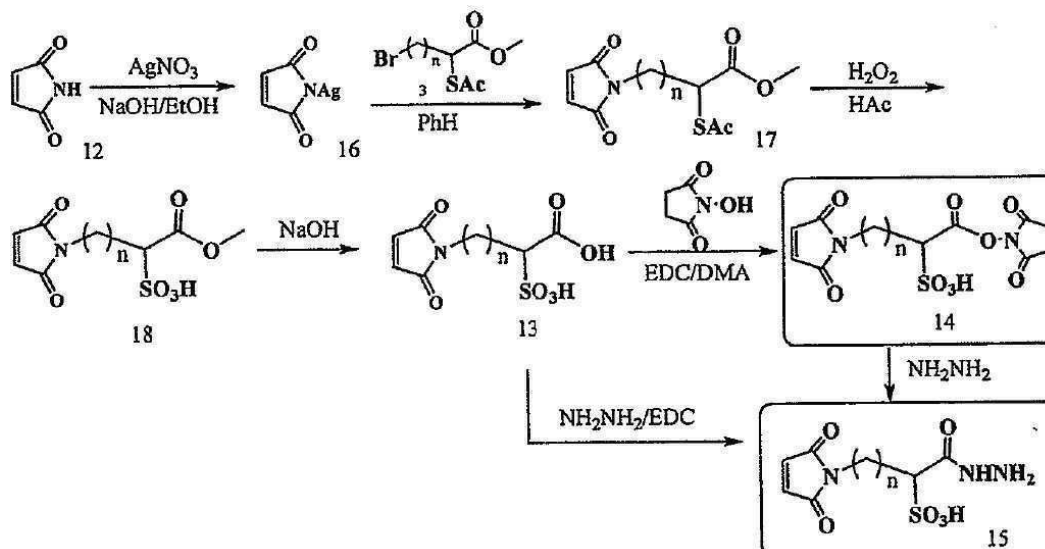
도면25



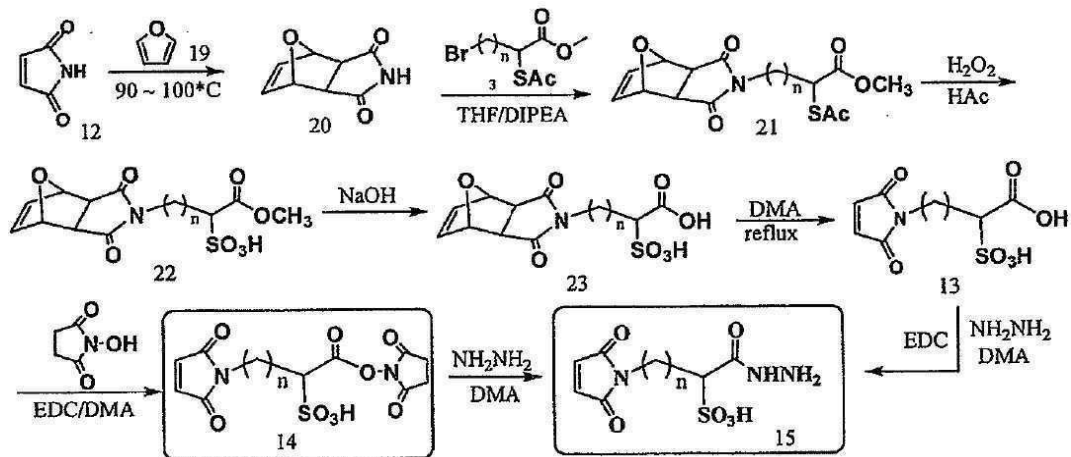
도면26



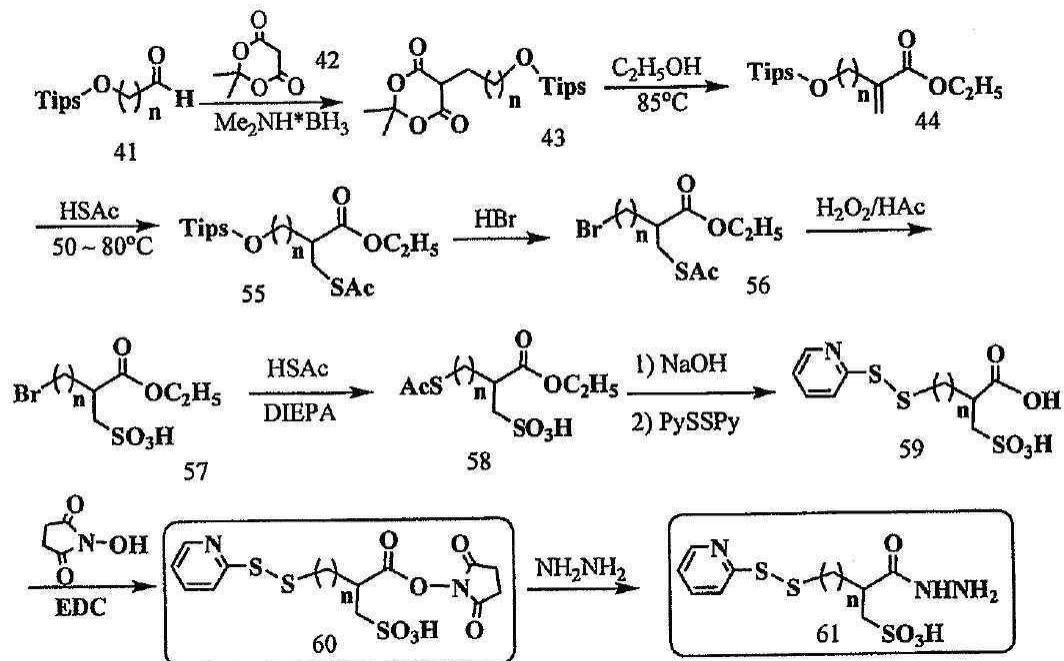
도면27



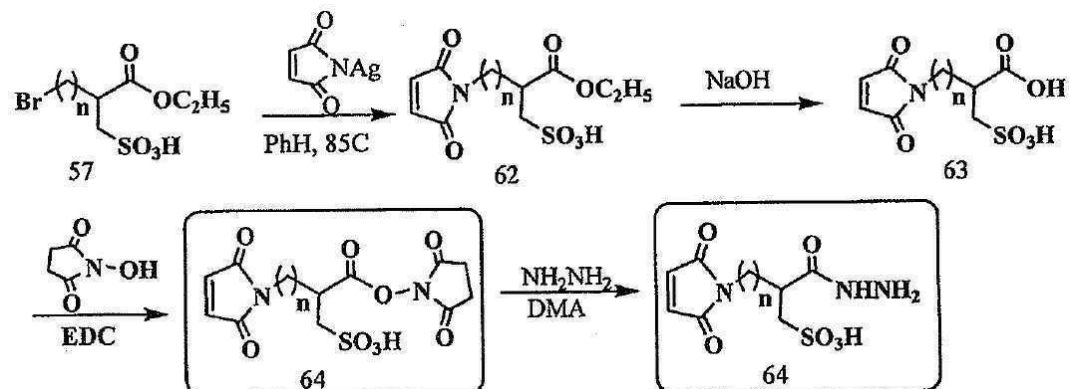
도면28



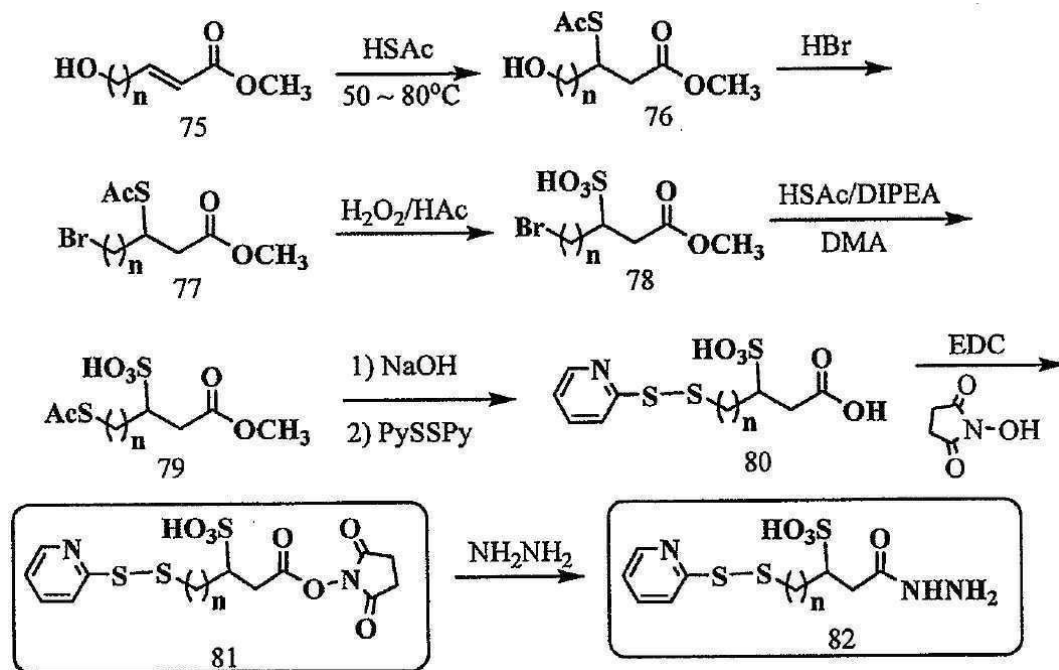
도면29



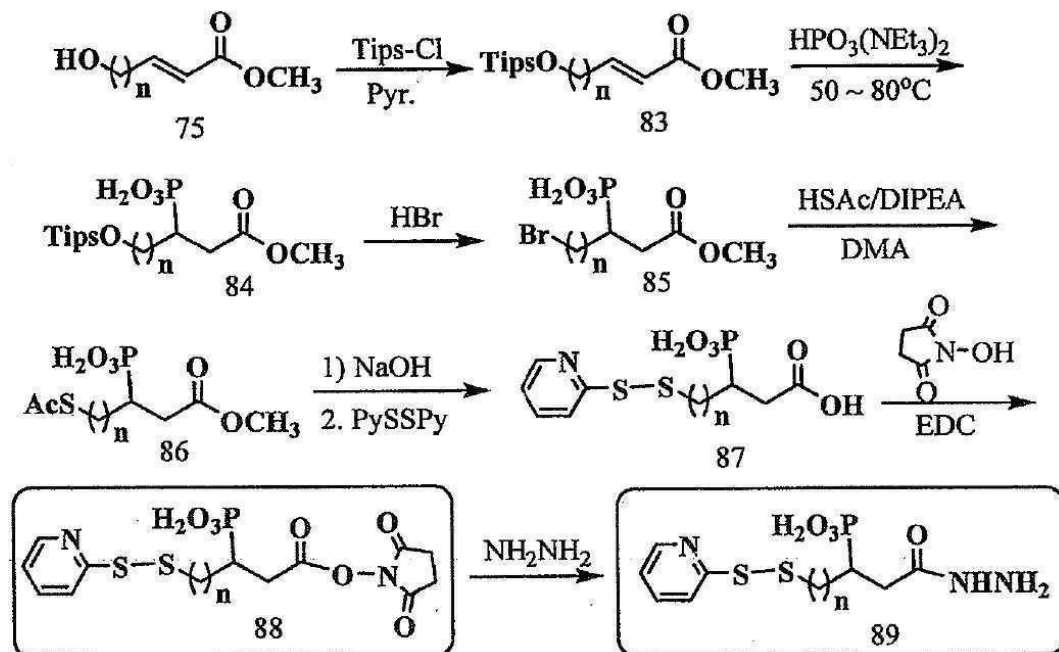
도면30



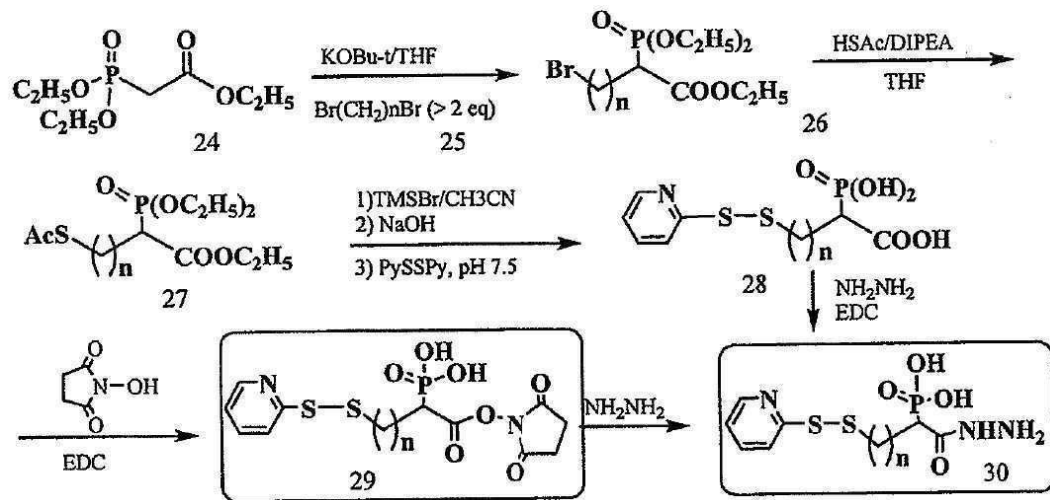
도면31



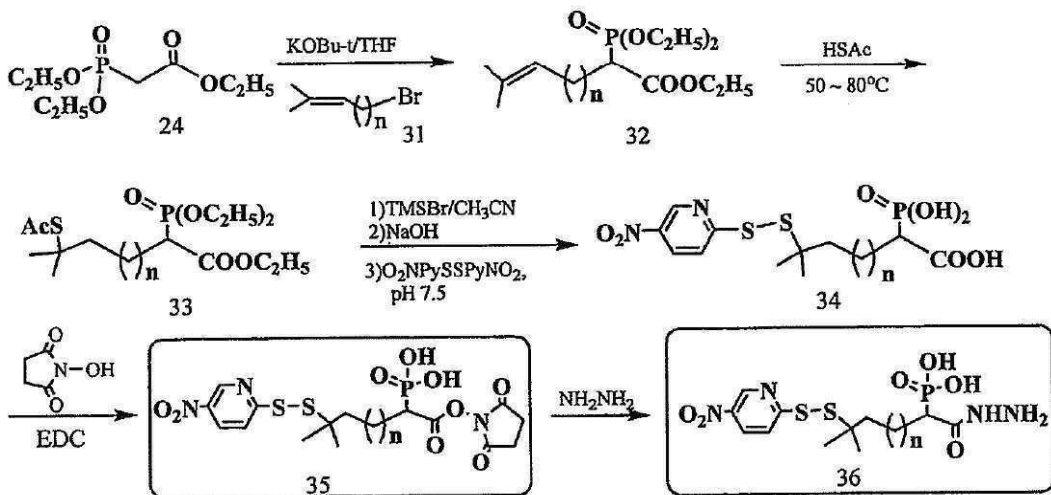
도면32



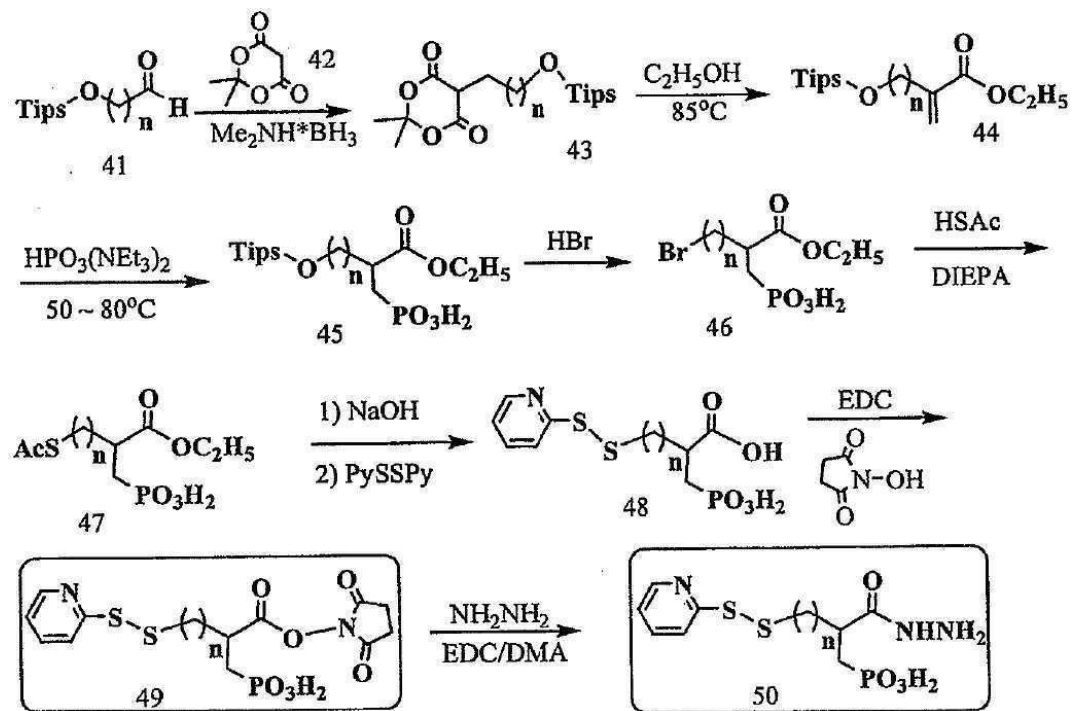
도면33



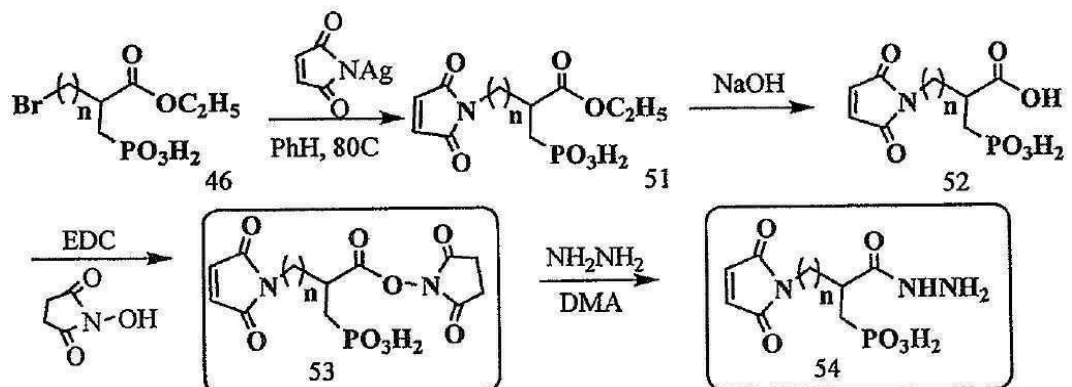
도면34



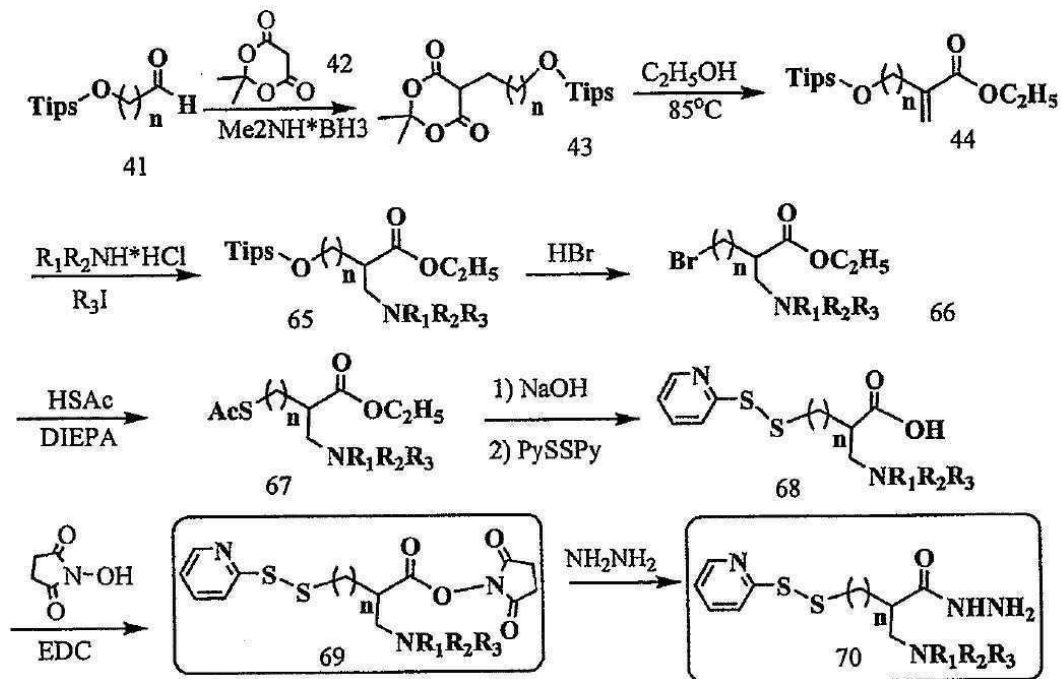
도면35



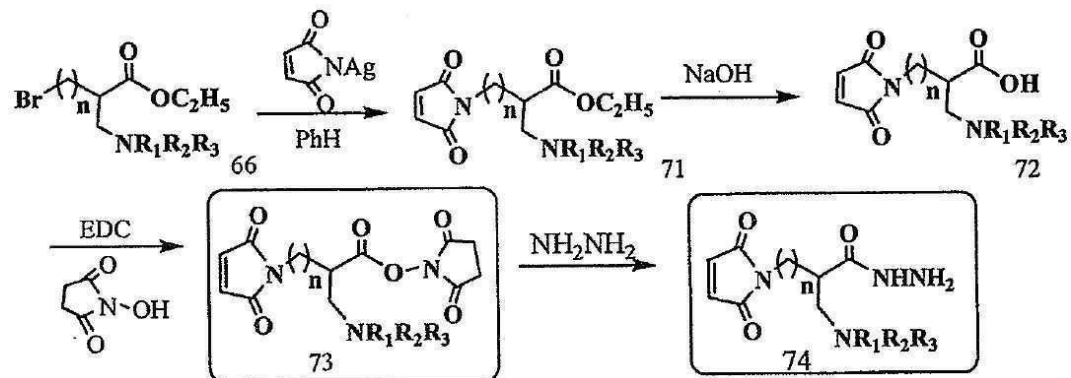
도면36



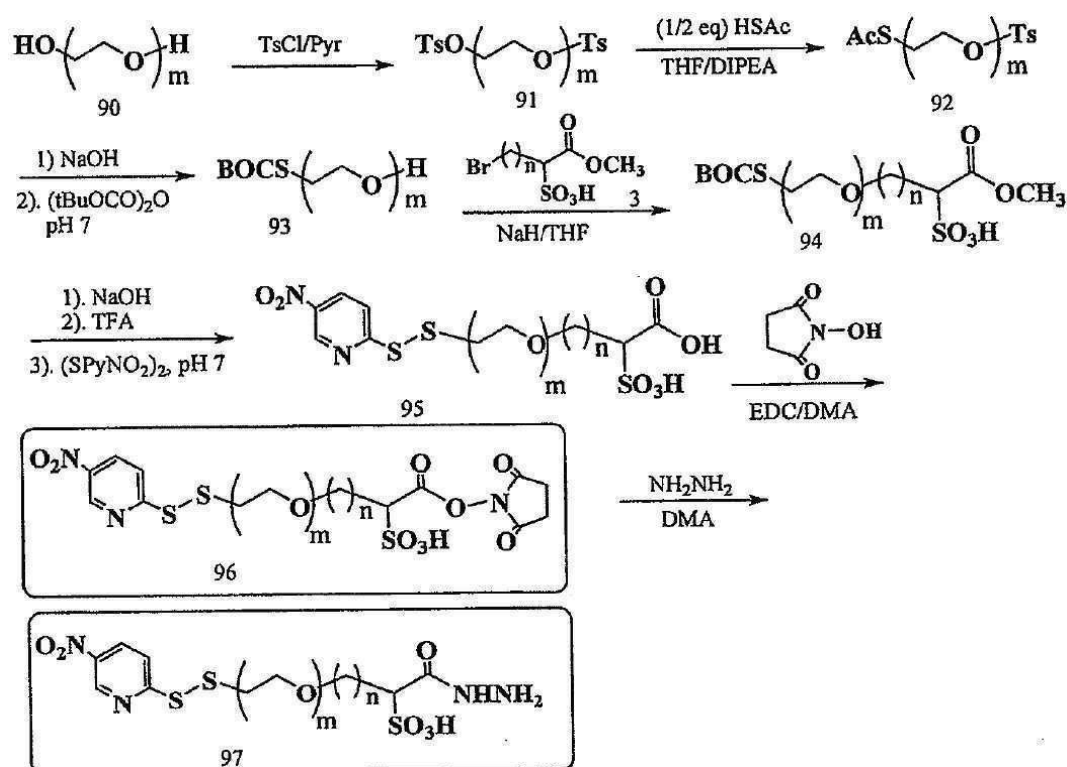
도면37



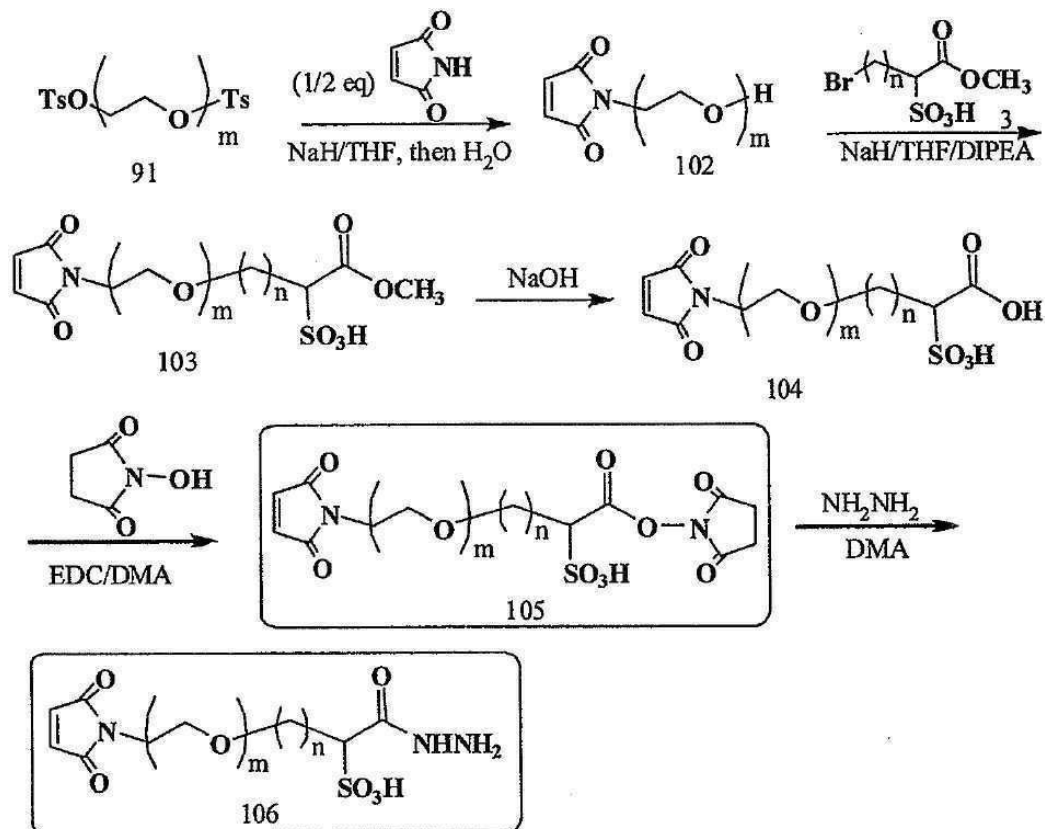
도면38



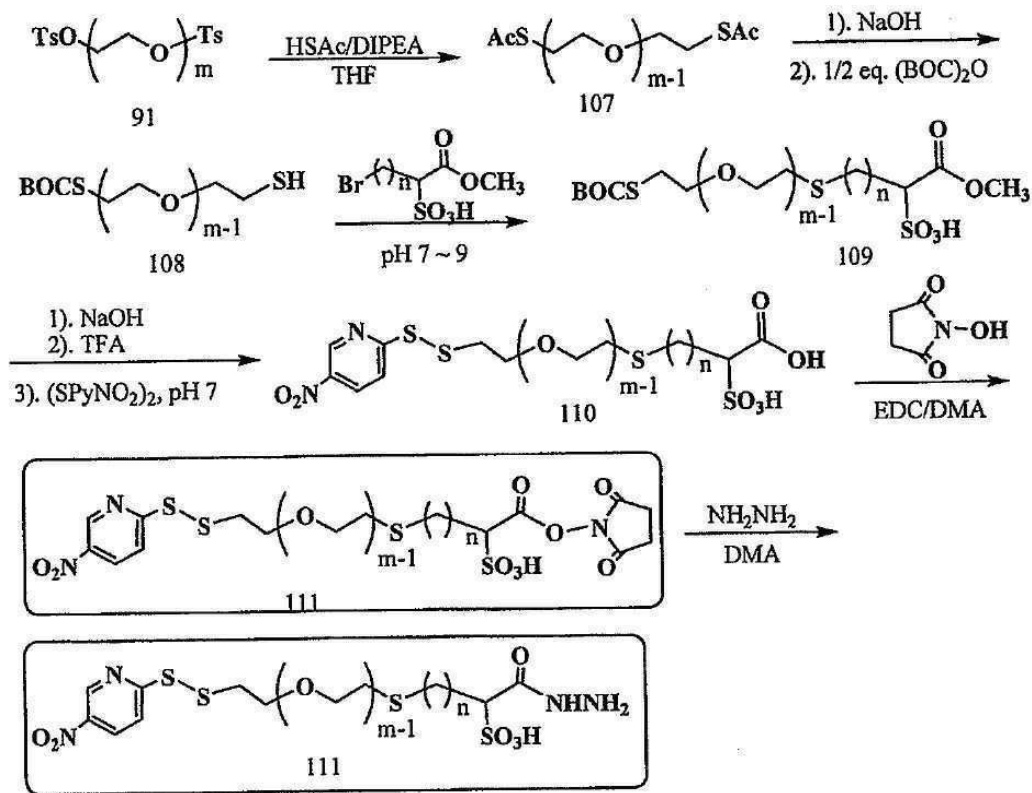
도면39



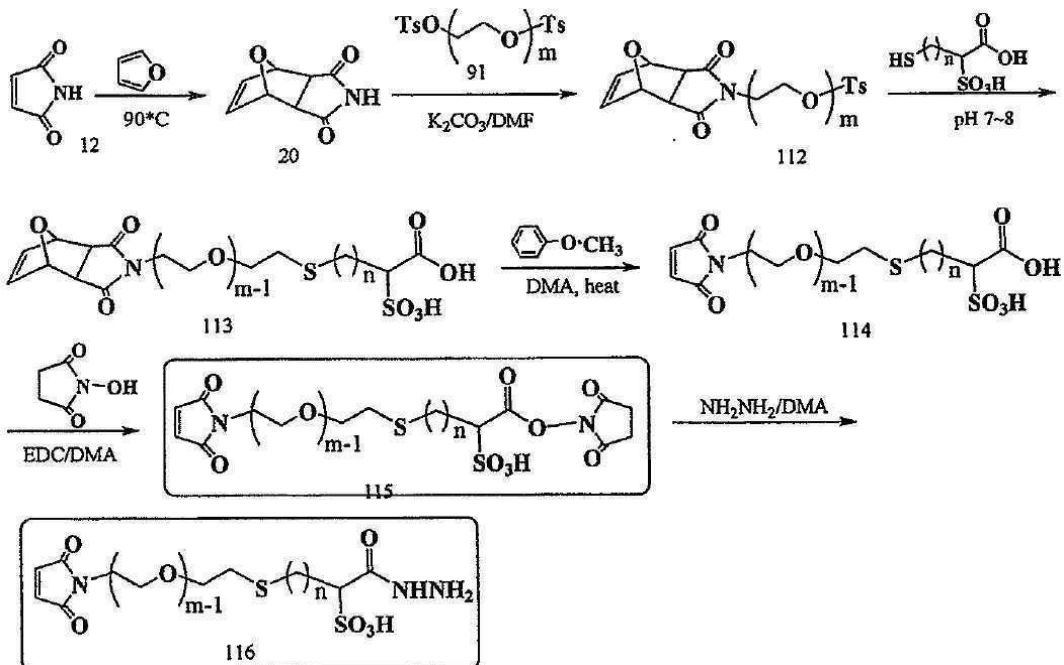
도면40



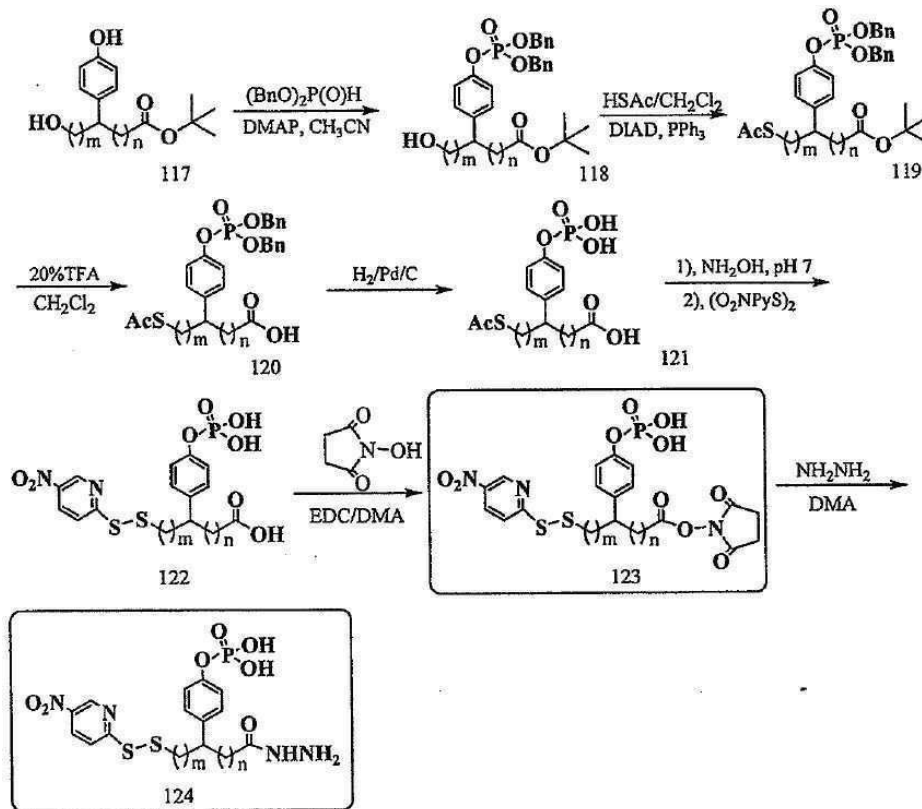
도면41



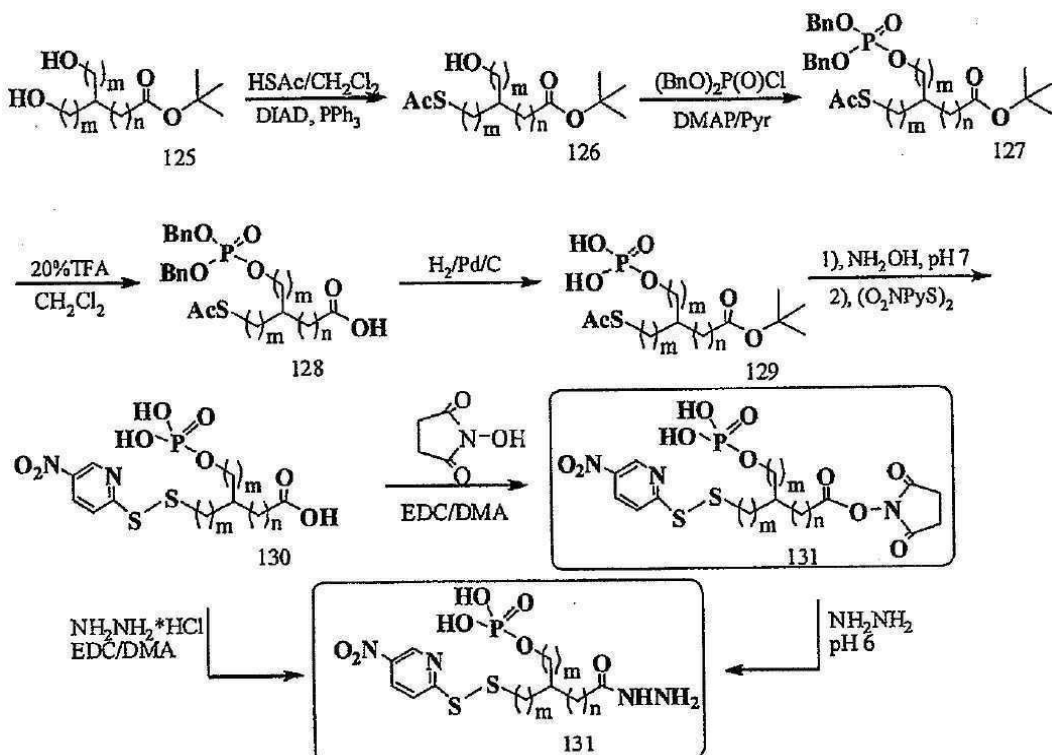
도면42



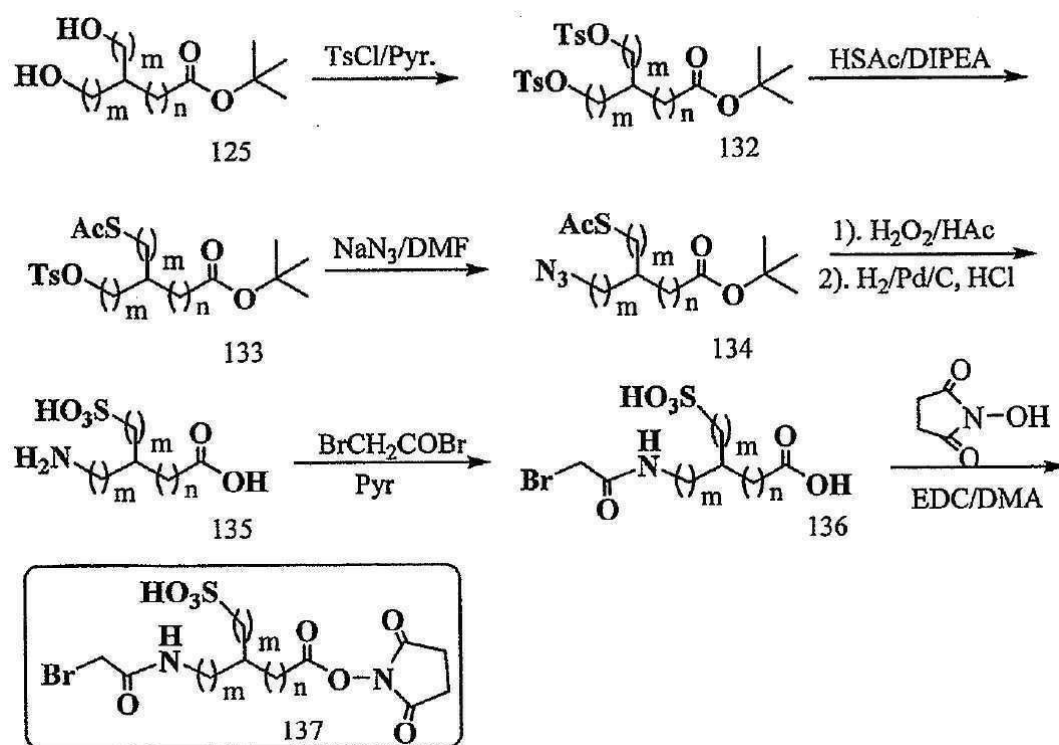
도면43



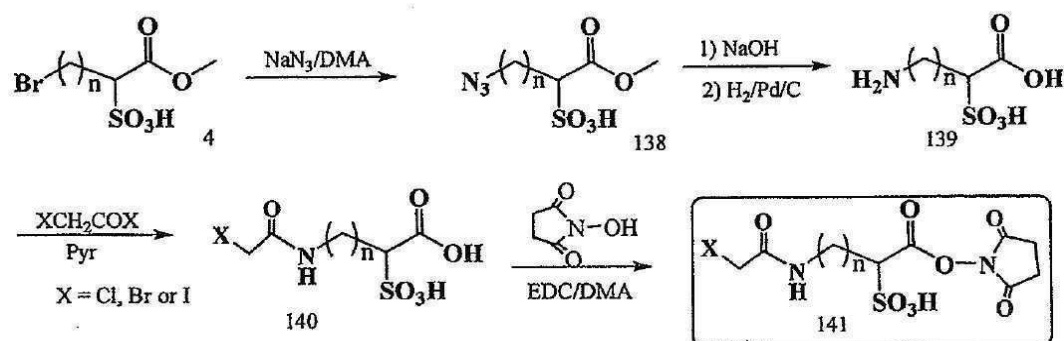
도면44



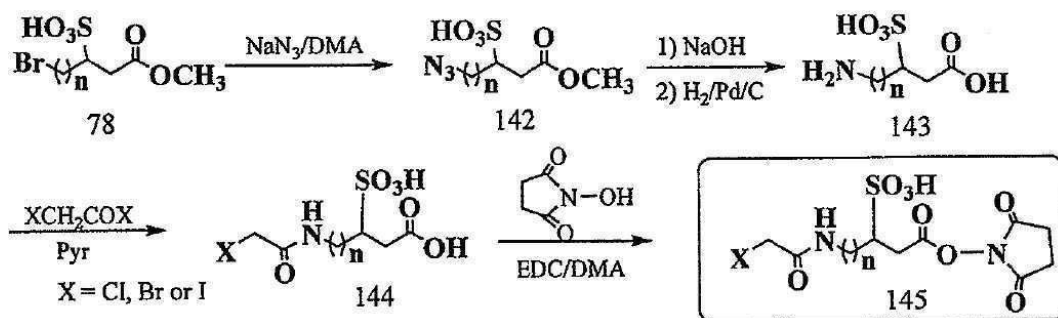
도면45



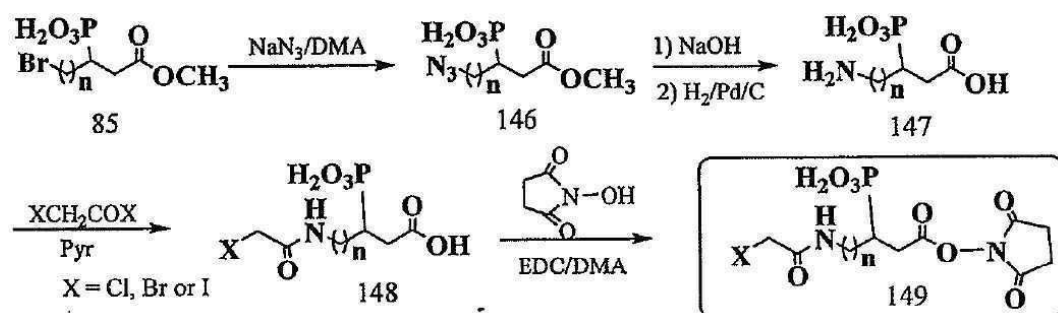
도면46



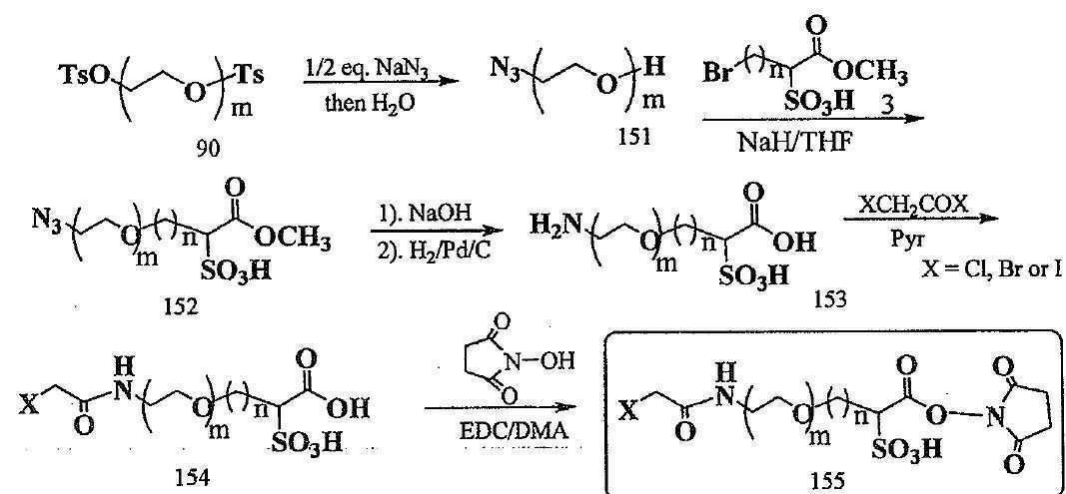
도면47



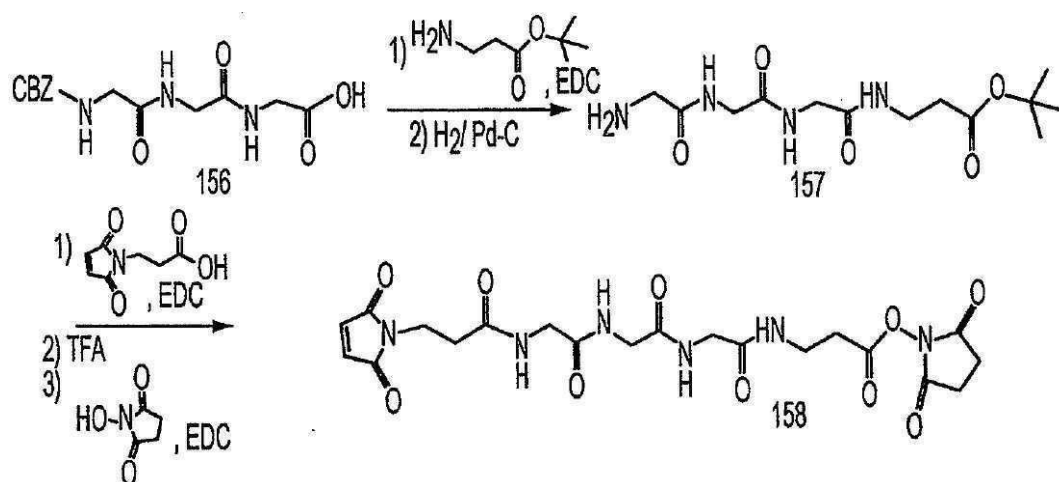
도면48



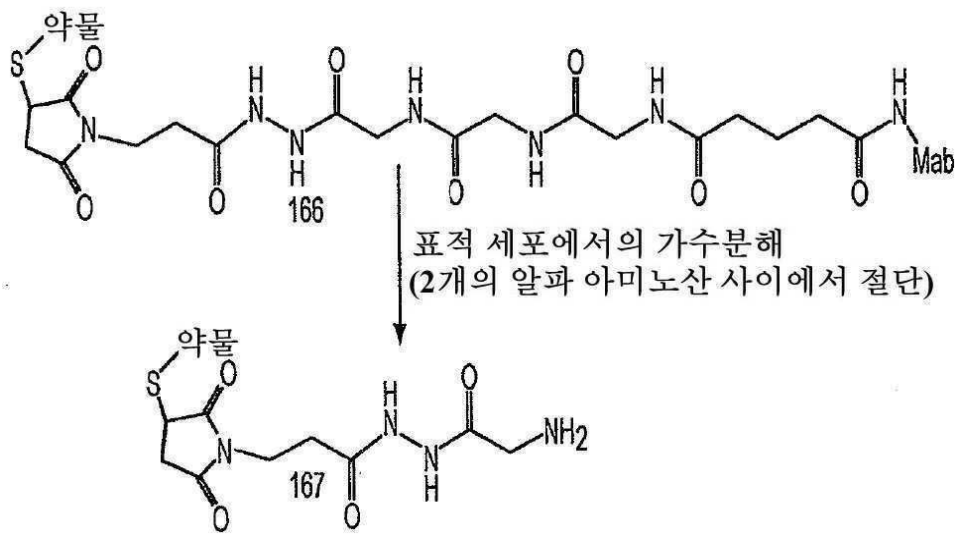
도면49



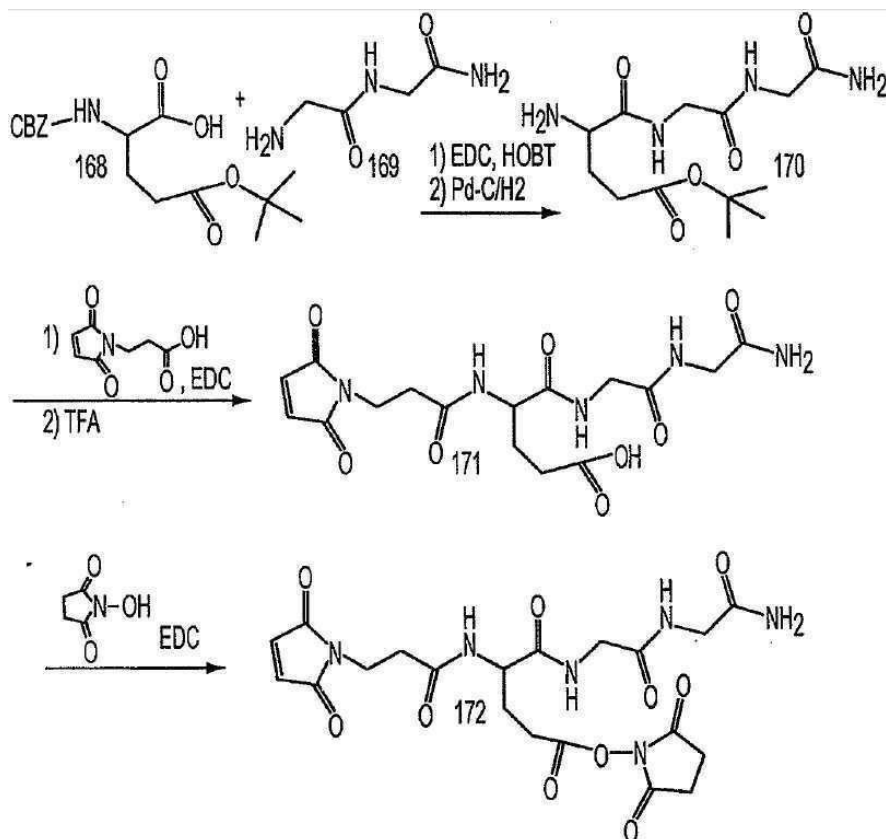
도면50



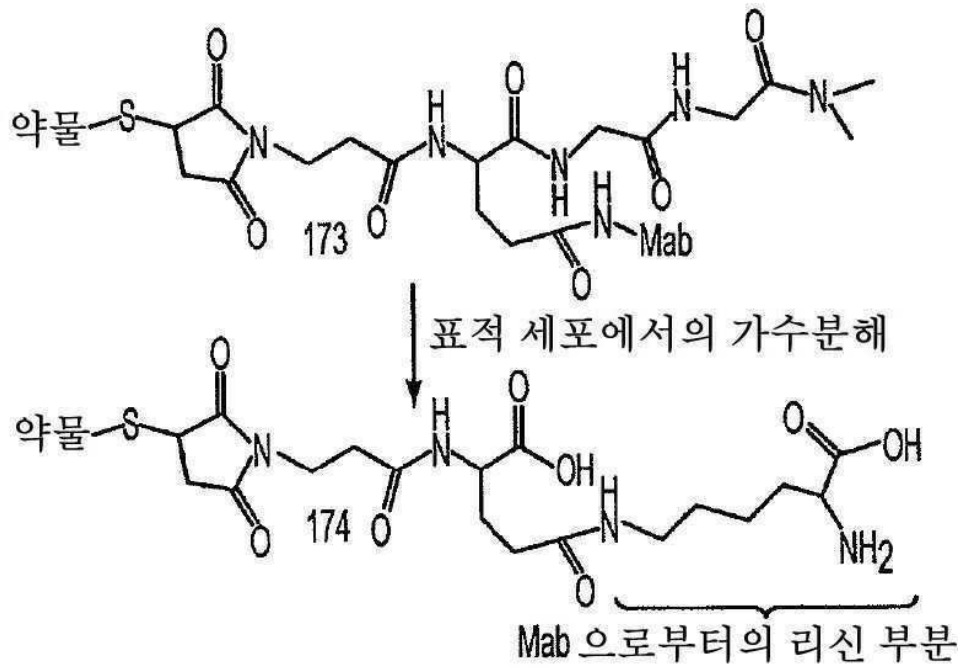
도면53



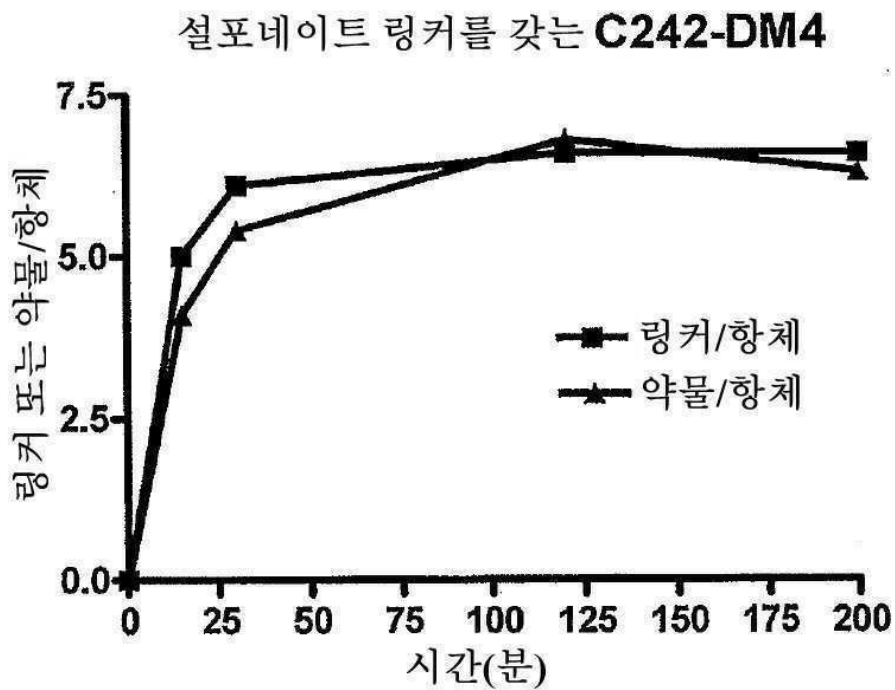
도면54



도면55

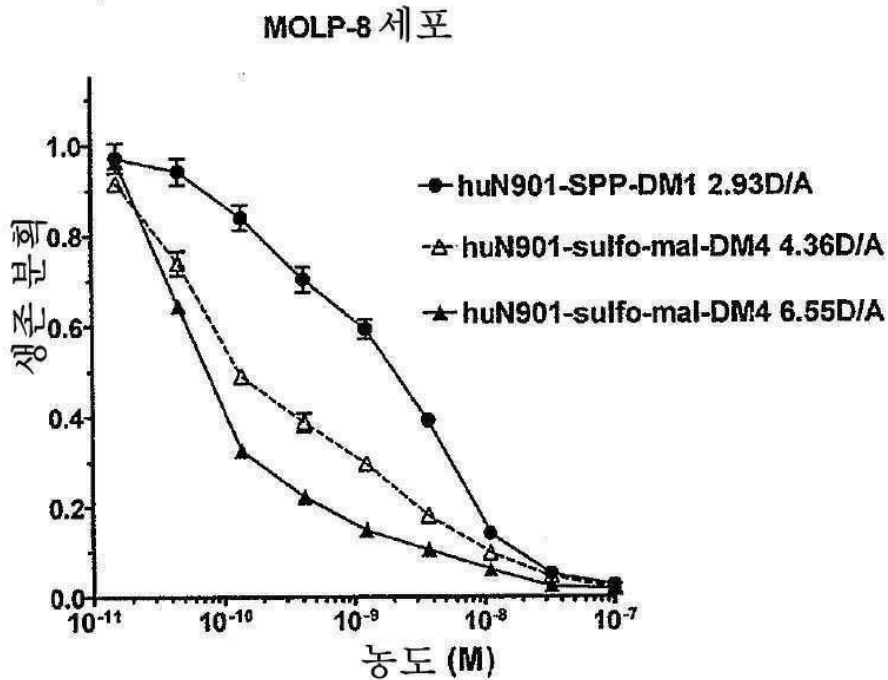


도면56



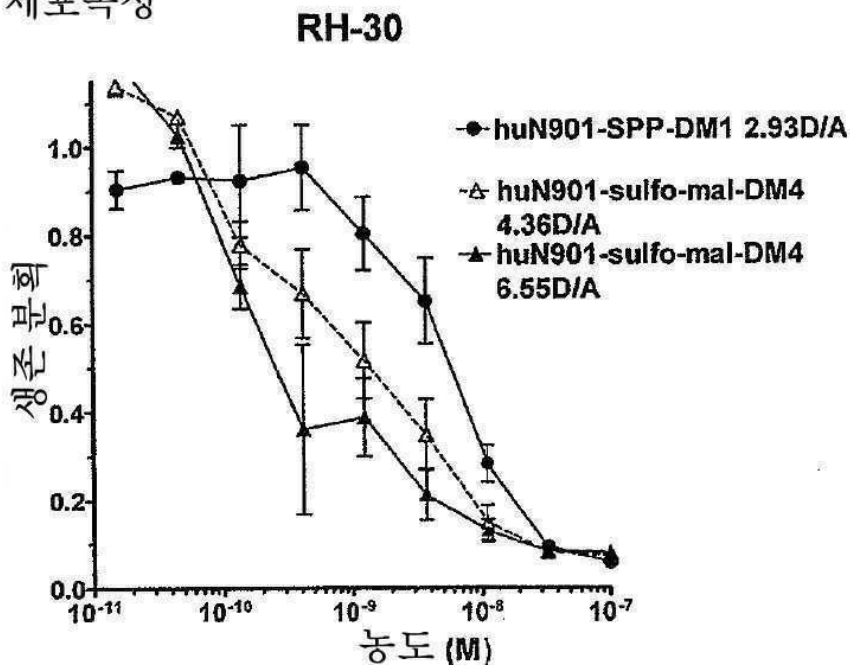
도면57a

항-CD56(huN901)항체-메이탄시노이드 컨쥬게이트의 세포독성



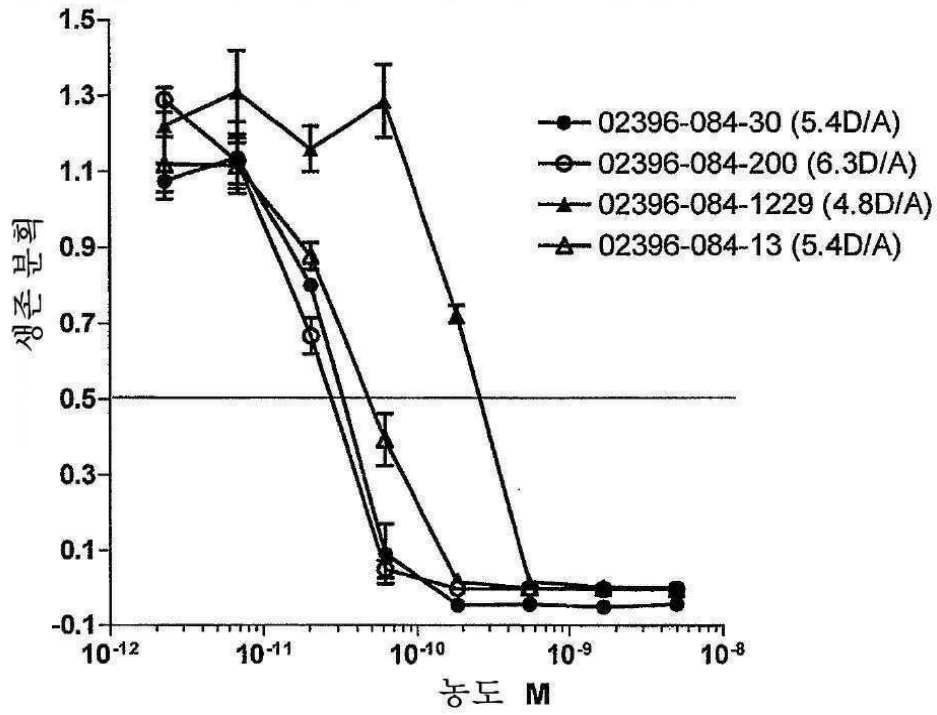
도면57b

항-CD56(huN901)항체-메이탄시노이드 컨쥬게이트 세포독성



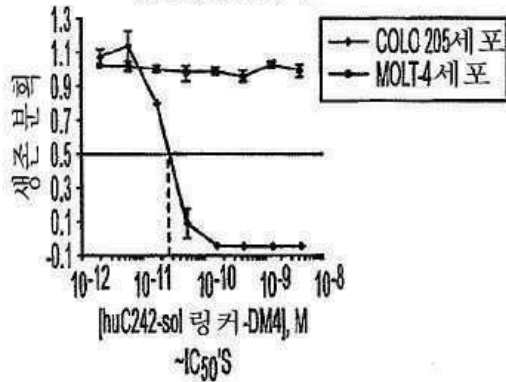
도면57c

항-CD56(huN901)항체-메이탄시노이드 킨쥬게이트 세포 독성



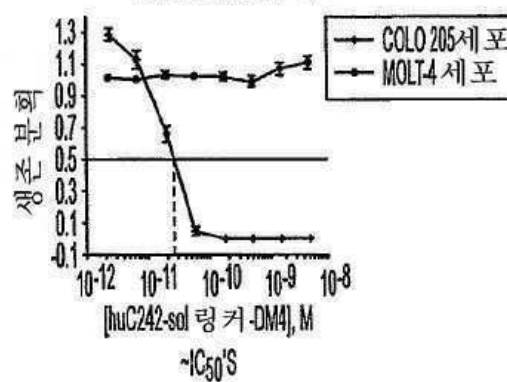
도면58

세포독성: huC242-셀포네이트 링커-DMA, (5.4 D/A)' VS.
COLO 205 & MOLT-4 세포



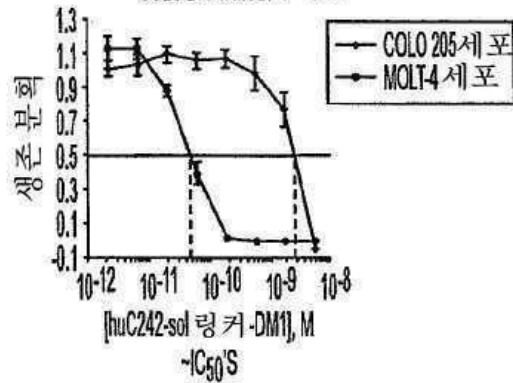
COLO 205 세포	3.3×10^{-11} M
MOLT-4 세포	$> 6.0 \times 10^{-9}$ M

세포독성: huC242-셀포네이트 링커-DMA, (6.3 D/A)' VS.
COLO 205 & MOLT-4 세포



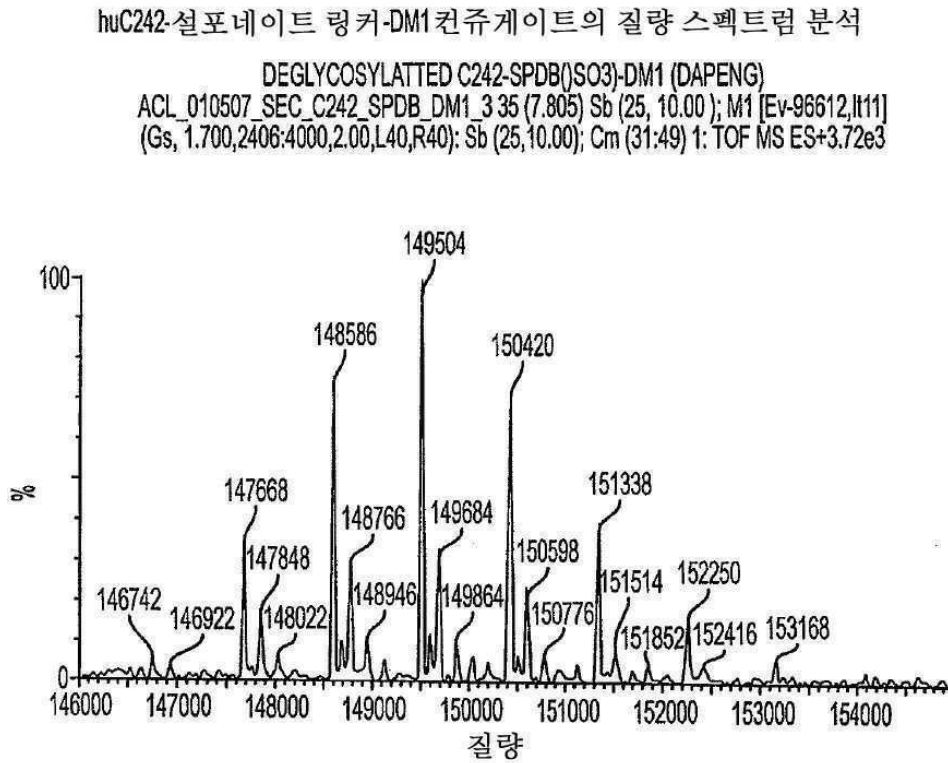
COLO 205 세포	2.9×10^{-11} M
MOLT-4 세포	$> 6.0 \times 10^{-9}$ M

세포독성: huC242-셀포네이트 링커-DM1, (5.4 D/A)' VS.
COLO 205 & MOLT-4 세포



COLO 205 세포	4.8×10^{-11} M
MOLT-4 세포	2.3×10^{-9} M

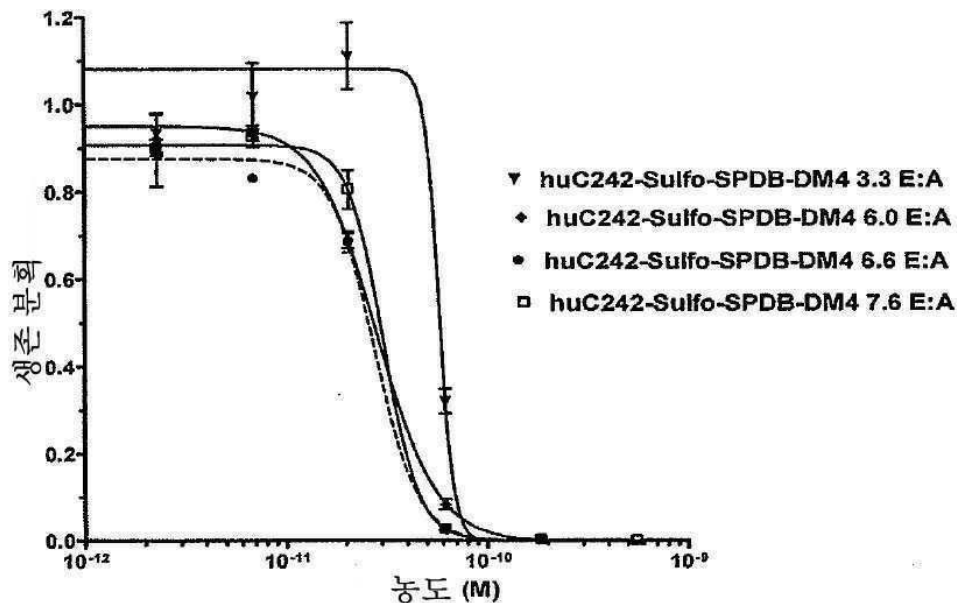
도면59



도면60

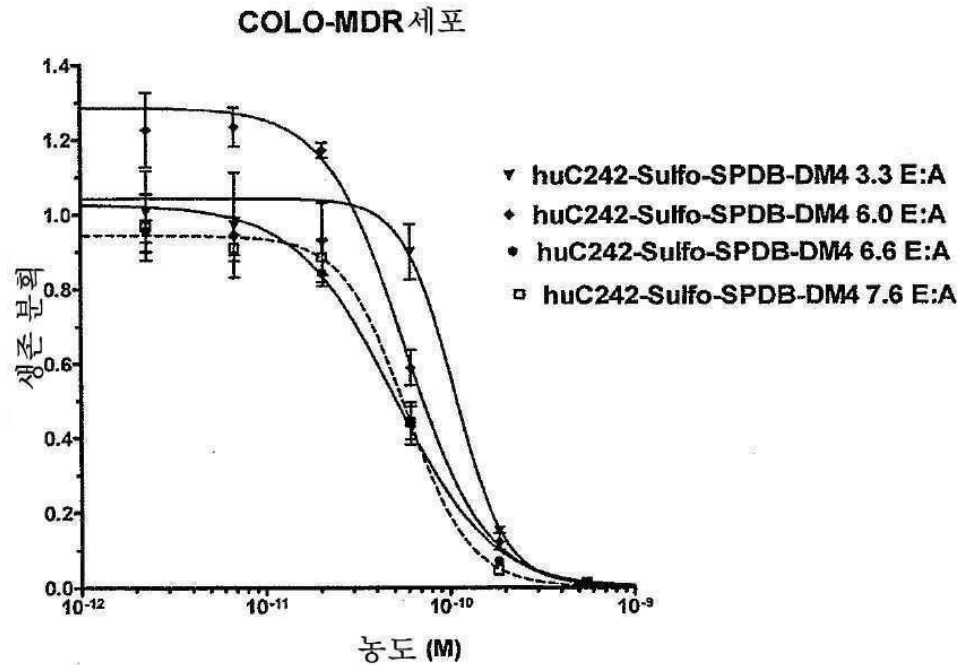
COLO205 세포에 대한 메이탄시노이드 부하 (E:A)를 증가시킬 때 항-CanAg (huC242)-설포네이트 링커-메이탄시노이드 컨쥬게이트의 세포독성

COLO205 세포



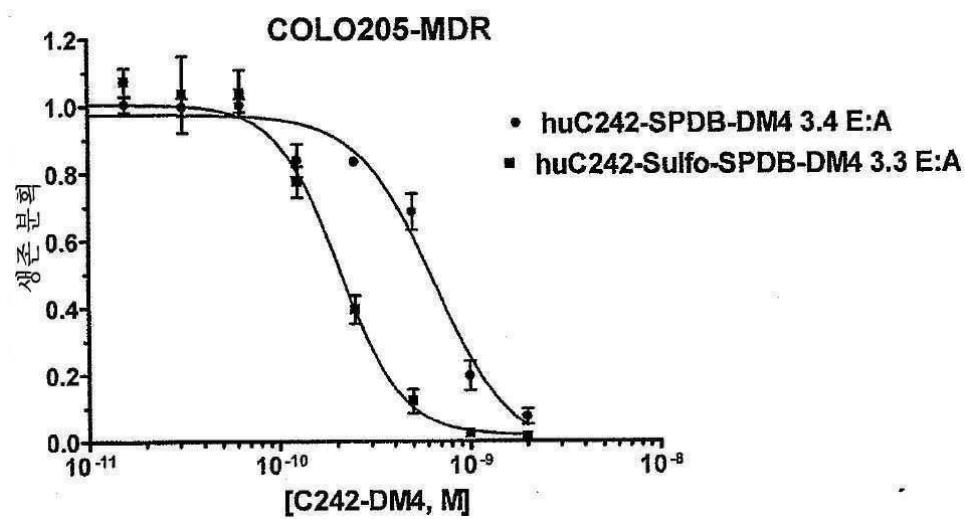
도면61

다중 약물 내성 세포인 COLO205-MDR 세포에 대한
메이탄시노이드 부하 (E:A)를 증가시킬 때
항-CanAg (huC242)-설포네이트 링커-메이탄시노이드
컨쥬게이트의 세포독성



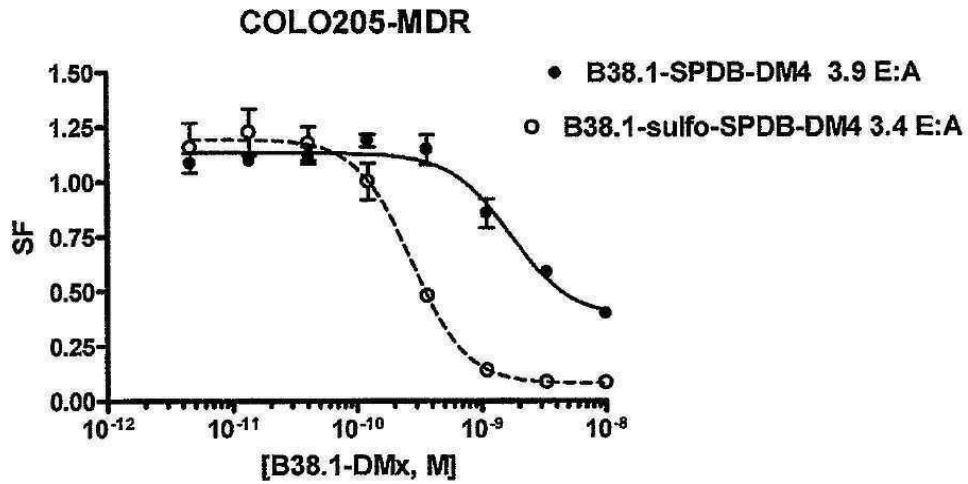
도면62

설포네이트 링커가 있는 경우와 없는 경우에 있어서
항-CanAg (huC242)-메이탄시노이드 컨쥬게이트의
다중 약물 내성 세포인 COLO205-MDR 세포에 대한 세포독성



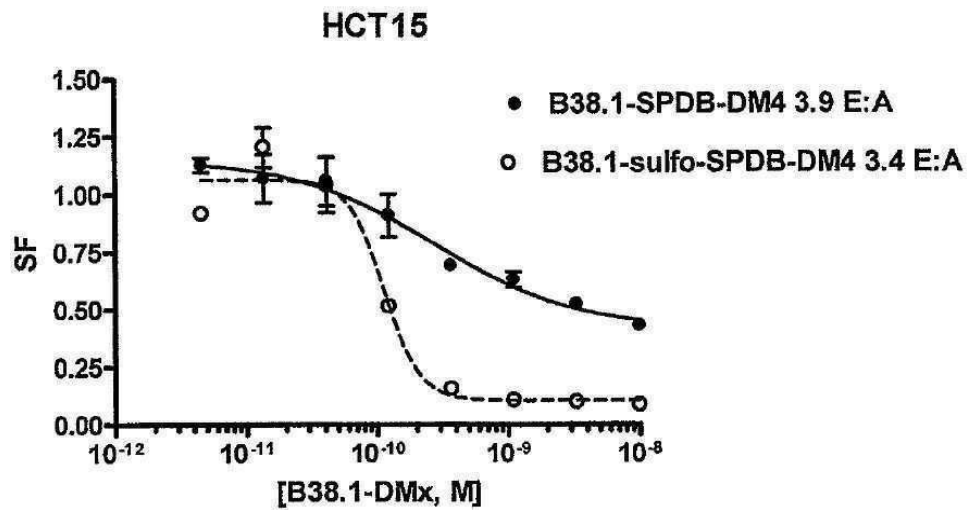
도면63

설폰네이트 링커가 있는 경우와 없는 경우에 있어서
항-EpCAM (B38.1)-메이탄시노이드 컨쥬게이트의
다중 약물 내성 세포인 COLO205-MDR 세포에 대한 세포독성



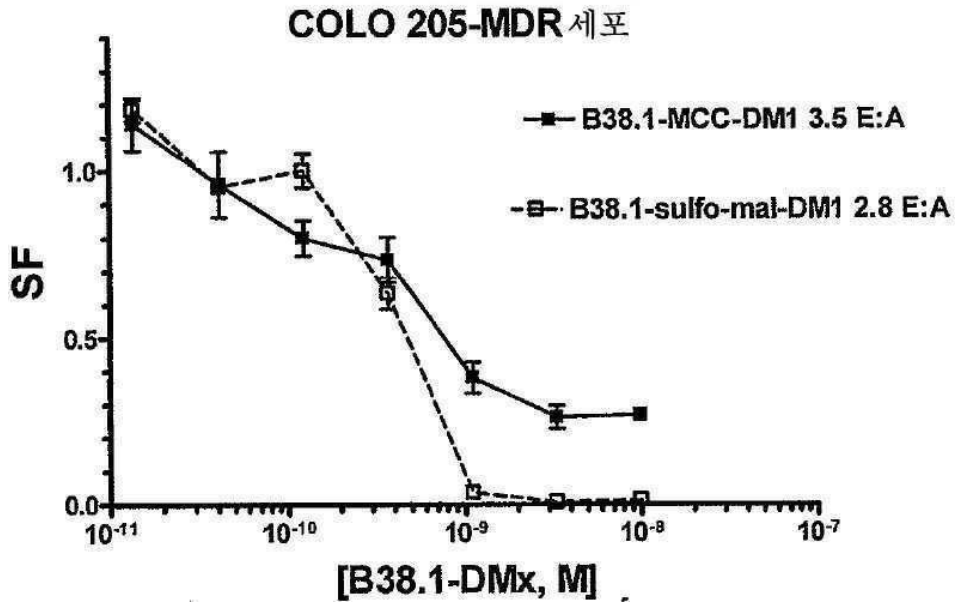
도면64

설폰네이트 링커가 있는 경우와 없는 경우에 있어서
항-EpCAM (B38.1)-메이탄시노이드 컨쥬게이트의
다중 약물 내성 세포인 HCT15 세포에 대한 세포독성



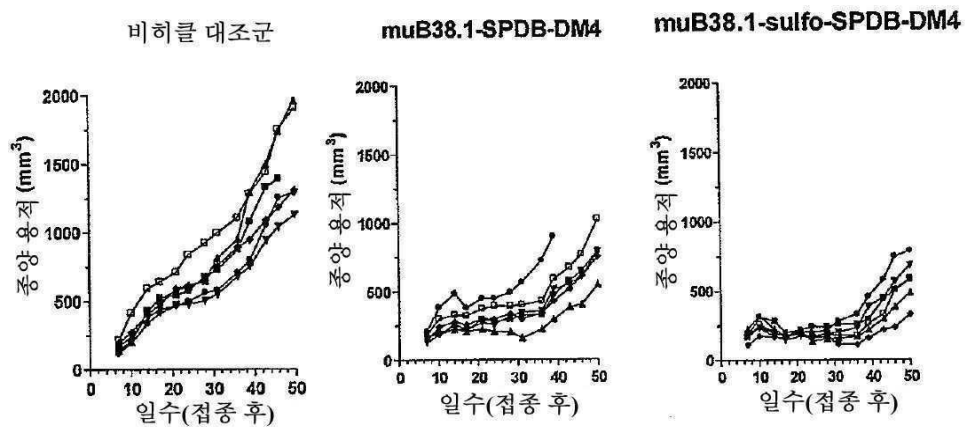
도면65

설폰네이트 링커가 있는 경우와 없는 경우에 있어서
항-EpCAM (B38.1)-메이탄시노이드 컨쥬게이트의
다중 약물 내성 세포인 COLO205-MDR 세포에 대한 세포독성

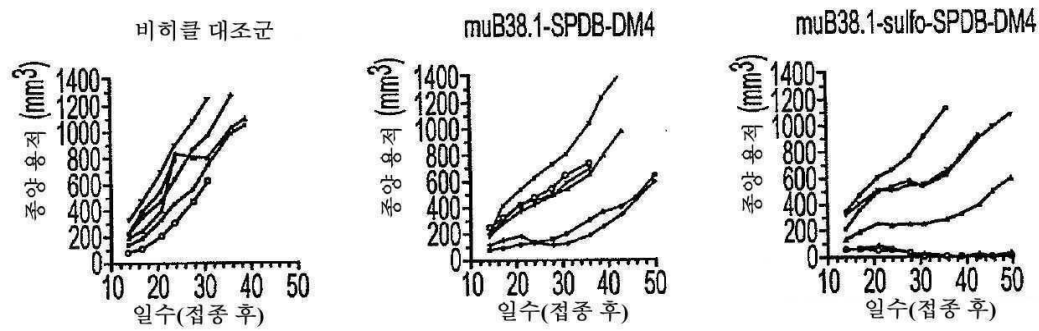


도면66

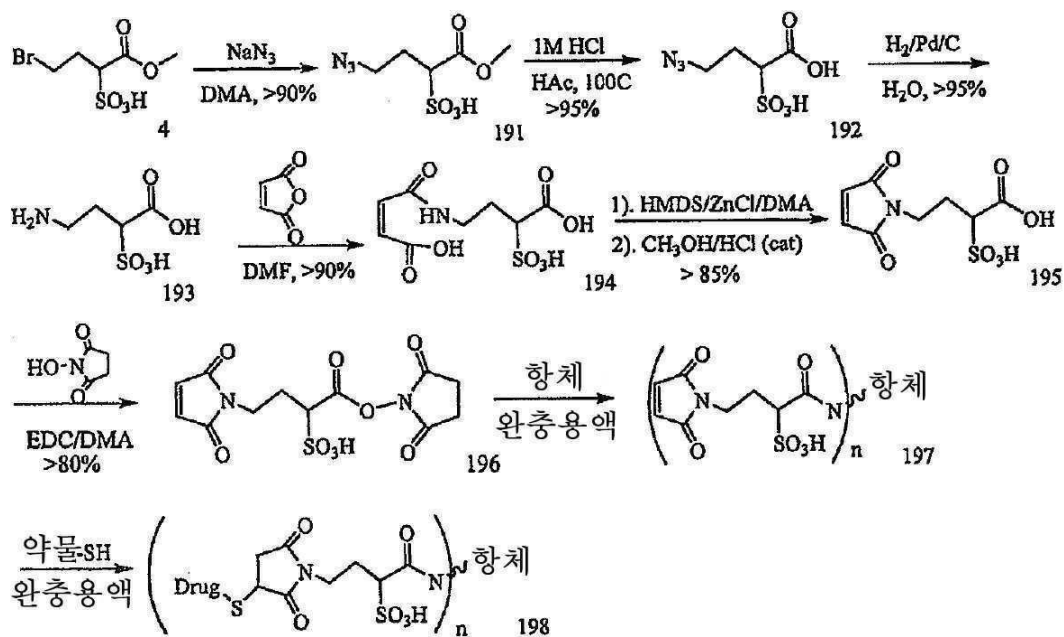
항-EpCAM 항체-메이탄시노이드 컨쥬게이트의
COLO205 mdr 이중이식체(개체 종양)에 대한 생체 내 항-종양 활성



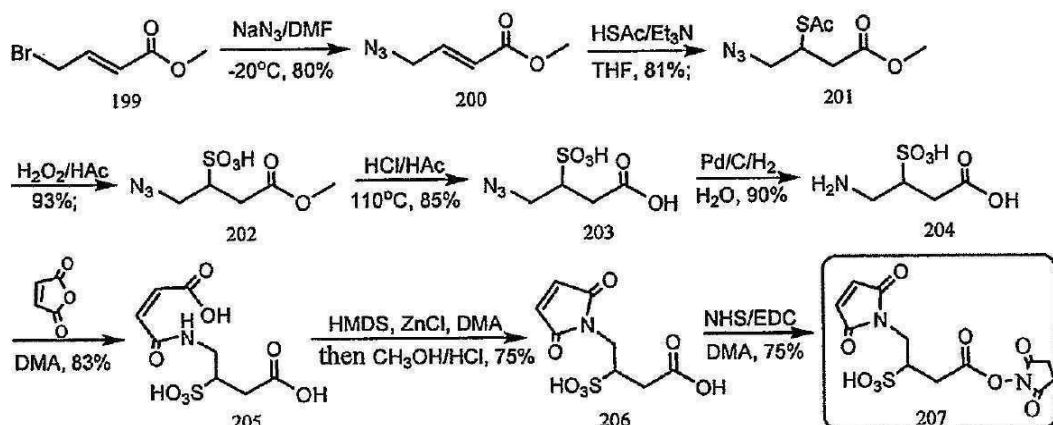
도면67



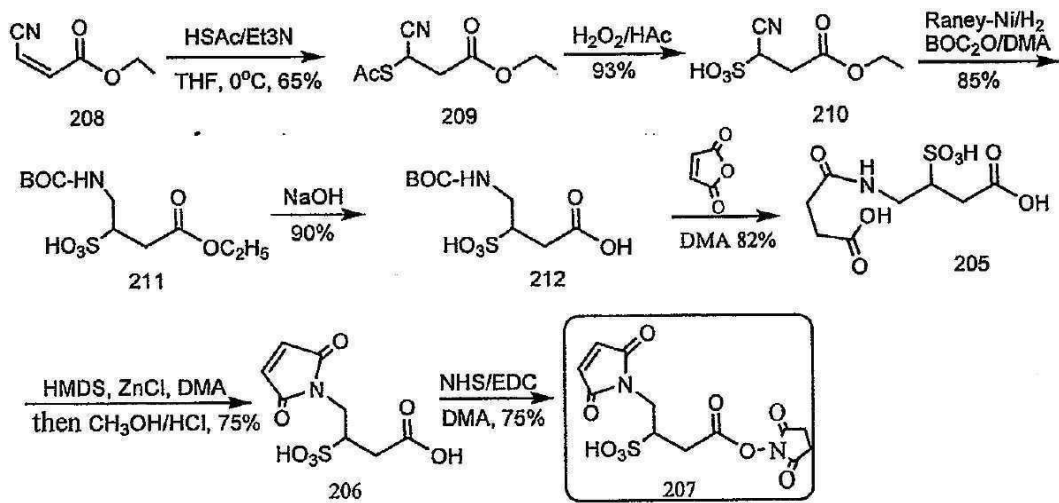
도면68



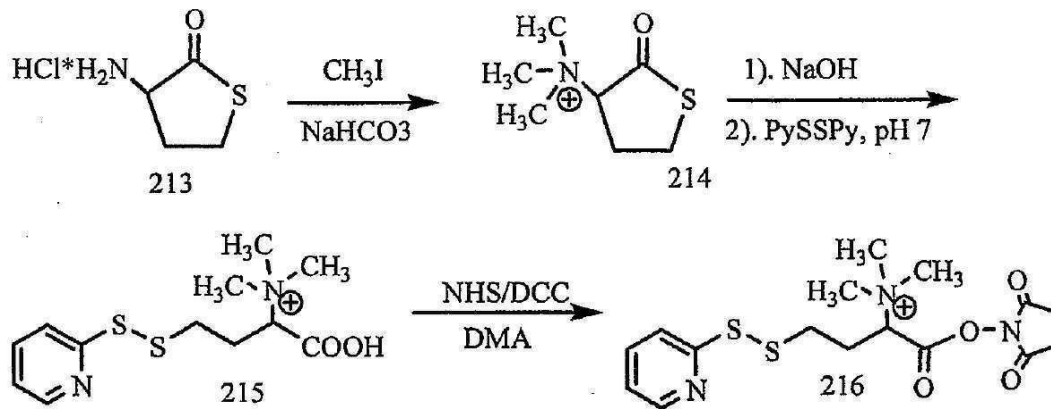
도면69



도면70

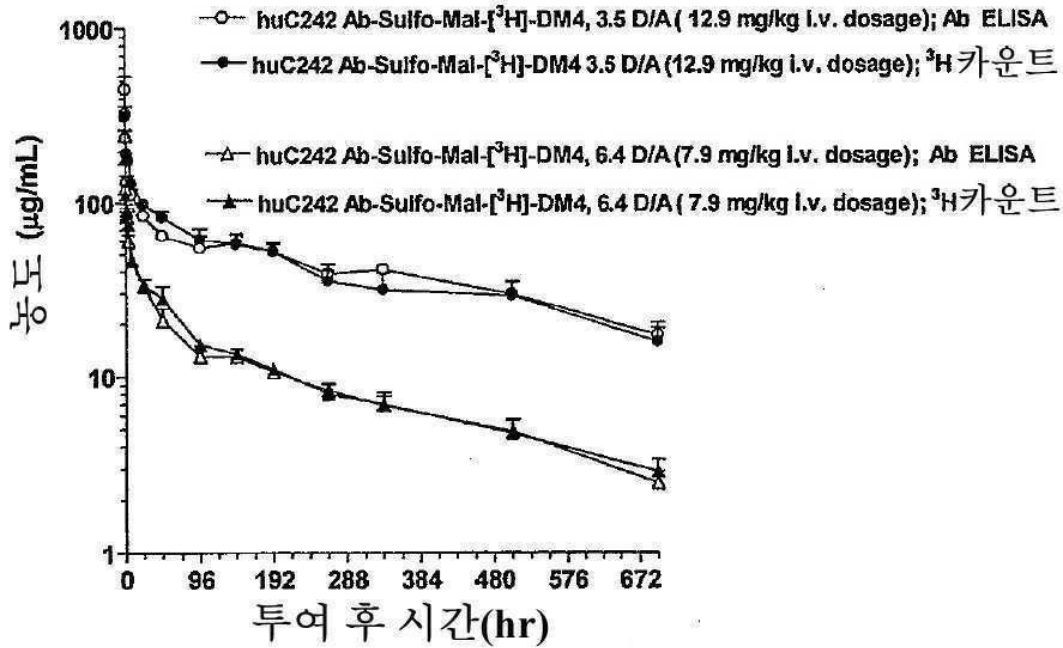


도면71



도면72a

CD-1 마우스에 각각 12.9 mg/kg 및 7.9 mg/kg의 용량으로
정맥주사되는 3.5 DM4/Ab 또는 6.4 DM4/Ab의 컨쥬게이트인
huC242 항체-설폰-Mal-[³H-표지]-DM4 컨쥬게이트의
혈장 약물 동력학
도 72a는 투여 후 시간 대 항체 농도
(ELISA 또는 ³H 카운트에 의해 측정)



도면72b

CD-1 마우스에 각각 12.9 mg/kg 및 7.9 mg/kg의 용량으로 정맥주사되는 3.5 DM4/Ab 또는 6.4 DM4/Ab의 컨쥬게이트인 huC242 항체-설폰-Mal-[3H-표지]-DM4 컨쥬게이트의 혈장 약물 동력학도 72b는 투여 후 시간 대 메이탄시노이드(DM4)/항체(Ab) 비율

