



(19) 대한민국특허청(KR)

(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2023년01월16일

(11) 등록번호 10-2489277

(24) 등록일자 2023년01월12일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

A61K 47/54 (2017.01) A61K 31/437 (2006.01)
 A61K 31/519 (2006.01) A61K 31/5377 (2006.01)
 A61K 38/07 (2006.01) A61K 45/06 (2006.01)
 A61P 35/00 (2006.01)

(52) CPC특허분류

A61K 47/545 (2017.08)
 A61K 31/437 (2013.01)

(21) 출원번호 10-2018-7037409

(22) 출원일자(국제) 2017년05월25일

심사청구일자 2020년05월22일

(85) 번역문제출일자 2018년12월24일

(65) 공개번호 10-2019-0021261

(43) 공개일자 2019년03월05일

(86) 국제출원번호 PCT/US2017/034537

(87) 국제공개번호 WO 2017/205661

국제공개일자 2017년11월30일

(30) 우선권주장

62/341,587 2016년05월25일 미국(US)

(56) 선행기술조사문헌

W02014062697 A2*

*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

(73) 특허권자

퍼듀 리서치 파운데이션

미국, 인디애나 47906, 웨스트 라파예트 파운드리 드라이브 101

엔도사이트, 인코포레이티드

미국, 인디애나 47906, 웨스트 라파예트, 켄트 애비뉴 3000

(72) 발명자

로우 필립 스튜어트

미국, 인디애나 47906, 웨스트 라파예트, 팜 릿지 로드 5850

왕 빙빙

미국, 인디애나 47906, 웨스트 라파예트, 오닉스 스트리스 976

(뒷면에 계속)

(74) 대리인

강명구, 이경민

전체 청구항 수 : 총 15 항

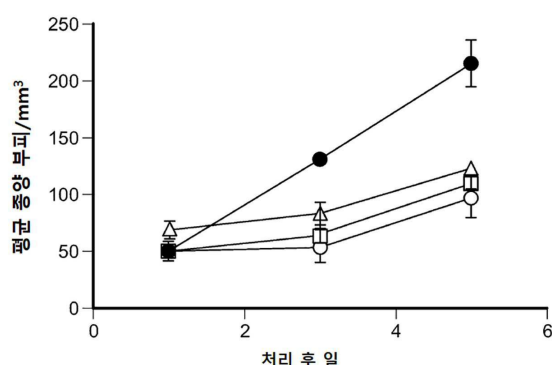
심사관 : 이재정

(54) 발명의 명칭 골수-유래 억제 세포를 표적화함으로써 암을 치료하는 방법

(57) 요약

본 발명에 기술된 발명은 링커를 통해 약물에 부착된 엽산 수용체 리간드를 포함하는 하나 이상의 화합물을 이용하여 암을 치료하기 위한 방법에 관한 것이다. 더욱 구체적으로, 본 발명에 기술된 발명은 골수-유래 억제 세포를 표적화하기 위해 링커를 통해 약물에 부착된 엽산 수용체 리간드를 포함하는 하나 이상의 화합물을 이용하여 암을 치료하기 위한 방법에 관한 것이다.

대표도 - 도36



도 36

(52) CPC특허분류

A61K 31/519 (2013.01)

A61K 31/5377 (2013.01)

A61K 38/07 (2013.01)

A61K 45/06 (2013.01)

A61P 35/00 (2018.01)

(72) 발명자

리몬 크리스토퍼 폴

미국, 인디애나 47906, 웨스트 라파예트, 팜 릿지
로드 5830

루 잉유안 제이.

미국, 인디애나 47906, 웨스트 라파예트, 와릭 스
트리트 833

윌러 II 레로이 더블유.

미국, 인디애나 47906, 웨스트 라파예트, 더블유.
캔들윅 레인 1436

명세서

청구범위

청구항 1

약물에 부착된 엽산을 포함하는 화합물을 치료적으로 유효한 양으로 포함하는 엽산 수용체-음성 암 치료를 위한 제약학적 조성물로서,

상기 약물이 TLR 작용제, 미세소관 억제제 및 PI3 키나제(PI3K) 억제제로부터 선정되며, 부착이 링커를 통해 이뤄지며,

상기 약물에 부착된 엽산에 의해 골수-유래 억제 세포(suppressor cell)가 억제되거나 고갈되는, 엽산 수용체-음성 암 치료를 위한 제약학적 조성물.

청구항 2

제 1항에 있어서, 상기 엽산은 엽산 수용체 β 에 특이적이며, 상기 엽산은 골수-유래 억제 세포 상의 엽산 수용체 β 에 결합하는 제약학적 조성물.

청구항 3

제 1항 또는 제 2항에 있어서, 상기 골수-유래 억제 세포는 CD11b 마커를 가지는 제약학적 조성물.

청구항 4

제 1항 또는 제 2항에 있어서, 상기 골수-유래 억제 세포는 Gr1 마커를 가지는 제약학적 조성물.

청구항 5

제 1항 또는 제 2항에 있어서, 상기 암은 비소세포폐암(non-small cell lung cancer), 두경부암(head and neck cancer), 삼중 음성 유방암(triple negative breast cancer), 유방암, 난소암(ovarian cancer), 대장암(colon cancer), 전립선암(prostate cancer), 폐암, 자궁내막암(endometrial cancer), 및 신장암(renal cancer)으로부터 선택되는 제약학적 조성물.

청구항 6

CL제 1항 또는 제 2항에 있어서, 상기 약물은 N1-글리시닐[4-((6-아미노-2-(부틸아미노)-8-하이드록시-9H-푸린-9-일)메틸)벤조일]]스페르민(N1-glycinyll[4-((6-amino-2-(butylamino)-8-hydroxy-9H-purin-9-yl)methyl)benzoyl] spermine), 닥톨리십(Dactolisib), 보르트만닌(wortmannin), 2-아미노-8-((1r, 4r)-4-(2-하이드록시에톡시)사이클로헥실)-6-(6-메톡시피리딘-3-일)-4-메틸피리도[2,3-d]피리미딘-7(8H)-원(2-amino-8-((1r,4r)-4-(2-hydroxyethoxy)cyclohexyl)-6-(6-methoxy pyridin-3-yl)-4-methylpyrido[2,3-d]pyrimidin-7(8H)-one), CpG 올리고뉴클레오타이드, 에베로리무스(everolimus), 튜블리신(tubulysin) 및 아피톨리십(Apitolisib)으로부터 선택되는 제약학적 조성물.

청구항 7

제 1항 또는 제 2항에 있어서, 상기 약물은 미세소관 억제제(microtubule inhibitor)인 제약학적 조성물.

청구항 8

제 1항 또는 제 2항에 있어서, 상기 약물은 PI3K 억제제인 제약학적 조성물.

청구항 9

제 1항 또는 제 2항에 있어서, 상기 약물은 TLR 작용제인 제약학적 조성물.

청구항 10

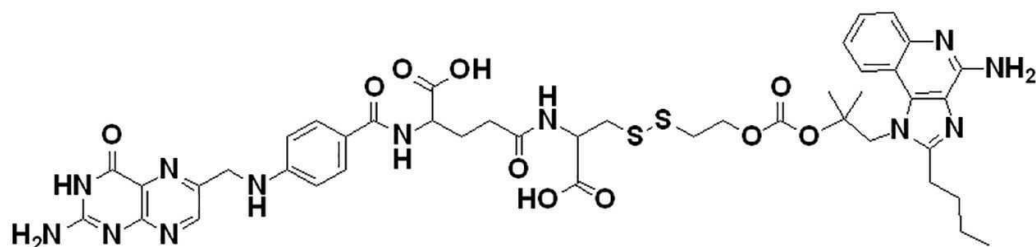
제 9항에 있어서, 상기 TLR 작용제는 TLR7 작용제 및 TLR 9 작용제로부터 선택되는 제약학적 조성물.

청구항 11

제 9항에 있어서, 상기에서 약물은 글수-유래 억제 세포를 리프로그래밍하는 제약학적 조성물.

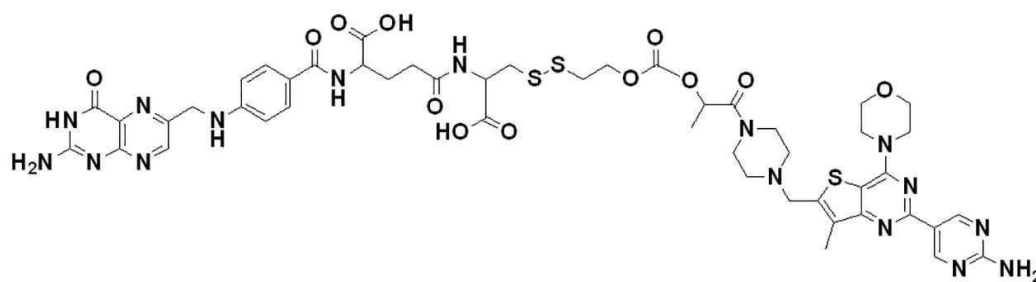
청구항 12

제 1항 또는 제 2항에 있어서, 상기 화합물은 하기의 화학식의 화합물인 제약학적 조성물:



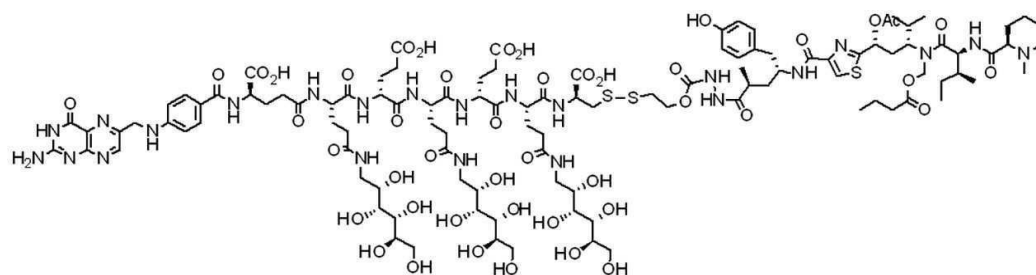
청구항 13

제 1항 또는 제 2항에 있어서, 상기 화합물은 하기의 화학식의 화합물인 제약학적 조성물:



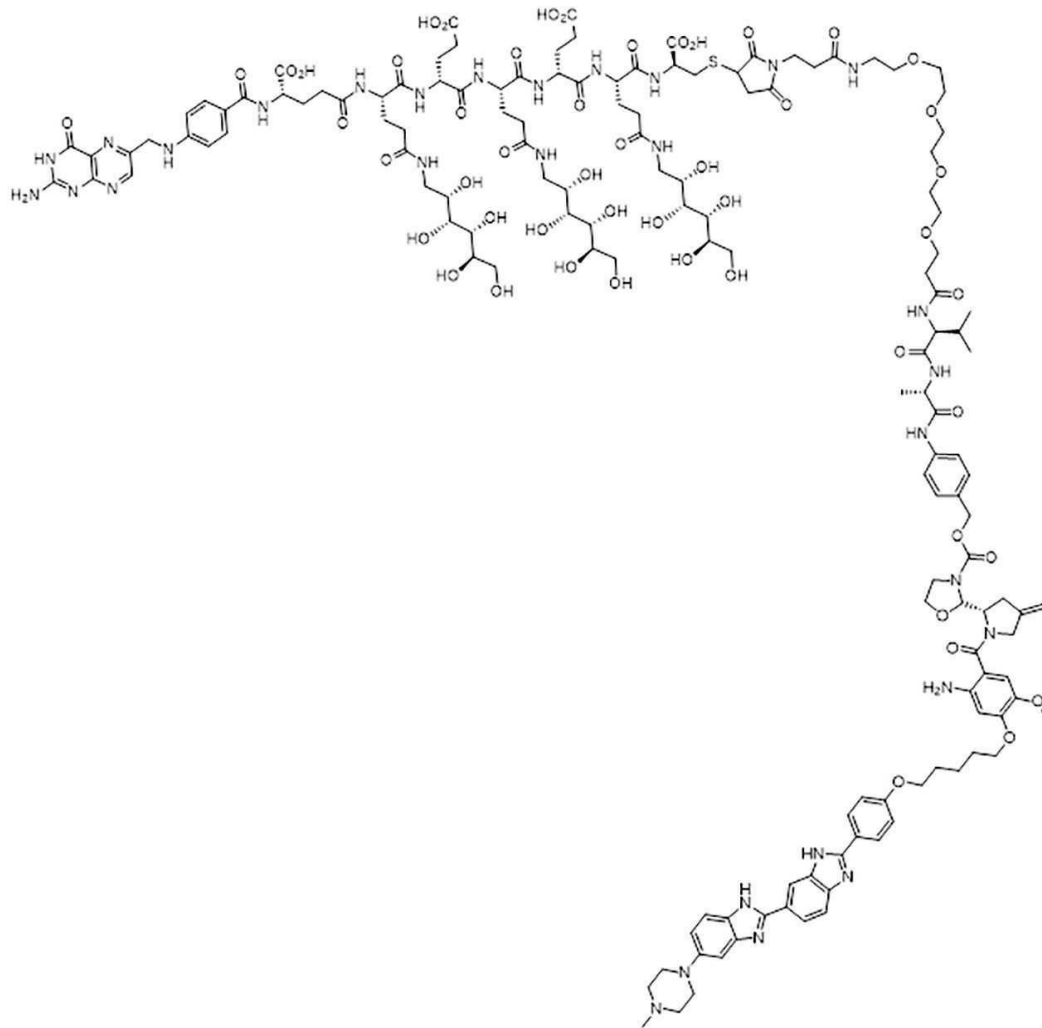
청구항 14

제 1항 또는 제 2항에 있어서, 상기 화합물은 하기의 화학식의 화합물인 제약학적 조성물:



청구항 15

제 1항 또는 제 2항에 있어서, 상기 화합물은 하기의 화학식의 화합물인 제약학적 조성물:



청구항 16

삭제

청구항 17

삭제

청구항 18

삭제

청구항 19

삭제

청구항 20

삭제

청구항 21

삭제

청구항 22

삭제

청구항 23

삭제

청구항 24

삭제

청구항 25

삭제

청구항 26

삭제

청구항 27

삭제

청구항 28

삭제

청구항 29

삭제

청구항 30

삭제

청구항 31

삭제

청구항 32

삭제

청구항 33

삭제

청구항 34

삭제

청구항 35

삭제

청구항 36

삭제

청구항 37

삭제

청구항 38

삭제

청구항 39

삭제

청구항 40

삭제

청구항 41

삭제

청구항 42

삭제

청구항 43

삭제

청구항 44

삭제

청구항 45

삭제

청구항 46

삭제

청구항 47

삭제

발명의 설명

기술 분야

[0001] 관련된 출원에 대한 교차 참조

[0002] 본 출원은 35 U.S.C. § 119(e)에 따라서 이의 전체가 참고문헌으로서 본 발명에 통합된, 2016년 5월 25일에 출원된 미국 가출원번호 62/341,587에 대해 우선권을 주장한다.

[0003] 본 발명의 분야

[0004] 본 발명에 기술된 발명은 링커를 통해 약물에 부착된 엽산(folate) 수용체 리간드를 포함하는 하나 이상의 화합물을 이용하여 암을 치료하는 방법에 관한 것이다. 특히, 본 발명에 기술된 발명은 골수-유래 억제 세포를 표적화하기 위해 링커를 통해 약물에 부착된 엽산 수용체 리간드를 포함하는 하나 이상의 화합물을 이용하여 암을 치료하는 방법에 관한 것이다.

배경 기술

[0005] 배경 및 요약

[0006] 방사선 요법, 화학 요법 및 호르몬 요법과 같이 항-암 기술에 상당한 발전이 있다는 사실에도 불구하고, 암은 여전히 미국에서 심장병에 이은 두 번째 주요 사망 원인으로 남아 있다. 일반적으로, 암은 미토마이신(mitomycin), 파클리탁셀(paclitaxel) 및 캄토테신(camptothecin)과 같은 매우 강력한 약물을 이용한 화학 요법으로 치료된다. 많은 경우에, 이들 화학 요법 약제는 용량 반응 효과(dose responsive effect)를 나타내며, 종양 억제는 약물 용량에 비례한다. 따라서, 적극적인 투약 요법(dosing regimen)이 종양(neoplasms) 치료에 사용되나; 고-용량 화학 요법은 암 세포에 대한 낮은 선택성 및 정상 세포에 대한 독성에 의해 저해된다. 종양 특

이성의 부족은 화학 요법이 극복해야하는 많은 장애물들 중 하나이다.

- [0007] 최근 화학 요법 한계에 대한 한 해결책은 매우 높은 특이성을 가진 항-암 약제의 유효한 농도를 전달하는 것이다. 이 목표를 달성하기 위해, 항-암 약물을 호르몬, 항체, 및 비타민과 컨쥬게이션함으로써 종양-선택적인 약물을 개발하는데 많은 노력을 기울여 왔다. 예를 들어, 낮은 분자량 비타민, 엽산(folic acid), 및 다른 엽산 수용체 결합 리간드가 엽산 수용체-양성 암에 대한 표적화제로서 특히 유용하다.
- [0008] 엽산(folic acid)은 비타민 B 패밀리의 멤버이며 핵산 및 아미노산의 생합성에 참여함으로써 세포 생존에서 필수적인 역할을 한다. 이 필수 비타민은 또한 엽산 수용체-양성 암 세포를 표적화함으로써 컨쥬게이션된 항-암 약물의 특이성을 향상시키는 높은 친화성 리간드이다. 엽산 수용체 (FR)가 비-점액성 난소 암종(non-mucinous ovarian carcinoma)의 90% 이상에서 상향 조절되는 것이 밝혀졌다. 엽산 수용체는 또한 신장, 뇌, 폐, 및 유방 암종에서 고-중 수준인 것으로 밝혀졌다. 반면, 엽산 수용체가 대부분의 정상 조직에서 낮은 수준으로 존재하여 암 세포를 선택적으로 표적화하는 메커니즘을 야기한다는 것이 보고되었다. 엽산 수용체가 매우 높은 특이성으로 종양 조직에 약제를 전달하는데 사용될 수 있으나, 엽산 수용체를 발현하지 않거나 원하는 특이성을 제공하기에 충분하지 않은 다수의 암이 존재한다. 따라서, 그러한 엽산 수용체-음성 암을 치료하기 위한 요법의 개발이 필요하다.
- [0009] 골수-유래 억제 세포 (Myeloid-derived supressor cells, MDSCs)는 종양과 관련되며 T 세포, NK 세포, DC 대식 세포, 및 NKT 세포와 같은 세포들을 억제함으로써 종양 환경에서 면역 억제를 강화할 수 있다. 따라서, MDSC가 종양 성장, 혈관신생, 및 전이를 촉진할 수 있다. 종양 환경에서 이들 세포의 존재는 암 환자의 생존과 음성적인 상관 관계에 있다. 따라서, MDSC를 고갈시키는 요법이 유용할 수 있다.
- [0010] 출원인들은 MDSC가 엽산 수용체 β 를 발현하기 때문에 MDSC에 약물을 표적화함으로써 엽산 수용체를 발현하는, 또는 엽산 수용체를 충분한 수로 발현하지 않는, 또는 아예 발현하지 않는 종양을 치료할 수 있음을 발견하였다. 따라서, 링커를 통해 약물에 연결된 엽산 수용체 결합 리간드를 이용하여 MDSC를 표적화함으로써 암을 치료하는 방법이 본 발명에 기술된다. MDSC를 고갈 또는 억제하고 암이 엽산 수용체를 발현하는지 여부와 상관없이 암을 가진 숙주 동물을 치료하기 위해 약물을 MDSC에 전달하기 위한 표적화 리간드로서 엽산을 이용하여 MDSC를 표적화할 수 있다. 따라서, 본 발명에 기술된 방법이 엽산 수용체를 발현하는 암 뿐만 아니라, 엽산 수용체를 발현하지 않는 암 치료에 사용될 수 있음이 이해된다.

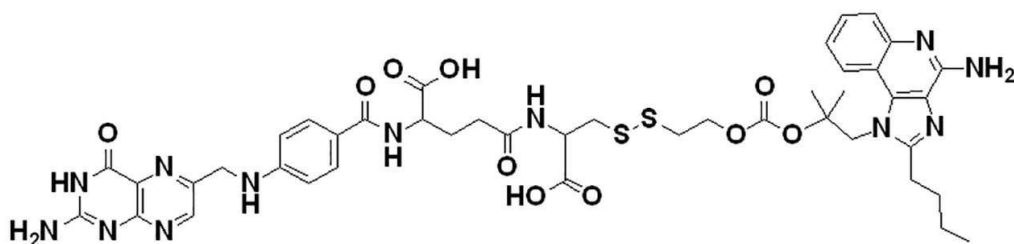
발명의 내용

해결하려는 과제

- [0011] 일 구현예에서, 엽산 수용체-음성 암을 치료하는 방법이 제공된다. 방법은 링커를 통해 약물에 부착된 엽산 수용체 리간드를 포함하는 하나 이상의 화합물의 치료적으로 유효한 양을 숙주 동물에 투여하는 것을 포함하며, 상기에서 골수-유래 억제 세포가 억제 또는 고갈된다.
- [0012] 또 다른 구현예에서, 엽산 수용체-음성 암을 치료하는 방법이 제공된다. 방법은 골수-유래 억제 세포를 고갈 또는 억제시키기 위해 링커를 통해 약물에 부착된 엽산 수용체 리간드를 포함하는 하나 이상의 화합물의 치료적으로 유효한 양을 숙주 동물에 투여하는 것을 포함한다.
- [0013] 또 다른 구현예에서, 골수-유래 억제 세포가 암에 존재하는 숙주 동물에서 엽산 수용체-음성 암을 치료하는 방법이 제공되며, 방법은 링커를 통해 약물에 부착된 엽산 수용체 리간드를 포함하는 하나 이상의 화합물의 치료적으로 유효한 양을 숙주 동물에 투여하고, 및 골수-유래 억제 세포를 가지는 암을 치료하는 것을 포함한다.
- [0014] 또 다른 구현예에서, 암을 치료하는 방법이 제공된다. 방법은 숙주 동물 세포의 암에서 골수-유래 억제 세포의 존재를 확인하고, 및 링커를 통해 약물에 부착된 엽산 수용체 리간드를 포함하는 하나 이상의 화합물의 치료적으로 유효한 양을 숙주 동물에게 투여하는 것을 포함한다.
- [0015] 또 다른 예시적인 구현예에서, 숙주 동물에서 암을 치료하는 방법이 제공된다. 방법은 골수-유래 억제 세포를 억제 또는 고갈시키기 위해 링커를 통해 약물에 부착된 엽산 수용체 리간드를 포함하는 하나 이상의 화합물의 치료적으로 유효한 양을 숙주 동물에게 투여하는 것을 포함한다.
- [0016] 또 다른 구현예에서, 숙주 동물에서 골수-유래 억제 세포를 표적화하는 방법이 제공된다. 방법은 골수-유래 억제 세포를 표적화하기 위해 숙주 동물에게 링커를 통해 약물에 부착된 엽산 수용체 리간드를 포함하는 하나 이상의 화합물의 치료적으로 또는 진단적으로 유효한 양을 투여하는 것을 포함한다.

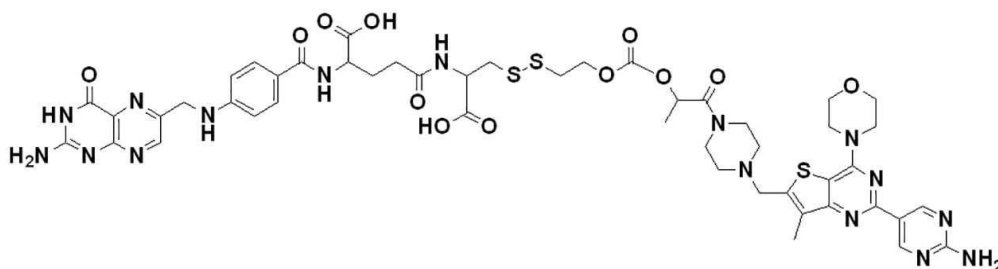
- [0017] 본 발명의 추가적인 예시적인 및 비-제한적인 구현에는 하기 열거된 절에서 기술된다. 하기 절의 모든 조합이 본 발명에 기술된 발명의 추가적인 구현예인 것으로 이해된다. 본 출원의 예시적인 구현예의 구체적인 설명 섹션에서 기술된 이들 구현예들의 모든 적용 가능한 조합 또한 본 발명의 구현예이다.
- [0018] 1. 링커를 통해 약물에 부착된 엽산 수용체 리간드를 포함하는 하나 이상의 화합물의 치료적으로 유효한 양을 숙주 동물에게 투여하는 것을 포함하며, 상기에서 골수-유래 억제 세포(suppressor cell)가 억제되거나 고갈되는, 엽산 수용체-음성(folate receptor-negative) 암을 치료하는 방법.
- [0019] 2. 골수-유래 억제 세포를 고갈 또는 억제시키기 위해 링커를 통해 약물에 부착된 엽산 수용체 리간드를 포함하는 하나 이상의 화합물의 치료적으로 유효한 양을 숙주 동물에게 투여하는 것을 포함하는, 엽산 수용체-음성 암을 치료하는 방법.
- [0020] 3. 링커를 통해 약물에 부착된 엽산 수용체 리간드를 포함하는 하나 이상의 화합물의 치료적으로 유효한 양을 숙주 동물에게 투여하고, 및 골수-유래 억제 세포를 가지는 암을 치료하는 것을 포함하는, 골수-유래 억제 세포가 암에 존재하는 숙주 동물에서 엽산 수용체-음성 암을 치료하는 방법.
- [0021] 4. 숙주 동물 세포의 암에서 골수-유래 억제 세포의 존재를 확인하고, 및 숙주 동물에게 링커를 통해 약물에 부착된 엽산 수용체 리간드를 포함하는 하나 이상의 화합물의 치료적으로 유효한 양을 투여하는 것을 포함하는, 암을 치료하는 방법.
- [0022] 5. 골수-유래 억제 세포를 억제 또는 고갈시키기 위해 숙주 동물에게 링커를 통해 약물에 부착된 엽산 수용체 리간드를 포함하는 하나 이상의 화합물의 치료적으로 유효한 양을 투여하는 것을 포함하는, 숙주 동물 세포에서 암을 치료하는 방법.
- [0023] 6. 골수-유래 억제 세포를 표적화하기 위해 숙주 동물에게 링커를 통해 약물에 부착된 엽산 수용체 리간드를 포함하는 하나 이상의 화합물의 치료적으로 또는 진단적으로 유효한 양을 투여하는 것을 포함하는, 숙주 동물에서 골수-유래 억제 세포를 표적화하는 방법.
- [0024] 7. 제 4절 내지 제 6절 중 어느 한 절(clauses)에 있어서, 상기에서 암은 엽산 수용체-음성인 방법.
- [0025] 8. 제 4절 내지 제 6절 중 어느 한 절에 있어서, 상기에서 암은 엽산 수용체-양성인 방법.
- [0026] 9. 제 1절 내지 제 8절 중 어느 한 절에 있어서, 상기에서 엽산 수용체 결합 리간드는 엽산 수용체 β 에 특이적이며, 상기에서 엽산 수용체 결합 리간드는 골수-유래 억제 세포 상의 엽산 수용체 β 에 결합하는 방법.
- [0027] 10. 제 1절 내지 제 9절 중 어느 한 절에 있어서, 상기에서 골수-유래 억제 세포는 CD11b 마커를 가지는 방법.
- [0028] 11. 제 1절 내지 제 10절 중 어느 한 절에 있어서, 상기에서 골수-유래 억제 세포는 Gr1 마커를 가지는 방법.
- [0029] 12. 제 1절 내지 제 11절 중 어느 한 절에 있어서, 상기에서 암은 비소세포폐암(non-small cell lung cancer), 두경부암(head and neck cancer), 삼중 음성 유방암(triple negative breast cancer), 유방암, 난소암(ovarian cancer), 대장암(colon cancer), 전립선암(prostate cancer), 폐암, 자궁내막암(endometrial cancer), 및 신장암(renal cancer)으로부터 선택되는 방법.
- [0030] 13. 제 1절 내지 제 12절 중 어느 한 절에 있어서, 상기에서 약물은 CI307, BEZ235, 보르트만닌(wortmannin), AMT, PF-04691502, CpG 올리고뉴클레오타이드, BLZ945, 레날리도마이드(lenalidomide), NLG919, 5,15-DPP, 피롤로벤조디아제핀(pyrrolobenzodiazepine), 메토크세이트(methotrexate), 에베로리무스(everolimus), 튜블리신, GDC-0980, AS1517499, BIRB796, n-아세틸-5-하이드록시트리프타민, 및 2,4-디아미노-6-하이드록시피리미딘으로부터 선택되는 방법.
- [0031] 14. 제 1절 내지 제 13절 중 어느 한 절에 있어서, 상기에서 약물은 미세소관 억제제(microtubule inhibitor)인 방법.
- [0032] 15. 제 14절에 있어서, 상기에서 약물은 골수-유래 억제 세포를 사멸시키는 방법.
- [0033] 16. 제 1절 내지 제 13절 중 어느 한 절에 있어서, 상기에서 약물은 PI3K 억제제, STAT6 억제제, MAPK 억제제, iNOS 억제제, 및 항-염증 약물로부터 선택되는 방법.
- [0034] 17. 제 16절에 있어서, 상기에서 약물은 골수-유래 억제 세포를 불활성화시키는 방법.
- [0035] 18. 제 1절 내지 제 13절 중 어느 한 절에 있어서, 상기에서 약물은 TLR 작용제인 방법.

- [0036] 19. 제 18절에 있어서, 상기에서 TLR 작용제는 TLR7 작용제 및 TLR 9 작용제로부터 선택되는 방법.
- [0037] 20. 제 18절 또는 제 19절에 있어서, 상기에서 약물은 골수-유래 억제 세포를 리프로그래밍하는 방법.
- [0038] 21. 제 14절 또는 제 15절에 있어서, 상기에서 약물은 튜블리신인 방법.
- [0039] 22. 제 16절에 있어서, 상기 약물은 PI3K 억제제인 방법.
- [0040] 23. 제 22절에 있어서, 상기에서 약물은 GDC-0980, 보르트만닌, 및 PF-04691502로부터 선택되는 방법.
- [0041] 24. 제 16절에 있어서, 상기에서 약물은 STAT6 억제제인 방법.
- [0042] 25. 제 24절에 있어서, 상기에서 약물은 AS1517499인 방법.
- [0043] 26. 제 16절에 있어서, 상기에서 약물은 MAPK 억제제인 방법.
- [0044] 27. 제 26절에 있어서, 상기에서 약물은 BIRB796인 방법.
- [0045] 28. 제 16절에 있어서, 상기에서 약물은 iNOS 억제제인 방법.
- [0046] 29. 제 28절에 있어서, 상기에서 약물은 AMT인 방법.
- [0047] 30. 제 16절에 있어서, 상기에서 약물은 항-염증 약물인 방법.
- [0048] 31. 제 30절에 있어서, 상기에서 약물은 메토틀렉세이트인 방법.
- [0049] 32. 제 18절 내지 제 20절 중 어느 한 절에 있어서, 상기에서 약물은 CI307, CpG 올리고뉴클레오타이드, 및 TLR7A로부터 선택되는 방법.
- [0050] 33. 제 1절 내지 제 13절 중 어느 한 절에 있어서, 상기에서 하나 이상의 화합물이 투여되며 화합물은 상이한 약물들을 포함하는 방법.
- [0051] 34. 제 33절에 있어서, 상기에서 상이한 약물들은 TLR7 작용제 및 PI3K 억제제인 방법.
- [0052] 35. 제 1절 내지 제 32절 중 어느 한 절에 있어서, 상기에서 하나 이상의 화합물이 투여되고 비공액 (unconjugated) 약물 또한 투여되는 방법.
- [0053] 36. 제 35절에 있어서, 상기에서 화합물 내의 약물은 TLR7 작용제이며 비공액 약물은 PI3K 억제제인 방법.
- [0054] 37. 제 1절 내지 제 12절 중 어느 한 절에 있어서, 상기에서 화합물은 하기의 화학식의 화합물인 방법:



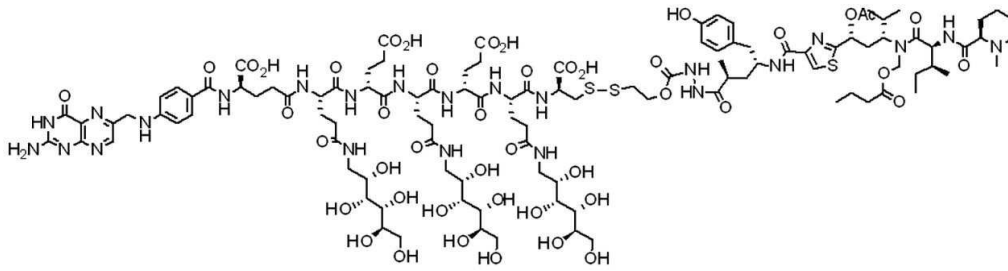
[0055]

- [0056] 38. 제 1절 내지 제 12절 중 어느 한 절에 있어서, 상기에서 화합물은 하기의 화학식의 화합물인 방법:



[0057]

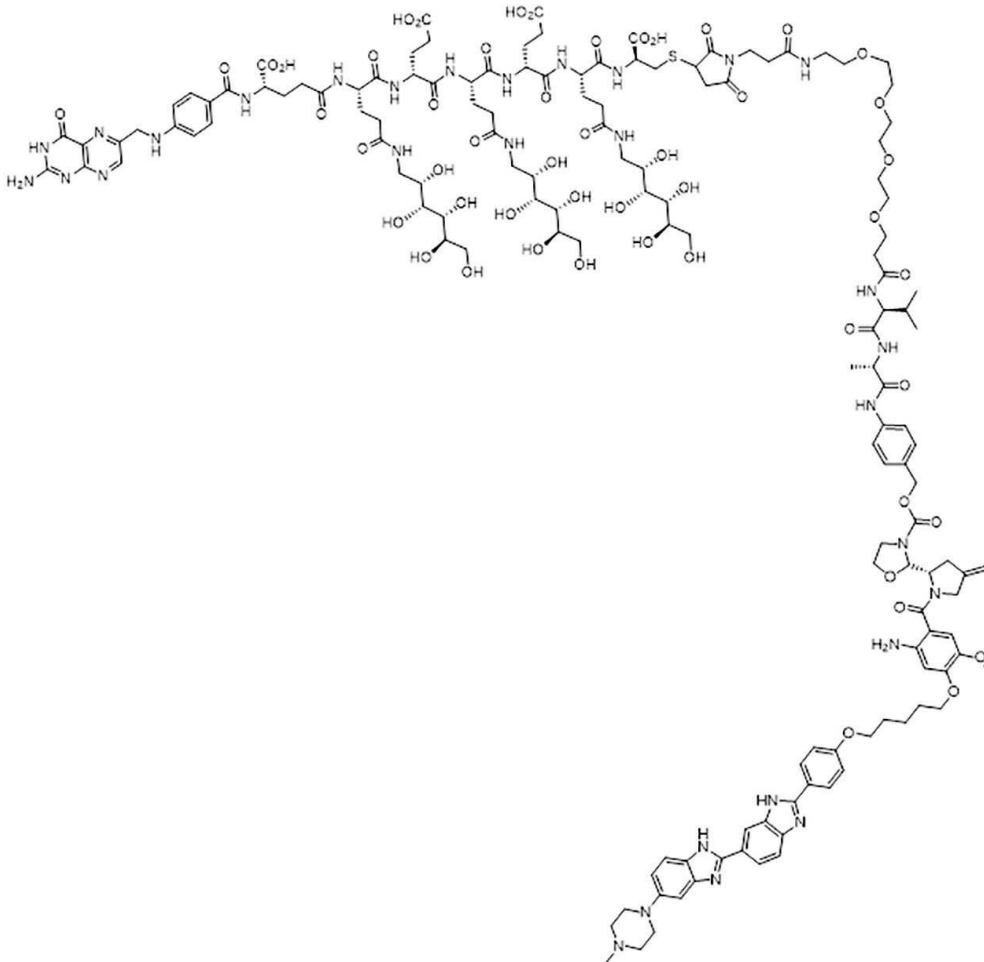
- [0058] 39. 제 1절 내지 제 12절 중 어느 한 절에 있어서, 상기에서 화합물은 하기의 화학식의 화합물인 방법:



[0059]

[0060]

40. 제 1절 내지 제 12절 중 어느 한 절에 있어서, 상기에서 화합물은 하기의 화학식의 화합물인 방법:



[0061]

[0062]

41. 제 1절 내지 제 40절 중 어느 한 절에 있어서, 상기에서 하나 이상의 화합물, 또는 하나 이상의 화합물의 약학적으로 허용 가능한 염의 염이 숙주 동물에게 투여되는 방법.

[0063]

42. 제 1절 내지 제 41절 중 어느 한 절에 있어서, 상기에서 투여는 비경구 투여 형태인 방법.

[0064]

43. 제 42절에 있어서, 상기에서 비경구 투여 형태는 피 내(intradermal) 투여 형태, 피하(subcutaneous) 투여 형태, 근육 내(intramuscular) 투여 형태, 복강 내(intraperitoneal) 투여 형태, 정맥 내(intravenous) 투여 형태, 및 경막 내(intrathecal) 투여 형태로부터 선택되는 방법.

[0065]

44. 제 1절 내지 제 43절 중 어느 한 절에 있어서, 상기에서 치료적으로 유효한 양 또는 진단적으로 유효한 양은 약 $.5 \text{ mg/m}^2$ 내지 약 6.0 mg/m^2 인 방법.

[0066]

45. 제 1절 내지 제 44절 중 어느 한 절에 있어서, 상기에서 치료적으로 유효한 양 또는 진단적으로 유효한 양은 약 0.5 mg/m^2 내지 약 4.0 mg/m^2 인 방법.

[0067]

46. 제 1절 내지 제 45절 중 어느 한 절에 있어서, 상기에서 치료적으로 유효한 양 또는 진단적으로 유효한 양

은 약 0.5 mg/m^2 내지 약 2.0 mg/m^2 인 방법.

[0068]

47. 제 1절 내지 제 7절 또는 제 9절 내지 제 46절 중 어느 한 절에 있어서, 상기에서 암은 염산 수용체-음성이며 암은 대장암, 폐암, 전립선암, 및 유방암으로부터 선택되는 방법.

도면의 간단한 설명

[0069]

도 1은 다양한 인간 종양에서의 FR- α 발현의 헤마톡실린 및 에오신 염색을 나타낸다: 간암 (도 1a); 두경부암 (도 1b); 흉선종 (도 1c).

도 2는 다양한 인간 종양에서의 FR- β 발현의 헤마톡실린 및 에오신 염색을 나타낸다: 간암 (도 2a); 두경부암 (도 2b); 흉선종 (도 2c).

도 3는 다양한 인간 종양에서의 FR- β 발현의 헤마톡실린 및 에오신 염색을 나타낸다: 방광암 (도 3a); 뇌암 (도 3b); 간암 (도 3c).

도 4는 다양한 인간 종양에서의 FR- β 발현의 헤마톡실린 및 에오신 염색을 나타낸다: 신장암 (도 4a); 피부암 (도 4b); 흉선 암종 (도 4c).

도 5는 마우스 MDSC (CD11b+Gr1+)에서의 FR- β 발현을 나타낸다. 도 5a: 생세포에 대해 게이팅된 MDSC 집단; 도 5b: MDSC 집단에 대해 게이팅된 FR- β 발현.

도 6은 마우스 TAM (CD11b+F4/80)에서의 FR- β 발현을 나타낸다. 도 6a: 생세포에 대해 게이팅된 TAM 집단; 도 6b: TAM 집단에 대해 게이팅된 FR- β 발현.

도 7은 다양한 약물과 공-배양한 후의 TAM/MDSC에 의한 인 비트로 아르기네이즈 생산을 나타낸다. 도 7a: (●) CL307; (■) BEZ235; (▲) 보르트만닌; (▼) AMT. 도 7b: (◆) CpG; (○) BIZ945; (□) 레날리도마이드; (Δ) NLG919. 도 7c: (▽) N-아세틸-5-하이드록시타민(hydroxyptamine); (◇) 2,4-디아미노-6-하이드록시피리미딘(hydroxypyrimidine); (■) 5,15-DPP; (x) 메토티렉세이트. 도 7d: (+) 에베로리무스; (◆) 튜블리신; (■) AS1517499; (●) BIRB796 (도라마피노드(doramapinod)).

도 8은 다양한 약물과 공-배양한 후의 TAM/MDSC에 의한 인 비트로 IL-10 생산을 나타낸다. 도 8a: (■) BEZ235; (▲) 보르트만닌; (▼) AMT. 도 8b: (○) BIZ945; (□) 레날리도마이드; (Δ) NLG919. 도 8c: (▽) N-아세틸-5-하이드록시타민; (◇) 2,4-디아미노-6-하이드록시피리미딘; (■) 5,15-DPP; (x) 메토티렉세이트. 도 8d: (|) 에베로리무스; (◆) 튜블리신; (■) AS1517499; (●) BIRB796 (도라마피노드).

도 9. 다양한 약물과 공-배양한 후의 TAM/MDSC에 의한 인 비트로 산화 질소 생산을 나타낸다. 도 9a: (■) BEZ235; (▲) 보르트만닌; (▼) AMT. 도 9b: (○) BIZ945; (□) 레날리도마이드; (Δ) NLG919. 도 9c: (▽) N-아세틸-5-하이드록시타민; (◇) 2,4-디아미노-6-하이드록시피리미딘; (■) 5,15-DPP; (x) 메토티렉세이트. 도 9d: (+) 에베로리무스; (◆) 튜블리신; (■) AS1517499; (●) BIRB796 (도라마피노드).

도 10. 도 10a에서, 두 TLR 작용제, (●) CpG (TLR9 작용제) 및 (◆) CL307 (TLR7 작용제)와 다양한 농도에서 공-배양한 후 TAM/MDSC에 의한 산화 질소 생산을 나타낸다. 검은 색 점선은 무처리 대조군 유래 산화 질소 수준을 나타낸다; 도 10b, 다른 TLR 작용제: 레시퀴모드 (TLR7/8 작용제), CpG ODN (TLR9 작용제), Poly IC (TLR3 작용제), 자이모산 (TLR2 작용제)와 공-배양한 후 유세포 분석으로 측정된 MDSC에서의 CD86 발현.

도 11은 인 비트로 TAM/MDSC과 상이한 농도의 두 약물의 공-배양으로 시험된, 두 TLR7 작용제, (■) CL307 및 (●) TLR7A에 의한 아르기네이즈 (도 11a) 및 산화 질소 (도 11b) 생산을 나타낸다. 도 11a에서 검은 색 점선은 무처리 대조군에서 아르기네이즈 수준을 나타낸다. 도 11a에서 검은 색 실선은 백그라운드의 아르기네이즈 수준을 나타낸다.

도 12는 TAM/MDSC 기능을 효과적으로 억제하기 위한 PI3K 억제제 활성을 확인하기 위해 세 가지 PI3K 억제제 (BEZ235, PF-04691502 및 GDC-0980)와 공-배양 후 TAM/MDSC에 의한 아르기네이즈 생산을 나타낸다.

도 13은 TAM/MDSC 기능을 효과적으로 억제하기 위한 PI3K 억제제 활성을 확인하기 위해 세 가지 PI3K 억제제 (BEZ235, PF-04691502 및 GDC-0980)와 공-배양 후 TAM/MDSC에 의한 IL-10 생산을 나타낸다.

도 14는 TAM/MDSC 기능을 효과적으로 억제하기 위한 PI3K 억제제 활성을 확인하기 위해 세 가지 PI3K 억제제

(BEZ235, PF-04691502 및 GDC-0980)와 공-배양 후 TAM/MDSC에 의한 산화 질소 생산을 나타낸다.

도 15는 TAM/MDSC와 TLR7 작용제 (CL307) 및 PI3K 억제제 (BEZ235)의 인 비트로 조합 처리에 의한 아르기네이즈 생산의 시너지적인 커브를 나타낸다; (■) 단일 처리, (●) 조합 처리.

도 16은 4T1 고형 종양 모델에서의 FA-TLR7 작용제 (FA-TLR7A)의 용량 연구를 나타낸다. 도 16a는 무처리 대조군 (●), 2 nmol 처리군 (■) 및 5 nmol (세모) 처리군에서의 종양 성장을 나타낸다. 도 16b는 무처리 대조군 (●), 10 nmol (▼) 처리군 및 20 nmol (◆) 처리군에서의 종양 성장을 나타낸다.

도 17은 도 16에서 나타난 4T1 고형 종양 모델에서 용량 연구의 상이한 군들에 대한 동물 체중을 나타낸다. 체중은 6일차에 처리를 시작할 때부터 매일 측정되었다. 도 17a는 무처리 대조군 (●), 2 nmol 처리군 (■) 및 5 nmol (세모) 처리군에서의 체중을 나타낸다. 도 17b는 무처리 대조군 (●), 10 nmol (▼) 처리군 및 20 nmol (◆) 처리군에서의 체중을 나타낸다.

도 18은 4T1 고형 종양 모델에서의 FA-TLR7 작용제의 인 비보 치료 연구를 나타낸다. 도 18a는 치료 시작 후 매일 측정된 종양 성장을 나타낸다, (●) 무처리 대조군, (■) FA-TLR7 작용제군, (○) 경쟁-FA-TLR7 작용제군. 도 18b는 치료 시작 후 매일 측정된 동물 체중을 나타낸다, (●) 무처리 대조군, (■) FA-TLR7 작용제군, (○) 경쟁-FA-TLR7 작용제군.

도 19는 4T1 고형 종양 모델에서 FA-튜블리신의 인 비보 치료 연구를 나타낸다. 도 19a는 치료 시작 후 매일 측정된 종양 성장을 나타낸다, (●) 무처리 대조군, (▲) FA-튜블리신군, (□) 경쟁-FA-튜블리신군. 도 19b 치료 시작 후 매일 측정된 동물 체중을 나타낸다, (●) 무처리 대조군, (▲) FA-튜블리신군, (□) 경쟁-FA-튜블리신군.

도 20은 4T1 고형 종양 모델에서 FA-PI3K 억제제의 인 비보 치료 연구를 나타낸다. 도 20a 치료 시작 후 매일 측정된 종양 성장을 나타낸다, (●) 무처리 대조군, (▼) FA-PI3K 억제제군, (Δ) 경쟁-FA-PI3K 억제제군. 도 20b는 치료 시작 후 매일 측정된 동물 체중을 나타낸다, (●) 무처리 대조군, (▼) FA-PI3K 억제제군, (Δ) 경쟁-FA-PI3K 억제제군.

도 21은 4T1 고형 종양 모델에서 FA-TLR7 작용제 및 비-표적화 PI3K 억제제 (BEZ235)로 조합 처리의 인 비보 치료 연구를 나타낸다. 도 21a는 치료 시작 후 매일 측정된 종양 성장을 나타낸다, (●) 무처리 대조군, (Δ) 조합군, (▽) 경쟁-조합군. 도 21b는 치료 시작 후 매일 측정된 동물 체중을 나타낸다, (●) 무처리 대조군, (◆) 조합군, (▽) 경쟁-조합군.

도 22는 4T1 고형 종양 모델에서 FA-TLR7 작용제 및 비-표적화 PI3K 억제제 (BEZ235)의 인 비보 치료 연구를 나타낸다. 도 22a는 치료 시작 후 매일 측정된 종양 성장을 나타낸다, (●) 무처리 대조군, (■) FA-TLR7 작용제, (◇) PI3K 억제제. 도 22b는 치료 시작 후 매일 측정된 동물 체중을 나타낸다, (●) 무처리 대조군, (■) FA-TLR7 작용제, (◇) PI3K 억제제.

도 23은 각각의 무처리 대조군, FA-TLR7 작용제군, FA-튜블리신군, FA-PI3K 억제제군 및 FA-TLR7 작용제 및 비-표적화 PI3K 억제제 (BEZ235)의 조합군의 치료군에 대한 처리 마지막 날의 평균 종양 부피를 나타낸다. * 및 ***는 통계적으로 유의미한 결과를 나타낸다.

도 24는 무처리 대조군, FA-TLR7 작용제군 (도 24a), FA-PI3K 억제제군 (도 24c), FA-튜블리신군 (도 24b), 및 조합군 (도 24d)과 경쟁군에서 시험된 F4/80+ 대식세포에서의 아르기네이즈의 세포 내 염색을 나타낸다. *은 통계적으로 유의미한 결과를 나타내고, ns는 통계적으로 유의미하지 않은 결과를 나타낸다.

도 25는 무처리 대조군, FA-TLR7 작용제군 (도 25a), FA-PI3K 억제제군 (도 25c), FA-튜블리신군 (도 25b) 및 조합군 (도 25d)과 경쟁군에서 시험된 M1 및 M2 대식세포의 비율 (F4/80+CD86+: F4/80+CD206+)을 나타낸다. *은 통계적으로 유의미한 결과를 나타내고, ns는 통계적으로 유의미하지 않은 결과를 나타낸다.

도 26은 무처리 대조군, FA-TLR7 작용제군 (도 26a), FA-PI3K 억제제군 (도 26c), FA-튜블리신군 (도 26b) 및 조합군 (도 26d)과 경쟁군에서 시험된 MDSC 집단 (CD11b+Gr1+)을 나타낸다. *은 통계적으로 유의미한 결과를 나타내고, ns는 통계적으로 유의미하지 않은 결과를 나타낸다.

도 27은 무처리 대조군, FA-TLR7 작용제군, FA-PI3K 억제제군, FA-튜블리신군, 및 조합군의 4T1 고형 종양으로부터 분리된 생세포에서 시험된 CD4 (도 27a) 및 CD8 (도 27b) T 세포 집단의 백분율을 나타낸다.

도 28은 IL-10 생산이 감소됨으로써 선택된 약물에 반응한 인 비트로 유도 인간 MDSC를 나타낸다. (●) 빈블라



스틴; (■) GDC0980; (▼) 튜블리신.

도 29 A-B는 3 가지 클래스의 약물로 처리된 후 MDSC에 의한 인간 T 세포 억제제의 억제를 나타낸다. 도 29A는 0.1 μ M의 약물로 처리된 후의 결과를 나타내며; 도 29B는 1.0 μ M의 약물로 처리된 후의 결과를 나타낸다.

도 30 A-C는 4T1 세포의 세 가지 클래스의 약물에 대한 저항성을 나타낸다. 4T1 세포를 3 가지 약물과 36시간 동안 배양하였다. 세포 독성은 LDH 분석으로 평가하였다. 도 30A는 다양한 농도에서 TLR 작용제에 대한 결과를 나타낸다; 도 30B는 다양한 농도에서 PI3K 억제제에 대한 결과를 나타낸다; 도 30C는 다양한 농도에서 튜블리신에 대한 결과를 나타낸다.

도 31 A-C는 4T1 세포의 세 가지 클래스의 FA-컨쥬게이트에 대한 저항성을 나타낸다. 4T1 세포를 FA-컨쥬게이트와 3시간 동안 배양하였다. 세포 독성은 LDH 분석으로 평가하였다. 도 31A는 다양한 농도에서 TLR 작용제 컨쥬게이트에 대한 결과를 나타낸다; 도 31B는 다양한 농도에서 PI3K 억제제 컨쥬게이트에 대한 결과를 나타낸다; 도 31C는 다양한 농도에서 튜블리신 컨쥬게이트에 대한 결과를 나타낸다.

도 32. 2주 동안 FA-컨쥬게이트를 지속적으로 처리하는 것에 의한 4T1의 종양 성장. (●) 대조군 마우스 1; (■) 대조군 마우스 2; (▲) 대조군 마우스 3; (○) FA-PI3K 억제제 컨쥬게이트 마우스 1; (□) FA-PI3K 억제제 컨쥬게이트 마우스 2; (Δ) FA-PI3K 억제제 컨쥬게이트 마우스 3; (*) FA-TLR7 작용제 마우스 1; (*) FA-TLR7 작용제 마우스 2; (V)FA-TLR7 작용제 마우스 3.

도 33은 엽산 약물 컨쥬게이트의 2주의 지속적인 처리 후 4T1 종양 유래 MDSC 및 TAM에서 측정된 아르기네이즈 수준을 나타낸다. () MDSC; () TAMs.

도 34는 세 가지 클래스의 FA-컨쥬게이트로 2주 동안 (7일/주) 처리된 4T1 고형 종양을 가진 Balb/c 마우스에서의 폐 전이 평가를 나타낸다. 연구 끝에 폐를 제거하여 전이를 실시예 15에 기술된 표준 절차에 따라 평가하였다.

도 35은 MDSC/TAM의 표적화에 의한 4T1 종양 모델에서 폐 전이의 요약을 나타낸다.

도 36은 종양 성장 생존 연구의 모니터링을 나타낸다: 4T1 세 가지 엽산-약물 컨쥬게이트의 생존 연구에서 5일째에 종양이 수술적으로 제거되기 전까지 종양 부피가 모니터링되었다. (●) 대조군; (○) FA-TLR7 작용제 컨쥬게이트; (Δ) FA-PI3K 억제제 컨쥬게이트; (□) FA-튜블리신 컨쥬게이트.

도 37은 4T1 고형 종양을 가진 마우스의 생존 커브를 나타낸다 (FA-TLR7 작용제 n=2, FA-PI3K 억제제 및 질병 대조군 n=3, FA-튜블리신 n=4). (■) 대조군; (Δ) FA-TLR7 작용제 컨쥬게이트; (○) FA-PI3K 억제제 컨쥬게이트; (□) FA-튜블리신 컨쥬게이트. 100%에 41 - 일 시점은 대조군 기호를 제외한 모든 기호를 포함한다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0070] 예시적인 구현예의 구체적인 설명
- [0071] 적용 가능한 바와 같이, 본 발명의 각 구현예가 본 발명에 기술된 임의의 다른 구현예와 조합될 수 있음이 이해된다. 예를 들어, 본 발명에 기술된 요약, 및/또는 열거된 절의 임의의 구현예, 또는 임의의 적용 가능한 이들의 조합은 본 발명 출원의 예시적인 구현예의 구체적인 설명 섹션에 기술된 임의의 구현예와 조합될 수 있다.
- [0072] 본 발명에 사용된, 용어 “골수-유래 억제 세포” (MDSCs)는 암, 예를 들어, 종양의 미세 환경 (microenvironment)에 존재하는 세포가 면역억제적이고, 하나 이상의 마커 CD11b 및 Gr1을 가지는 것을 말한다. MDSC는 통상의 기술 분야에 공지된 방법, 예를 들어, CD11b 및 Gr1과 같은 MDSC에 특이적인 마커를 이용한 유세포분석으로 확인될 수 있다.
- [0073] 본 발명에 사용된, 구 “상기에서 골수-유래 억제 세포가 암에 존재한다”는 일반적으로 암 (예를 들어, 종양)의 미세 환경에 존재하는, 또는, 예를 들어, 암성(cancerous) 조직 (예를 들어, 종양 조직)에서 발견되는 MDSC를 말한다.
- [0074] 본 발명에 사용된, 용어 “투여하는”은 일반적으로 본 발명에 기술된 화합물을 숙주 동물에 도입하는 임의의 및 모든 수단을 말하며, 경구 (po), 정맥 내 (iv), 근육 내 (im), 피하 (sc), 경피(transdermal), 흡입 (inhalation), 구강 내(buccal), 안 내(ocular), 설하(sublingual), 질 내(vaginal), 직장 내(rectal), 및 유사 투여 경로를 포함하나, 이에 한정되지 않는다. 본 발명에 기술된 화합물은 단위 투여 형태 및/또는 하나 이

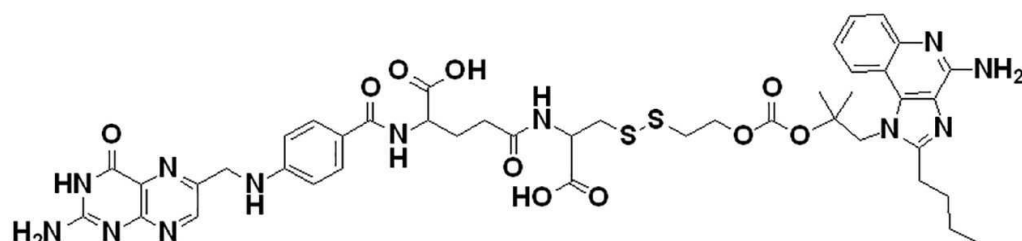
상의 약학적으로-허용 가능한 담체, 보조제, 희석제, 부형제, 및/또는 비히클, 및 이의 조합을 함유하는 조성물로 투여될 수 있다.

- [0075] 본 발명에 사용된, 용어 “조성물”은 일반적으로 본 발명에 기술된 화합물을 포함하는 하나 이상의 성분을 포함하는 임의의 제품을 말한다. 본 발명에 기술된 조성물이 본 발명에 기술된 단리된 화합물 또는 본 발명에 기술된 화합물의 염, 용액, 수화물, 용매화물, 및 다른 형태로부터 제조될 수 있음이 이해된다. 수산기, 아미노기, 및 유사 기와 같은 특정 작용기가 화합물의 다양한 물리적 형태에서 물 및/또는 다양한 용매와 복합체를 형성할 수 있음이 인정된다. 본 발명에 기술된 화합물의 다양한 비정질(amorphous), 정질, 부분적으로 결정질, 결정질, 및/또는 다른 형태학적 형태로부터 조성물이 제조될 수 있음 또한 이해된다. 조성물이 본 발명에 기술된 화합물의 다양한 수화물 및/또는 용매화물로부터 제조될 수 있음 또한 이해된다. 따라서, 본 발명에 기술된 화합물을 인용하는 그러한 약학적 조성물 본 발명에 기술된 화합물의 각각, 또는 이의 임의의 조합, 또는 이의 개별 형태, 이의 다양한 형태학적 형태 및/또는 이의 용매 또는 수화 형태를 포함하는 것으로 이해되어야 한다.
- [0076] 출원인들은 MDSC가 엽산 수용체 β 를 발현하기 때문에 MDSC에 약물을 표적화함으로써 엽산 수용체를 발현하는, 또는 엽산 수용체를 충분한 수로 발현하지 않는, 또는 아예 발현하지 않는 종양을 치료할 수 있음을 발견하였다. 따라서, 링커를 통해 약물에 연결된 엽산 수용체 결합 리간드를 이용하여 MDSC를 표적화함으로써 암을 치료하는 방법이 본 발명에 기술된다. MDSC를 고갈 또는 억제하고 암이 엽산 수용체를 발현하는지 여부와 상관없이 암을 가진 숙주 동물을 치료하기 위해 약물을 MDSC에 전달하기 위한 표적화 리간드로서 엽산을 이용하여 MDSC를 표적화할 수 있다. 따라서, 본 발명에 기술된 방법이 엽산 수용체를 발현하는 암 뿐만 아니라, 엽산 수용체를 발현하지 않는 암 치료에 사용될 수 있음이 이해된다.
- [0077] 일 구현예에서, 엽산 수용체-음성 암을 치료하는 방법이 제공된다. 방법은 링커를 통해 약물에 부착된 엽산 수용체 리간드를 포함하는 하나 이상의 화합물의 치료적으로 유효한 양을 숙주 동물에 투여하는 것을 포함하며, 상기에서 골수-유래 억제 세포가 억제 또는 고갈된다.
- [0078] 또 다른 구현예에서, 엽산 수용체-음성 암을 치료하는 방법이 제공된다. 방법은 골수-유래 억제 세포를 고갈 또는 억제시키기 위해 링커를 통해 약물에 부착된 엽산 수용체 리간드를 포함하는 하나 이상의 화합물의 치료적으로 유효한 양을 숙주 동물에 투여하는 것을 포함한다.
- [0079] 또 다른 구현예에서, 골수-유래 억제 세포가 암에 존재하는 숙주 동물에서 엽산 수용체-음성 암을 치료하는 방법이 제공되며, 방법은 링커를 통해 약물에 부착된 엽산 수용체 리간드를 포함하는 하나 이상의 화합물의 치료적으로 유효한 양을 숙주 동물에 투여하고, 및 골수-유래 억제 세포를 가지는 엽산 수용체 음성 암을 치료하는 것을 포함한다.
- [0080] 또 다른 구현예에서, 암을 치료하는 방법이 제공된다. 방법은 숙주 동물 세포의 암에서 골수-유래 억제 세포의 존재를 확인하고, 및 링커를 통해 약물에 부착된 엽산 수용체 리간드를 포함하는 하나 이상의 화합물의 치료적으로 유효한 양을 숙주 동물에게 투여하는 것을 포함한다.
- [0081] 또 다른 예시적인 구현예에서, 숙주 동물에서 암을 치료하는 방법이 제공된다. 방법은 골수-유래 억제 세포를 억제 또는 고갈시키기 위해 링커를 통해 약물에 부착된 엽산 수용체 리간드를 포함하는 하나 이상의 화합물의 치료적으로 유효한 양을 숙주 동물에게 투여하는 것을 포함한다.
- [0082] 또 다른 구현예에서, 숙주 동물에서 골수-유래 억제 세포를 표적화하는 방법이 제공된다. 방법은 골수-유래 억제 세포를 표적화하기 위해 숙주 동물에게 링커를 통해 약물에 부착된 엽산 수용체 리간드를 포함하는 하나 이상의 화합물의 치료적으로 또는 진단적으로 유효한 양을 투여하는 것을 포함한다.
- [0083] 본 발명의 추가적인 예시적인 및 비-제한적인 구현예는 하기 열거된 절에서 기술된다.
- [0084] 1. 링커를 통해 약물에 부착된 엽산 수용체 리간드를 포함하는 하나 이상의 화합물의 치료적으로 유효한 양을 숙주 동물에게 투여하는 것을 포함하며, 상기에서 골수-유래 억제 세포(suppressor cell)가 억제되거나 고갈되는, 엽산 수용체-음성암을 치료하는 방법.
- [0085] 2. 골수-유래 억제 세포를 고갈 또는 억제시키기 위해 링커를 통해 약물에 부착된 엽산 수용체 리간드를 포함하는 하나 이상의 화합물의 치료적으로 유효한 양을 숙주 동물에게 투여하는 것을 포함하는, 엽산 수용체-음성 암을 치료하는 방법.
- [0086] 3. 링커를 통해 약물에 부착된 엽산 수용체 리간드를 포함하는 하나 이상의 화합물의 치료적으로 유효한 양을

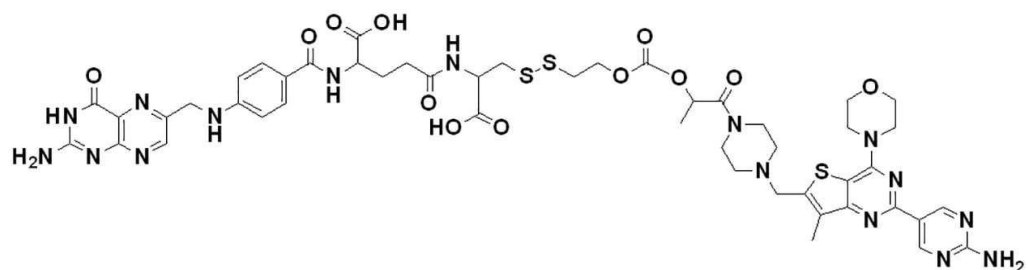
숙주 동물에 투여하고, 및 골수-유래 억제 세포를 가지는 암을 치료하는 것을 포함하는, 골수-유래 억제 세포가 암에 존재하는 숙주 동물에서 엽산 수용체-음성 암을 치료하는 방법.

- [0087] 4. 숙주 동물 세포의 암에서 골수-유래 억제 세포의 존재를 확인하고, 및 숙주 동물에게 링커를 통해 약물에 부착된 엽산 수용체 리간드를 포함하는 하나 이상의 화합물의 치료적으로 유효한 양을 투여하는 것을 포함하는, 암을 치료하는 방법.
- [0088] 5. 골수-유래 억제 세포를 억제 또는 고갈시키기 위해 숙주 동물에게 링커를 통해 약물에 부착된 엽산 수용체 리간드를 포함하는 하나 이상의 화합물의 치료적으로 유효한 양을 투여하는 것을 포함하는, 숙주 동물 세포에서 암을 치료하는 방법.
- [0089] 6. 골수-유래 억제 세포를 표적화하기 위해 숙주 동물에게 링커를 통해 약물에 부착된 엽산 수용체 리간드를 포함하는 하나 이상의 화합물의 치료적으로 또는 진단적으로 유효한 양을 투여하는 것을 포함하는, 숙주 동물에서 골수-유래 억제 세포를 표적화하는 방법.
- [0090] 7. 제 4절 내지 제 6절 중 어느 한 절(clauses)에 있어서, 상기에서 암은 엽산 수용체-음성인 방법.
- [0091] 8. 제 4절 내지 제 6절 중 어느 한 절에 있어서, 상기에서 암은 엽산 수용체-양성인 방법.
- [0092] 9. 제 1절 내지 제 8절 중 어느 한 절에 있어서, 상기에서 엽산 수용체 결합 리간드는 엽산 수용체 β 에 특이적이며, 상기에서 엽산 수용체 결합 리간드는 골수-유래 억제 세포 상의 엽산 수용체 β 에 결합하는 방법.
- [0093] 10. 제 1절 내지 제 9절 중 어느 한 절에 있어서, 상기에서 골수-유래 억제 세포는 CD11b 마커를 가지는 방법.
- [0094] 11. 제 1절 내지 제 10절 중 어느 한 절에 있어서, 상기에서 골수-유래 억제 세포는 Gr1 마커를 가지는 방법.
- [0095] 12. 제 1절 내지 제 11절 중 어느 한 절에 있어서, 상기에서 암은 비소세포폐암(non-small cell lung cancer), 두경부암(head and neck cancer), 삼중 음성 유방암(triple negative breast cancer), 유방암, 난소암(ovarian cancer), 대장암(colon cancer), 전립선암(prostate cancer), 폐암, 자궁내막암(endometrial cancer), 및 신장암(renal cancer)으로부터 선택되는 방법.
- [0096] 13. 제 1절 내지 제 12절 중 어느 한 절에 있어서, 상기에서 약물은 CI307, BEZ235, 보르트만닌(wortmannin), AMT, PF-04691502, CpG 올리고뉴클레오타이드, BLZ945, 레날리도마이드(lenalidomide), NLG919, 5,15-DPP, 피롤로벤조디아제핀(pyrrolobenzodiazepine), 메토크세이트(methotrexate), 에베로리무스(everolimus), 튜블리신(튜블리신), GDC-0980, AS1517499, BIRB796, n-아세틸-5-하이드록시트립타민, 및 2,4-디아미노-6-하이드록시 피리미딘으로부터 선택되는 방법.
- [0097] 14. 제 1절 내지 제 13절 중 어느 한 절에 있어서, 상기에서 약물은 미세소관 억제제(microtubule inhibitor)인 방법.
- [0098] 15. 제 14절에 있어서, 상기에서 약물은 골수-유래 억제 세포를 사멸시키는 방법.
- [0099] 16. 제 1절 내지 제 13절 중 어느 한 절에 있어서, 상기에서 약물은 PI3K 억제제, STAT6 억제제, MAPK 억제제, iNOS 억제제, 및 항-염증 약물로부터 선택되는 방법.
- [0100] 17. 제 16절에 있어서, 상기에서 약물은 골수-유래 억제 세포를 불활성화시키는 방법.
- [0101] 18. 제 1절 내지 제 13절 중 어느 한 절에 있어서, 상기에서 약물은 TLR 작용제인 방법.
- [0102] 19. 제 18절에 있어서, 상기에서 TLR 작용제는 TLR7 작용제 및 TLR 9 작용제로부터 선택되는 방법.
- [0103] 20. 제 18절 또는 제 19절에 있어서, 상기에서 약물은 골수-유래 억제 세포를 리프로그래밍하는 방법.
- [0104] 21. 제 14절 또는 제 15절에 있어서, 상기에서 약물은 튜블리신인 방법.
- [0105] 22. 제 16절에 있어서, 상기 약물은 PI3K 억제제인 방법.
- [0106] 23. 제 22절에 있어서, 상기에서 약물은 GDC-0980, 보르트만닌, 및 PF-04691502로부터 선택되는 방법.
- [0107] 24. 제 16절에 있어서, 상기에서 약물은 STAT6 억제제인 방법.
- [0108] 25. 제 24절에 있어서, 상기에서 약물은 AS1517499인 방법.
- [0109] 26. 제 16절에 있어서, 상기에서 약물은 MAPK 억제제인 방법.

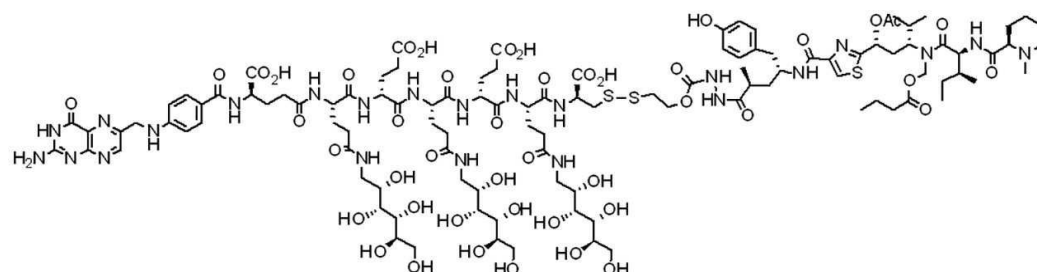
- [0110] 27. 제 26절에 있어서, 상기에서 약물은 BIRB796인 방법.
- [0111] 28. 제 16절에 있어서, 상기에서 약물은 iNOS 억제제인 방법.
- [0112] 29. 제 28절에 있어서, 상기에서 약물은 AMT인 방법.
- [0113] 30. 제 16절에 있어서, 상기에서 약물은 항-염증 약물인 방법.
- [0114] 31. 제 30절에 있어서, 상기에서 약물은 메토티렉세이트인 방법.
- [0115] 32. 제 18절 내지 제 20절 중 어느 한 절에 있어서, 상기에서 약물은 CI307, CpG 올리고뉴클레오타이드, 및 TLR7A로부터 선택되는 방법.
- [0116] 33. 제 1절 내지 제 13절 중 어느 한 절에 있어서, 상기에서 하나 이상의 화합물이 투여되며 화합물은 상이한 약물들을 포함하는 방법.
- [0117] 34. 제 33절에 있어서, 상기에서 상이한 약물들은 TLR7 작용제 및 PI3K 억제제인 방법.
- [0118] 35. 제 1절 내지 제 32절 중 어느 한 절에 있어서, 상기에서 하나 이상의 화합물이 투여되고 비공액 (unconjugated) 약물 또한 투여되는 방법.
- [0119] 36. 제 35절에 있어서, 상기에서 화합물 내의 약물은 TLR7 작용제이며 비공액 약물은 PI3K 억제제인 방법.
- [0120] 37. 제 1절 내지 제 12절 중 어느 한 절에 있어서, 상기에서 화합물은 하기의 화학식의 화합물인 방법:



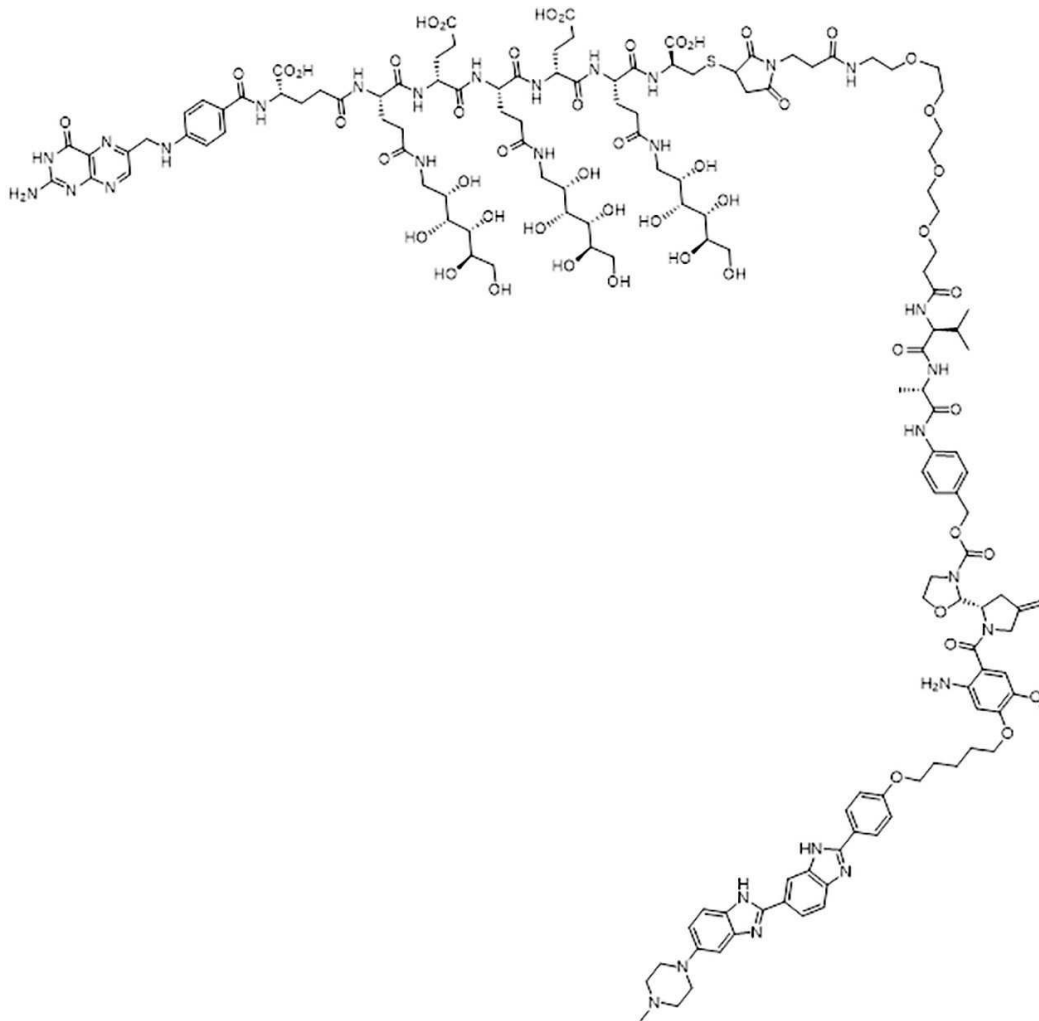
- [0121]
- [0122] 38. 제 1절 내지 제 12절 중 어느 한 절에 있어서, 상기에서 화합물은 하기의 화학식의 화합물인 방법:



- [0123]
- [0124] 39. 제 1절 내지 제 12절 중 어느 한 절에 있어서, 상기에서 화합물은 하기의 화학식의 화합물인 방법:



- [0125]
- [0126] 40. 제 1절 내지 제 12절 중 어느 한 절에 있어서, 상기에서 화합물은 하기의 화학식의 화합물인 방법:



[0127]

[0128]

41. 제 1절 내지 제 40절 중 어느 한 절에 있어서, 상기에서 하나 이상의 화합물, 또는 하나 이상의 화합물의 약학적으로 허용 가능한 염의 염이 숙주 동물에게 투여되는 방법.

[0129]

42. 제 1절 내지 제 41절 중 어느 한 절에 있어서, 상기에서 투여는 비경구 투여 형태인 방법.

[0130]

43. 제 42절에 있어서, 상기에서 비경구 투여 형태는 피 내(intradermal) 투여 형태, 피하(subcutaneous) 투여 형태, 근육 내(intramuscular) 투여 형태, 복강 내(intraperitoneal) 투여 형태, 정맥 내(intravenous) 투여 형태, 및 경막 내(intrathecal) 투여 형태로부터 선택되는 방법.

[0131]

44. 제 1절 내지 제 43절 중 어느 한 절에 있어서, 상기에서 치료적으로 유효한 양 또는 진단적으로 유효한 양은 약 0.5 mg/m^2 내지 약 6.0 mg/m^2 인 방법.

[0132]

45. 제 1절 내지 제 44절 중 어느 한 절에 있어서, 상기에서 치료적으로 유효한 양 또는 진단적으로 유효한 양은 약 0.5 mg/m^2 내지 약 4.0 mg/m^2 인 방법.

[0133]

46. 제 1절 내지 제 45절 중 어느 한 절에 있어서, 상기에서 치료적으로 유효한 양 또는 진단적으로 유효한 양은 약 0.5 mg/m^2 내지 약 2.0 mg/m^2 인 방법.

[0134]

47. 제 1절 내지 제 7절 또는 제 9절 내지 제 46절 중 어느 한 절에 있어서, 상기에서 암은 염산 수용체-음성이며 암은 대장암, 폐암, 전립선암, 및 유방암으로부터 선택되는 방법.

[0135]

일 구현예에서, MDSC의 활성을 고갈 또는 억제하기 위한 MDSC의 표적화는 종양 성장의 억제, 종양의 완전한 또는 부분적인 제거, 안정된 질병, 종양 세포의 사멸, 및 숙주 동물에 대한 유사 치료적 효과를 야기할 수 있다. 본 발명에 사용된, MDSC를 “고갈” 또는 “억제” 시키는 것의 의미는 MDSC의 집단의 일부 또는 전부를 사멸시키거나, MDSC의 활성을 억제 또는 제거하거나 (예를 들어, 종양 조직에서 혈관 신생을 자극하는 MDSC의 능력을 감소시키거나 제거), MDSC를 리프로그래밍하여 MDSC가 종양 생존을 지원하기보다 억제하도록 하거나, MDSC의 수

가 증가하는 것을 방지하거나 MDSC의 수를 감소시키거나, 또는 MDSC에 숙주 동물에게 항-암 치료적 효과를 야기하는 임의의 다른 영향을 미치는 것을 의미한다.

[0136] 본 발명에 기술된 방법은 그런 치료가 필요한 암을 가진 “숙주 동물” 치료에 사용된다. 일 구현예에서, 본 발명에 기술된 방법은 인간 임상 의학 또는 수의학 적용에 사용될 수 있다. 따라서, “숙주 동물”은 본 발명에 기술된 바와 같이 하나 이상의 화합물(들) 또는 염산-이미징제 컨쥬게이트가 투여될 수 있으며, 숙주 동물은 인간 (예를 들어, 인간 환자)일 수 있으며 또는, 수의학 적용의 경우, 실험실 동물, 농업 동물, 가축, 또는 야생 동물일 수 있다. 일 측면에서, 숙주 동물은 인간, 설치류 (예를 들어, 마우스, 래트, 햄스터 등), 토끼, 원숭이, 침팬지와 같은 실험실 동물, 개, 고양이, 및 토끼와 같은 가축, 소, 말, 돼지, 양, 염소와 같은 농업 동물, 및 곰, 팬더, 사자, 호랑이, 표범, 코끼리, 얼룩말, 기린, 고릴라, 돌고래, 및 고래와 같은 사육되는 야생 동물일 수 있다.

[0137] 다양한 구현예에서, 본 발명에 기술된 암은 양성 종양 및 악성 종양을 포함하는 종양발생성(tumorigenic) 암일 수 있고, 또는 암은 비-종양발생성일 수 있다. 일 구현예에서, 암은 자발적으로 또는 숙주 동물의 생식계에 존재하는 돌연변이와 같은 과정에 의해 또는 체세포 돌연변이에 의해 발생할 수 있으며, 또는 암은 화학적-, 바이러스적-, 또는 방사선에 의해 유발될 수 있다. 또 다른 구현예에서, 본 발명에 기술된 발명에 적용 가능한 암은 암종(carcinoma), 육종(sarcoma), 림프종(lymphoma), 흑색종(melanoma), 중피종(mesothelioma), 비인두암종(nasopharyngeal carcinoma), 백혈병(leukemia), 선암(adenocarcinoma), 및 골수종(myeloma)을 포함하나, 이에 한정되지 않는다.

[0138] 일부 측면에서, 암은 폐암, 골암, 췌장암, 피부암, 두부암(cancer of the head), 경부암(cancer of the neck), 피부 흑색종(cutaneous melanoma), 안구 흑색종(intraocular melanoma), 자궁암, 난소암, 자궁내막암, 직장암, 위암, 대장암, 유방암, 삼중 음성 유방암, 나팔관의 암종(carcinoma of the fallopian tubes), 자궁내막의 암종, 자궁경부의 암종, 호지킨병(Hodgkin's Disease), 식도의 암, 소장의 암, 내분비기관의 암, 갑상선의 암, 부갑상선의 암, 비소세포폐암, 부신의 암, 연조직의 육종, 요도의 암, 전립선암, 흉선종(thymoma), 흉선암, 백혈병, 림프종, 흉막중피종(pleural mesothelioma), 방광의 암, 버킷 림프종(Burkitt's lymphoma), 요관의 암, 신장의 암, 중추신경계의 종양(neoplasm), 뇌 암, 뇌하수체 선종(pituitary adenoma) 또는 위식도 접합부(gastroesophageal junction)의 선암종일 수 있다.

[0139] 일부 측면에서, 암은 비소세포폐암, 퇴행성 갑상선암(anaplastic thyroid cancer), 췌관 선암종(pancreatic ductal adenocarcinoma), 두경부암, 표피성장인자 수용체(epidermal growth factor receptor) 음성 유방암, 악성 중피종, 성인 전형적 호지킨 림프종, 포도막 흑색종(uveal melanoma), 교모세포종(glioblastoma), 신장암종, 평활근육종(leiomyosarcoma), 및 결절성활액막염(pigmented villonodular synovitis)으로 이루어진 군으로부터 선택될 수 있다.

[0140] 또 다른 구현예에서, 암은 비소세포폐암, 두경부암, 삼중 음성 유방암, 유방암, 난소암, 대장암, 전립선암, 폐암, 자궁내막암, 및 신장암으로부터 선택된다.

[0141] 또 다른 구현예에서, 암은 염산 수용체-음성이며 암은 대장암, 폐암, 전립선암, 및 유방암으로부터 선택된다. MDSC과 관련된 임의의 암은 본 발명에 기술된 방법에 따라 치료될 수 있다.

[0142] 염산 수용체 결합 리간드의 일부인 “염산”의 예시적인 구현예는 염산(folic acid), 및 폴린산(folinic acid), 프테로일폴리글루탐산(pteroylpolyglutamic acid), 프테로일-D-글루탐산(pteroyl-D-glutamic acid), 및 테트라하이드로프테린(tetrahydropterins), 디하이드로폴레이트(dihydrofolates), 및 테트라하이드로폴레이트(tetrahydrofolates)와 같은 염산 수용체-결합 프테리딘과 같은 염산(folic acid)의 유사체 및 유도체, 및 이들의 데아자(deaza) 및 디데아자 유사체를 포함한다. 용어 “데아자” 및 “디데아자” 유사체는 자연적으로 발생된 염산(folic acid) 구조에서 하나 또는 두 개의 질소 원자가 치환된 탄소 원자를 가지는 당업계에서 인정된 유사체, 또는 이의 유사체 또는 유도체를 말한다. 예를 들어, 데아자 유사체는 염산, 폴린산, 프테로폴리글루탐산(pteropolyglutamic acid) 및 테트라하이드로프테린, 디하이드로폴레이트, 및 테트라하이드로폴레이트와 같은 염산 수용체-결합 프테리딘의 1-데아자, 3-데아자, 5-데아자, 8-데아자, 및 10-데아자 유사체를 포함한다. 디데아자 유사체는 예를 들어, 염산, 폴린산, 프테로폴리글루탐산, 및 테트라하이드로프테린, 디하이드로폴레이트, 및 테트라하이드로폴레이트와 같은 염산 수용체-결합 프테리딘의 1,5-디데아자, 5,10-디데아자, 8,10-디데아자, 및 5,8-디데아자 유사체를 포함한다. 본 발명의 복합체 형성 리간드로서 복합체로서 유용한 다른 염산은 염산 수용체-결합 유사체 아미노프테린, 아메토프테린 (메토크세이트로도 알려진), N¹⁰-메틸폴레이트, 2-데아미노-하이드록시폴레이트, 1-데아자메토프테린 또는 3-데아자메토프테린과 같은 데아자 유사체, 및 3' 디클로로-4-

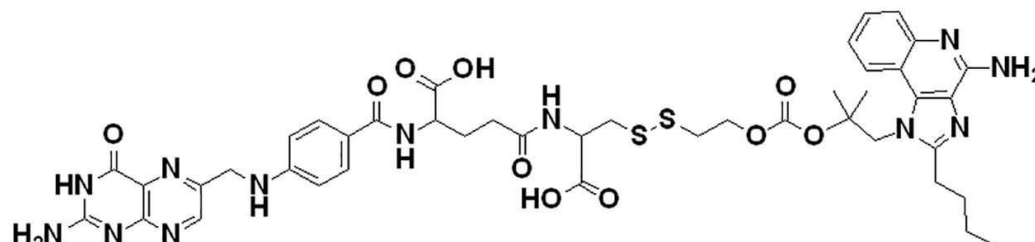
아미노-4-테옥시-N¹⁰-메틸프테로일글루탐산 (디클로로메토티렉세이트)이다. 엽산 수용체에 결합하는 추가적인 엽산 (예를 들어, 엽산(folic acid)의 유사체)은 이들의 개시 내용이 본 발명에 참고문헌으로서 통합된 미국 특허 출원 공개 번호 2005/0227985 및 2004/0242582에 기술된다. 엽산(folic acid), 및 상술한 유사체 및/또는 유도체는 또한 이들의 엽산(folate)-수용체로의 결합 능력을 반영한 “a folate,” “the folate,” 또는 “folates” 라고 지칭되며, 그러한 리간드는 외인성 분자와 컨주게이션될 때 엽산-매개 내포작용(endocytosis)과 같은 막경유 운반(transmembrane transport)을 향상시키는데 효과적이다. 상술된 것들은 본 발명에 기술된 엽산 수용체 결합 리간드로 사용될 수 있다.

- [0143] 일 구현예에서 본 발명에 기술된 엽산 수용체 결합 리간드는 본 발명에 기술된 방법에 사용하기 위한 화합물을 만들기 위해 링커를 통해 약물과 연결될 수 있다. MDSC 고갈 또는 억제에 적합한 임의의 약물이 본 발명에 기술된 방법에 따라 사용될 수 있다. 일 구현예에서, 약물은 CI307, 빈블라스틴(vinblastine), GDC0980, BEZ235, 보르트만닌, AMT, PF-04691502, CpG 올리고뉴클레오타이드, BLZ945, 레날리도마이드, NLG919, 5,15-DPP, 피롤로벤조디아제핀, 메토티렉세이트, 에베로리무스, 튜블리신, GDC-0980, AS1517499, BIRB796, n-아세틸-5-하이드록시트립타민, 및 2,4-디아미노-6-하이드록시피리미딘으로부터 선택된다.
- [0144] 일 측면에서, 약물은 미세소관 억제제일 수 있다. 본 구현예에서, 약물은 골수-유래 억제 세포를 사멸시킬 수 있으며, 약물은 튜블리신일 수 있다.
- [0145] 또 다른 구현예에서, 약물은 PI3K 억제제, STAT6 억제제, MAPK 억제제, iNOS 억제제, 및 항-염증 약물로부터 선택된다. 본 구현예에서, 약물은 골수-유래 억제 세포를 불활성화시킬 수 있다. 본 구현예에서, 약물은 GDC-0980, 보르트만닌, 및 PF-04691502로부터 선택된 PI3K 억제제, STAT6 억제제 (예를 들어, AS1517499), MAPK 억제제 (예를 들어, BIRB796), iNOS 억제제 (예를 들어, AMT), 또는 항-염증 약물 (예를 들어, 메토티렉세이트)일 수 있다.
- [0146] 또 다른 구현예에서, 약물은 TLR7 작용제, TLR9 작용제, TLR3 작용제 (예를 들어, Poly: IC), 또는 TLR7/8 작용제 (예를 들어, 이미퀴모드)와 같은 TLR 작용제일 수 있다. TLR 작용제는 예를 들어, CI307, CpG 올리고뉴클레오타이드, 및 TLR7A로부터 선택될 수 있다. 본 구현예에서, 약물은 골수-유래 억제 세포를 리프로그래밍할 수 있다.
- [0147] 또 다른 구현예에서, 약물은 DNA-알킬화제 또는 DNA-삽입제 (예를 들어, PBD, pro-PBD 또는 혹스트 염색), 트라벡테딘(trabectedin), 독소루비신(doxorubicin), 젬시타빈(gemcitabine), 비스포스포네이트(bisphosphonate) (예를 들어, 유리 또는 리포솜 형태), 및 전 세포사멸(proapoptotic) 펩타이드로 이루어진 군으로부터 선택될 수 있다. 또 다른 구현예에서, 약물은 모노포스포릴 리피드(monophosphoryl lipid) A (예를 들어, 제독된 LPS), mTOR 억제제 (예를 들어, 에베로리무스 또는 라파마이신), PPAR γ 작용제, 및 PPAR δ 작용제로 이루어진 군으로부터 선택될 수 있다.
- [0148] 또 다른 측면에서, 약물은 실리비닌(silibinin), src 카이네이즈 억제제, MerTK 억제제, 및 Stat3 억제제로 이루어진 군으로부터 선택될 수 있다. 본 구현예에서, 약물은 src 카이네이즈 억제제 (예를 들어, 다사티닙)일 수 있다. 또 다른 구현예에서, 약물은 MerTK 억제제 (예를 들어, UNC1062)일 수 있다. 또 다른 구현예에서, 약물은 Stat3 억제제 (예를 들어, 수니티닙 및 소라페닙으로부터 선택된)일 수 있다.
- [0149] 본 발명에 기술된 약물의 유사체 또는 유도체가 또한 본 발명에 기술된 화합물에서 사용될 수 있다는 것이 이해된다. 약물은 또한 링커를 통해 엽산 수용체 결합 리간드에 연결된 이미징제일 수 있다.
- [0150] 또 다른 측면에서, 하나 이상의 화합물이 투여될 수 있으며 화합물은 상이한 약물들을 포함할 수 있다. 일 구현예에서, 상이한 약물들은 예를 들어, TLR7 작용제 및 PI3K 억제제로부터 선택될 수 있다. 또 다른 구현예에서, 하나 이상의 화합물이 하나 이상의 비공액 약물들 (즉, 엽산 수용체 결합 리간드에 연결되지 않은)과 함께 투여될 수 있다. 조합 요법 구현예를 위해, 본 발명에 기술된 임의의 화합물들 및 약물들이 사용될 수 있거나, 또는 MDSC를 고갈 또는 억제하는 다른 약물들이 본 발명에 기술된 방법에 따라 사용될 수 있다. 조합 요법 구현예를 위해, 상승 작용이 본 발명에 기술된 것처럼 발생할 수 있다. 일 구현예에서, 본 발명에 참조로서 통합된 미국 출원 공개 번호 20140140925에 기술된 바와 같이, MDSC를 고갈 또는 억제하기 위해 숙주 동물을 본 발명에 기술된 방법으로 처리하기 전에, 숙주 동물의 엽산 수용체 상태를 결정하기 위해 엽산-이미징제 컨주게이트를 숙주 동물에게 투여함으로써 숙주 동물이 처리될 수 있다. 본 구현예에서, 숙주 동물의 엽산 수용체 상태는 양성 또는 음성으로 결정될 수 있으며, 엽산 수용체 상태는 숙주 동물에 투여되어야 할 화합물을 결정하는데 사용될 수 있다.

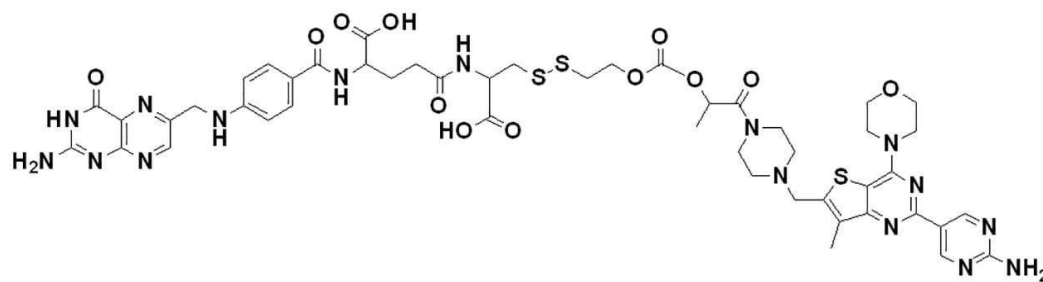
[0151] 본 발명에 기술된 방법의 추가적인 측면에서, 하나 이상의 화합물에서 엽산은 엽산 수용체- α 에 특이적인 엽산 및 엽산 수용체- β 에 특이적인 엽산으로부터 선택된다. 본 측면에서, 두 가지 이상의 화합물이 투여될 수 있으며 한 화합물 내의 엽산은 엽산 수용체- α 에 특이적인 엽산이며, 다른 화합물 내의 엽산은 엽산 수용체- β 에 특이적인 엽산이다. 본 예시적인 측면에서, 엽산 수용체 양성 암은 종양과 화합물의 결합을 통해 직접적으로 치료함으로써 및 MDSC를 억제 또는 고갈시키기 위해 MDSC와 또 다른 화합물의 결합에 의해 간접적으로 종양을 치료함으로써 치료될 수 있다.

[0152] 또 다른 구현예에서, 화합물은 하기 화학식 (또한 본 발명에서 FA-TLR7로 지칭되는), 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염을 가진다

[0153]

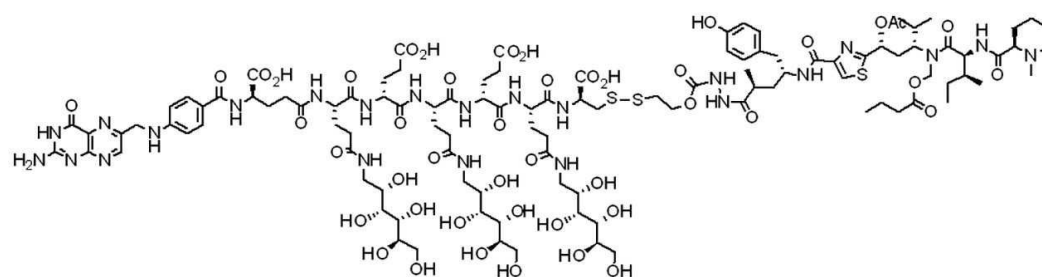


[0154] 또 다른 구현예에서, 화합물은 하기 화학식 (또한 본 발명에서 FA-PI3K로 지칭되는) 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염을 가진다



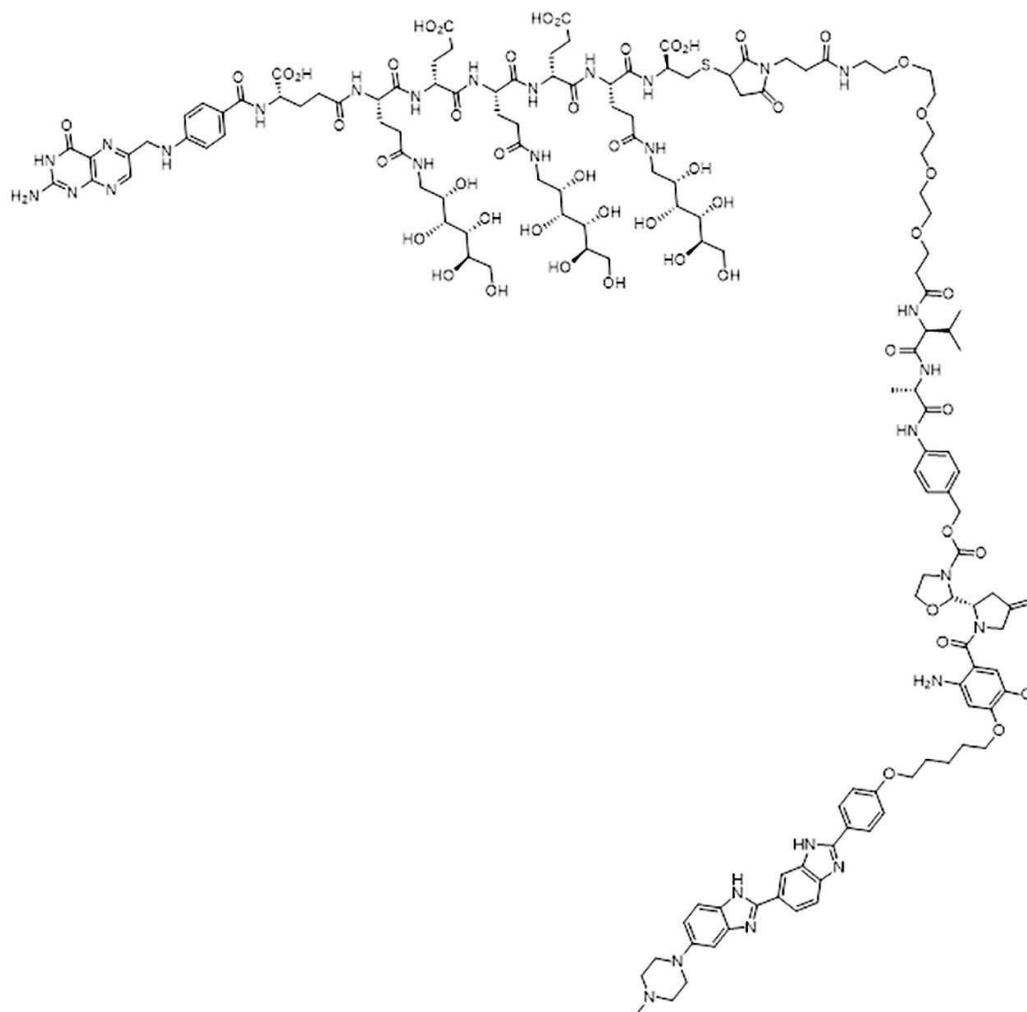
[0155]

[0156] 또 다른 구현예에서, 화합물은 하기 화학식 (또한 본 발명에서 FA-튜블리신으로 지칭되는) 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염을 가진다



[0157]

[0158] 또 다른 구현예에서, 화합물은 하기 화학식 (또한 본 발명에서 FA-PBD로 지칭되는) 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염을 가진다



[0159]

[0160]

본 발명에 사용된, 용어 “약학적으로 허용 가능한 염”은 제약에 사용될 수 있는 반대 이온(counter ion)을 가진 염들을 말한다. 이러한 염들은 (1) 모 화합물의 유리 염기와 염산, 브롬화 수소산, 질산, 인산, 황산, 및 과염소산 등과 같은 무기산, 또는 아세트산, 옥살산, (D) 또는 (L) 말산, 말레산, 메탄 술폰산, 에탄 술폰산, p-톨루엔술폰산, 살리실산, 타르타르산, 구연산, 숙신산 또는 말론산 등과 같은 유기산의 반응에 의해 수득할 수 있는, 산 부가 염; 또는 (2) 모 화합물에 존재하는 산성 양자가 금속 이온, 예를 들어, 알칼리 금속 이온, 알칼리토 이온, 또는 알루미늄 이온으로 대체되거나; 또는 에탄올아민, 디에탄올아민, 트리에탄올아민, 트리메탄아민, N-메틸글루카민 등과 같은 유기 염기와 배위결합한 경우 형성된 염을 포함한다. 약학적으로 허용 가능한 염은 통상의 기술 분야의 기술자에게 자명하며, 그러한 임의의 약학적으로 허용 가능한 염은 본 발명에 기술된 구현예와 관련하여 고려될 수 있다.

[0161]

적합한 산 부가 염은 무-독성 염을 형성하는 산으로부터 형성된다. 예시적인 실시예는 아세테이트(acetate), 아스파테이트(aspartate), 벤조에이트(benzoate), 베실레이트(besylate), 비카보네이트/카보네이트(bicarbonate/carbonate), 바이설페이트/설페이트(bisulphate/sulphate), 보레이트(borate), 캄실레이트(camsylate), 시트레이트(citrate), 에디실레이트(edisylate), 에실레이트(esylate), 포메이트(formate), 푸마레이트(fumarate), 글루셉테이트(gluceptate), 글루코네이트(gluconate), 글루쿠로네이트(glucuronate), 헥사플루오로포스페이트(hexafluorophosphate), 하이제이트(dibenzate), 하이드로클로라이드/클로라이드(hydrochloride/chloride), 하이드로브로마이드/브로마이드(hydrobromide/bromide), 하이드로아이오다이드/아이오다이드(hydroiodide/iodide), 이세티오네이트(isethionate), 락테이트(lactate), 말레이트(malate), 말리에이트(maleate), 말로네이트(malonate), 메실레이트(mesylate), 메틸설페이트(methylsulphate), 나프틸레이트(naphthylate), 2-나프틸레이트(2-napsylate), 니코티네이트(nicotinate), 나이트레이트(nitrate), 오로테이트(orotate), 옥살레이트(oxalate), 팔미테이트(palmitate), 파모에이트(pamoate), 포스페이트/하이드로젠 포스페이트/디하이드로젠 포스페이트(phosphate/hydrogen phosphate/dihydrogen phosphate), 사카레이트(saccharate), 스테아레이트(stearate), 숙시네이트(succinate), 타르트레이트(tartrate), 토실레이트

(tosylate) 및 트리플루오로아세테이트 염(trifluoroacetate salts)을 포함한다.

[0162] 본 발명에 기술된 화합물의 적합한 염기성 염은 무독성 염을 형성하는 염기로부터 형성된다. 예시적인 실시예는 아르기닌(arginine), 벤자틴(benzathine), 칼슘(calcium), 콜린(choline), 디에틸아민(diethylamine), 디올아민(diolamine), 글리신(glycine), 라이신(lysine), 마그네슘(magnesium), 메글루민(meglumine), 올아민(olamine), 포타슘(potassium), 소듐(sodium), 트로메타민(tromethamine) 및 아연 염(zinc salts)을 포함한다. 헤미설페이트 및 헤미칼슘 염과 같은 산 및 염기의 헤미염(Hemisalt)이 또한 형성될 수 있다.

[0163] 일 측면에서, 본 발명에 기술된 바와 같은 화합물이 혈류, 근육, 또는 내부 기관에 직접적으로 투여될 수 있다. 그러한 비경구 투여를 위한 적합한 경로는 정맥 내, 동맥 내, 복강 내, 경막 내, 경막외, 뇌실 내(intracerebroventricular), 요도 내, 흉골 내, 두개 내, 종양 내, 근육 내 및 피하 전달을 포함한다. 비경구 투여를 위한 적합한 수단은 니들(마이크로니들 포함) 주사기, 니들-프리 주사기, 및 인퓨전(infusion) 기술을 포함한다.

[0164] 예시적인 일 측면에서, 비경구 조성물은 통상적으로 염, 카보하이드레이트 및 완충제(바람직하게는 3 내지 9의 pH의)와 같은 담체 또는 부형제를 함유할 수 있는 수용액이나, 일부 적용의 경우, 이들은 멸균, 무-발열원 물 또는 인삼염-완충 식염수와 같은 적합한 비히클과 컨주게이션되어 사용되는 멸균된 비-수용액으로 또는 건조된 형태로 더욱 적합하게 제제화될 수 있다. 다른 구현예에서 본 발명에 기술된 화합물을 함유하는 임의의 조성물은 본 발명에 기술된 바와 같이 화합물의 비경구 투여를 위해 구성될 수 있다. 멸균 조건하에 비경구 조성물의 제조가, 예를 들어, 멸균 조건 하에 동결건조함으로써 통상의 기술자에게 자명한 표준 약학적 기술을 이용하여 쉽게 달성될 수 있다. 일 구현예에서, 비경구 조성물의 제조에 사용된 화합물의 용해도가 용해도-증강제의 혼입과 같은 적절한 제제 기술의 사용에 의해 증가될 수 있다.

[0165] 화합물의 투여량(dosage)은 숙주 동물의 상태, 치료될 암, 화합물의 투여 경로 및 조직 분포, 및 조합 치료에서 방사선 요법 또는 추가적인 약물과 같은 다른 치료적 처치의 공동-이용 가능성에 따라 현저히 달라질 수 있다. 숙주 동물에 투여될 치료적으로 유효한 양(즉, 화합물) 또는 진단적으로 유효한 양(예를 들어, 참조로서 본 발명에 통합된 미국 출원 공개 번호 20140140925에 기술된 엽산-이미징제 컨주게이트)는 숙주 동물의 체표면적, 질량, 및 상태에 대한 임상가의 평가에 기반한다. 치료적으로 유효한 또는 진단적으로 유효한 양은, 예를 들어, 환자 체중의 약 0.05 mg/kg 내지 환자 체중의 약 30.0 mg/kg, 또는 환자 체중의 약 0.01 mg/kg 내지 환자 체중의 약 5.0 mg/kg의 범위일 수 있으며, 모두 환자 체중의 kg인 0.01 mg/kg, 0.02 mg/kg, 0.03 mg/kg, 0.04 mg/kg, 0.05 mg/kg, 0.1 mg/kg, 0.2 mg/kg, 0.3 mg/kg, 0.4 mg/kg, 0.5 mg/kg, 1.0 mg/kg, 1.5 mg/kg, 2.0 mg/kg, 2.5 mg/kg, 3.0 mg/kg, 3.5 mg/kg, 4.0 mg/kg, 4.5 mg/kg, 및 5.0 mg/kg를 포함하나, 이에 한정되지 않는다. 화합물의 치료적으로 유효한 또는 진단적으로 유효한 총 양이 단일 용량 또는 분할 용량으로 투여될 수 있으며, 임상가의 재량에 따라, 본 발명에 제시된 통상적인 범위를 벗어날 수 있다.

[0166] 또 다른 구현예에서, 화합물 또는 엽산-이미징제 컨주게이트가 약 $0.5 \mu\text{g}/\text{m}^2$ 내지 약 $500 \text{ mg}/\text{m}^2$, 약 $0.5 \mu\text{g}/\text{m}^2$ 내지 약 $300 \text{ mg}/\text{m}^2$, 또는 약 $100 \mu\text{g}/\text{m}^2$ 내지 약 $200 \text{ mg}/\text{m}^2$ 의 치료적으로 또는 진단적으로 유효한 양으로 투여될 수 있다. 다른 구현예에서, 양은 약 $0.5 \text{ mg}/\text{m}^2$ 내지 약 $500 \text{ mg}/\text{m}^2$, 약 $0.5 \text{ mg}/\text{m}^2$ 내지 약 $300 \text{ mg}/\text{m}^2$, 약 $0.5 \text{ mg}/\text{m}^2$ 내지 약 $200 \text{ mg}/\text{m}^2$, 약 $0.5 \text{ mg}/\text{m}^2$ 내지 약 $100 \text{ mg}/\text{m}^2$, 약 $0.5 \text{ mg}/\text{m}^2$ 내지 약 $50 \text{ mg}/\text{m}^2$, 약 $0.5 \text{ mg}/\text{m}^2$ 내지 약 $600 \text{ mg}/\text{m}^2$, 약 $0.5 \text{ mg}/\text{m}^2$ 내지 약 $6.0 \text{ mg}/\text{m}^2$, 약 $0.5 \text{ mg}/\text{m}^2$ 내지 약 $4.0 \text{ mg}/\text{m}^2$, 또는 약 $0.5 \text{ mg}/\text{m}^2$ 내지 약 $2.0 \text{ mg}/\text{m}^2$ 가 될 수 있다. 총 양이 단일 또는 분할 용량으로 투여될 수 있으며, 임상가의 재량에 따라, 본 발명에 제시된 통상적인 범위를 벗어날 수 있다. 이들 양은 체표면적 m^2 에 기반한다.

[0167] 본 발명에 기술된 화합물은 하나 이상의 키랄 중심을 함유할 수 있거나, 또는 그렇지 않으면 다중 입체이성질체로 존재할 수 있다. 일 구현예에서, 본 발명에 기술된 발명은 임의의 특정 입체 화학적 요건을 제한하는 것이 아니며, 화합물이 광학적으로 순수할 수 있고, 라세미, 및 거울상 이성질체의 다른 혼합물, 다른 부분입체이성질체의 혼합물 등을 포함하는 임의의 다양한 입체이성질체 혼합물일 수 있음이 이해된다. 또한 그러한 입체이성질체의 혼합물이 하나 이상의 다른 키랄 중심에서 입체화학 배열의 혼합물을 포함하면서, 하나 이상의 키랄 중심에서 단일 입체화학 배열(stereochemical configuration)을 포함할 수 있음이 이해된다.

[0168] 유사하게, 본 발명에 기술된 화합물은 시스, 트랜스, E 및 Z 이중 결합과 같은 기하학적 중심을 포함할 수 있다. 또 다른 구현예에서, 본 발명에 기술된 발명이 임의의 특정 기하 이성질체 요건을 제한하려는 것이 아니

며, 화합물이 순수할 수 있으며, 또는 임의의 다양한 기하 이성질체 혼합물일 수 있음이 이해되어야 한다. 또한, 그러한 기하 이성질체의 혼합물이 하나 이상의 다른 이중 결합에서 기하 혼합물을 포함하면서, 하나 이상의 이중 결합에서 단일 배열을 포함할 수 있음이 이해된다.

[0169] 본 발명에 사용된, 용어 “링커(linker)”는 분자의 둘 이상의 기능적 부분을 연결하여 본 발명의 화합물을 형성하는 원자 사슬을 포함한다. 예시적으로, 원자의 사슬은 C, N, O, S, Si, 및 P, 또는 C, N, O, S, 및 P, C, N, O, 및 S로부터 선택된다. 원자의 사슬은 염산 및 약물과 같은 화합물의 상이한 기능적 성능을 공유적으로 연결한다. 링커는 인접한 백본에서 약 2 내지 약 100개의 원자 범위와 같이 다양한 길이를 가질 수 있다.

[0170] 본 발명에 사용된, 용어 “해리 가능한(releasable) 링커” 또는 “해리 가능한 링커”는 pH-불안정, 산-불안정, 염기-불안정, 산화-불안정, 대사적-불안정, 생화학적-불안정, 또는 효소-불안정 결합과 같은 생리학적 조건하에 파손될 수 있는 하나 이상의 결합을 포함하는 링커를 말한다. 결합 파손을 야기하는 그러한 생리학적 조건이 반드시 생물학적 또는 대사 과정을 포함해야하는 것이 아니며, 대신에 예를 들어, 생리적 pH에서 가수 분해 반응과 같은 표준 화학 반응 또는 세포질 pH보다 낮은 pH를 가지는 엔도솜과 같은 세포 기관으로의 구획화의 결과로서 포함될 수 있음이 이해된다.

[0171] 절단 가능한 결합이 해리 가능한 링커의 양 말단 중 하나 또는 둘 다에 해리 가능한 링커 내의 인접한 두 원자를 연결 및/또는 다른 링커 부분 또는 본 발명에 기술된 염산 및/또는 약물을 연결할 수 있는 것이 이해된다. 절단 가능한 결합이 해리 가능한 링커 내의 두 인접한 원자를 연결한 경우, 결합의 파손 후에, 해리 가능한 링커가 두 개 이상의 단편으로 파손된다. 또는, 절단 가능한 결합이 해리 가능한 링커 및 또 다른 모이어티에 존재하는 경우, 결합의 파손 후에, 해리 가능한 링커가 다른 모이어티로부터 분리된다.

[0172] 또 다른 구현예에서, 화합물의 투여를 위한 조성물이 약 90%, 또는 약 95%, 또는 약 96%, 또는 약 97%, 또는 약 98%, 또는 약 99%, 또는 약 99.5% 이상의 순도를 가진 화합물로부터 제조된다. 또 다른 구현예에서, 화합물의 투여를 위한 조성물은 90% 이상, 또는 95% 이상, 또는 96% 이상, 또는 97% 이상, 또는 98% 이상, 또는 99% 이상, 또는 99.5% 이상의 순도를 가진 화합물로부터 제조된다.

[0173] 실시예

[0174] 약품 및 시약:

[0175] Fmoc-Glu-OtBu는 AAPPTEC Inc에서 구입하였다. 4-클로로-3-나이트로퀴놀린은 Matrix Scientific Inc에서 구입하였다. Fmoc-8-아미노-3,6-디옥사옥타노익산은 PolyPeptide Inc에서 구입하였다. N10-(트리플루오로아세틸)프테로산, 튜블리신은 Endocyte Inc에 의해 제공되었다. Solid phase synthesis monitor kit는 ANASPEC Inc에서 구입하였다. 2,2-디메틸옥시란(dimethyloxirane), 암모늄 하이드록사이드(ammonium hydroxide), 디-tert-부틸 디카보네이트, 트리플루오로아세트산, 톨루엔, 2-프로판올, 메탄올, Pd/C, 1,2-디아미노에탄 트리틸 (폴리머-결합된 레진), 트리에틸아민, 발레릴 클로라이드, 에틸아세테이트, 헥산, Na₂SO₄, 칼슘옥사이드, 디클로로메탄, 3-클로로포옥시벤조산, 벤조일 이소시아네이트, H-cys(Trt)-2-클로로트리틸 레진, 소듐 메톡사이드, 디메틸아미노 피리딘, 아세트나이트릴, DMSO, 4-클로로-3-나이트로-a,a,a-트리플루오로톨루엔, 하이드라진 하이드레이트, 에탄올, Na₂CO₃, NaHCO₃, 농축 HCl, 에테르, 트리클로로메틸클로로포메이트, 설퍼릴 클로라이드, 2-머캅토프로피리딘, 2-머캅토폐탄올, DMF, PyBOP, DIPEA, 에탄디티올, 티이소프로필실란, 20% 피페리딘 DMF 용액, 4-클로로-3-나이트로-a,a,a-트리플루오로톨루엔, 하이드라진 하이드레이트, 5,15-DPP, 레시퀴모드(resiquimod), 2,4-디아미노-6-하이드록시피리미딘, N-아세틸-5-하이드록시트립타민, 메토티렉세이트, 에베로리무스, 자이모산, MnCl₂, L-아르기닌, dulbecco's 인산완충식염수 (PBS), 클로스트리움 히스톨리티쿰(clostridium histolyticum) 유래 콜라게네이스(collagenase), 소 채장 유래 디옥시리보뉴클레이스 I, 소 고환 유래 히알루로디테이스(hyaluronidase), 소 혈청 알부민 (BSA), 글라이신, 소듐 아자이드, OPD 기질은 Sigma에서 구입하였다. 수소, 아르곤, 질소 압축 가스는 Indiana Oxygen Company에서 구입하였다. BEZ235, PF-04691502, GDC-0980, 보르트만닌, BLZ945, 레날리도마이드, NLG 919, AS1517499, 및 BIRB796는 Selleckchem에서 구입하였다. AMT는 Tocris Bioscience에서 구입하였다. CL307, CpG, 및 Poly IC는 InvivoGen Inc에서 구입하였다. Greiss reagent는 Lifetechnology Inc에서 구입하였다. 10% Triton X-100는 Pierce Inc에서 구입하였다. 프로테이즈 억제제는 Research Products International에서 구입하였다. QuantiChrom™ 요소 분석 키트는 BioAssay Systems에서 구입하였다. 마우스 IL-10 듀오세트(duoset), 및 항-마우스 FITC-아르기네이스(arginase)는 R&D systems에서 구입하였다. RPMI 1640 배지, 염산-결핍 RPMI 1640 배지는 Gibco Inc에서 구입하였다. 페니실린 스트렙토마이신 용액 (50x), L-글루타민 (200 mM), 2.21 mM EDTA (1x)가 들어있는 0.25% 트립신은 Corning Inc에서 구입하였다.

우태아혈청 (FBS)은 Atlanta biologicals Inc에서 구입하였다. 동물용 엽산 결핍 식이는 Envigo Inc에서 구입하였다. 마우스 엽산 수용체- β 항체 (F3IgG2a)는 NIH의 Dr. Dimitrov에게서 제공받았다. 마우스 Fc 차단제 (CD16/CD32), 항-마우스 FITC-CD11b, 항-마우스 PE-F4/80, 항-마우스 PE-Gr1, 항-마우스 PE-CD4, 항-마우스 FITC-CD8, 7-AAD 생존능 염색 용액, 적혈구 파쇄 버퍼 (10X)는 Biolegend Inc에서 구입하였다. 고정 가능한 생존능 염료(Fixable viability dye) eFluor®660는 eBioscience, Inc에서 구입하였다. Pierce™16% 포름알데하이드 (w/v) (무-메탄올)는 Thermo Fischer Scientific에서 구입하였다. 이소플루란은 VetOne Inc에서 구입하였다. Andy Fluor™647 NHS 에스터 (숙신이미딜 에스터)는 Applied Bioprobes에서 구입하였다. 마우스 GM-CSF는 Miltenyi Biotec Inc에서 구입하였다. 엽산-튜블리신은 문헌 공정에 따라 제조하였다 (예를 들어 W02014/062697에 기술된 과정 참조). 항 인간 APC-CD33 항체는 Biolegend Inc에서 구입하였다. 인간 T 세포 배양 배지 (TexMACS 배지), 인간 IL-2는 Miltenyi Biotec에서 구입하였다. 인간 T 세포 분리 키트 (인간 T 세포 농축 키트)는 STEMCELL에서 구입하였다. Ficoll-Paque™ Plus는 GE Healthcare에서 구입하였다. 6-티오구아닌 및 메틸렌 블루는 Sigma에서 구입하였다.

[0176] 생물학적 실시예

[0177] 실시예 1: 세포 배양 및 동물 사육

[0178] 엽산 수용체를 발현하지 않는 4T1 세포는 Endocyte Inc에 의해 제공되었다. 세포를 RPMI 1640 완전 배지 (10% 우태아혈청, 1% 페니실린 스트렙토마이신 및 2 mM L-글루타민이 보충된 RPMI 1640 배지)에서 습도 95% 5% CO₂ 대기하에 37°C 에서 배양하였다. 세포 배지에 2.21 mM EDTA가 들어있는 0.25% 트립신을 3 내지 4일마다 첨가하였다. 6 내지 8주령의 암컷 balb/c 마우스를 Envigo Inc로부터 얻었다. 동물들은 정상 설치류 식사 또는 엽산 결핍 식이를 유지하였으며, 실험 기간 동안 멸균 환경에서 표준 12h 명암 사이클로 사육되었다. 모든 동물 절차는 NIH 지침에 따라 Purdue 동물 관리 및 사용위원회의 승인을 받았다.

[0179] 실시예 2: 종양 모델

[0180] 4T1 고품 종양 모델: 6 내지 8주령의 암컷 balb/c 마우스를 2 주 동안 엽산 결핍 식이로 유지하였다. 종양 이식 전에, 마우스 몸의 왼쪽 상의 털을 전기 면도기로 제거하였다. RPMI 1640 완전 배지 50 μ L에 부유된 5만개의 4T1 세포들을 피하로 유방 지방 패드 근처에 이식하였다. 6일째 종양의 부피가 약 20 내지 50 mm³에 도달하면 치료를 시작하였다. FR⁺ TAMs/MDSC의 특성을 확인하기 위해, 종양 부피가 300 내지 500 mm³에 도달하면 종양을 분해시켰다(digest). 종양 분해는 세포 표면 단백질의 손상을 최소화하도록 개발되었다. 분해 각테일은 무혈청 엽산-결핍 RPMI 1640 배지 10 MI 중에 1 mg/mL 콜라게네이즈 IV, 소 고환 유래 0.1 mg/mL 히알루로니데이즈, 및 0.2 mg/mL 디옥시리보뉴클레이즈 I로 구성되었다. 37°C에서 1 시간 동안 부드럽게 흔들어 분해한 후, 분해 반응을 10% 열 불활성화 FBS를 함유하는 엽산-결핍 RPMI 1640 배지를 첨가함으로써 중지시켰으며, 부서진 종양들을 40 μ m 세포 여과기를 통과시켜 개별 세포들을 수집하였다. 그 후 분리된 세포들을 스펀다운하여 분해 각테일을 제거하고 얼음 상에서 5분 동안 적혈구 파쇄 버퍼 (1x) 5 내지 10 mL에 재-부유시켰다. 30 내지 40 mL의 PBS를 첨가하여 세포 파쇄 반응을 중지시켰다. 그 후 세포를 스펀다운하여 상등액을 제거하고 2% FBS를 함유하는 PBS인 유동 염색 배지(flow staining medium)에 재-부유하였다. 세포를 계수하였고 그 후 유세포 분석 염색을 위해 준비되었다.

[0181] 4T1 복막 모델: 6 내지 8주령의 암컷 balb/c 마우스를 정상 설치류 식사로 유지하였다. 300 μ L PBS 중의 1000만개의 4T1 세포를 복강에 주사하였다. 복막 세척을 함으로써 복수를 7일 내지 10일 사이에 수집하였다. 세포들을 스펀 다운하여 상등액을 제거하고 얼음 상에서 5분 동안 적혈구 파쇄 버퍼 (1x) 5 내지 10 mL에 재-부유하였다. 30 내지 40 mL의 PBS를 첨가하여 세포 파쇄 반응을 중지시켰다. 그 후 세포를 스펀다운하여 상등액을 제거하고 10 ng/mL 마우스 GM-CSF가 보충된 RPMI 1640 완전 배지에 재-부유하였다. 세포를 계수한 뒤 유세포 분석 염색 및 인 비트로 스크리닝을 위해 준비되었다.

[0182] RM1 고품 종양 모델: 6 내지 8주령의 수컷 C57BL/6 마우스를 2 주 동안 엽산 결핍 식이로 유지하였다. 종양 이식 전에, 마우스 목의 털을 전기 면도기로 제거하였다. 50 μ L RPMI 1640 완전 배지에 부유된 2백만 개의 RM1 세포들을 피하로 이식하였다. 종양 이식 후 매일 동물들을 모니터링하였다. 종양 크기가 약 500 mm³에 도달했을 때, 마우스를 안락사시켰다. 종양을 4T1 종양 모델과 유사한 각테일을 이용하여 분해하였다. 37°C에서 1 시간 동안 부드럽게 흔들어 분해한 후, 분해 반응을 10% 열 불활성화 FBS를 함유하는 엽산-결핍 RPMI 1640 배지를 첨가함으로써 중지시켰으며, 부서진 종양들을 40 μ m 세포 여과기를 통과시켜 개별 세포들을 수집하였다. 그 후 분리된 세포들을 스펀다운하여 분해 각테일을 제거하고 얼음 상에서 5분 동안 적혈구 파쇄 버퍼 (1x) 5 내지 10

mL에 재-부유시켰다. 30 내지 40 mL의 PBS를 첨가하여 세포 파쇄 반응을 중지시켰다. 그 후 세포를 스핀다운하여 상등액을 제거하고 2% FBS를 함유하는 PBS인 유동 염색 배지에 재-부유하였다. 세포를 계수한 뒤 유세포 분석 염색을 위해 준비되었다.

[0183] CT26 고형 종양 모델: 6 내지 8주령의 암컷 balb/c 마우스를 2 주 동안 엽산 결핍 식이로 유지하였다. 종양 이식 전에, 마우스 목의 털을 전기 면도기로 제거하였다. 50 μ L RPMI 1640 완전 배지에 부유된 2백만 개의 CT26 세포들을 피하로 이식하였다. 종양 이식 후 매일 동물들을 모니터링하였다. 종양 크기가 약 500 mm³에 도달했을 때, 마우스를 안락사시켰다. 종양을 4T1 종양 모델에서와 같이 유사한 각테일을 이용하여 분해하였다. 37°C에서 1 시간 동안 부드럽게 흔들어 분해한 후, 분해 반응을 10% 열 불활성화 FBS를 함유하는 엽산-결핍 RPMI 1640 배지를 첨가함으로써 중지시켰으며, 부서진 종양들을 40 μ m 세포 여과기를 통과시켜 개별 세포들을 수집하였다. 그 후 분리된 세포들을 스핀다운하여 분해 각테일을 제거하고 얼음 상에서 5분 동안 적혈구 파쇄 버퍼 (1x) 5 내지 10 mL에 재-부유시켰다. 30 내지 40 mL의 PBS를 첨가하여 세포 파쇄 반응을 중지시켰다. 그 후 세포를 스핀다운하여 상등액을 제거하고 2% FBS를 함유하는 PBS인 유동 염색 배지에 재-부유하였다. 세포들을 계수하고 그 후 유세포 분석 염색을 위해 준비되었다.

[0184] EMT6 고형 종양 모델: 6 내지 8주령의 암컷 balb/c 마우스를 2 주 동안 엽산 결핍 식이로 유지하였다. 종양 이식 전에, 마우스 목의 털을 전기 면도기로 제거하였다. 50 μ L RPMI 1640 완전 배지에 부유된 2백만 개의 EMT6 세포들을 피하로 이식하였다. 종양 이식 후 매일 동물들을 모니터링하였다. 종양 크기가 약 500 mm³에 도달했을 때, 마우스를 안락사시켰다. 종양을 4T1 종양 모델에서와 같이 유사한 각테일을 이용하여 분해하였다. 37°C에서 1 시간 동안 부드럽게 흔들어 분해한 후, 분해 반응을 10% 열 불활성화 FBS를 함유하는 엽산-결핍 RPMI 1640 배지를 첨가함으로써 중지시켰으며, 부서진 종양들을 40 μ m 세포 여과기를 통과시켜 개별 세포들을 수집하였다. 그 후 분리된 세포들을 스핀다운하여 분해 각테일을 제거하고 얼음 상에서 5분 동안 적혈구 파쇄 버퍼 (1x) 5 내지 10 mL에 재-부유시켰다. 30 내지 40 mL의 PBS를 첨가하여 세포 파쇄 반응을 중지시켰다. 그 후 세포를 스핀다운하여 상등액을 제거하고 2% FBS를 함유하는 PBS인 유동 염색 배지에 재-부유하였다. 세포들을 계수하고 그 후 유세포 분석 염색을 위해 준비되었다.

[0185] 실시예 3: 유세포 분석(Flow Cytometry Analysis)

[0186] 세포 표면 마커 염색: 고형 종양 모델 또는 복막 종양 모델로부터 수득한 단일-세포 현탁액이 상기 언급된 바와 같이 준비되었다. 유동 염색 배지 100 μ L 중의 백만개의 세포를 마우스 Fc 차단제 0.7 μ L와 함께 아이스 상에서 5분 동안 인큐베이션하였다. 인큐베이션 후에 MDSC (CD11b, Gr1), TAMs (CD11b, F4/80), 및 엽산 수용체- β (F3IgG2a)에 대한 표면 마커가 Fc 차단제와 함께 첨가되었다. 표 1 및 2는 표면 마커 염색에 사용된 항체의 부피를 표시한다. 아이스 상에서 1시간 동안 인큐베이션한 후, 세포들을 500 μ L PBS로 세척하고 유동 염색 배지 200 μ L에 재-부유하였다. 사/생(Dead/live) 세포 마커 (사/생 7-AAD 3 μ l 또는 BV421 1 μ l)을 각 샘플에 첨가하고 상온에서 암조건으로 인큐베이션하였다. 15분 후, 세척없이 세포들을 BD Accuri C6TM 유세포 분석기를 이용하여 분석하였다 (표 1 염색). 표 2의 염색에 대해 1회 세척을 수행하였으며 세포들을 BD Fortessa 유세포 분석기를 이용하여 분석하였다. 결과는 도 5 및 도 6에 나타났다. 도 5 및 도 6에 나타난 바와 같이, 고형 4T1 종양에서 마우스 MDSC 및 TAM 집단이 각각 CD11b+Gr1+ 및 CD11b+F4/80+마커에 의해 식별될 수 있었다. 이들 두 세포주 집단을 게이팅(gate)한 후, 이들 두 집단의 대부분에서 FR- β 발현이 관찰될 수 있었다 (MDSC에서 61.2% 및 TAM에서 95%).

표 1

항체	BV605-Ly 6C	FITC-CD 11b	PerCp/Cy5.5-Gr 1	Alexa Fluor 647-F3IgG2a	BV421 사(d ead)/생(live)	AF594-F4/ 80
부피	0.5 μ L	1 μ L	0.5 μ L	0.5 μ L	1 μ L	0.5 μ L

[0187]

[0188] 표 1. PDL-1 및 FR- β 의 유세포 염색을 위한 100 μ L 세포 현탁액에서 항체 부피.

[0189] 세포 내 아르기네이즈 염색: TAM/MDSC에 대한 세포 표면 마커가 이전에 언급된 절차에 따라 표지되었다. 생존능 염료 eFluor®660 0.1 μ L을 항체 각테일과 함께 첨가하였다. PBS로 세척한 후, 세포들을 500 μ L PBS 중의 4% 포름알데하이드로 4°C에서 15분 동안 고정하였다. 세포들을 스핀다운하여 고정 용액을 제거하였다. 세포들을

0.1 M 글라이신 및 0.05% 소듐 아자이드를 함유하는 세척 버퍼 500 μ L로 2회 세척하였다. 마지막으로 스핀 다운한 후, 세포에 0.1 M 글라이신, 0.05% 소듐 아자이드 및 0.1% triton-100를 함유하는 투과화(permeabilization) 용액 1 mL를 첨가하였다. 투과화는 상온에서 5분 동안 수행되었다. 투과화된 세포들을 1500 rpm으로 1분 동안 스핀 다운하였으며, 세포들을 0.05 M 글라이신, 0.05% 소듐 아자이드 및 0.2% 젤라틴을 함유하는 차단 버퍼 1 mL로 3회 세척하였다. 그 후 세포들을 4℃에서 하룻밤 동안 차단 버퍼 1 mL에 재-부유하여 비-특이적 세포 내 결합을 방지하였다. 그 후 세포들을 1500 rpm에서 1분 동안 스핀 다운하여 상등액을 제거하였고 1 μ L FITC-아르기네이즈를 함유하는 또 다른 차단 버퍼 100 μ L를 첨가하였다. 세포들을 암조건으로 4℃에서 하룻밤 동안 두었다. 1500 rpm 으로 1분 동안 스핀 다운한 뒤, 세포들을 차단 버퍼 1 mL로 세척하였고, 그 후 유세포 분석(BD Accuri C6™ flow cytometer)을 위해 준비되었다.

실시예 4: 인 비트로 TAM/MDSC 스크리닝

복막 모델로부터 분리된 세포를 10 ng/mL 마우스 GM-CSF로 보충된 RPMI 1640 완전 배지에 재-부유하였으며 96웰 플레이트에 분주하였다. 표 2에 표시된 스크리닝 약물의 각각 다른 농도를 동일한 배지에 용해시켰고 배지 300 μ L 중에 50만 개의 세포를 함유하는 각 웰에 첨가하였다. 약물을 첨가하지 않은 배지 300 μ L 중에 50만 개의 세포를 함유하는 웰을 무처리 대조군으로 두었다. 세 개의 여분 웰을 세포 없이 배지 300 μ L로 채웠으며 약물을 백그라운드 대조군으로 두었다. 그 후 세포들을 습도 95% 5% CO₂ 대기하에 37℃ 에서 24시간 내지 48시간 동안 인큐베이션하였다. 인큐베이션 끝에, IL-10 ELISA 및 산화 질소 분석을 위해 상등액을 수집하였다. 세포들을 PBS 300 μ L로 2회 세척하고, 그 후 아르기네이즈 분석을 위해 준비되었다.

표 2

이름	기능	클래스	이름	기능	클래스
CL307	TLR7 작용제	III	5,15-DPP	STAT3 억제제	II
BEZ235	PI3K 억제제	II	메토트렉세이트	항-염증	II
보르트만닌	PI3K 억제제	II	에베로리무스	mTOR 억제제	II
AMT	iNOS 억제제	II	튜블리신	미세소관 억제제	I
PF-04691502	PI3K 억제제	II	GDC-0980	PI3K 억제제	II
CpG	TLR9 작용제	III	AS1517499	STAT6 억제제	II
BLZ945	CSF-1R 억제제	II	BIRB796	p38 α MAPK 억제제	II
레날리도마이드	TNF- α 분 비 억제제	II	N-아세틸-5-하이드록시트립타민	BH4 억제제	II
NLG 919	IDO 경로 억제제	II	2,4-디아미노-6-하이드록시피리미딘(DAHP)	GTP 사이클로하이드롤레이스(cyclohydrolase) I 억제제	II
Poly I:C	TLR3 작용제	III	빈블라스틴(vinblastine)	미세소관 억제제	I
자이모산(Zymosan)	TLR5 작용제	III	Am-9-79	토포이로머레이스(Topoisoimerase) I 억제제	I

표 2. 인 비트로 스크리닝을 위한 화합물 및 기능 목록

실시예 5: 아르기네이즈 분석

아르기네이즈 활성은 I.M. Corraliza , M.L. Campo, G. Soler , M. Modolell, 'Determination of arginase activity in macrophages: a micromethod', Journal of Immunological Methods 174 (1994) 231-235에 기술된 바와 같이 세포 파쇄물에서 측정되었다. 간략하게, 96웰 플레이트에서 분리된 TAMs/MDSCs의 상이한 약물들과의 인 비트로 인큐베이션 후에, 세포들을 PBS 300 μ L로 2회 세척하였다. 그 후 세포들을 상온에서 프로테이즈 억

제제 (1x)를 포함하는 0.1% Triton X-100 100 μ L로 30분 동안 파쇄하였다. 그 후에, 파쇄 용액 50 μ L을 새 V-형 96웰 플레이트에 옮겼다. 아르기네이즈 활성 용액 (10 mM $MnCl_2$ /50 mM Tris-HCl (pH 7.5)) 50 μ L을 세포 파쇄물에 첨가하였다. 효소를 10분 동안 56°C로 가열하여 활성화시켰다. 활성화된 용액 25 μ L와 아르기네이즈 기질 용액 (0.5 M L-아르기닌 (pH 9.7)) 25 μ L을 37°C에서 60분 동안 부드럽게 흔들어 인큐베이션함으로써 아르기닌 가수분해가 수행되었다. 상온까지 식힌 후, 반응 용액 10 μ L을 그 후 90 μ L까지 PBS로 희석하였다. 이 희석 용액 10 μ L을 96웰 평 바닥 투명 플레이트에 옮겼다. 요소 시약 200 μ L을 각각의 웰에 첨가하였다. 암 상태에서 상온으로 10분 동안 인큐베이션한 후, 요소 농도를 플레이트 리더기로 520nm에서 측정하였다. 결과는 도 7, 도 11, 도 12, 도 15 및 도 24에 나타났다.

[0196] 도 7에 나타난 바와 같이, CL307, BEZ235, 보르트만닌, CpG, 튜블리신, AS1517499, 및 BIRB796를 포함한 여러 약물이 효과적으로 인 비트로 TAM/MDSC 아르기네이즈 생산을 감소시킬 수 있음을 알 수 있다. 아르기네이즈 농도가 520 nm 흡광도에 비례하였다. 각 도에서 검은 색 점선이 무처리 대조군의 아르기네이즈 수준을 나타낸다. 검은 색 실선은 백그라운드의 아르기네이즈 수준을 나타낸다. 모든 샘플에 대한 520 nm에서의 흡광도가 시험된 약물의 농도 0.1 μ M 내지 100 μ M에 대해 플로팅하였다.

[0197] 도 11에 나타난 바와 같이, TAM/MDSC에 의한 아르기네이즈 생산에 미치는 새로 합성된 TLR7 작용제 (TLR7A)의 영향력을 시험하기 위해, TLR7A 및 C1307를 TAM/MDSC과 상이한 농도에서 공-배양하였다. 도 11에서, TLR7A가 상용되는 TLR7 작용제 (C1307)보다 아르기네이즈 감소에 더욱 효과적임을 알 수 있다.

[0198] 도 12에 나타난 바와 같이, 세 가지 PI3K 억제제들의 인 비트로에서 TAM/MDSC에 의한 아르기네이즈 생산 감소에 대한 효과를 비교함으로써, GDC-0980가 TAM/MDSC에 의한 아르기네이즈 생산을 효과적으로 감소시킬 수 있는 최고의 후보임을 알 수 있다.

[0199] 도 15에 나타난 바와 같이, 4T1 목막 종양 모델로부터 수득한 TAM/MDSC를 TLR7 작용제 (C1307), PI3K 억제제 (BEZ235) 및/또는 두 약물의 조합과 상이한 농도에서 배양하였다. 도 15에 나타난 바와 같이 모든 조합의 EC50가 두 약물 사이에서 플로팅되었다. 사각형 기호는 C1307 또는 BEZ235의 단일 처리 EC50를 나타낸다. 개별적으로 아르기네이즈 생산에 영향을 미칠 수 있는 두 가지 상이한 약물을 조합함으로써, 시너지적인 효과가 관찰되어, TAM/MDSC에 의한 아르기네이즈 생산을 더욱 감소시킬 수 있음을 알 수 있다.

[0200] 도 24에 나타난 바와 같이, F4/80+ 대식세포 상에서의 아르기네이즈의 세포 내 염색이 무처리 대조군, FA-TLR7 작용제군, FA-PI3K 억제제군, FA-튜블리신군 및 조합군과 경쟁군(competition group)에서 시험되었다. 상기 방법 부분에서 기술한 바와 같이, 치료 연구 끝에 종양 분해 후에, F4/80+ 대식세포 상에서의 아르기네이즈 발현 수준을 확인하기 위해 분리된 세포를 대식세포 표면 마커 (F4/80) 및 M2 대식세포 기능 마커 (아르기네이즈)로 염색하였다. 아르기네이즈에 의한 L-아르기닌의 고갈이 독성 T 세포 증식을 억제할 수 있기 때문에, 아르기네이즈 상향 조절이 TAM/MDSC의 중요한 억제 마커임이 확인되었다. 치료군 및 경쟁군의 살아있는 세포에서 아르기네이즈+F4/80+ 세포 증식이 무처리군의 동일한 집단과 비교되었다. 도 24에 나타난 바와 같이, 처리군의 아르기네이즈+F4/80+ 세포 집단은 무처리 대조군에 비해 극적으로 감소하였으며, 이 효과는 경쟁자 (FA-PEG-NH₂)의 추가 첨가에 의해 경쟁될 수 있다. 따라서, 4T1 고형 종양에서 FR+ TAM/MDSC를 표적화함으로써, 세 가지 클래스의 FA-컨쥬게이션된 SMDC가 TAM/MDSC의 면역 억제에 영향을 줄 수 있다고 결론지을 수 있다.

[0201] 실시예 6: IL-10 ELISA 분석

[0202] 상이한 화합물과의 인 비트로 인큐베이션 후 TAM/MDSC에 의한 IL-10 생산이 R&D Systems의 마우스 IL-10 DuoSet ELISA와 함께 제공된 프로토콜에 따른 ELISA 분석에 의해 확인되었다. 간략하게, 고 친화도 96-웰 플레이트를 웰당 담체 단백질이 없는 PBS 중 4 μ g/mL의 작업 농도의 희석된 포획(capture) 항체 100 μ L로 코팅하였다. 플레이트를 밀봉하고, 상온에서 하룻밤 동안 인큐베이션하였다. 각 웰을 흡인하고, 스쿼트 병을 이용하여 세척 버퍼 (PBS 중의 0.05% Tween®, pH 7.2-7.4) 400 μ L로 3회 세척하였다. 마지막 세척 후에, 남은 세척 버퍼를 플레이트를 뒤집고 깨끗한 페이퍼 타월에 압지함으로써 제거하였다. 플레이트에 시약 희석제 (PBS 중의 1% BSA, pH 7.2-7.4) 300 μ L를 각 웰에 첨가함으로써 블로킹하였고, 상온에서 1시간 동안 인큐베이션하였다. 흡인/세척을 상기 기술한 바와 동일하게 3회 반복하였다. 플레이트에 샘플을 첨가할 준비가 되었다. TAM/MDSC 인 비트로 스크리닝의 샘플 상등액 100 μ L을 각 웰에 첨가하였다. 플레이트를 접착 스트립으로 덮고 상온에서 2시간 동안 인큐베이션하였다. 상기 언급한 흡인/세척 과정을 3회 반복하였다. 시약 희석액 중의 300 ng/mL 농도의 검출 항체 100 μ L를 각 웰에 첨가하였다. 플레이트를 새 접착 스트립으로 덮고 2시간 동안 상온에서 인큐베이션하였다. 상기 언급한 흡인/세척 과정을 3회 반복하였다. 작업 희석 100 μ L의 스트렙타비딘-HRP (시약 희석액

중 1 내지 40 회석)을 각 웰에 첨가하였다. 플레이트를 덮고 암조건으로 상온에서 20분 동안 인큐베이션하였다. 상기 언급한 흡인/세척 과정을 3회 반복하였다. 기질 용액 (DI 물 20 mL 중 OPD 은색 및 금색 정제 한 봉지) 200 μ L을 각 웰에 첨가하였다. 플레이트를 상온에서 암조건으로 20분 동안 인큐베이션하였다. 정지 용액 (3M HCl) 50 μ L를 각 웰에 첨가하였다. 충분히 섞였는지 확인하기 위해 플레이트를 부드럽게 두드렸다. IL-10 농도는 492 nm에서 마이크로 리더기에 의해 결정된 흡광도에 비례하였다. 결과는 도 8 및 도 13에 나타났다.

[0203] 도 8에 나타난 바와 같이, BEZ235, 보르트만닌, 튜블리신, 레날리도마이드, AS1517499, 및 BIRB796를 포함하는 여러 약물이 효과적으로 TAM/MDSC에 의한 인 비트로 IL-10 생산을 감소시킬 수 있음을 알 수 있다. IL-10의 농도는 492 nm에서의 흡광도와 비례하였다. 각 도에서 검은 색 점선은 무처리 대조군의 IL-10 수준을 나타냈다. 검은 색 실선은 백그라운드의 IL-10 수준을 나타냈다. 모든 샘플에 대한 492 nm에서의 흡광도가 시험된 약물 농도 0.1 μ M 내지 100 μ M에 대해 플로팅되었다.

[0204] 도 13에 나타난 바와 같이, 인 비트로 TAM/MDSC에 의한 IL-10의 생산 감소에 대한 세 가지 PI3K 억제제의 효과를 비교함으로써, GDC-0980가 TAM/MDSC에 의한 IL-10 생산을 효과적으로 감소시킬 수 있는 최고의 후보임을 알 수 있다.

[0205] 실시예 7: 산화 질소 분석

[0206] Je-In Youn, Srinivas Nagaraj, Michelle Collazo, and Dmitry I. Gabrilovich, ' Subsets of Myeloid-Derived Suppressor Cells in Tumor Bearing Mice', J Immunol. 2008 Oct 15; 181(8): 5791-5802에 보고된 바와 같이 산화 질소 생산을 그리스(Greiss) 시약으로 측정하였다. 간략하게, TAM/MDSC 및 상이한 약물들을 인 비트로 인큐베이션한 후에, 각 웰의 상등액 50 μ L을 96-웰 플레이트 평 바닥 투명 플레이트에 옮겼다. 그리스 시약 20 μ L 및 DI 물 30 μ L을 상등액 50 μ L가 들어있는 각 웰에 첨가하였다. 플레이트 리더기 측정에 앞서 반응 용액을 상온의 암조건하에 30분 동안 두었다. 548 nm에서의 흡광도는 TAM/MDSC에 의해 생산된 산화 질소의 농도와 연관성이 있다. 결과는 도 9, 도 10, 도 11 및 도 14에 나타났다.

[0207] 도 9에 나타난 바와 같이, BEZ235, 보르트만닌, AMT, 메토틱세이트, 튜블리신, AS1517499, 에베로리무스, 및 BIRB796를 포함하는 여러 약물들이 인 비트로에서 TAM/MDSC에 의한 산화 질소 생산을 효과적으로 감소시킬 수 있음을 알 수 있다. 산화 질소의 농도는 548 nm에서의 흡광도에 비례하였다. 각 도에서 검은 색 점선은 무처리 대조군의 산화 질소 수준을 나타냈다. 검은 색 실선은 백그라운드의 산화 질소 수준을 나타냈다. 모든 샘플에 대한 548 nm에서의 흡광도가 시험된 약물의 농도 0.1 μ M 내지 100 μ M에 대해 플로팅되었다.

[0208] 도 10에 나타난 바와 같이 TAM/MDSC를 상이한 TLR 작용제와의 공-배양 이후 인 비트로 산화 질소의 극적인 생산 증가 및 CD86의 상향 조절이 나타났으며 이는 TAM/MDSC의 항-종양 기능을 가진 M1 대식세포로의 리프로그래밍을 나타낸다.

[0209] 도 11에 나타난 바와 같이, 새롭게 합성한 TLR7 작용제 (TLR7A)의 TAM/MDSC에 의한 산화 질소 생산에 대한 영향력을 시험하기 위해, TLR7A 및 C1307를 상이한 농도로 TAM/MDSC와 공-배양하였다. 도 11에서, TLR7A가 상용되는 TLR7 작용제 (C1307)보다 산화 질소 증가에 더욱 효과적임을 알 수 있다.

[0210] 도 14에 나타난 바와 같이, 인 비트로에서 세 가지 PI3K 억제제의 TAM/MDSC에 의한 산화 질소 생산 감소 효과를 비교함으로써, GDC-0980가 TAM/MDSC에 의한 산화 질소 생산을 효과적으로 감소시킬 수 있는 최고의 후보임을 알 수 있다.

[0211] 실시예 8: 통계 분석

[0212] 값 사이의 통계적 유의성은 Student's t-테스트로 결정하였다. 모든 데이터는 평균 \pm SD로 나타났다. $p < 0.05$ 의 확률 값은 유의적인 것으로 고려되었다.

[0213] 실시예 9: M1 및 M2 대식세포의 비율

[0214] M1 및 M2 대식세포의 비율 (F4/80+CD86+: F4/80+CD206+)이 무처리 대조군, FA-TLR7 작용제군, FA-PI3K 억제제군, FA-튜블리신 및 조합군과 경쟁군에서 시험되었다.

[0215] 상기 방법 부분에서 기술된 바와 같이, 치료 연구의 끝에 종양 분해 후, 분리된 세포들을 F4/80 대식세포 마커 및 M1 (CD86), M2 (CD206) 마커로 염색하였다. 4T1 고형 종양에서 M1 및 M2 대식세포의 비율이 연구되었으며 도 25에 요약되었다. 종양 환경에서의 대식세포는 주로 종양 성장을 지원하고 면역 반응을 억제하는 M2 대식세포 기능으로 간주되어왔다. 반면에, M1 대식세포는 종양 세포를 제거하고 항-암 면역 반응을 자극할 수 있다고 간

주되어 왔다. 따라서, M1 및 M2 대식세포 비율을 연구하는 것이 FR- β 양성 TAM/MDSC를 표적화하는데 중요하다. 도 25에 나타난 바와 같이, 처리군 및 경쟁군의 M1 및 M2 대식세포 비율 (F4/80+CD86+ 세포 집단 대 F4/80+CD206+ 세포 집단)이 무처리 대조군의 비율과 비교되었다. 결과적으로, 세 가지 처리군 (FA-TLR7 작용제, FA-PI3K 억제제 및 조합)에서의 비율은 무처리 대조군에 비해 극적으로 증가하였으며 이 효과는 경쟁자 (FA-PEG-NH₂)의 추가 첨가에 의해 경쟁될 수 있다. 따라서, 4T1 고형 종양에서 FR+ TAM/MDSC를 표적화함으로써, 세 가지 클래스의 FA-컨쥬게이트된 MDSC가 면역억제 M2 대식세포 환경을 항-암 M1 대식세포 환경으로 전환시킬 수 있어, 종양의 느린 성장에 기여할 수 있는 것으로 결론지을 수 있다

[0216] 실시예 10: MDSC 집단

[0217] MDSC 집단 (CD11b+Gr1+)을 무처리 대조군, FA-TLR7 작용제군, FA-PI3K 억제제군, FA-튜블리신군 및 조합군과 경쟁군에서 시험하였다.

[0218] 상기 방법 부분에 기술된 바와 같이, 치료 연구의 끝에 종양 분해 후에, 분리된 세포들을 MDSC 마커 CD11b+Gr1+로 염색하였다. 도 26 참조. 오직 FA-TLR7 작용제군 및 조합군만이 극적으로 감소된 MDSC 집단을 나타냈다. FA-튜블리신 및 FA-PI3K 억제제 처리군에서 MDSC 집단은 무처리 대조군 및 경쟁군에 비해 차이를 나타내지 않았다. TLR7 작용제 처리 (FA-TLR7 작용제군 및 조합군)에서 MDSC 집단의 감소는 종양 생존을 억제하는 기능으로의 MDSC를 리프로그래밍한 결과일 수 있으며, 이는 MDSC의 표현형 변화를 야기할 수 있다. 인 비트로 데이터가 TAM/MDSC에 대한 튜블리신의 독성을 나타냈지만, 종양 세포가 독소 튜블리신의 존재하에 MDSC 생존을 지원할 수 있는 성장 인자 및 사이토카인을 방출할 수 있기 때문에 인 비보 종양 환경은 튜블리신의 사멸 기능을 억제할 수 있다. 결과적으로, FA-튜블리신 처리에 대해 MDSC 집단은 변하지 않았다. 그러나, 도 24, 25 및 26의 결과를 조합함으로써, FA-튜블리신군 및 FA-PI3K 억제제군에서의 TAM/MDSC의 기능 (아르기네이즈 수준) 및 종양 환경 (M1 및 M2 대식세포 비율)이 MDSC의 표현형의 변화 없이도 변경되었음을 알 수 있다.

[0219] 실시예 11: CD4 및 CD8 T 세포 집단의 백분율

[0220] 무처리 대조군, FA-TLR7 작용제군, FA-PI3K 억제제군, FA-튜블리신군, 조합군과 경쟁군에서 4T1 고형 종양으로 부터 분리된 생 세포(live cell)에서 CD4 및 CD8 T 세포 집단의 백분율이 시험되었다 (도 27 참조).

[0221] 엽산 SMDC 처리는 CD4+ T의 집단 증가에 CD8+ T 세포보다 더욱 현저한 효과가 있다. PI3K가 T 세포 증식 및 활성화에 중요하기 때문에, 조합군에서 CD4+ 및 CD8+ T 세포 모두가 무처리 대조군과 비교하여 다르거나 감소된 집단을 나타내지 않는 것이 언급되어야 한다.

[0222] 실시예 12: 인 비보 연구

[0223] FA-TLR7A의 용량 연구가 군 당 2 마리의 마우스를 포함하는 4T1 고형 종양 모델에서 수행되었다. 처리는 종양 이식 (피하, 5만 세포/마우스) 후 6일째에 시작하여 주에 5일 동안 다른 용량의 FA-TLR7A를 i.v. 주사함으로써 수행되었다. 처리는 2주 동안 지속되었다. 종양 부피는 매일 측정되었다. 이 연구에서, 엽산 수용체- β 와 TLR7 작용제를 통해 TAM/MDSC를 표적화함으로써, 종양 성장이 특히 5 nmol, 10 nmol 및 20 nmol의 군에서 느려진 것을 볼 수 있었다. 결과는 도 16 및 17에 나타났다.

[0224] FA-TLR7 작용제의 치료 연구가 군 당 3 마리의 마우스를 포함하는 4T1 고형 종양 모델에서 수행되었다. 처리는 종양 이식 (피하, 5만 세포/마우스) 후 6일째에 시작하여 주에 5일 동안 PBS 중의 10 nmol의 FA-TLR7A 100 μ l를 i.v. 주사함으로써 수행되었다. 처리는 2주 동안 지속되었다. 경쟁군은 동일한 스케줄로 200배 이상의 경쟁자 (FA-PEG-NH₂)와 FA-TLR7 작용제 10 nmol를 공동-주사함으로써 수행되었다. 총 주사 부피는 100 μ l였다. 종양 부피는 매일 측정되었다. 이 연구에서, 엽산 수용체- β 와 TLR7 작용제를 통해 TAM/MDSC를 표적화함으로써, 종양 성장이 느려진 것을 볼 수 있었다. 그리고 이 효과는 추가 FA-PEG-NH₂를 첨가함으로써 경쟁될 수 있어, 이는 FA-TLR7 작용제의 항-암 활성이 FR- β 를 통해 매개되는 것임을 확인할 수 있었다. 결과는 도 18에 나타났다.

[0225] FA-튜블리신의 치료 연구가 군 당 3 마리의 마우스를 포함하는 4T1 고형 종양 모델에서 수행되었다. 처리는 종양 이식 (피하, 5만 세포/마우스) 후 6일째에 시작하여 주에 5일 동안 PBS 중의 30 nmol의 FA-튜블리신 100 μ l를 i.v. 주사함으로써 수행되었다. 처리는 2주 동안 지속되었다. 경쟁군은 동일한 스케줄로 200배 이상의 경쟁자 (FA-PEG-NH₂)와 FA-FA-튜블리신 30 nmol를 공동-주사함으로써 수행되었다. 총 주사 부피는 100 μ l였다. 종양 부피는 매일 측정되었다. 이 연구에서, 엽산 수용체- β 와 튜블리신을 통해 TAM/MDSC를 표적화함으로써, 종양 성장이 느려진 것을 볼 수 있었다. 그리고 이 효과는 추가 FA-PEG-NH₂를 첨가함으로써 경쟁될 수 있어, 이는

FA-튜블리신의 항-암 활성이 FR- β 를 통해 매개되는 것임을 확인할 수 있었다. 결과는 도 19에 나타났다.

[0226] FA-PI3K 억제제의 치료 연구가 군 당 3 마리의 마우스를 포함하는 4T1 고형 종양 모델에서 수행되었다. 처리는 종양 이식 (피하, 5만 세포/마우스) 후 6일째에 시작하여 주에 5일 동안 PBS 중의 10 nmol의 FA-PI3K 억제제 100 μ l를 i.v. 주사함으로써 수행되었다. 처리는 2주 동안 지속되었다. 경쟁군은 동일한 스케줄로 200배 이상의 경쟁자 (FA-PEG-NH₂)와 FA-PI3K 억제제 10 nmol를 공동-주사함으로써 수행되었다. 총 주사 부피는 100 μ l였다. 종양 부피는 매일 측정되었다. 이 연구에서, 염산 수용체- β 와 FA-PI3K 억제제를 통해 TAM/MDSC를 표적화함으로써, 종양 성장이 느려진 것을 볼 수 있었다. 그리고 이 효과는 추가 FA-PEG-NH₂를 첨가함으로써 경쟁될 수 있어, 이는 FA-PI3K 억제제의 항-암 활성이 FR- β 를 통해 매개되는 것임을 확인할 수 있었다. 결과는 도 20에 나타났다.

[0227] FA-TLR7 작용제 및 비-표적화 PI3K 억제제 (BEZ235)의 조합 치료 연구가 군 당 3 마리의 마우스를 포함하는 4T1 고형 종양 모델에서 수행되었다. 처리는 종양 이식 (피하, 5만 세포/마우스) 후 6일째에 시작하여 주에 5일 동안 마우스 당 0.27 mg의 경구 투여BEZ235와 함께 PBS 중의 10 nmol의 FA-TLR7 작용제 100 μ l를 i.v. 주사함으로써 수행되었다. 처리는 2주 동안 지속되었다. 경쟁군은 동일한 스케줄로 200배 이상의 경쟁자 (FA-PEG-NH₂)와 마우스 당 0.27 mg의 경구 투여 BEZ235와 조합된 FA-TLR7 작용제 10 nmol를 공동-주사함으로써 수행되었다. 총 주사 부피는 100 μ l였다. 종양 부피는 매일 측정되었다. 이 연구에서, FA-TLR7 작용제 및 비-표적화 PI3K 억제제의 조합에 의해, 종양 성장이 현저히 느려진 것을 볼 수 있었다. 그리고 이 효과는 추가 FA-PEG-NH₂를 첨가함으로써 경쟁될 수 있어, 이는 조합 처리의 항-암 활성이 FR- β 를 통해 매개되는 것임을 확인할 수 있었다. 그러나, PI3K 억제제인 BEZ235를 도입함으로써, 조기 투여시 동물 체중이 감소와 같은 일정 독성이 관찰될 수 있다. 결과는 도 21에 나타났다.

[0228] FA-TLR7 작용제의 인 비보 치료 연구가 상기 언급한 바와 같이 수행되었다. PI3K 억제제 (BEZ235)의 비-표적화 요법이 유사한 투여 스케줄로 주 당 5일 동안 마우스 당 0.27 mg의 경구 투여함으로써 수행되었다. 연구는 2주 동안 지속되었다. 도 21 및 22를 비교함으로써, 종양 성장을 지연에 대한 시너지 효과가 조합 처리에서 나타났으며, 이는 TAM/MDSC와 TLR7 작용제 및 PI3K 억제제의 공배양에 의한 아르기네이즈 생산에 대한 시너지 효과에 대한 이전의 인 비트로 연구가 확인되었다. 결과는 도 22에 나타났다.

[0229] 도 23은 치료군에 대한 처리 마지막날의 평균 종양 부피를 나타낸다.

[0230] 실시예 13: PBMC로부터 인간 MDSC의 인 비트로 유도

[0231] 건강한 공여자 유래 인간 PBMC를 표준 절차에 따라 밀도 구배 원심분리를 함으로써 분리하였다:

[0232] 혈액을 PBS (1:2 희석)으로 희석하였다. 피콜(Ficoll) 15 ml을 50 ml 튜브에 옮겼다. 희석한 혈액 35 ml을 조심스럽게 피콜 배지 위에 두었다. 튜브를 400 g로 24°C에서 쉬지 않고 30분 동안 원심분리하였다. 원심분리를 멈춘 후, 레이어링을 흘뜨리지 않으면서 튜브를 원심분리기에서 조심스럽게 제거하였다. PBMC를 튜브에서 조심스럽게 제거하고 새 50 mL 코니칼 튜브로 옮겼다. 분리된 PBMC를 PBS로 세척하고 300 g에서 10분 동안 원심분리하였다. 상등액을 따라 내었다. 펠렛을 PBS로 다시 한 번 세척하고 200 g로 15분 동안 원심분리하였다. 분리된 PBMC는 혈구계산기(hemocytometer)로 계수하였다.

[0233] 분리된 PBMC를 무혈청 배지에서 4시간 동안 37°C에서 3×10^6 cell/ml의 밀도로 부착함으로써 추가로 정제하였다. 현탁 세포를 제거한 후, 부착된 PBMC를 IL-6 및 GM-CSF가 10 ng/ml 보충된 RPMI-1640 완전 배지에서 7일 동안 배양하였다. 그 후 인간 MDSC를 CD33+ 세포로서 유동(flow)으로 분리하였다. RPMI-1640 완전 배지에서 7일 동안 PBMC와 공-배양함으로써 정상 인간 대식세포를 분화시켰다.

[0234] 인간 MDSC를 선택한 약물과 함께 2일 동안 배양하였다. MDSC에 의해 생산된 IL-10을 측정하고 약물 농도에 대해 플로팅하였다. 인간 MDSC는 IL-10을 감소시키는 이들 약물들에 대해 유사한 반응을 나타냈으며, 이는 MDSC의 면역 억제제의 억제에 기여할 수 있다. 결과는 도 28에 나타났다.

[0235] 실시예 14: 인 비트로 인간 T 세포의 활성화 및 T 세포 억제제의 억제

[0236] 인간 PBMC는 실시예 13에 언급한 바와 같이 밀도 구배 원심분리로 분리하였다. 분리된 PBMC는 15ml 튜브에서 2% FBS 및 1mM EDTA를 포함하는 PBS 1 ml에 5×10^7 cells/ml 농도로 재-부유되었다. 인간 T 세포 농축 키트의 각테일 용액 50 μ l을 현탁액에 첨가하였다. 세포들을 RT에서 10분 동안 인큐베이션하였다. 자성 비드 (인간 T 세포

농축 키트) 50 μ l를 첨가하고 RT에서 5분 동안 인큐베이션하였다. T 세포 및 자성 비드가 든 튜브를 RT에서 5분 동안 자석(magnet)에 넣었다. 상등액에는 음성적으로 선택된 인간 T 세포가 함유되어 있으며, 이를 수집 및 계수하였다. 분리된 T 세포들을 1×10^6 cells/ml의 밀도로 IL-2 50 U/ml과 3일 동안 배양하였다. 그 후 세포 용액을 피펫으로 잘 혼합하고 비드를 제거하기 위해 자석 옆에 5분 동안 두었다. 억제 분석을 위해 활성화된 인간 T 세포를 함유하는 현탁액을 수집하였다.

[0237] 0.1 또는 1 μ M의 농도로 3 클래스의 약물들과 2일 동안 공-배양한 인간 MDSC을 활성화된 인간 T 세포와 8:1의 비율로 18시간 동안 혼합하였다. IFN- γ 의 생산을 T 세포 활성화 마커로서 측정하였다. 대식세포와 비교하여, MDSC는 50%의 T 세포 활성화 억제를 나타냈다. 0.1 μ M의 약물 농도에서, T 세포로부터 IFN- γ 생산의 유의미한 변화가 없었다. 그러나, 1 μ M의 농도에서, TLR7 작용제 처리된 MDSC는 T 세포 유래 IFN- γ 가 극적으로 증가된 것으로 나타나, MDSC의 억제 기능이 인 비트로 TLR7 작용제 자극에 의해 억제되거나 반전될 수 있음을 나타냈다. 결과는 도 29에 나타났다.

[0238] 실시예 15: 폐 전이 분석

[0239] 종양 크기가 50 mm³에 도달했을 때, 4T1을 이식한 Balb/c 마우스에 세 가지 클래스의 FA-컨쥬게이트를 2 주 동안 (7일/주) 처리하였다. 2주 처리 후, 동물을 안락사하고 폐를 콜라게네이즈 IV PBS 용액 (1 mg/ml) 5 ml로 2 시간 동안 37°C에서 분해하였다. 현탁액을 70 μ m 세포 여과기에 통과시켜 단일 세포 현탁액을 수득하였다. 세포들을 6-티오구아닌 60 μ M 을 함유하는 RPMI-1640 완전배지 10 ml로 10 내지 14일 동안 공-배양하였다. 배양 끝에 배지를 제거하였다. 세포들을 메탄올 5 ml로 5분 동안 상온에서 고정하였으며 DI 물로 1회 세척하였다. 세포를 염색하기 위해 메틸렌 블루 (0.03%, v/v) 5 ml를 상온에서 5분 동안 첨가하였다. 물로 세척한 후, 전이를 평가하기 위해 세포들을 기건하였다.

[0240] 4T1 세포들은 FA-컨쥬게이트 및 방출된 약물 모두에 저항성을 나타낸다. 따라서, FA-컨쥬게이트의 인 비보 항-암 활성이 면역 억제 기능을 억제 또는 리프로그래밍함으로써 FR- β 양성 골수 세포의 표적화에 기인한다고 생각될 수 있다. 결과는 도 30 및 도 31에 나타났다.

[0241] 향상된 치료 효과가 달성될 수 있는지를 확인하기 위해 FA-컨쥬게이트의 투여를 주 당 5일에서 주 당 7일로 변경하였다. 4T1 고형 종양으로의 FA-컨쥬게이트의 지속적인 투여는 종양 성장을 감소시킬 수 있다. 결과는 도 32에 나타났다.

[0242] MDSC/TAM를 표적화함으로써, 아르기네이즈 수준은 T 세포 억제의 제거에 기여할 수 있는 세 가지 처리군에서 극적으로 감소되었다. 결과는 도 33에 나타났다.

[0243] MDSC는 혈관신생 및 종양 세포 침습을 촉진하는 전-전이성 니치(pre-metastatic niche) 형성에 참여함으로써 종양 전이의 촉진에 직접적으로 연루되었다. 우리의 가설은 MDSC/TAM의 제거가 암 전이를 방지한다는 것이다. 이전의 연구는 TLR7 자극/PI3K 억제가 MDSC 집단을 감소시키거나, 또는 면역 억제 MDSC/TAM를 M1 유사 대식세포로 전환시키거나, 또는 아르기네이즈 및 IL-10과 같은 면역 억제 기능을 억제할 수 있는 것으로 나타났다. 결과적으로, T 세포 활성화가 촉진될 수 있고 전신 면역이 향상될 수 있다. 전이 데이터는 무처리 질병 대조군에 비해 치료군에서 감소된 폐 전이를 나타냈다. 결과는 도 34 및 35에 나타났다.

[0244]

[0245] 실시예 16: 생존 연구

[0246] Balb/c 마우스는 5×10^4 cells s.q로 이식되었다. 종양 크기가 ~50 mm³에 도달했을 때 FA-컨쥬게이트 처리가 시작되었으며 주 당 7일로 2주 동안 지속되었다. 종양 크기가 150-200 mm³에 도달했을 때 종양을 수술로 제거하였다. 동물 생존이 모니터링되었다.

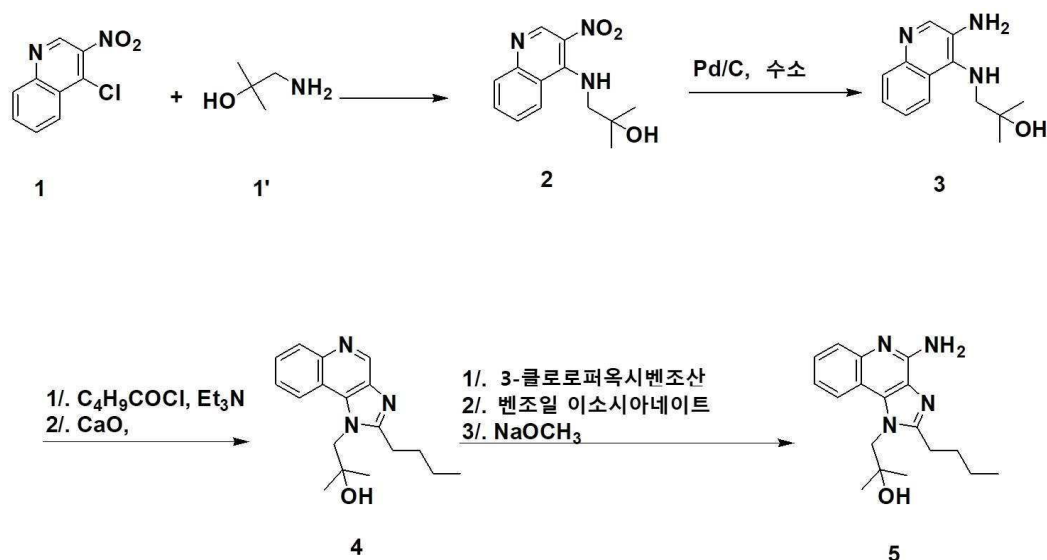
[0247] MDSC/TAM를 표적화하기 위해, 종양 크기가 50 mm³에 도달했을 때 4T1 고형 종양을 가진 마우스에 FA-컨쥬게이트를 처리하였다. 종양 크기가 150-200 mm³에 도달했을 때 종양을 제거하였다. 처리는 총 2주 동안 지속되었다 (주 당 7일). 마우스의 생존이 모니터링되었다. MDSC/TAM의 면역 억제 기능의 제거 후, 동물 생존이 현저히 증가된 것을 볼 수 있었다. 이 연구는 동물 생존 및 혈청 사이토카인을 모니터링하기 위해 여전히 진행 중이다. 결과는 도 36 및 도 37에 나타났다.

[0248] 화학 실시예

[0249] 실시예 1: TLR7 작용제 (TLR7A)의 합성

[0250] TLR7 작용제 (TLR7A)는 Nikunj M. Shukla, Cole A. Mutz, Subbalakshmi S. Malladi, Hemamali J. Warshakoon, Rajalakshmi Balakrishna, and Sunil A. David, 'Regioisomerism-dependent TLR7 agonism and antagonism in an imidazoquinoline; Structure-Activity Relationships in Human Toll-Like Receptor 7-Active Imidazoquinoline Analogues', J Med Chem. 2012 Feb 9; 55(3): 1106-1116에 보고된 바와 같이 반응식 1의 절차에 따라 합성되었다.

[0251] 반응식 1



[0252] 단계 1: 1-아미노-2-메틸프로판-2-올 (화합물 1')의 합성

[0254] 2,2-디메틸옥시란 (0.1 g, 1.388 mmol)을 얼음 냉각된 암모늄 하이드록사이드 용액에 적가하였다. 반응 혼합물을 상온에서 12 시간 동안 교반하였다. 용매를 진공 하에 제거하였으며 잔류물을 메탄올에 용해하였다. Di-tert-부틸 카보네이트 (0.75 g, 3.47 mmol)를 반응 혼합물에 첨가한 후 4시간 동안 교반하였다. 혼합물을 컬럼 크로마토그래피 (24% EtOAc/헥산)를 이용하여 정제하여 tert-부틸 2-하이드록시-2-메틸프로필카바메이트를 수득하였다. 순수한 tert-부틸 2-하이드록시-2-메틸프로필카바메이트를 트리플루오로아세트산 5 mL에 용해하고 35분 동안 교반하였다. 용매를 감압하에 제거하여 트리플루오로아세트산 염 1'으로서 1-아미노-2-메틸프로판-2-올을 얻었다. ¹H NMR 500 MHz (500 MHz, CDC13, δ in ppm): δ 8.62 (s, 2H), 3.02 (d, 2H), 2.06-2.04 (m, 2H), 1.37-1.34 (s, 6H).

[0255] 단계 2: 2-메틸-1-(3-나이트로퀴놀린-4-일아미노)프로판-2-올 (화합물 2)의 합성

[0256] 1-아미노-2-메틸프로판-2-올 (화합물 1')의 트리플루오로아세트산 염 (450 mg, 2.4 mmol)을 톨루엔 및 2-프로판올의 4:1 혼합물 중의 4-클로로-3-나이트로퀴놀린 (화합물 1) (250 mg, 1.2 mmol) 및 Et₃N (0.5 ml, 3 mmol)의 용액에 첨가하였다. 혼합물을 고체가 침전하기 시작할 때까지 70℃로 반 시간 동안 가열하였다. 그 후 반응 혼합물을 냉각, 여과, 톨루엔/2-프로판올 (7:3), 에테르 및 차가운 물로 세척하였다. 잔류물을 80℃에서 건조하여 2-메틸-1-(3-나이트로퀴놀린-4-일아미노)프로판-2-올 (화합물 2)을 수득하였다. LCMS: [M+H]⁺ m/z=261.

[0257] 단계 3: 1-(3-아미노퀴놀린-4-일아미노)-2-메틸프로판-2-올 (화합물 3)의 합성

[0258] 2-메틸-1-(3-나이트로퀴놀린-4-일아미노)프로판-2-올 (화합물 2) (450 mg, 1.72 mmol)을 메탄올에 용해시켰으며 상에서 촉매로서 수소 풍선으로 4시간 동안 수소화하였다. 그 후 용액을 셀라이트를 이용하여 여과한 후, 감압하에 용매를 증발시켜 1-(3-아미노퀴놀린-4-일아미노)-2-메틸프로판-2-올 (화합물 3)을 수득하였다. LCMS: [M+H]⁺ m/z=231. ¹H NMR 500 MHz (CDC13, δ in ppm): δ 8.12 (s, 1H), 7.61-7.58 (m, 1H), 7.48-7.40 (m, 2H), 4.90 (s, 2H), 3.47 (2H), 1.35-1.21 (s, 6H).

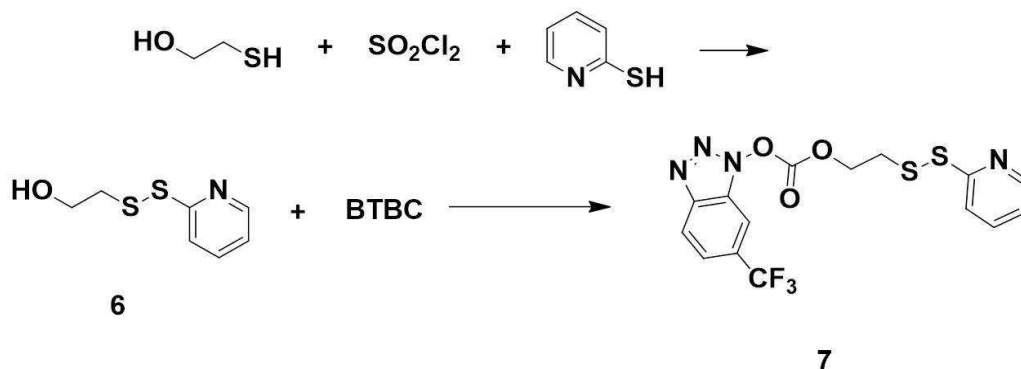
[0259] 단계 4: 1-(4-아미노-2-부틸-1H-이미다조[4,5-c]퀴놀린-1-일)-2-메틸프로판-2-올 (화합물 5, TLR7A)의 합성

[0260] 무수 THF 중의 화합물 3 (100 mg, 0.43 mmol) 용액에 트리에틸아민 (66 mg, 0.65 mmol) 및 발레릴 클로라이드 (62 mg, 0.52 mmol)를 첨가하였다. 그 후 반응 혼합물을 6-8시간 동안 교반한 뒤, 진공 하에서 용매를 제거하였다. 잔류물을 EtOAc에서 용해시키고, 물 및 염수로 세척하였으며, 그 후 Na₂SO₄ 상에서 건조하여 중간체 아마이드 화합물을 수득하였다. 이를 MeOH에 용해시킨 후, 칼슘 옥사이드를 첨가하였으며, 마이크로웨이브에서 110℃로 1시간 동안 가열하였다. 그 후 용매를 제거하였으며 잔류물을 컬럼 크로마토그래피 (9% MeOH/디클로로메탄)를 이용하여 정제하여 화합물 4 (58 mg)를 수득하였다. MeOH:디클로로메탄:클로로폼 (0.1:1:1)의 혼합 용매 중의 화합물 4 용액에 3-클로로퍼옥시벤조산 (84 mg, 0.49 mmol)을 첨가하였으며, 용액을 45-50℃에서 40분 동안 환류하였다. 그 후 용매를 제거하고 잔류물을 컬럼 크로마토그래피 (20% MeOH/디클로로메탄)를 이용해 정제하여 옥사이드 유도체 (55 mg)를 수득하였다. 그 후 이를 무수 디클로로메탄에 용해시킨 뒤, 벤조일 이소시아네이트 (39 mg, 0.26 mmol)를 첨가하고 45℃에서 15분 동안 가열하였다. 그 후 용매를 진공 하에서 제거하고, 잔류물을 무수 MeOH에 용해시킨 뒤, 초과 소듐 메톡사이드를 첨가하였다. 그 후 반응 혼합물을 80℃에서 한 시간 동안 가열하였다. 용매를 진공 하에서 제거하고, 잔류물을 컬럼 크로마토그래피 (11% MeOH/디클로로메탄)를 이용해 정제하여 화합물 5를 수득하였다. LCMS: [M+H]⁺ m/z=312. ¹H NMR 500 MHz (CDCl₃, δ in ppm): δ 8.16-8.15 (d, 1H), 7.77-7.46 (d, 1H), 7.46-7.43 (m, 1H), 7.33-7.26 (m, 1H), 3.00-2.97 (m, 2H), 1.84-1.78 (m, 2H), 1.47-1.41 (m, 2H), 1.36 (s, 6H), 0.98-0.95 (m, 3H).

[0261] 실시예 2: 헤테로이작용기(Heterobifunctional) 다이설파이드(Disulfide) 링커 (화합물 7)의 합성

[0262] 헤테로이작용기 다이설파이드 링커 (화합물 7)는 Satyam A., 'Design and synthesis of releasable folate-drug conjugates using a novel heterobifunctional disulfide-containing linker', Bioorg. Med. Chem. Lett. 2008 Jun 1;18(11):3196-9에 기술된 절차에 따라 반응식 2에 나타난 바와 같이 합성되었다.

[0263] 반응식 2



[0264]

[0265] 단계 1: 헤테로이작용기 다이설파이드 링커 (화합물 7)의 합성

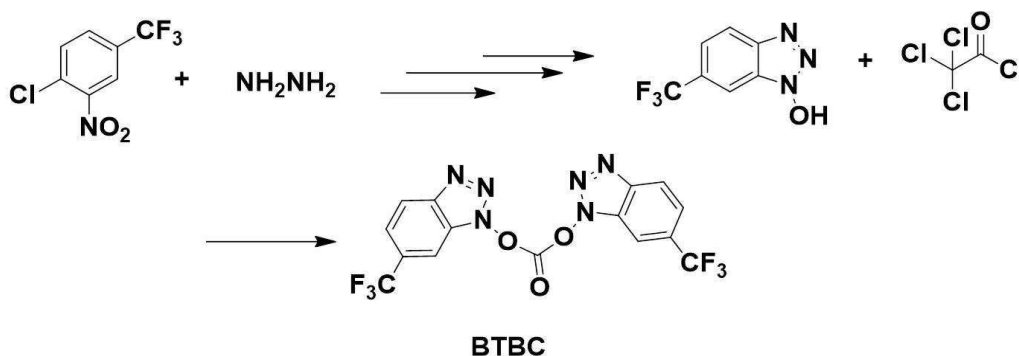
[0266] 설퍼릴 클로라이드 (메틸렌 클로라이드 중의 1M 용액 25 mL)을 건식 메틸렌 클로라이드 25 mL 중의 2-머캅토프로피리딘 (2.5 g, 22.5 mmol) 용액에 0-5℃에서 20분에 걸쳐 질소 대기 하에 첨가하였다. 황색 고체가 침전되었다. 혼합물을 상온에서 2시간 동안 교반하였으며 로타랩(rotavap)으로 농축하였고, 이렇게 하여 얻은 과립 고체를 건식 메틸렌 클로라이드 50 mL에 넣고 얼음-수조에서 냉각시켰다. 0-5℃에서 질소 대기하에 이 교반된 현탁액에 건식 메틸렌 클로라이드 30 mL 중의 2-머캅토포에탄올 (1.7 mL, 24.2 mmol) 용액을 5분에 걸쳐 첨가하였다. 초기에, 현탁액이 용해되어 투명한 용액을 형성하였다. 그러나, 15-20분 이내로, 담황색 과립 고체가 분리되기 시작하였다. 혼합물을 상온에서 하룻밤 동안 교반하였다. 침전물을 여과, HPLC 급 메틸렌 클로라이드로 세척, 및 진공 건조기로 몇 시간 동안 건조하였다. 화합물 (화합물 6)의 유리 염기가 메틸렌 클로라이드 중의 이의 하이드로클로라이드 염의 현탁액을 동몰량보다 조금 더 많은 디메틸아미노피리딘과 혼합하고 메틸렌 클로라이드 중의 5% 메탄올을 용리액(eluant)으로서 이용한 실리카겔의 짧은 컬럼을 통해 통과함으로써 유리할 수 있다. 아세트나이트릴 10 mL 중의 화합물 6 (유리 염기, 1 g, 5.4 mmol)의 용액을 교반된 아세트나이트릴 50 mL중의 BTBC (2.5 g, 5.7 mmol) 용액에 2분에 걸쳐 상온에서 첨가하였다. 혼합 결과물을 상온에서 38시간 동안 교반하였다. 혼합물을 진공 하에 농축하고 잔류물을 에틸아세테이트 (50 mL) 및 1N NaHCO₃ (25 mL) 사이에서 분배하였다. 유기층이 분리되었으며, 추가로 1N NaHCO₃ (10 mL)로 세척되고, 건조되었으며 (무수 Na₂SO₄), 여과 및 진공

에서 농축되어 화합물 7을 얻었다. LCMS: $[M+H]^+$ $m/z=416$. 1H NMR 500 MHz (CDCl₃, δ in ppm): δ 8.38-8.32 (m, 3H), 8.09-8.07 (m, 1H), 7.77-7.75 (m, 1H), 7.70-7.69 (m, 1H), 7.14-7.13 (m, 1H), 4.81-4.78 (m, 2H), 3.33-3.31 (m, 2H).

[0267] 실시예 3: BTBC (화합물 8)의 합성

[0268] BTBC가 Takeda, K.; Tsuboyama, K.; Hoshino, M.; Kishino, M.; Ogura, H. 'A Synthesis of a New Type of Alkoxy-carbonylating Reagents from 1,1-Bis[6-(trifluoromethyl)benzotriazolyl] Carbonate (BTBC) and Their Reactions', Synthesis, 1987, 557-560에 기술된 절차에 따라 반응식 3에 나타난 바와 같이 합성되었다.

[0269] 반응식 3



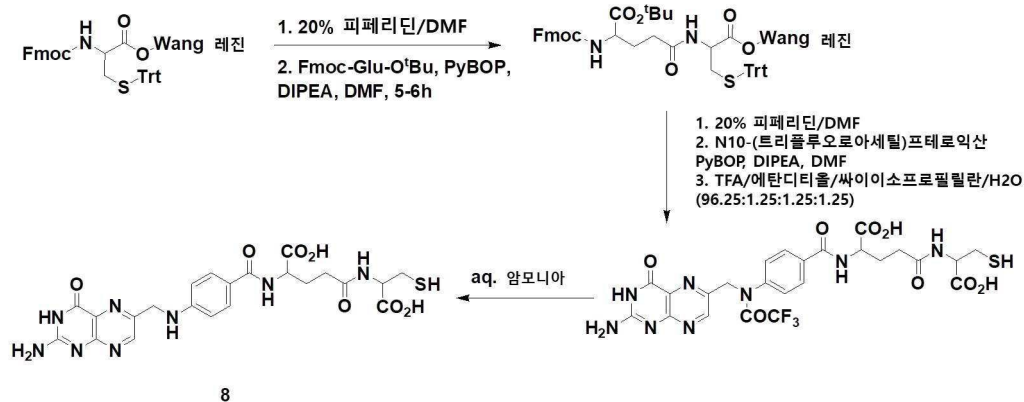
[0270]

[0271] 99% 에탄올 (20 mL) 중의 4-클로로-3-나이트로-*a,a,a*-트리플루오로톨루엔 (2.5 g, 0.011 mol) 및 하이드라진 하이드레이트 (1.65 g, 0.033 mol)의 혼합물이 24시간 동안 환류되었다. 감압 하에 용매를 제거한 후, 잔류물을 수용성 Na₂CO₃ 용액에 용해시켰다. 용액을 에테르로 세척하여 출발 물질을 제거하고 농축 HCl로 산성화하여 산물을 침전시켰으며, 이를 물로 세척하고 건조시켜 1-하이드록시-6-(트리플루오로메틸)벤조트리아졸을 수득하였다. 건조 에테르 (50 mL) 중의 1-하이드록시-6-(트리플루오로메틸)벤조트리아졸 (1 g, 5 mmol)의 교반된 용액에 트리클로로메틸클로로포메이트 (0.26 g, 1.23 mmol)를 상온에서 첨가하였다. 10분 후, 추가 수량의 트리클로로메틸클로로포메이트 (0.26 g, 1.23 mmol)를 혼합물에 첨가하였고 1시간 동안 부드럽게 환류하였으며, 형성된 침전물을 수집하고 건조 에테르로 세척하였다. BTBC의 거의 순수한 결정체가 수득되었다. LCMS: $[M+H]^+$ $m/z=432$.

[0272] 실시예 4: 고상 합성에 의한 엽산(folic acid)-시스테인 (화합물 9)의 합성

[0273] H-Cys(Trt)-2-클로로트리틸 레진 (100 mg)를 디클로로메탄 12 mL에 분산시켰으며 아르곤으로 10분 동안 기포화하였다. 디클로로메탄을 제거한 후, DMF 10 mL을 첨가하였으며 5분 동안 기포화하였다. DMF 중의 20% 피페리딘 용액 5 mL을 10분씩 3회 첨가하였다. 레진을 DMF 10 mL로 5분씩 3회 세척되었다. 레진을 세척하기 위해 이소프로판올 10 mL을 5분씩 3회 첨가하였다. 수 분 동안 기건한 후, 유리 아민을 블루 비드를 갖는 고형 합성 모니터 키트(solid synthesis monitor kit)로 테스트하였으며, 아민의 완전한 탈보호를 나타냈다. DMF에 용해된 Fmoc-Glu-OtBu (64 mg, 0.15 mol), DIPEA (0.105 mL, 0.6 mol), PyBOP (79 mg, 0.15 mol)를 DMF 용액 중의 비드에 첨가하였다. 반응 5-6 시간 후, DMF/IPA로 3회 세척을 반복 수행하였다. 아민의 탈보호는 20% 피페리딘 DMF 용액 5 mL을 3회 첨가함으로써 수행되었다. DMF로 3회 세척한 후, N10-(트리플루오로아세틸) 프테로산 (62 mg, 0.15 mol), DIPEA (0.105 mL, 0.6 mol), PyBOP (79 mg, 0.15 mol)을 함유하는 DMF 용액 2 mL이 DMF 용액 중의 비드에 첨가되었다. 반응은 아르곤 하에서 5-6시간 동안 지속되었다. 레진으로부터 화합물을 절단하기 위해 96.25/1.25/1.25/1.25의 부피 비로 혼합된 TFA/에탄디올/티이소프로필실란/H₂O 용액 8 mL을 30분씩 3회 첨가하였다. 트리플루오로아세틸-보호된 화합물 8을 HPLC를 통해 정제하였다. 암모늄 용액 (5 mL, 0.5 M)으로 2시간 동안 상온에서 트리플루오로아세틸기를 탈보호 후 화합물 8을 수득하였다. LCMS: $[M+H]^+$ $m/z=544$.

[0274] 반응식 4

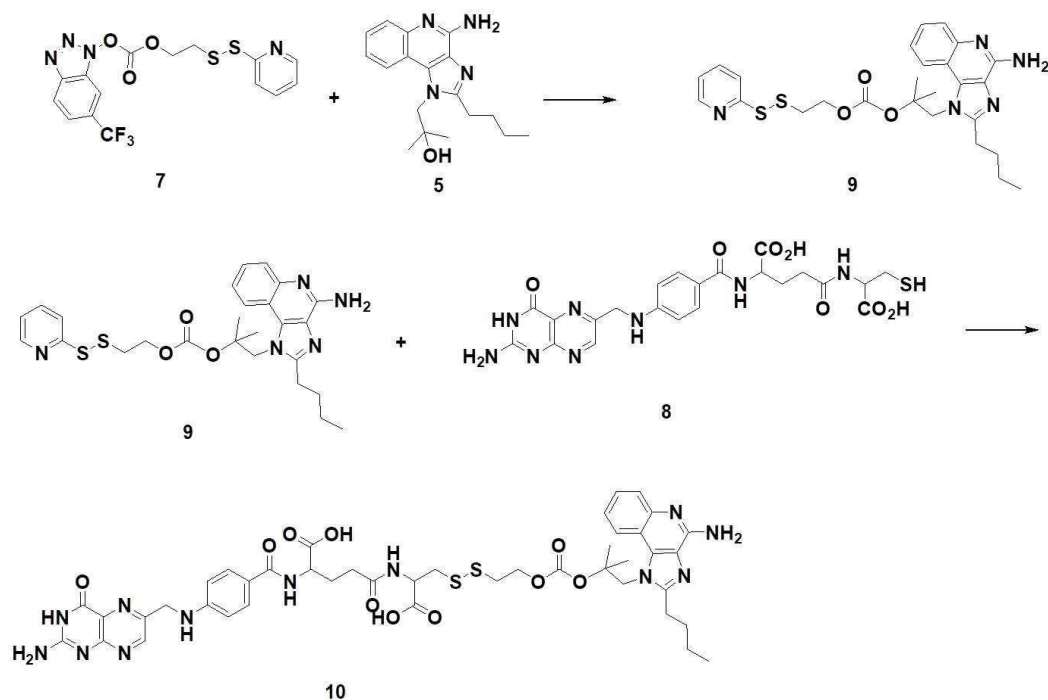


[0275]

[0276] 실시예 5: TLR7 작용제 (TLR7A)의 엽산(folic acid) 컨쥬게이트의 합성

[0277] TLR7 작용제 (TLR7A)의 엽산(folic acid) 컨쥬게이트는 반응식 5에 나타난 바와 같이 합성되었다.

[0278] 반응식 5



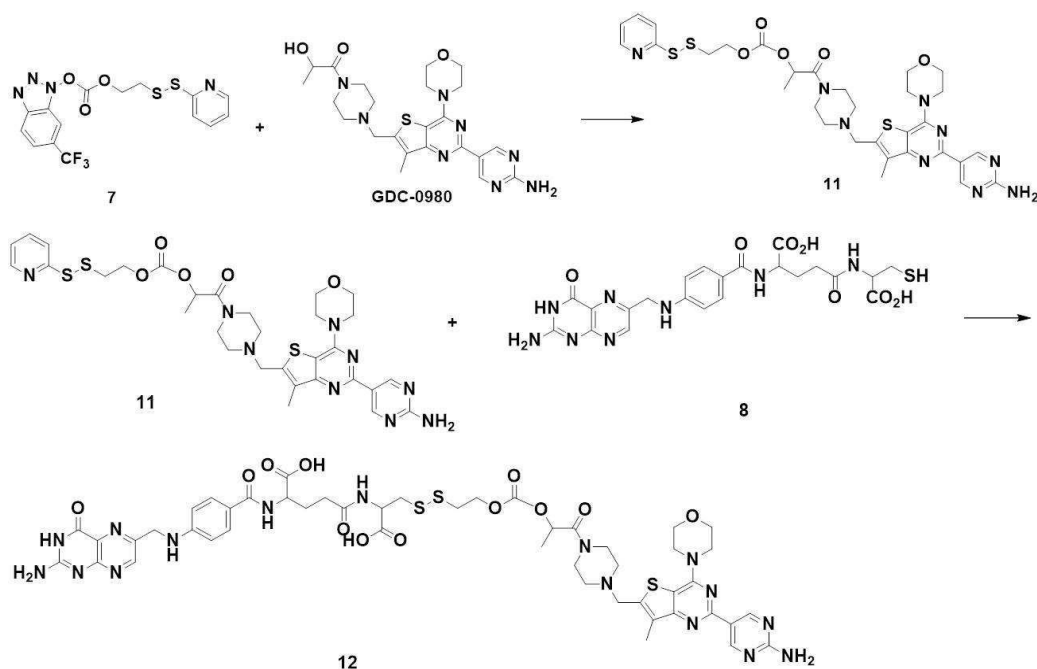
[0279]

[0280] 헤테로이작용기 링커 7 (88 mg, 0.213 mmol)를 메틸렌 클로라이드 4 mL 중의 화합물 5 (33 mg, 0.106 mmol) 및 디메틸아미노피리딘 (39 mg, 0.319 mmol) 용액에 상온에서 질소 대기하에 첨가하고 혼합물을 환류 온도에서 7시간 동안 교반하였으며 이 때 혼합물의 TLC 분석은 >80%의 전환율을 나타냈다. 에틸렌 클로라이드 중의 10% 아세트로나이트릴을 용리액으로서 이용한 컬럼 크로마토그래피로 혼합물을 농축하고 정제하였다. 순수한 산물 화합물 9가 담황색 고체로서 수득되었다. DMSO 중의 화합물 8 (1 eq.) 용액이 20분 간격으로 디메틸아미노피리딘 (1 eq.)과 DMSO 중의 약물-링커 중간체 화합물 9 (1.0-1.5 eq.)의 용액에 3 부분으로 첨가되었다. 아르곤 하에 RT에서 1-2 시간의 교반 후에, 혼합물의 LCMS 분석은 주 산물로서 원하는 엽산-약물 컨쥬게이트 (화합물 10)의 형성을 나타냈다. 혼합물은 분취용 HPLC로 정제되었다. LCMS: $[M+H]^+$ m/z=959.

[0281] 실시예 6: FA-PI3K 억제제 (화합물 12)의 합성

[0282] PI3K 억제제 (GDC-0980)의 엽산(folic acid) 컨쥬게이트는 반응식 6에 나타난 바와 같이 합성되었다.

[0283] 반응식 6

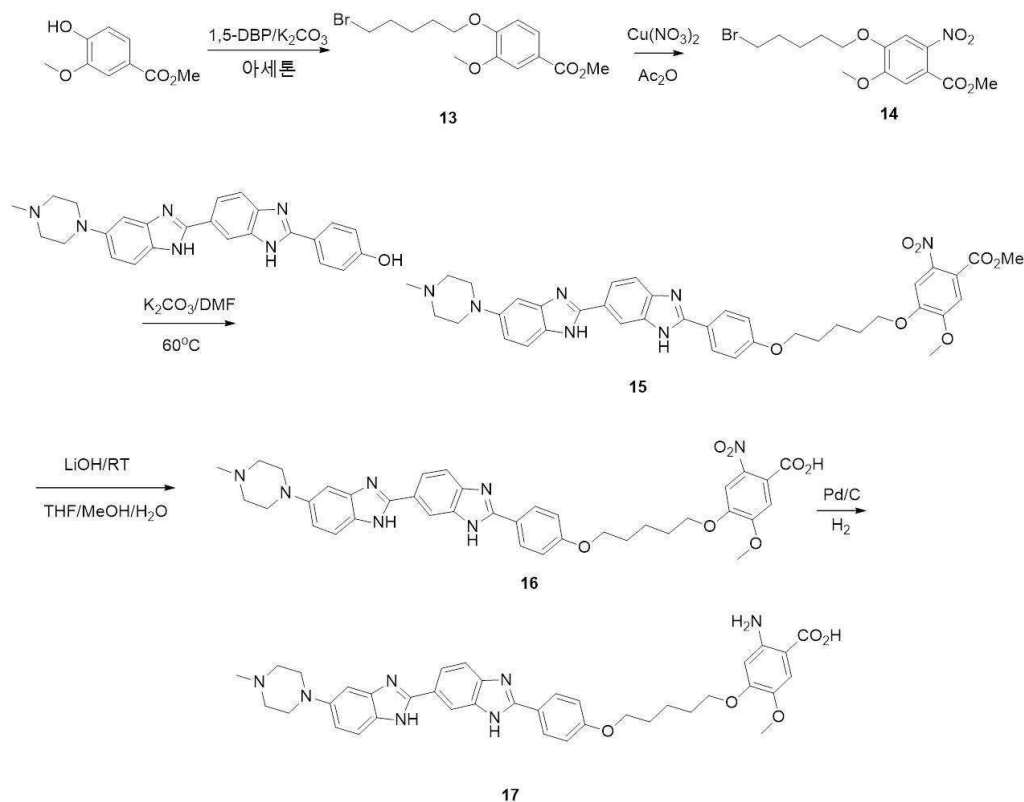


[0284]

[0285]

헤테로이작용기 링커 7 (50 mg, 0.12 mmol)를 메틸렌 클로라이드 4 mL 중의 GDC-0980 (5 mg, 0.01 mmol) 및 디메틸아미노피리딘 (5 mg, 0.03 mmol) 용액에 질소 대기하에 RT에서 첨가하였으며 혼합물을 환류 온도에서 7시간 동안 교반하였고 이 때 혼합물의 TLC 분석은 >80%의 전환율을 나타냈다. 에틸렌 클로라이드 중의 10% 아세트나이트릴을 용리액으로서 이용한 컬럼 크로마토그래피로 혼합물을 농축하고 정제하였다. 순수한 산물 화합물 9가 담황색 고체로서 수득되었다. DMSO 중의 화합물 8 (1 eq.) 용액이 20분 간격으로 디메틸아미노피리딘 (1 eq.)와 DMSO 중의 약물-링커 중간체 화합물 11 (1.0-1.5 eq.)의 용액에 3 부분으로 첨가되었다. 아르곤 하에 RT에서 1-2 시간의 교반 후에, 혼합물의 LCMS 분석은 주 산물로서 원하는 염산-약물 컨쥬게이트 화합물 12의 형성을 나타냈다. 혼합물은 분취용 HPLC로 정제되었다. LCMS: $[M+H]^+$ m/z=1145.

[0286] 실시예 7: FA-PBD 억제제 (화합물 25)의 합성



[0287]

[0288]

페놀 화합물 (2.20 g, 12.1 mmol)을 아세톤 (Na_2SO_4 패드를 통해 건조된, 48.4 mL)에 용해시켰고 이 용액을 1,5-디브로모펜탄 (49.4 mL, 36.3 mmol) 및 K_2CO_3 (6.69 g, 48.4 mmol)에 첨가하였다. 반응물을 Ar 하에서 6시간 동안 환류 가열하였다. 반응물을 RT로 냉각시키고 고체를 여과하였다. 여과물을 농축하고 CombiFlash로 0-30% EtOAc/p-에테르에서 정제하여 고체로서 화합물 13 (3.3893 g, 수율 84.5%)를 수득하였다. LCMS: $[M+H]^+$ m/z = 331. 1H NMR ($CDCl_3$, δ in ppm): 7.65 (dd, J = 8.5, 2.0 Hz, 1H), 7.54 (d, J = 2.0 Hz, 1H), 6.86 (d, J = 8.50 Hz, 1H), 4.08 (t, J = 6.50 Hz, 2H), 3.91 (s, 3H), 3.89 (s, 3H), 3.44 (t, J = 6.5 Hz, 2H), 1.95 (m, 4H), 1.65 (m, 2H).

[0289]

Ac_2O (52 mL) 중의 화합물 13 (3.3893 g, 10.23 mmol)을 $0^\circ C$ 까지 냉각시키고 느린 첨가로 $Cu(NO_3)_3H_2O$ (2.967 g, 12.28 mmol)를 처리하였다. 반응물은 $0^\circ C$ 에서 1시간 동안, 그 후 RT에서 2시간 동안 교반되었다. 반응이 완료된 후, 반응 혼합물을 얼음물에 붓고 1시간 동안 교반하였다. 그에 따른 침전물을 여과로 수집하였다. 산물을 물 (3 x)로 세척하였고 화합물 14 (3.7097 g, 수율 96%)로서 기건되었다. LCMS: $[M+H]^+$ m/z = 376. 1H NMR ($CDCl_3$, δ in ppm): 7.41 (s, 1H), 7.05 (s, 1H), 4.08 (t, J = 6.50 Hz, 2H), 3.94 (s, 3H), 3.89 (s, 3H), 3.42 (t, J = 7.0 Hz, 2H), 1.93 (m, 4H), 1.63 (m, 2H).

[0290]

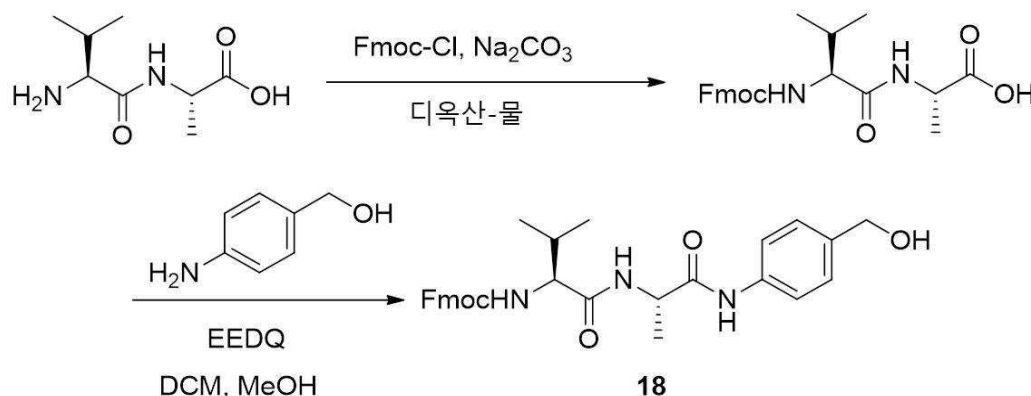
Ar 하에 DMF (1.5 mL) 중의 화합물 14 (37.6 mg, 0.1 mmol) 및 흑스트 염료 (53.3 mg, 0.1 mmol)의 용액에 K_2CO_3 를 rt에서 처리하였다. 반응물을 $60^\circ C$ 로 가열하고 하룻밤 동안 유지하였다. 그 후 반응물을 rt로 냉각하고 고체를 여과하였다. 잔류물을 Prep-HPLC (이동상 A: 50 mM NH_4HCO_3 버퍼, pH 7.0; B = ACN. 방법: 30분에 10-100 B%)로 정제하여 화합물 15 (13.1 mg, 수율 18%)를 얻었다. LCMS: $[M+H]^+$ m/z = 720.71.

[0291]

화합물 15 (13.1 mg, 0.0182 mmol)를 THF/MeOH/H₂O (3/1/1, 0.2 mL)에 용해시키고 aq. LiOH 용액 (1 M, 36 μ L)으로 4시간 동안 rt에서 Ar 하에 처리하였다. 대부분의 용매를 진공에서 제거하고 수상을 농축 HCl로 pH 2-3로 산성화하였으며, 침전물을 여과함으로써 고체 (화합물 16, 12.8 mg, 정제 없이)로 수집하였다. 여과물을 물 (3 x)로 세척하였고 다음 단계를 위해 기건하였다. LCMS: $[M+H]^+$ m/z = 706.

[0292]

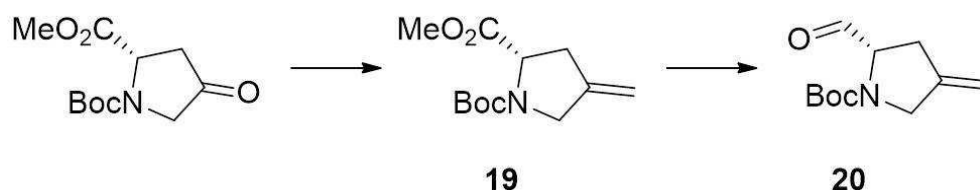
MeOH (10 mL) 중의 화합물 16 (15.7 mg, 0.022 mmol)을 Parr shaker (10% 습식 Pd/C, 5% wt, 7.85 mg, H₂ 41 PSI)에서 2시간 동안 수소화하였다. 셀라이트 패드를 통해 여과하여 산물을 분리하였다. 용매를 진공에서 제거하여 조 화합물 17을 얻었다, LCMS: [M+H]⁺ m/z = 676.79.



[0293]

[0294]

물 (40 mL) 중의 Val-Ala-OH (1 g, 5.31 mM) 용액에 Na₂CO₃ (1.42 g, 13.28 mM)를 첨가하고 디옥산(dioxane) (40 mL)을 첨가하기 전에 0°C로 냉각되었다. 디옥산 (40 mL) 중의 Fmoc-Cl (1.44 g, 5.58 mM) 용액이 10 분 동안 0°C에서 적가되었다. 반응 혼합물을 0°C에서 2시간 동안 교반한 후, RT에서 16시간 동안 교반하였다. 디옥산을 진공 하에 제거하고, 반응 혼합물을 물 (450 mL)로 희석하였으며, 1N HCl를 이용하여 pH를 2로 조정하고 EtOAc (3 x 250 mL)로 추출하였다. 합쳐진 유기층을 염수로 세척하고, MgSO₄ 상에서 건조하고, 여과하고, 감압 하에 농축하고 건조하여 Fmoc-Val-Ala-OH를 수득하였다. 이 산물을 건식 DCM (25 mL)에 현탁하고 PABA (0.785 g, 6.38 mM) 및 EEDQ (1.971 g, 7.97mM)가 첨가되었다. 그에 따른 혼합물을 투명한 용액이 얻어질 때까지 아르곤 하에서 메탄올로 처리하였다. 반응물을 하룻밤 동안 교반하고 여과하였다. 여과물을 디에틸 에테르 (4x)로 세척하고 고진공 하에서 건조하여 화합물 18 (1.85 g, 68%)을 수득하였다. ¹H NMR (500 MHz, CD₃OD): δ 7.79 (d, J₁= 8.0 Hz, 2H), 7.65 (t, J₁= 7.0 Hz, J₂= 7.5 Hz, 2H), 7.54 (d, J₁= 8.0 Hz, 2H), 7.38 (t, J₁= 7.5 Hz, J₂= 7.5 Hz, 2H), 7.33-7.24 (m, 4H), 4.54 (s, 2H), 4.48 (q, J₁= 14.0 Hz, J₂= 7.0 Hz, 1H), 4.42-4.32 (m, 2H), 4.22 (t, J₁= 7.0 Hz, J₂= 6.5 Hz, 1H), 3.94 (d, J₁= 7.0 Hz, 1H), 2.07 (m, 1H), 1.43 (d, J₁= 7.5 Hz, 3H), 0.97 (d, J₁= 7.0 Hz, 3H), 0.95 (d, J₁= 7.0 Hz, 3H); LCMS (ESI): (M + H)⁺ = C₃₀H₃₃N₃O₅에 대한 계산 값, 516.24; 실재값 516.24



[0295]

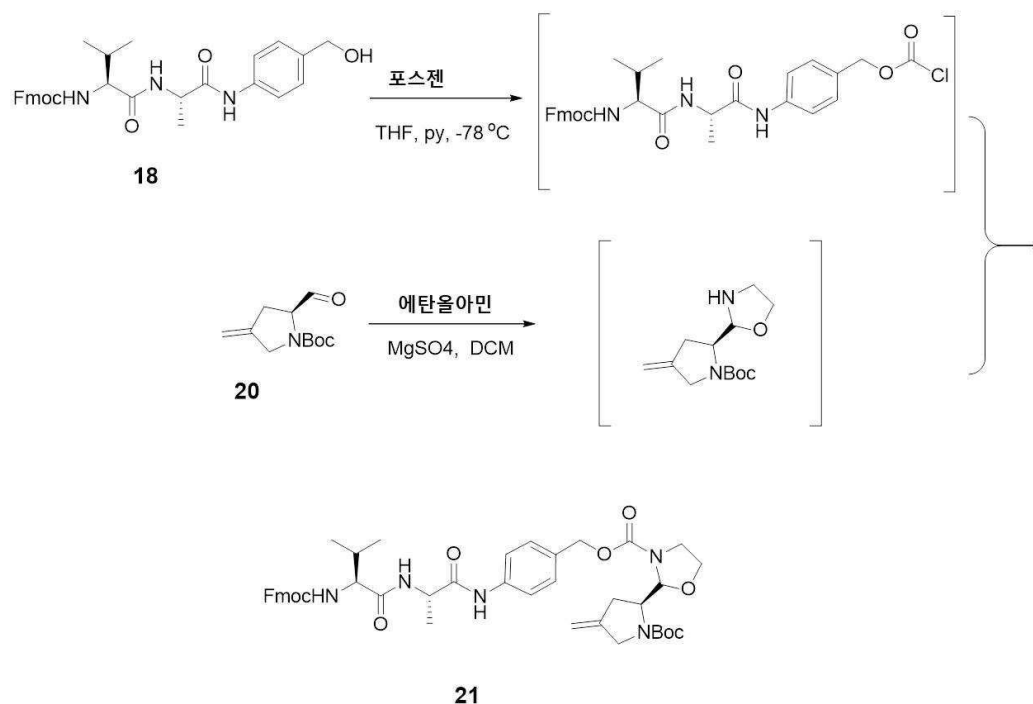
[0296]

화합물 19. 비티히 반응(Wittig reaction)에 의해 (S)-1-tert-부틸 2-메틸 4-옥소피롤리딘-1,2-디카복실레이트를 화합물 19로 전환하였다. THF (30 mL) 중의 Ph₃PCH₃Br (917.8 mg, 2.57 mmol)는 0°C에서 KO^tBu (THF 중에 1 M, 2.57 μL, 2.57 mmol)를 적가 처리되었다. 반응은 주위 온도에서 2시간 동안 유지되었다. 교반된 용액에 THF 20 mL 중의 케톤 (250 mg, 1.028 mmol)이 0-10°C에서 첨가되었다. 그 후 반응물은 주위 온도에서 하룻밤 동안 교반되었다. 반응을 H₂O/EtOAc (1:1, 40 mL)로 킨칭하고 대부분의 THF를 감압하에 제거하였다. 수상을 EtOAc (20 mL, 3 x)로 추출하고 유기상을 H₂O, 및 염수로 순차적으로 세척하고 무수 Na₂SO₄ 상에서 건조하여 농축하였다. 잔류물을 CombiFlash로 0-50% EtOAc/페트롤륨 에테르에서 정제하여 화합물 19 (77.2 mg, 31%)를 얻었다. LCMS: [M-Boc+H]⁺ m/z =142.

[0297]

화합물 20. DCM/톨루엔 (1:3, 9.8 mL) 중의 (S)-1-tert-부틸 2-메틸 4-메틸렌피롤리딘-1,2-디카복실레이트 (353.2 mg, 1.46 mmol)에 DIBAL (톨루엔 중에 1 M, 2 eq, 2.92 mmol)를 -78°C에서 아르곤 하에 적가 처리하였

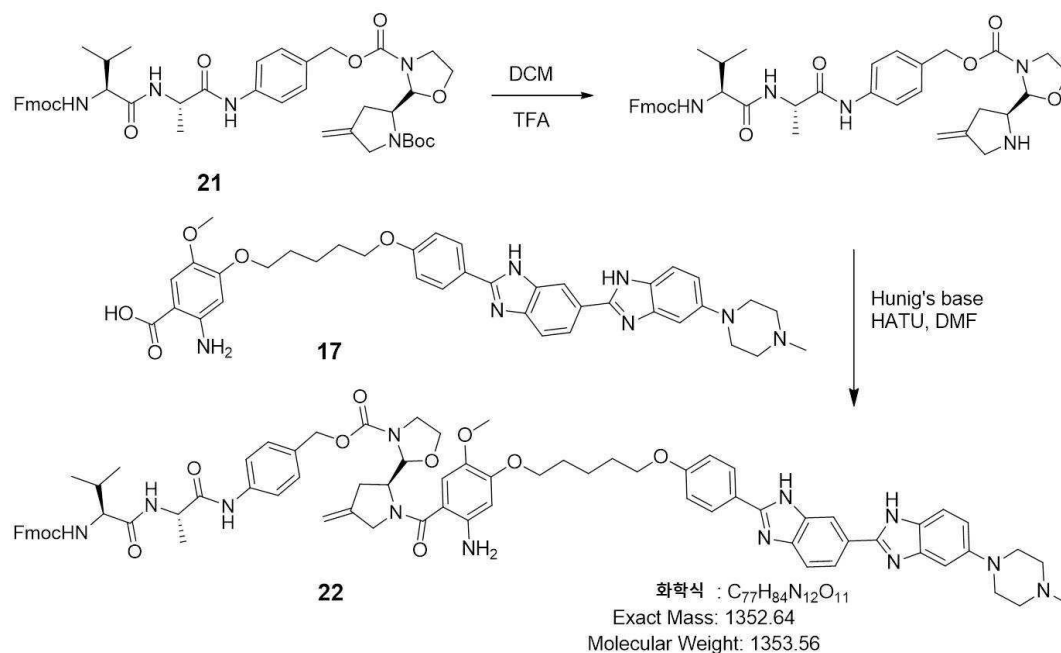
다. 반응물을 -78℃에서 4시간 동안 교반하였다. 그 후 -78℃에서 MeOH 60 μL에 뒤이어 5% HCl (0.5 mL) 및 EtOAc (18 mL)을 첨가하여 반응을 퀸칭하였다. 냉수조를 제거하고 반응물을 30분 동안 교반하였다. EtOAc 층을 분리하고 염수로 세척하고, 무수 Na₂SO₄ 상에서 건조하고 농축하여 화합물 20을 얻었다.



[0298]

[0299]

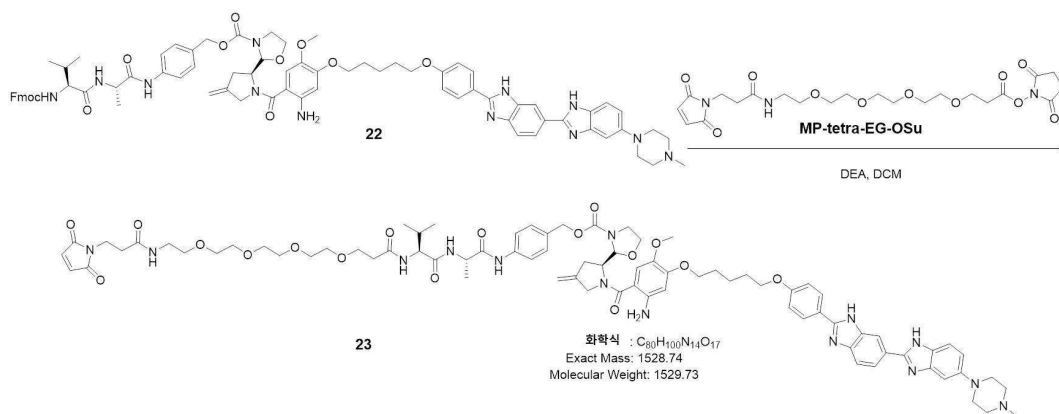
화합물 20 (550 mg, 2.6 mmol)을 DCM (10 mL)에 용해시키고, MgSO₄ (3 g)를 첨가한 후 DCM (10 mL) 중의 에탄올아민 (0.16 mL, 2.6 mmol)을 적가하였다. 반응물을 rt에서 1시간 동안 교반하였다. 여과 및 진공 하에서의 농축하여 옥사졸린(oxazoline) 중간체를 얻었다. 또 다른 플라스크에서, 화합물 18 (516 mg, 1.0 mmol)을 THF (40 mL)에 용해시키고 피리딘을 첨가하였다 (0.8 mL, 10 mmol). 용액을 -78 °C로 냉각시키고, 디포스젠 (0.16 mL, 1.5 mmol)를 첨가하였다. 반응물을 -78 °C에서 1시간 동안 교반하고, DCM (20 mL) 및 옥사졸리딘(oxazolidine) 중간체 용액을 적가하였다. 반응 혼합물을 몇 시간에 걸쳐 -20 °C까지 가온시켰다. LC-MS 및 TLC가 산물 형성을 나타냈다. 반응 혼합물을 실리카겔로 농축하고 속성 크로마토그래피 (120 gold Redisep 컬럼, 페트롤륨 에테르 중의 0-100% EtOAc)로 정제하여 화합물 21 (0.59 g, 74%)를 얻었다. LCMS (ESI): (M + H)⁺ = C₄₄H₅₃N₅O₉에 대한 계산값, 796.38; 실제값 796.74.



[0300]

[0301]

rt에서 30분 동안 화합물 21 (101.0 mg, 0.127 mmol)을 TFA/DCM (각 0.5 mL)에서 교반하였다. LC-MS는 Boc 기의 완전한 제거를 나타냈다. 반응 혼합물을 고진공 하에서 농축하여 TFA 및 DCM를 제거하였고, DMF (1.0 mL)에 재-용해시켰으며, Hunig's 염기 (0.3 mL)를 첨가함으로써 pH 8-9로 조정하였다. 화합물 17 (86.0 mg, 0.127 mmol)이 첨가된 후, PyBoP (84 mg, 0.16 mmol) 및 반응물을 rt에서 2시간 동안 교반하였다. 90분째에 LC-MS는 주요 피크가 원하는 산물을 가졌음을 나타냈다. 반응 혼합물을 실리카겔 카트리지에 로딩하였으며 속성 크로마토그래피 (12g gold, 0-30% MeOH/DCM)로 정제하여 원하는 산물, 화합물 22 (140 mg, 81%)를 얻었다. LCMS (ESI): $(M + H)^+ = C_{77}H_{84}N_{12}O_{11}$ 에 대한 계산값, 1353.64; 실제값 1354.18.



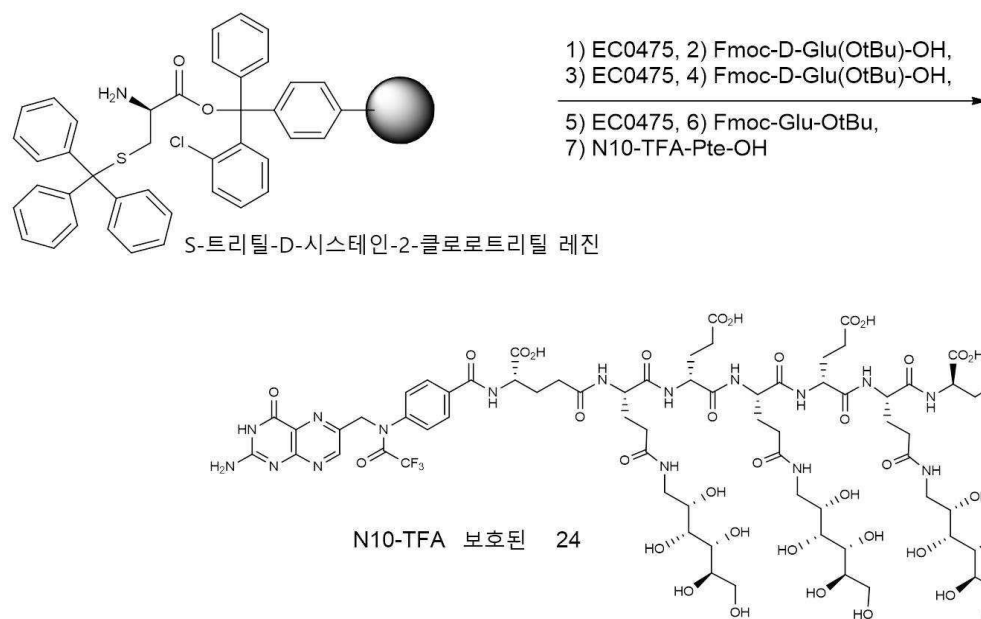
[0302]

[0303]

화합물 22 (140 mg, 0.10 mmol)를 DEA/DCM (12/18 mL)에 용해하고 rt에서 30분 동안 교반하였다. LC-MS는 Fmoc 기의 완전한 제거를 나타냈다. 반응 혼합물을 고진공 하에서 농축하여 초과 디에틸아민을 제거하였으며 DCM (5 mL)에 재-용해하였다. 상용되는 α -말레이미도프로피오닐- ω -숙신이미딜-4(에틸렌 글리콜) (Ma1-PEG₄-NHS) (62 mg, 0.12 mmol)을 첨가하고 반응물을 rt에서 1시간 동안 교반하였다. 반응 혼합물을 농축하고, DMSO에 재용해하였으며 HPLC 컬럼에 직접적으로 로딩하고 분취용 HPLC (C18 컬럼, 5-80% ACN/pH7 버퍼)로 정제되어 원하는 산물인 화합물 23 (55.8 mg, 36%)를 얻었다. LCMS: $[M+2H]^{2+}$ m/z = $C_{80}H_{100}N_{14}O_{17}$ 에 대한 계산값, 765.37; 실제값 765.74.

[0304]

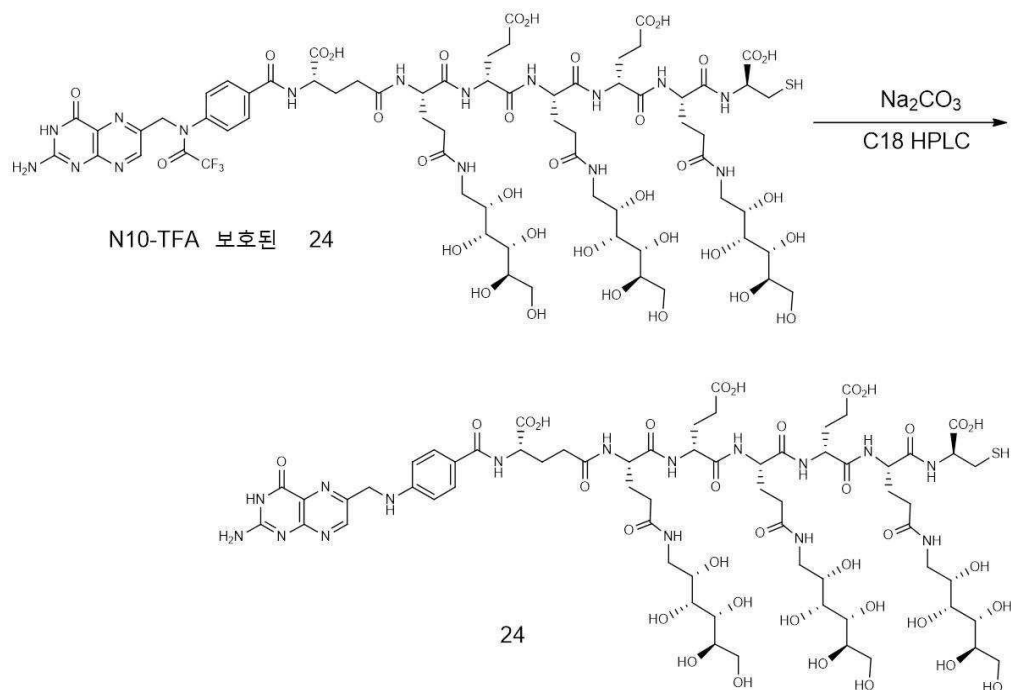
N^{10} -TFA 보호된 화합물 24. N^{10} -TFA 보호된 화합물 24은 하기 과정에 따라 제조된다.



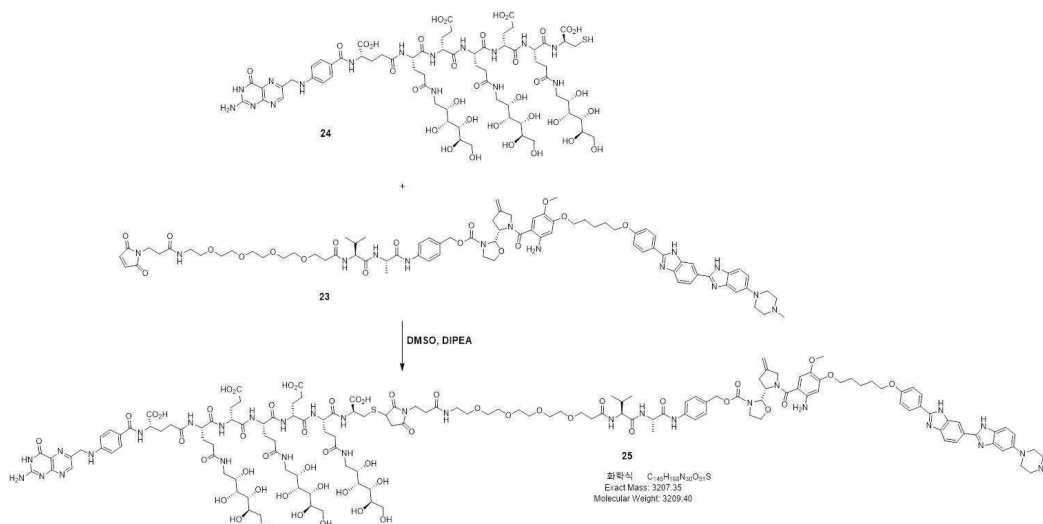
[0305]

[0306]

화합물 24는 W02014/062679에 기술된 바와 같이 제조된다. 화합물 24는 하기 과정에 따라 제조된다.



[0307]

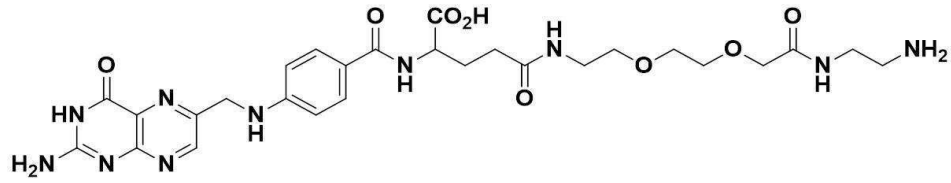


[0308]

[0309]

화합물 24 (9.85 mg, 0.006 mmol)는 용해될 때까지 DMSO (2 mL)에 교반되었다. DIPEA (50 μ L)에 뒤이어, DMSO 중의 화합물 23 (6.24 mg, 0.004 mmol) (2 mL)을 첨가하였다. 반응물을 RT에서 50분 동안 교반하였다. 10분째에 LC-MS 분석은 완전한 전환을 나타냈다. 반응 혼합물을 직접적으로 prep-HPLC 컬럼에 로딩하고 정제하여 (10-100% MeCN/암모늄 비카보네이트, pH 7 버퍼) 원하는 산물인 실시예 25 (5.5 mg, 42%)를 얻었다. 1H NMR (500 MHz, DMSO- D_6 + D_2O) (선택된 데이터): δ 8.60 (s, 1H), 8.44-8.08 (m*, 1H), 8.07 (d, $J=8.5$ Hz, 2H), 8.06-7.84 (m*, 2H), 7.80-7.57 (m*, 2H), 7.57 (d, $J=8$ Hz, 2H), 7.51 (d, $J=6.5$ Hz, 2H), 7.44 (m*, 1H), 7.22 (m*, 2H), 7.08 (d, $J=8$ Hz, 2H), 6.93 (d, $J=8.5$ Hz, 1H), 6.60 (d, $J=8.5$ Hz, 2H), 6.33 (s, 1H), 4.95 (m*, 4H), 4.45 (m*, 3H); LCMS: $[M+4H]^{4+}$ m/z = $C_{145}H_{198}N_{30}O_{51}S$ 에 대한 계산값, 803.34; 실제값 803.80.

[0310] 비교 실시예 1:

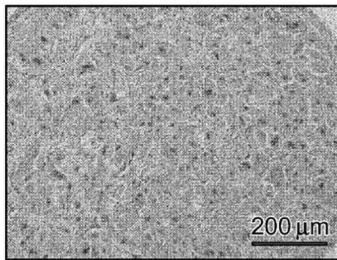


[0311]

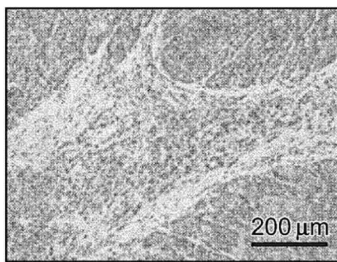
[0312] (본 발명에서 경쟁자 또는 경쟁으로도 지칭됨)

도면

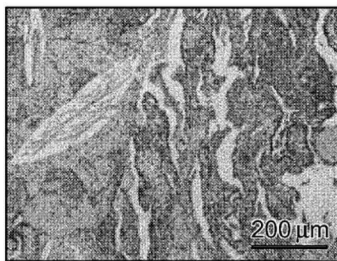
도면1



도 1A

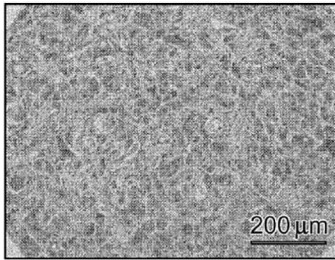


도 1B

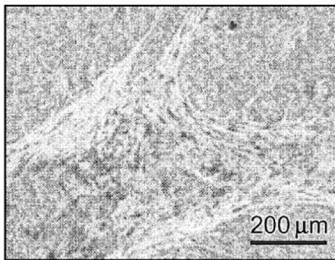


도 1C

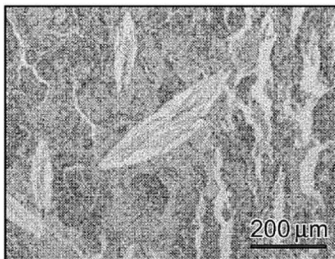
도면2



도 2A

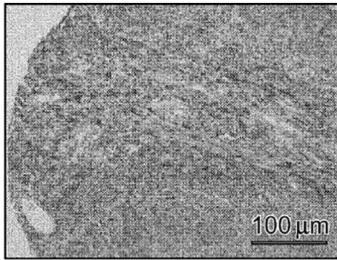


도 2B

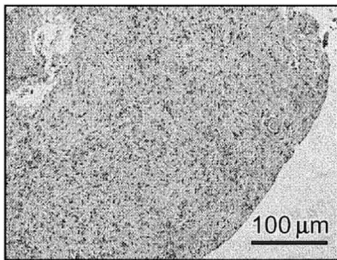


도 2C

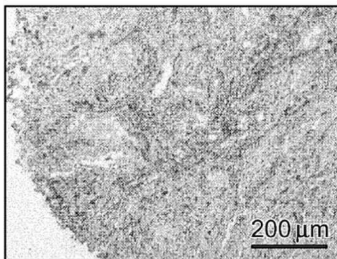
도면3



도 3A

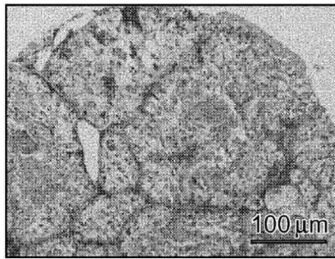


도 3B

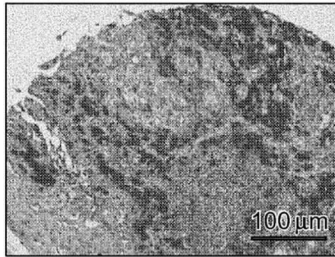


도 3C

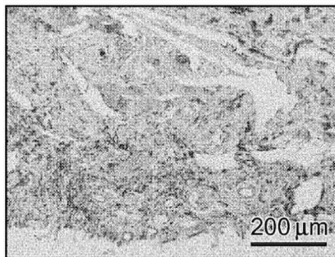
도면4



도 4A

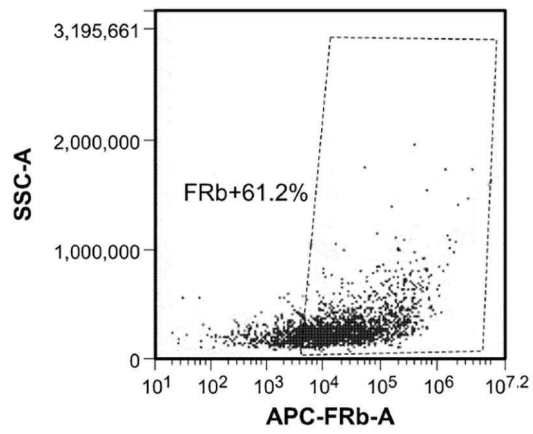
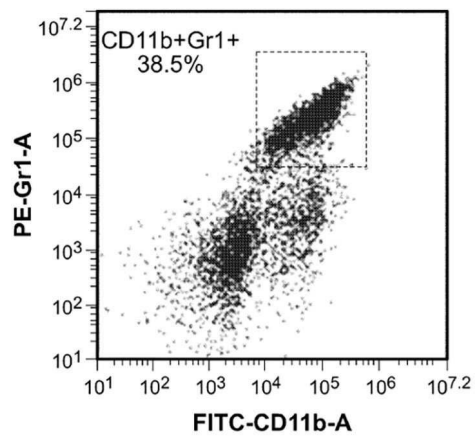


도 4B

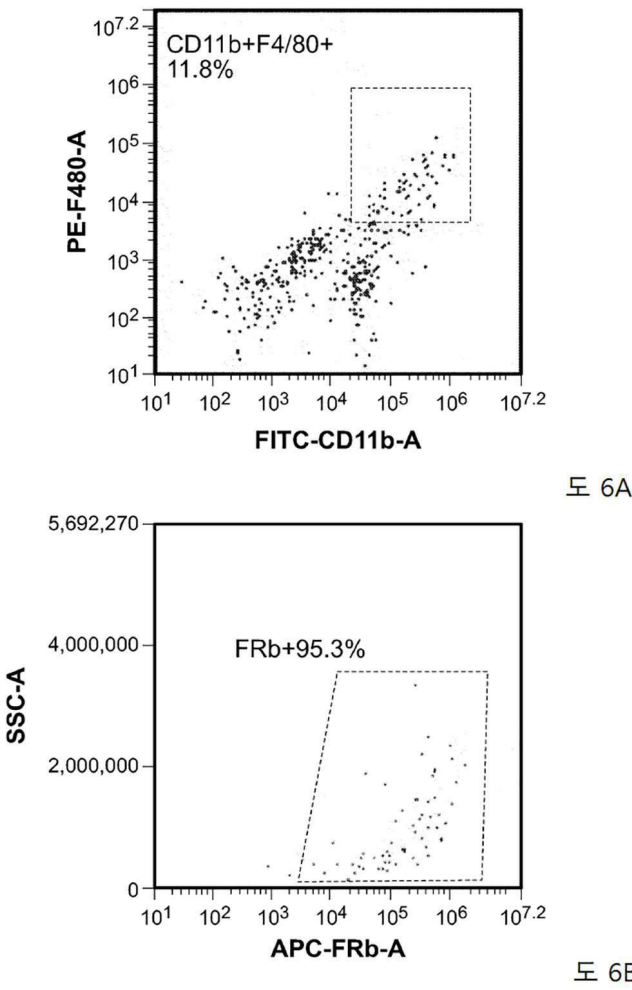


도 4C

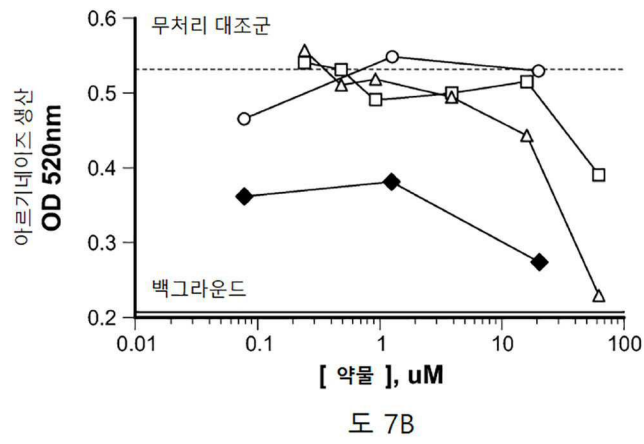
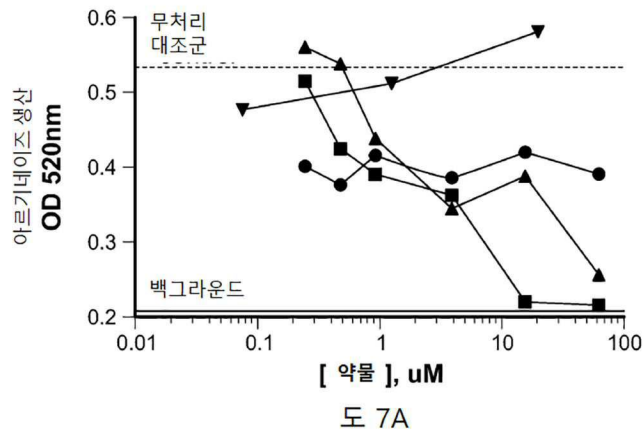
도면5



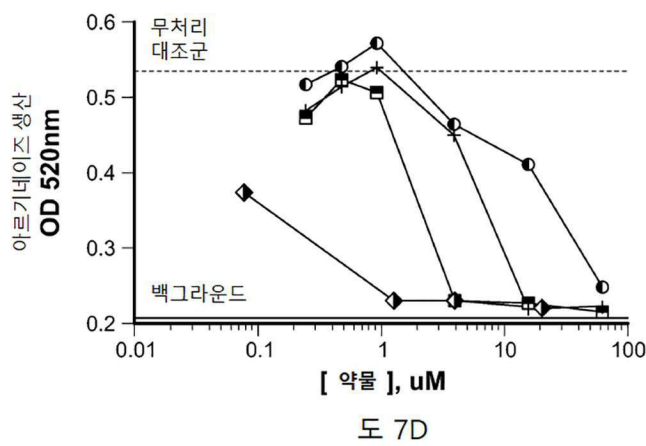
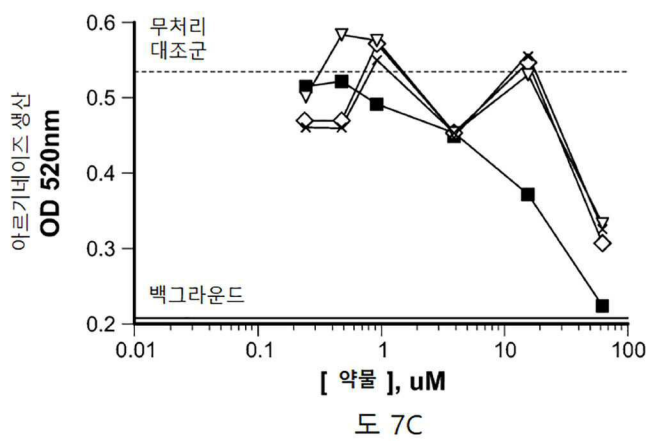
도면6



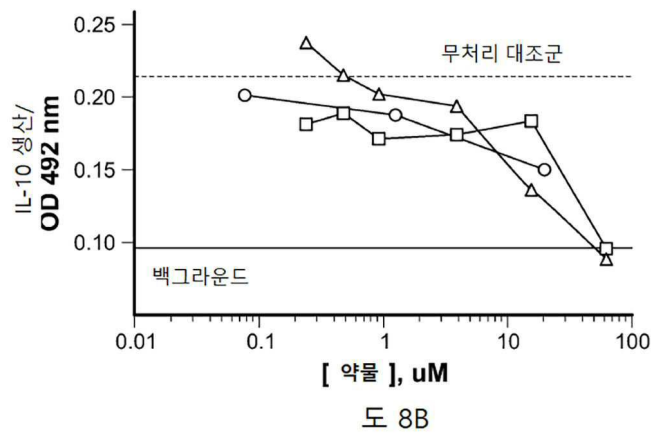
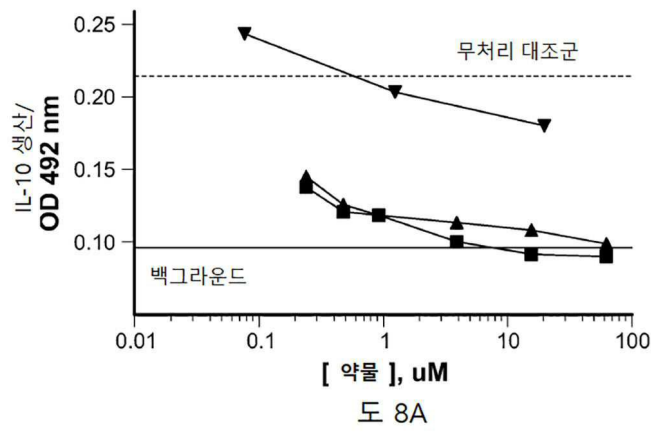
도면7a



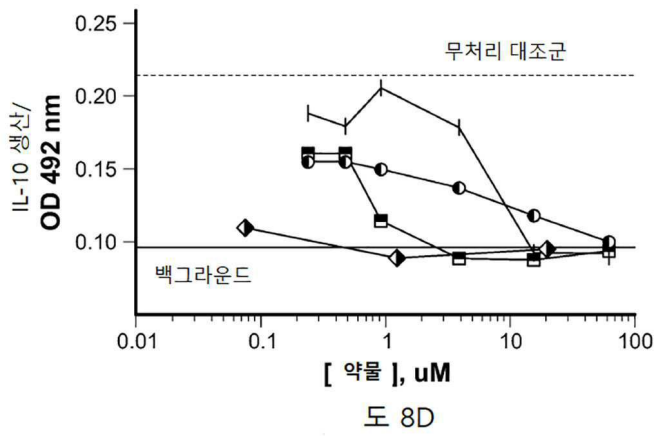
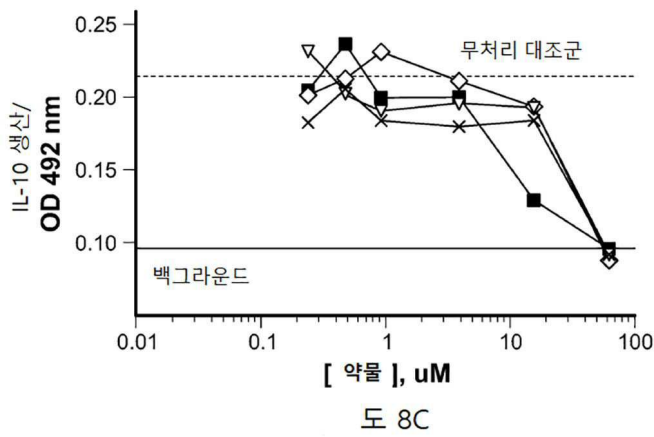
도면7b



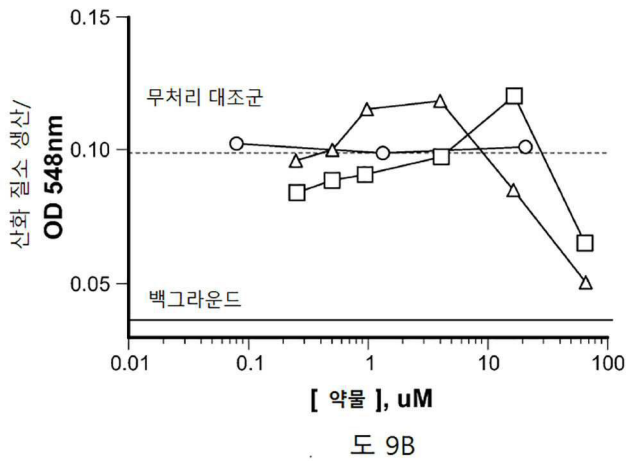
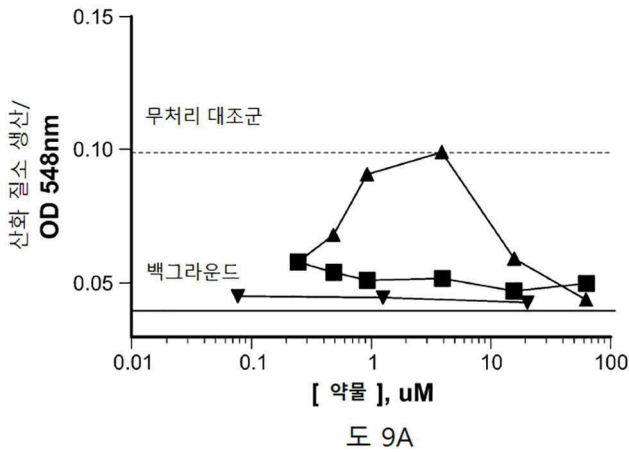
도면 8a



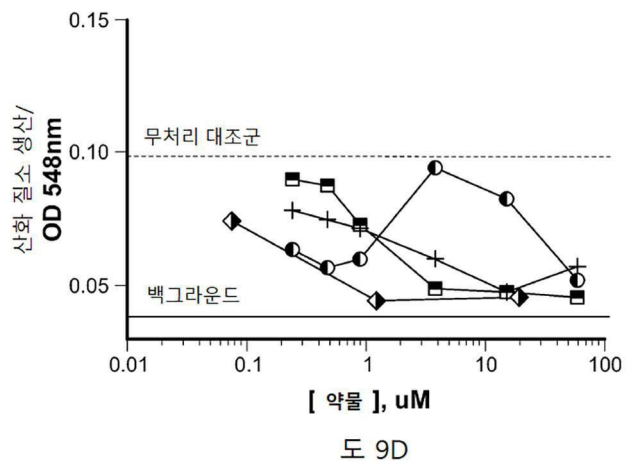
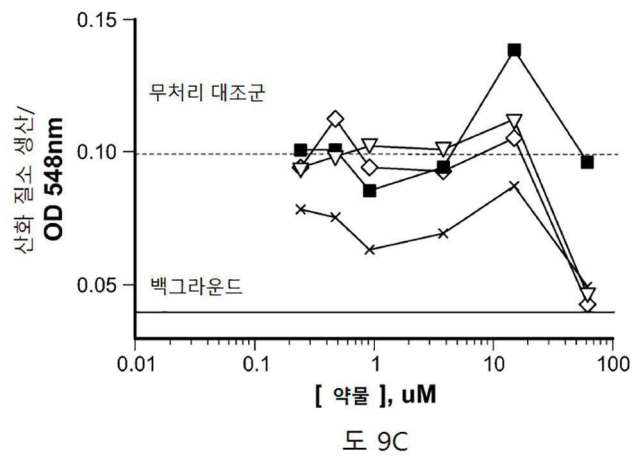
도면8b



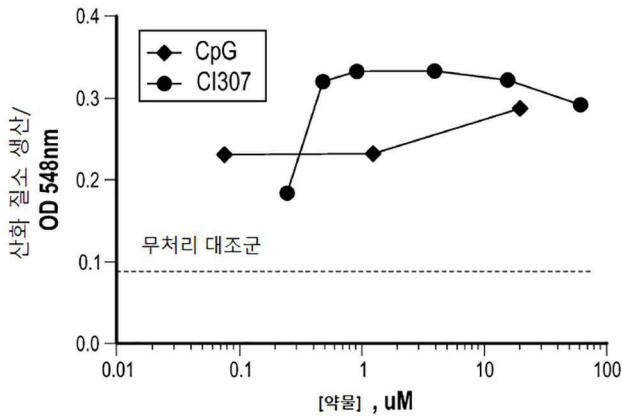
도면9a



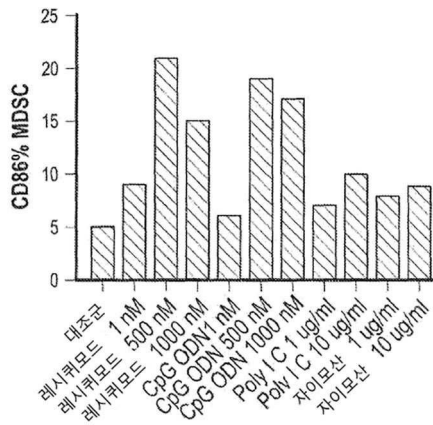
도면9b



도면10

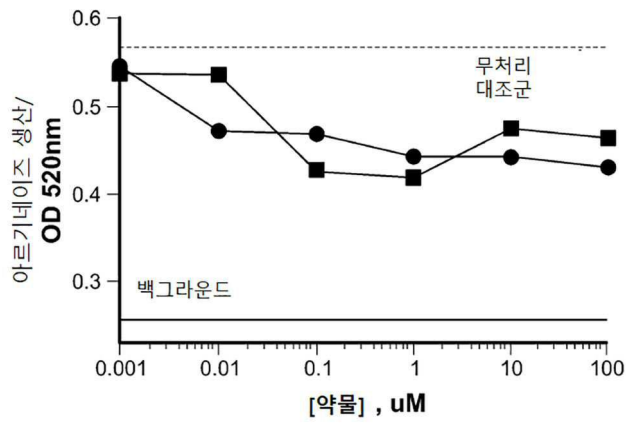


도 10A

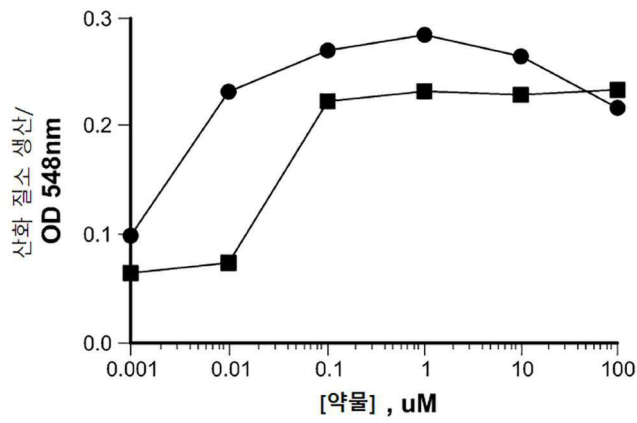


도 10B

도면11

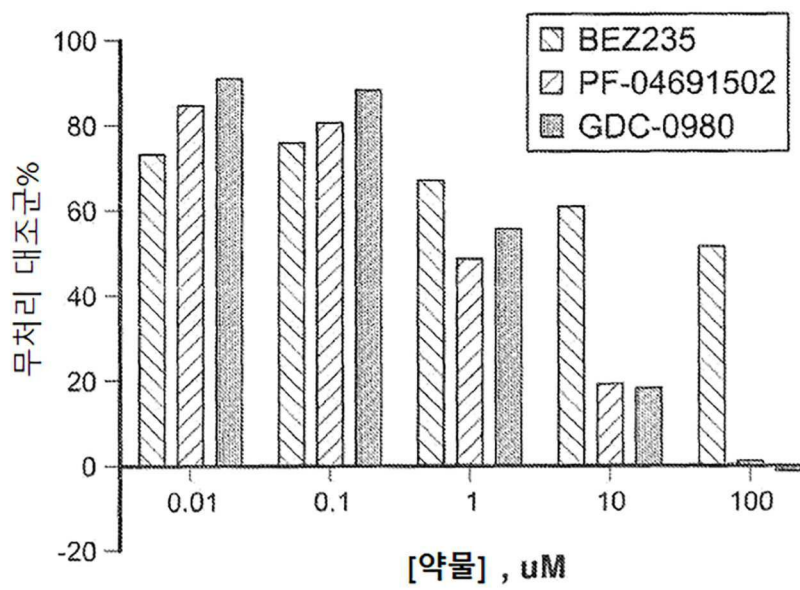


도 11A



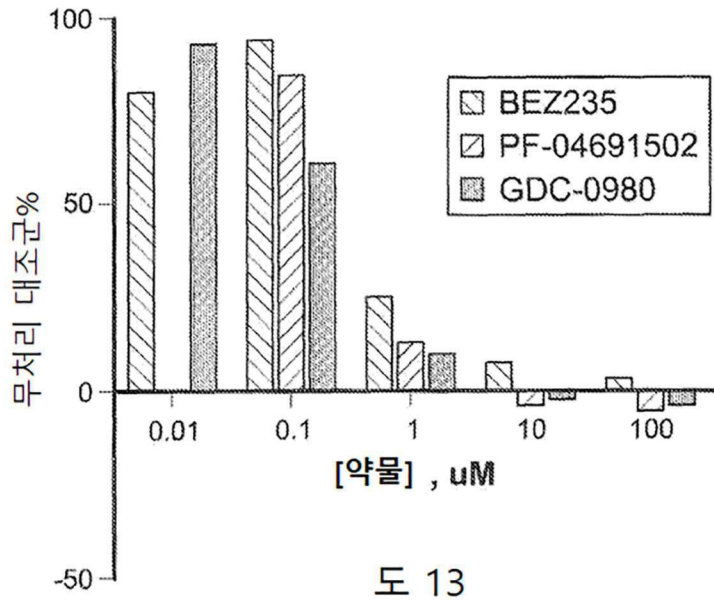
도 11B

도면12

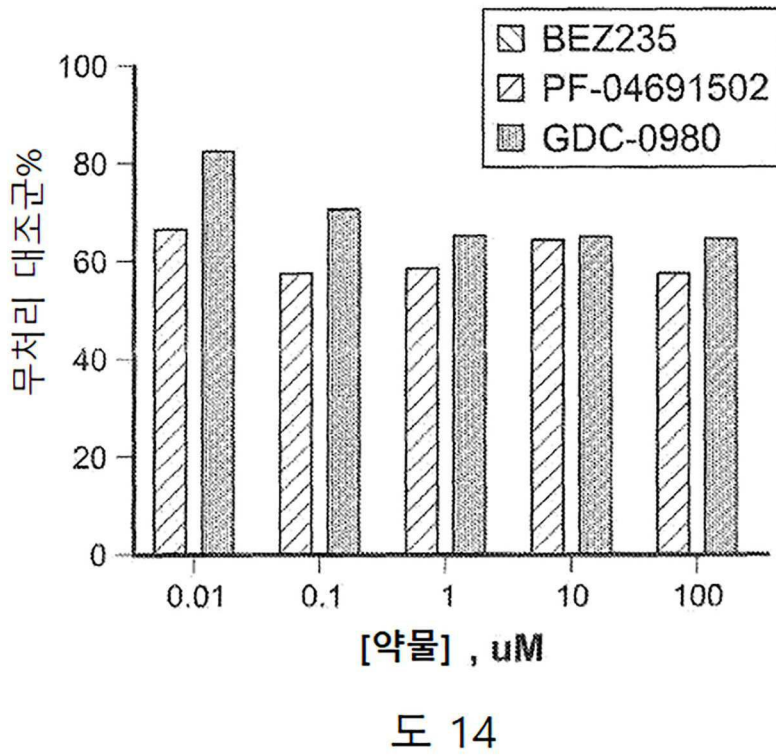


도 12

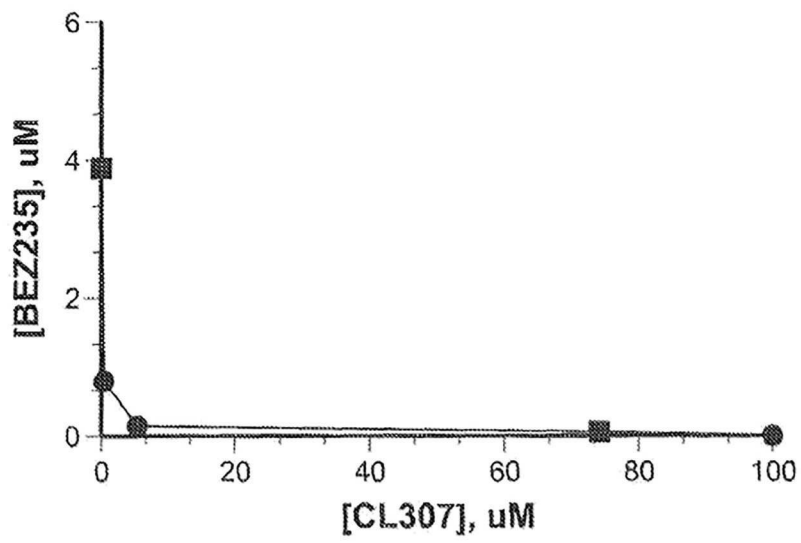
도면13



도면14

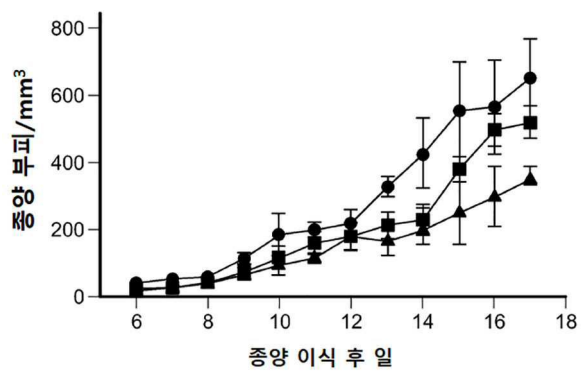


도면15

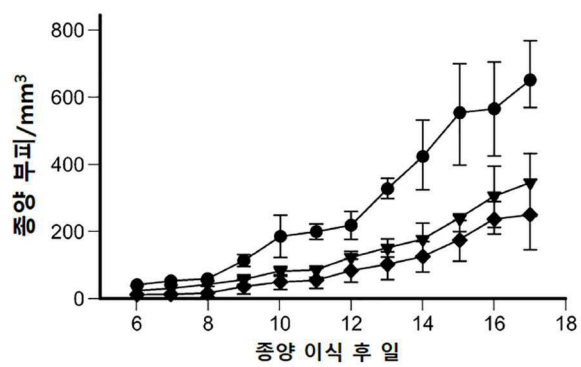


도 15

도면16

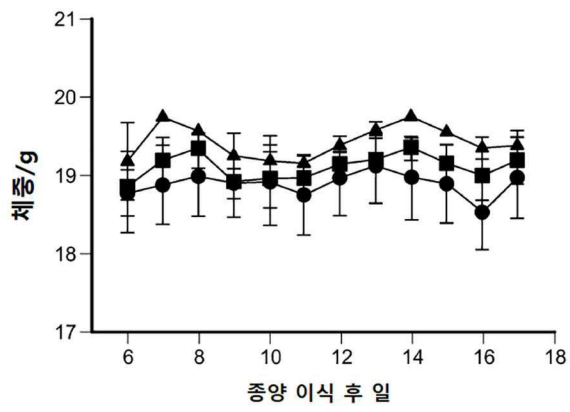


도 16A

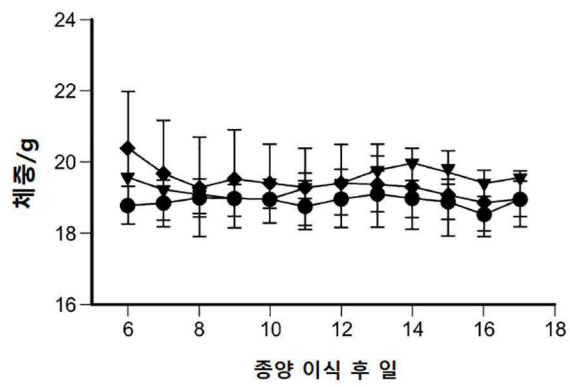


도 16B

도면17

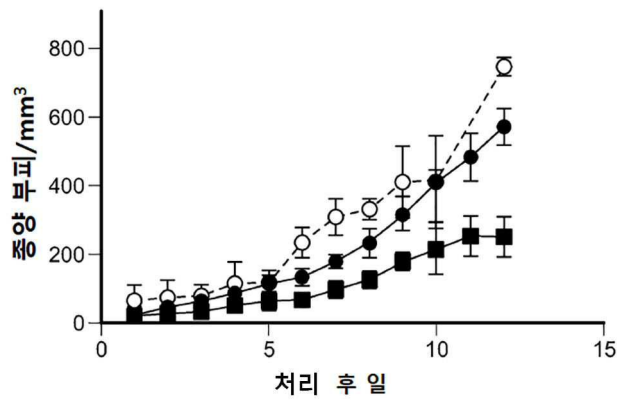


도 17A

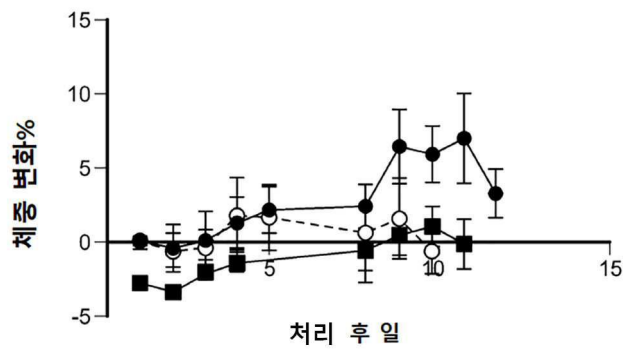


도 17B

도면18

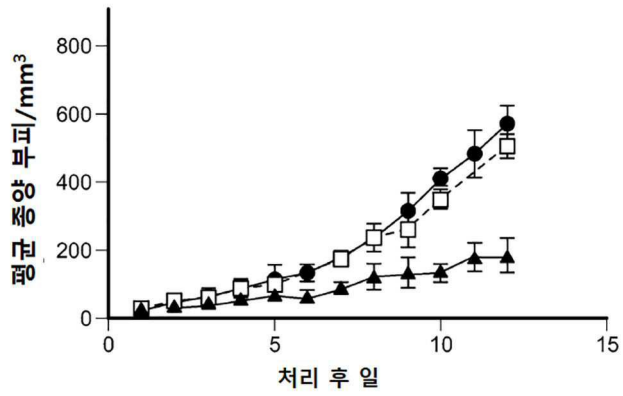


도 18A

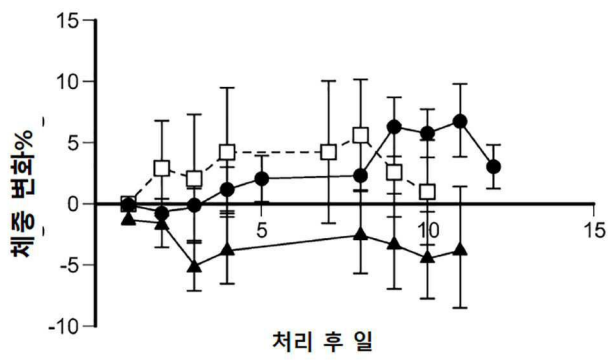


도 18B

도면19

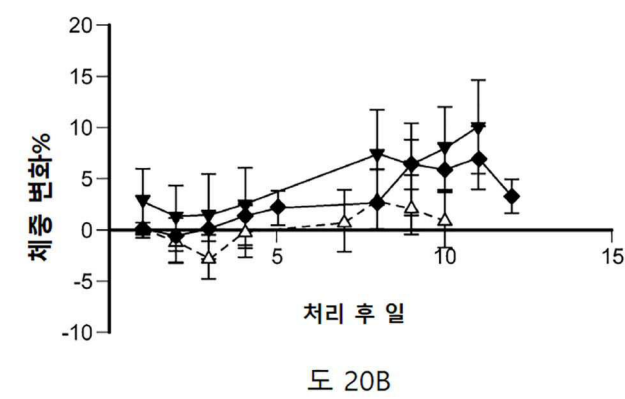
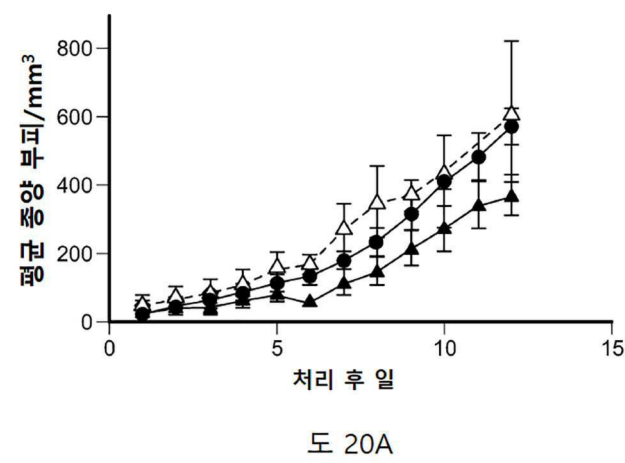


도 19A

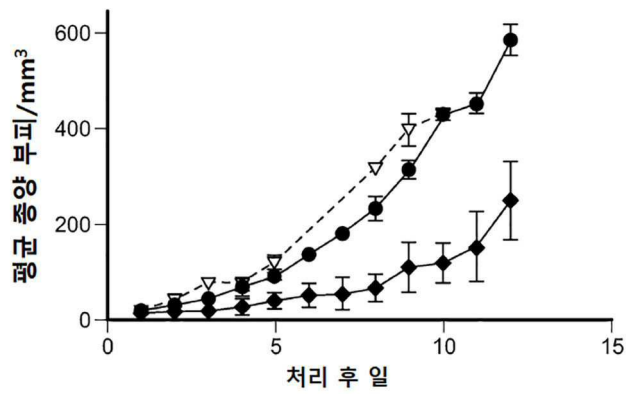


도 19B

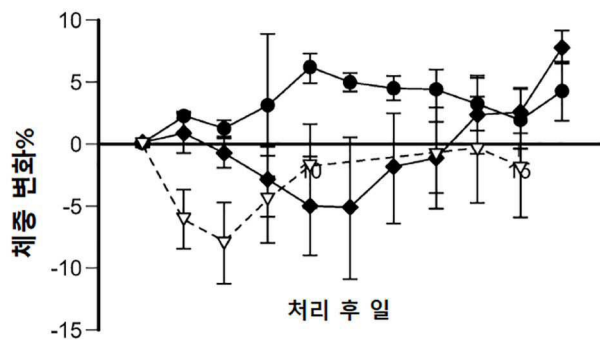
도면20



도면21

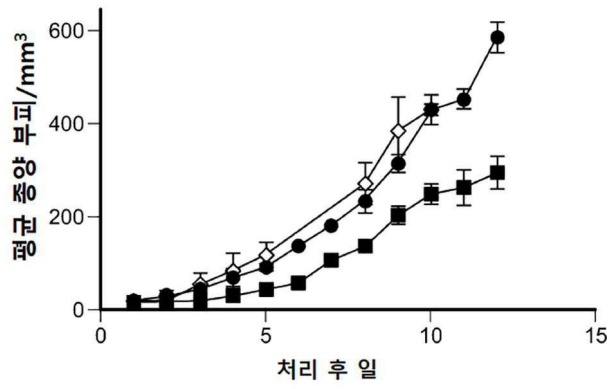


도 21A

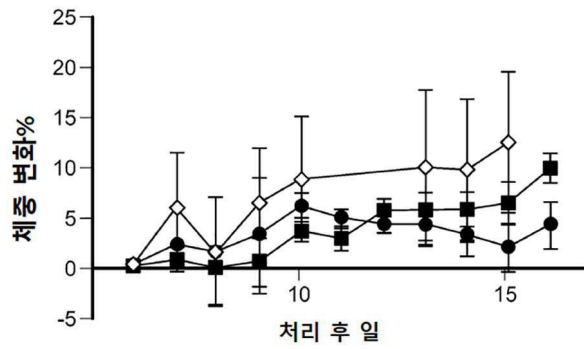


도 21B

도면22

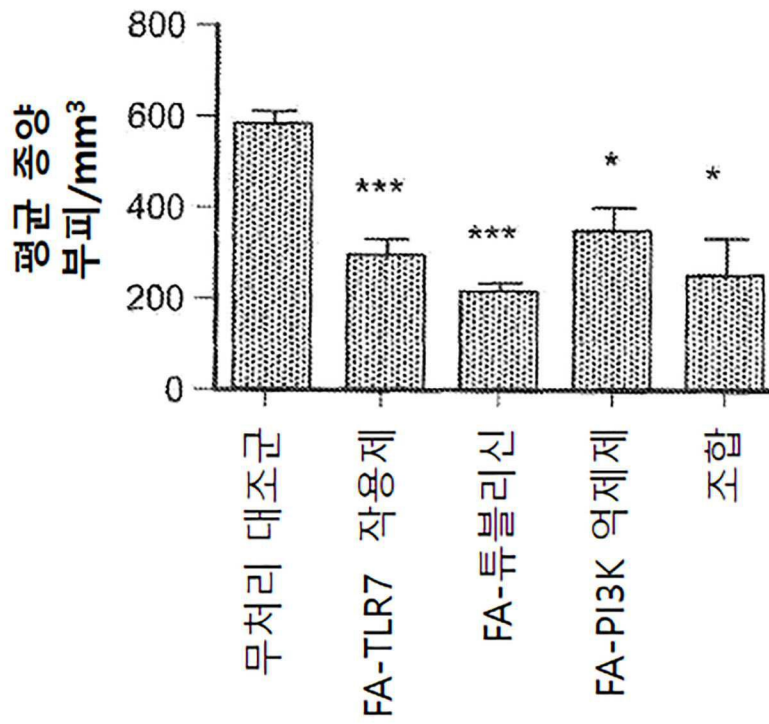


도 22A



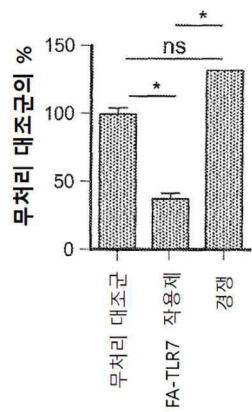
도 22B

도면23

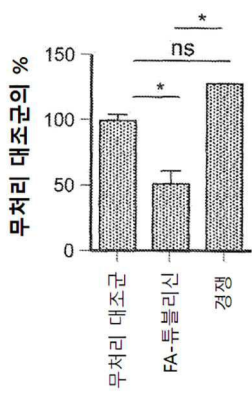


도 23

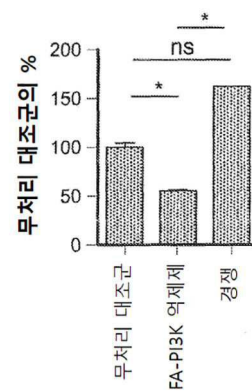
도면24



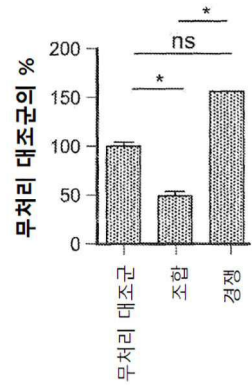
도 24A



도 24B

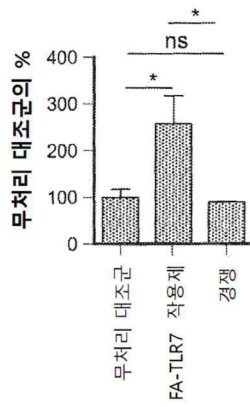


도 24C

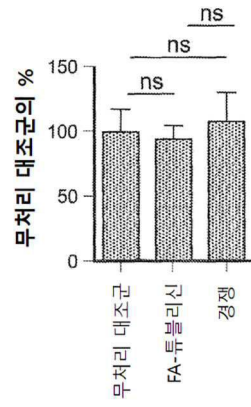


도 24D

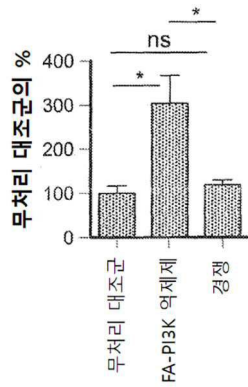
도면25



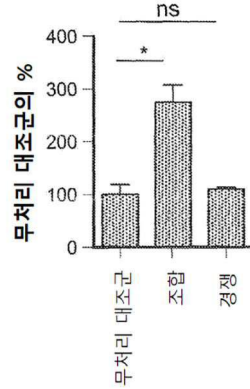
도 25A



도 25B

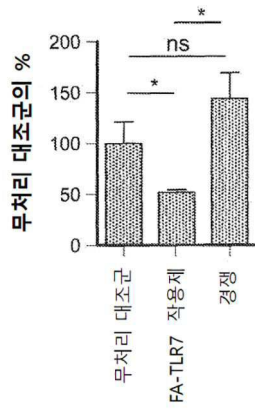


도 25C

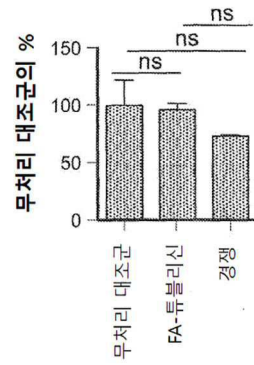


도 25D

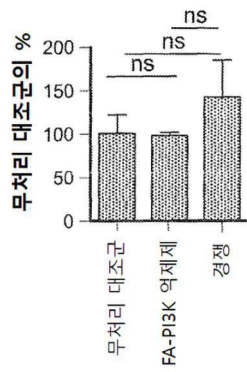
도면26



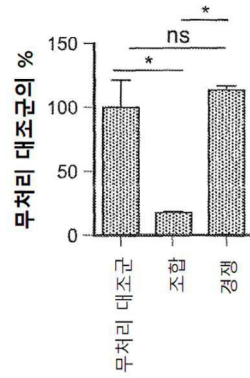
도 26A



도 26B

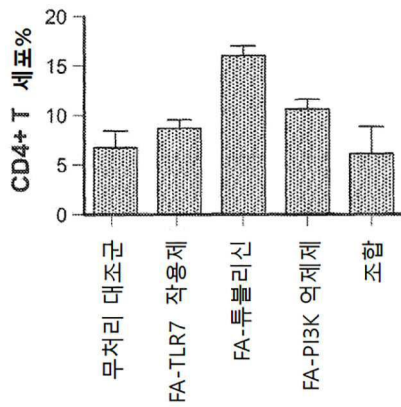


도 26C

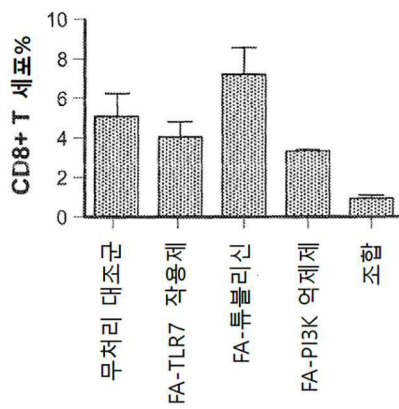


도 26D

도면27

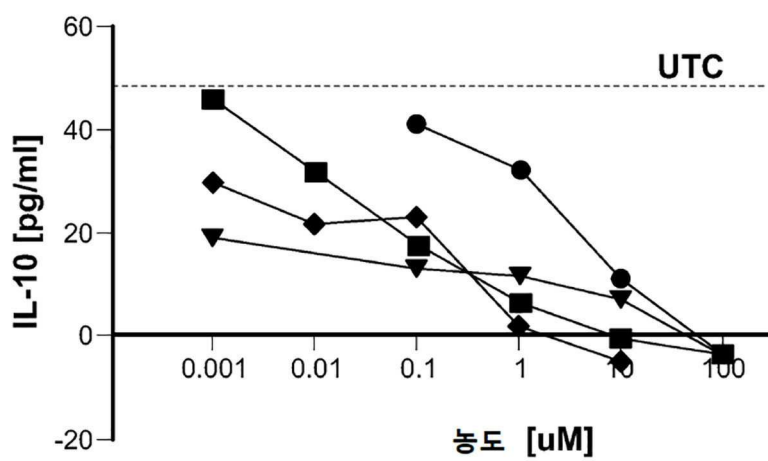


도 27A



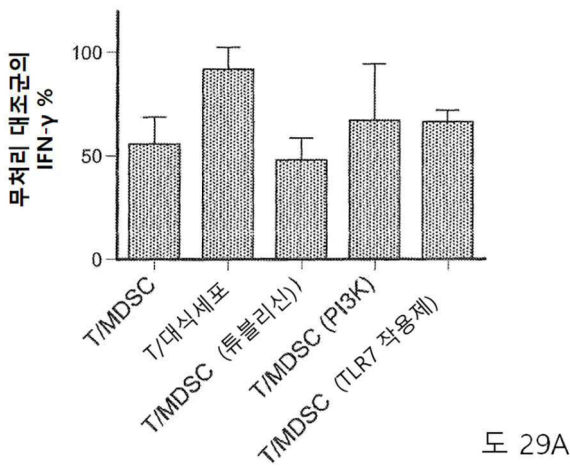
도 27B

도면28

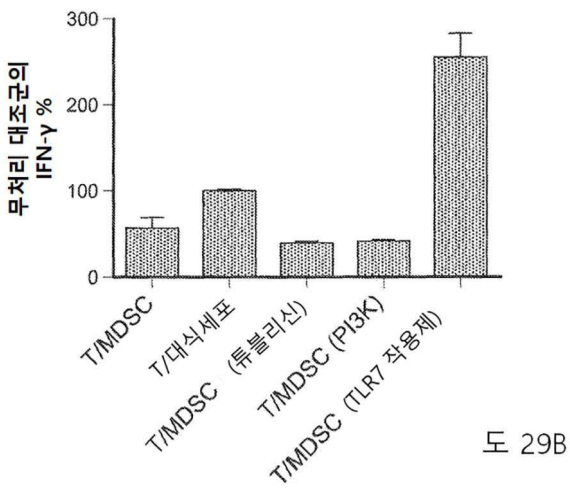


도 28

도면29

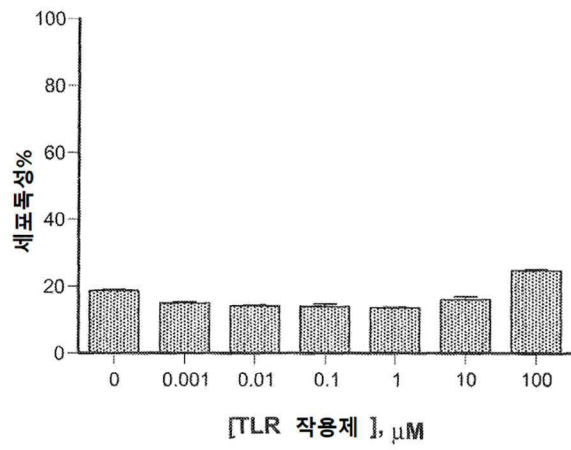


도 29A

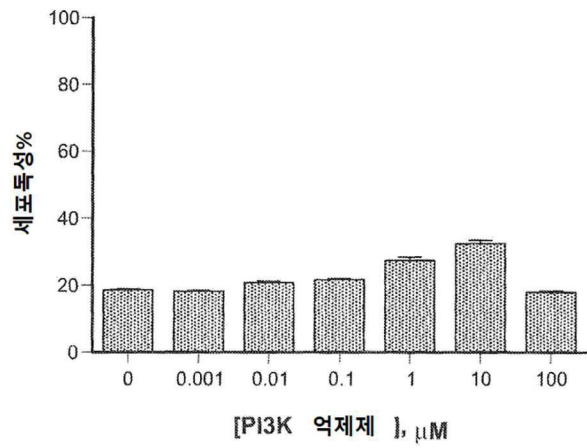


도 29B

도면30a

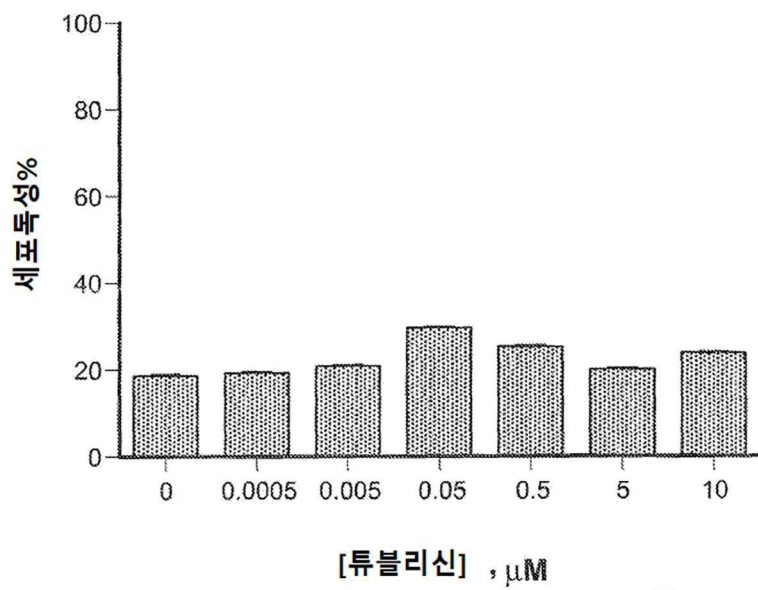


도 30A



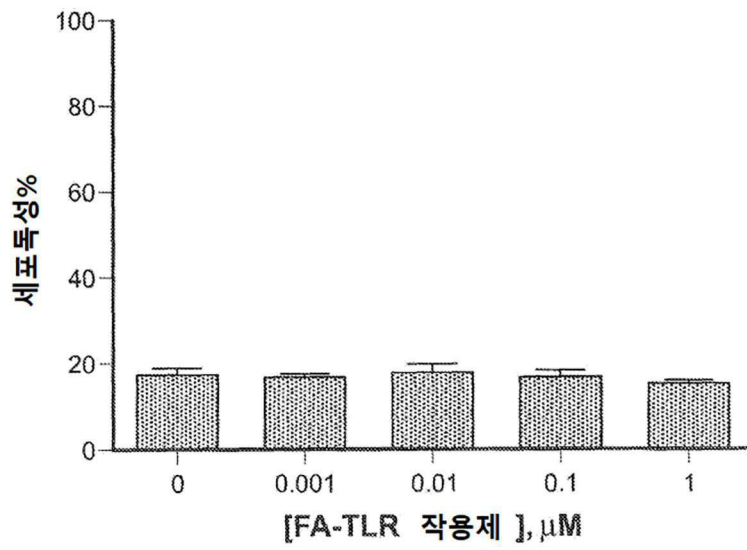
도 30B

도면30b



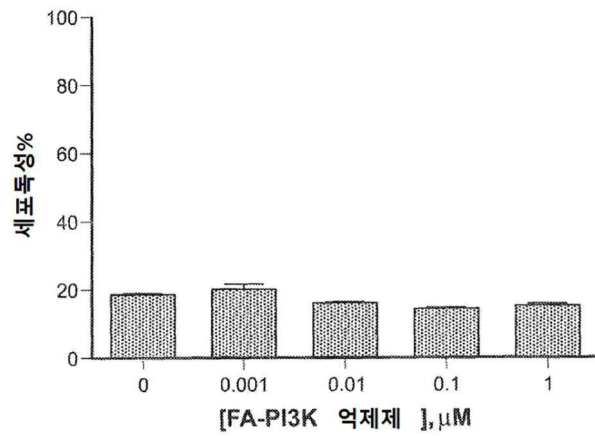
도 30C

도면31a

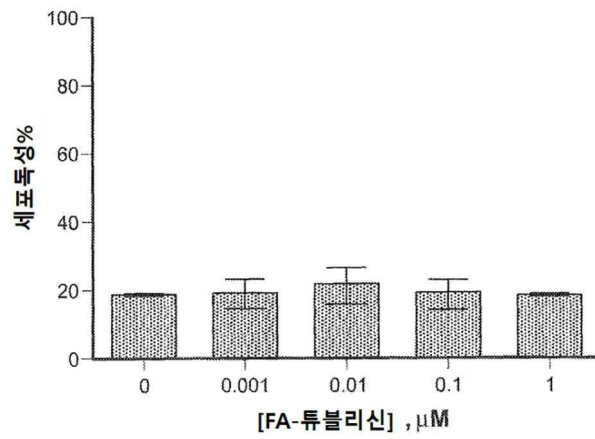


도 31A

도면31b

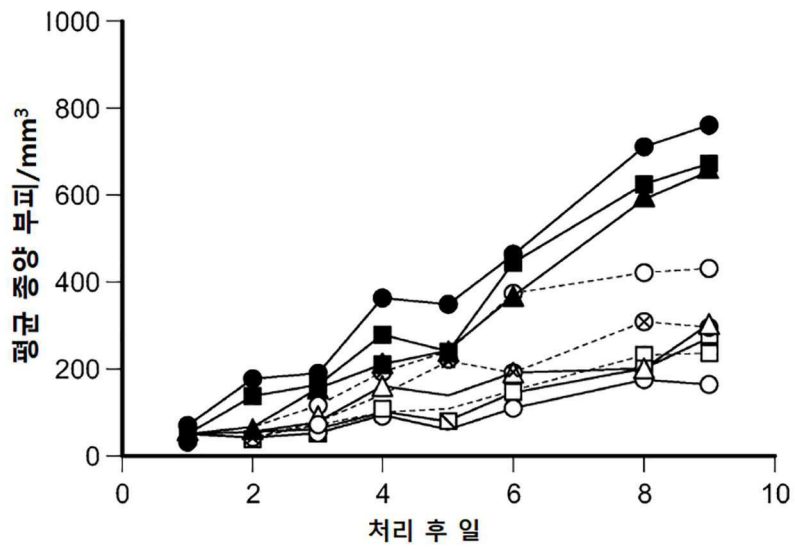


도 31B



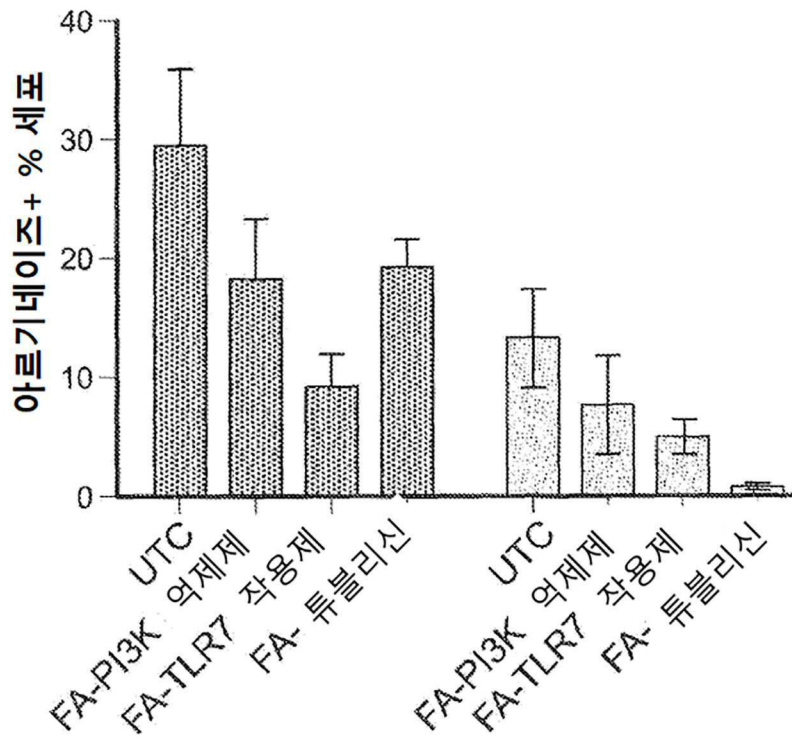
도 31C

도면32



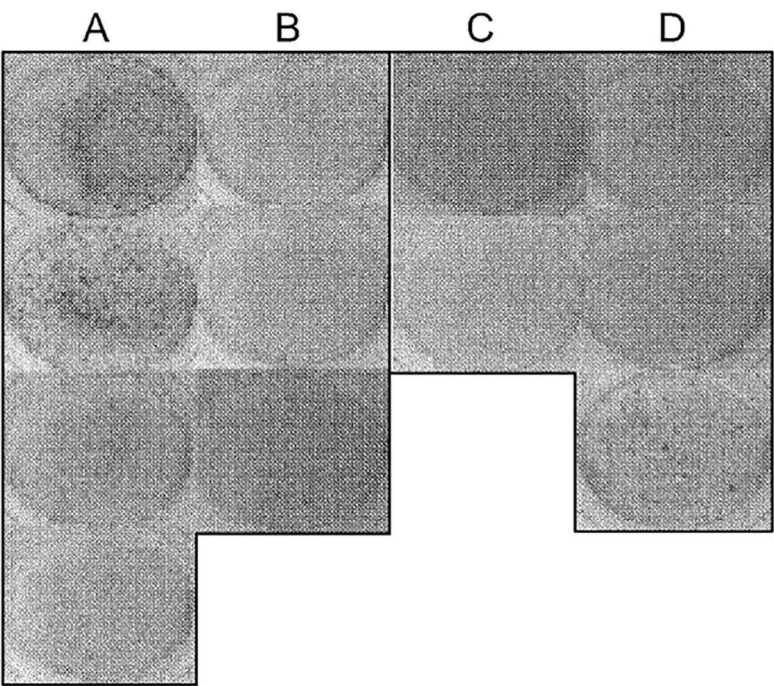
도 32

도면33



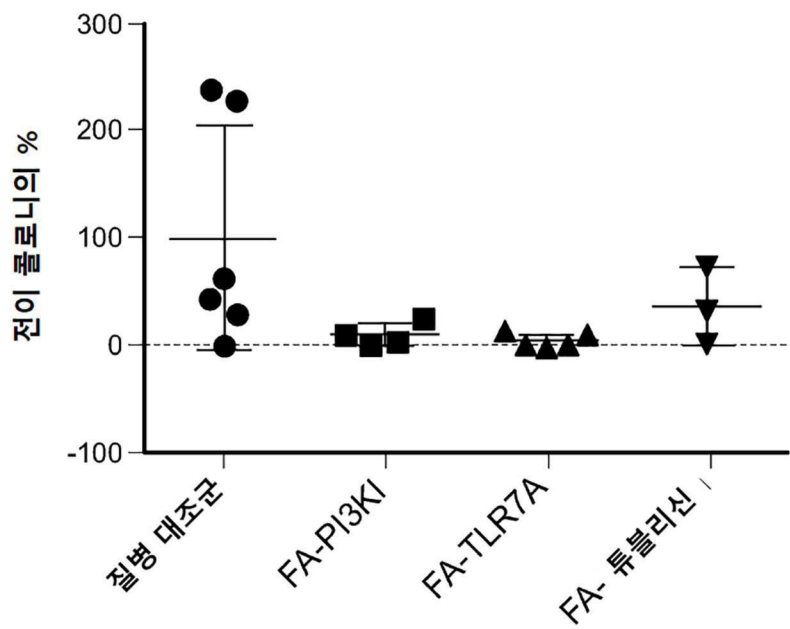
도 33

도면34



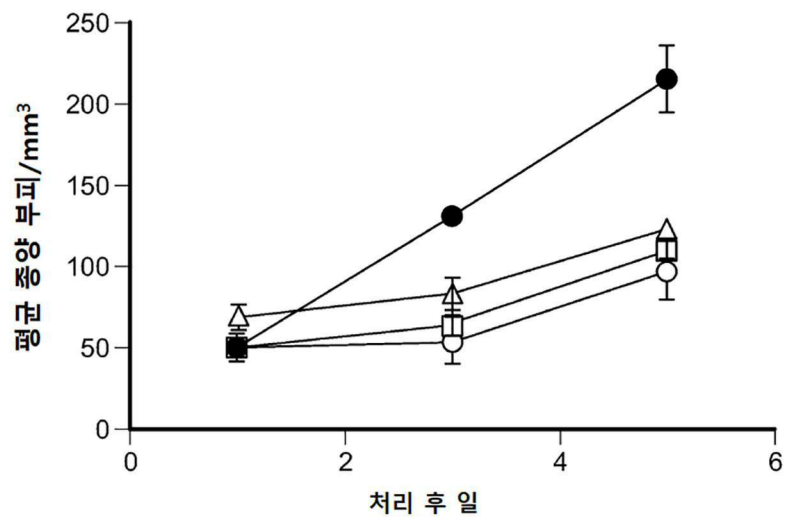
도 34

도면35



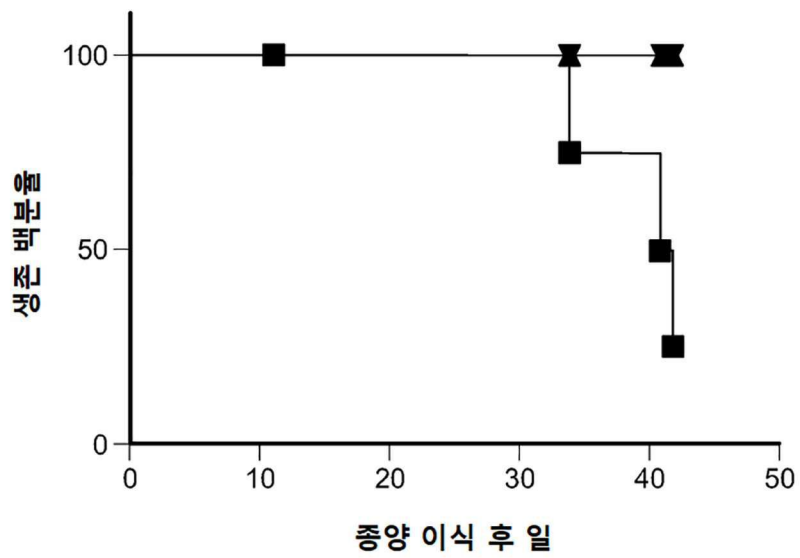
도 35

도면36



도 36

도면37



도 37