

	(19) 대한민국특허청(KR) (12) 공개특허공보(A)	(11) 공개번호 10-2009-0054431 (43) 공개일자 2009년05월29일
(51) Int. Cl. C07K 5/10 (2006.01) A61K 47/48 (2006.01) C07K 7/06 (2006.01)	(71) 출원인 메닥 게젤사프트 후르 클리니셰 스페지알프라파라 테 엠베하 독일, 20354 함부르크, 페흐란트스트라쎄 3	
(21) 출원번호 10-2009-7003884	(72) 발명자 크라츠 페릭스 독일, 79241 이링겐, 줌 압스바인가르텐 19	
(22) 출원일자 2009년02월25일 심사청구일자 없음 번역문제출일자 2009년02월25일	와르네케 안드레 독일, 79117 프레이버그, 아우그스트-겐더-스트라 쎄	
(86) 국제출원번호 PCT/EP2007/006618 국제출원일자 2007년07월25일	(74) 대리인 김석윤, 이승초	
(87) 국제공개번호 WO 2008/012086 국제공개일자 2008년01월31일		
(30) 우선권주장 10 2006 035 083.9 2006년07월28일 독일(DE)		

전체 청구항 수 : 총 34 항

(54) 단백질 결합 메토티렉사트 유도체 및 상기 유도체를 포함하는 약제

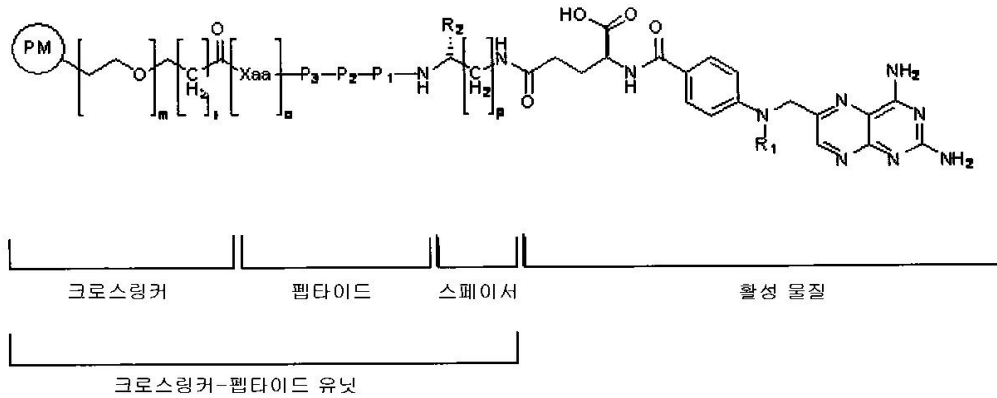
(57) 요약

본 발명은 메토티렉사트 유도체에 관한 것이며, 상기 메토티렉사트는 단백질 결합기를 포함하며 그리고 활성 물질 또는 저분자 활성 물질 유도체가 릴리즈될 수 있도록 신체 내에서 효소적으로 분해될 수 있다. 또한 본 발명은 메토티렉사트 유도체를 생산하기 위한 방법, 그 이용 및 메토티렉사트 유도체를 포함하는 약제에 관한 것이다.

특허청구의 범위

청구항 1

다음의 일반 구조식 1을 가지는 것을 특징으로 하는 메토틱렉사트 유도체.
(일반 구조식 1)



여기서,

$R_1 = H$ 또는 CH_3 ,

$R_2 = H$ 또는 $COOH$

$P_1 =$ 리신, 메티오닌, 알라닌, 프롤린 또는 글리신

$P_2 =$ 류신, 페닐알라닌, 메티오닌, 알라닌, 프롤린 또는 티로신

$P_3 =$ D-알라닌, 알라닌, D-발린, 발린, 류신 또는 페닐알라닌

$X_{aa} =$ 알칼리성 사이드 체인을 가진 아미노산

$m = 0$ 내지 6

$n = 0$ 내지 5

$o = 0$ 내지 2

$p = 1$ 내지 10

PM은 단백질 결합기이다.

청구항 2

제 1항에 있어서, 상기 PM은 선택적으로 치환될 수 있는 메일린이미드기, 2-디티오피리딜기, 할로젠 아세트아미드기, 할로젠 아세테이트기, 이황화물기, 아크릴산 에스테르기, 모노알킬 말레산 에스테르기, 모노알킬 메일아민산 아미드기, N-히드록시 숙신이미딜 에스테르기, 이소티오시아네이트기 및 아지리딘기 로 구성된 그룹으로부터 선택되는 것을 특징으로 하는 메토틱렉사트 유도체.

청구항 3

제 2항에 있어서, 상기 PM은 선택적으로 치환될 수 있는 메일린이미드기인 것을 특징으로 하는 메토틱렉사트 유도체.

청구항 4

제 3항에 있어서, 상기에서 $m = 0$ 그리고 $n = 4$ 인 것을 특징으로 하는 메토틱렉사트 유도체.

청구항 5

제 3항에 있어서, 상기에서 $m = 3$ 그리고 $n = 1$ 인 것을 특징으로 하는 메토틱렉사트 유도체.

청구항 6

앞선 청구항들 중 어느 하나에 있어서, 상기에서 $R_1 = CH_3$ 인 것을 특징으로 하는 메토틱렉사트 유도체.

청구항 7

앞선 청구항들 중 어느 하나에 있어서, 상기에서 $R_2 = COOH$ 그리고 $p = 4$ 인 것을 특징으로 하는 메토틱렉사트 유도체.

청구항 8

앞선 청구항들 중 어느 하나에 있어서, 상기에서 $P_1 =$ 리신, 아날린 또는 메티오닌 인것을 특징으로 하는 메토틱렉사트 유도체.

청구항 9

앞선 청구항들 중 어느 하나에 있어서, 상기에서 $P_2 =$ 페닐알라닌, 메티오닌, 알라닌 또는 티로신 인것을 특징으로 하는 메토틱렉사트 유도체.

청구항 10

앞선 청구항들 중 어느 하나에 있어서, 상기에서 $P_3 =$ D-알라닌, 알라닌, D-발린, 발린 또는 페닐알라닌 인것을 특징으로 하는 메토틱렉사트 유도체.

청구항 11

제 8항 내지 제 10항 중 어느 한 항에 있어서, 상기에서 $P_1 =$ 리신, $P_2 =$ 류신 또는 페닐알라닌 그리고 $P_3 =$ 알라닌, D-알라닌, 발린 또는 D-발린 인것을 특징으로 하는 메토틱렉사트 유도체.

청구항 12

제 11항에 있어서, 상기에서 $P_2 =$ 류신 그리고 $P_3 =$ D-발린 인것을 특징으로 하는 메토틱렉사트 유도체.

청구항 13

제 11항에 있어서, 상기에서 $P_2 =$ 류신 그리고 $P_3 =$ 발린 인것을 특징으로 하는 메토틱렉사트 유도체.

청구항 14

제 11항에 있어서, 상기에서 $P_2 =$ 페닐알라닌 그리고 $P_3 =$ D-알라닌 인것을 특징으로 하는 메토틱렉사트 유도체.

청구항 15

제 11항에 있어서, 상기에서 $P_2 =$ 페닐알라닌 그리고 $P_3 =$ 알라닌 인것을 특징으로 하는 메토틱렉사트 유도체.

청구항 16

제 8항 내지 제 10항 중 어느 한 항에 있어서, 상기에서 $P_1 =$ 메티오닌, $P_2 =$ 메티오닌, 알라닌 또는 페닐알라닌 그리고 $P_3 =$ 알라닌 또는 페닐알라닌 인것을 특징으로 하는 메토틱렉사트 유도체.

청구항 17

제 16항에 있어서, 상기에서 $P_2 =$ 알라닌 그리고 $P_3 =$ 페닐알라닌 인것을 특징으로 하는 메토틱렉사트 유도체.

청구항 18

제 16항에 있어서, 상기에서 P_2 = 페닐알라닌 그리고 P_3 = 알라닌 인것을 특징으로 하는 메토틱렉사트 유도체.

청구항 19

제 16항에 있어서, 상기에서 P_2 = 메티오닌 그리고 P_3 = 알라닌 인것을 특징으로 하는 메토틱렉사트 유도체.

청구항 20

제 16항에 있어서, 상기에서 P_2 = 메티오닌 그리고 P_3 = 페닐알라닌 인것을 특징으로 하는 메토틱렉사트 유도체.

청구항 21

앞선 청구항들 중 어느 하나에 있어서, 상기에서 $o = 0$ 인 것을 특징으로 하는 메토틱렉사트 유도체.

청구항 22

앞선 청구항들 중 어느 하나에 있어서, 상기에서 X_{aa} = 아지닌, 리신 또는 히스티딘 인것을 특징으로 하는 메토틱렉사트 유도체.

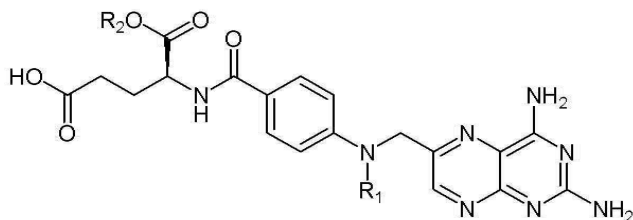
청구항 23

제 22항에 있어서, 상기에서 X_{aa} = 아지닌 그리고 $o = 0$ 인것을 특징으로 하는 메토틱렉사트 유도체.

청구항 24

메토틱렉사트 유도체가 다음의 일반 구조식 2를 가지는 것을 특징으로 하는 앞선 청구항들 중 어느 한 항에 따른 메토틱렉사트 유도체의 제조방법.

(일반 구조식 2)

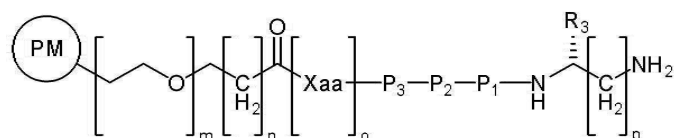


여기서,

$R_1 = CH_3, H$ 또는 $COCF_3$

$R_2 = C(CH_3)_3$, 알콕시-치환 벤질기 또는 트리알킬 시릴기이며, 다음의 일반 구조식 3의 크로스링커-펩타이드 유닛을 가진 촉매제/보조제 염기가 첨가된 카복실산 활성화 시약의 존재 속에서 반응되며,

(일반 구조식 3)



여기서,

$R_3 = H, COOH$ 또는 $COOtBu$

$P_1 =$ 리신, 메티오닌, 알라닌, 프롤린 또는 글리신

$P_2 =$ 류신, 페닐알라닌, 메티오닌, 알라닌, 프롤린 또는 티로신

$P_3 =$ D-알라닌, 알라닌, D-발린, 발린, 류신 또는 페닐알라닌

$X_{aa} =$ 알칼리성 사이드 체인을 가진 아미노산

$m = 0$ 내지 6

$n = 0$ 내지 5

$o = 0$ 내지 2

$p = 1$ 내지 10

PM은 단백질 결합기이며,

여기서 가능성 있는 친핵성기들은 P_1, P_2 및 X_{aa} 에서 보호기들에 의해 선택적으로 보호되도록 존재하며, 그리고 제 2 단계에 있어 산과 선택적으로 양이온-청소 시약으로 처리된다.

청구항 25

제 24항에 있어서, 상기 카복실산 활성화 시약은 N,N'-디이소프로필 카보디이미드, N,N'-디시클로헥실 카보디이미드, (벤조트리아졸-1-일록시)트리스(디메틸아미노)포스포늄 헥사플루오로포스페이트, 2-클로로-1-메틸피리디니움 요오드화물 및 O-(아자벤조트리아졸-1-yl)-N,N,N',N'-테트라메틸우로니움 헥사플루오로포스페이트로 구성된 그룹으로부터 선택되는 것을 특징으로 하는 메토타렉사트 유도체의 제조방법.

청구항 26

제 24항에 있어서, 상기 촉매제/보조제 염기는 트리알킬아민, 피리딘, 4-디메틸아미노피리딘 (DMAP) 및 히드록시벤조트리아졸 (HOBt) 또는 그들의 화합물로 구성된 그룹으로부터 선택되는 것을 특징으로 하는 메토타렉사트 유도체의 제조방법.

청구항 27

제 24 항 내지 제 26항 중 어느 한 항에 있어서, N-에틸디이소프로필아민과 관련한 O-(아자벤조트리아졸-1-yl)-N,N,N',N'-테트라메틸우로니움 헥사플루오로포스페이트는 카복실산 활성화 시약으로 사용되는 것을 특징으로 하는 메토타렉사트 유도체의 제조방법.

청구항 28

제 24항에 있어서, 상기 제 2 단계에서 수소 염화물이 산으로서 사용되는 것을 특징으로 하는 메토타렉사트 유도체의 제조방법.

청구항 29

제 24항에 있어서, 상기 제 2 단계에서 트리플루오로아세트산이 산으로서 사용되는 것을 특징으로 하는 메토타렉사트 유도체.

청구항 30

제 24항에 있어서, 상기 제 2 단계에서 상기 양이온-청소 시약은 물, 페놀, 티오아니졸, 디이소프로필실란 및 1,2-에탄 디티올, 또는 그들의 화합물로 구성된 그룹으로부터 선택되는 것을 특징으로 하는 메토타렉사트 유도체의 제조방법.

청구항 31

제 24항에 있어서, 메토타렉사트- γ -*tert.*-부틸에스테르는 N-에틸디이소프로필아민과 관련한 O-(아자벤조트리아

줄-1-y1)-N,N,N',N'-테트라메틸우로니움 헥사플루오로포스페이트를 사용하는 (((6-메일인이미도헥산오일)D-알라닐)페닐알라닐)테르트.-부톡실카보닐일실) 리신-트리플루오레아세테이트로 반응시키며, 그리고 제 2 단계에서 트리플루오로아세트산으로 처리되는 것을 특징으로 하는 메토틱렉사트 유도체의 제조방법.

청구항 32

한 개 또는 그 이상의 약학적으로 수용 가능한 보조 작용제가 선택적으로 함께 하는 제 1항 내지 제 23항 중 어느 한 항에 따른 메토틱렉사트 유도체를 포함하는 약물.

청구항 33

암 질병의 치료를 위해 사용되는 것을 특징으로 하는 제 1항 내지 제 23항 중 어느 한 항에 따른 메토틱렉사트 유도체의 용도.

청구항 34

관절염 질병의 치료를 위해 사용되는 것을 특징으로 하는 제 1항 내지 제 23항 중 어느 한 항에 따른 메토틱렉사트 유도체의 용도.

명세서

기술분야

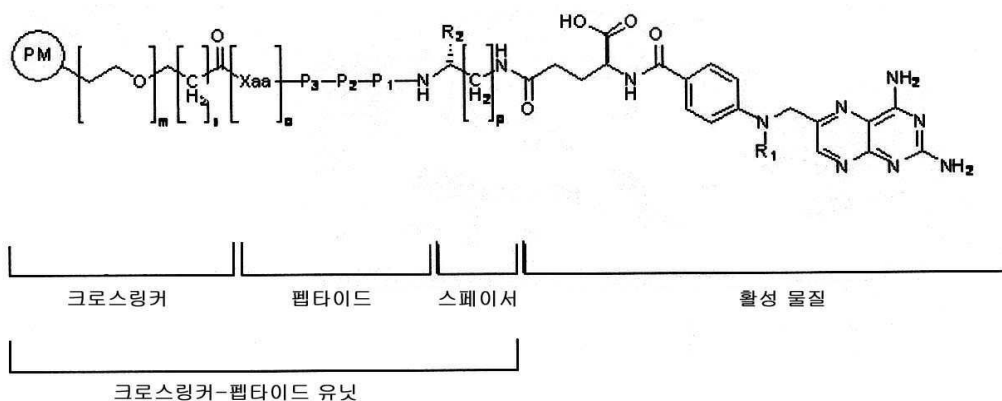
<1> 본 발명은 메토틱렉사트(methotrexate) 유도체 및 메토틱렉사트 펩티드 유도체에 관한 것으로, 상기 유도체는 단백질 결합기를 포함하고 있으며, 활성 물질 또는 저분자 활성 물질 유도체가 릴리즈(release)될 수 있도록 신체 내에서 효소적으로 분해(cleaved)될 수 있으며, 그리고 보다 구체적으로는 메토틱렉사트 유도체를 생산하기 위한 방법, 그 사용 및 메토틱렉사트 유도체를 포함하고 있는 약물에 관한 것이다.

배경기술

<2> 메토틱렉사트(MTX)는 중앙 및 류머티즘 관절염의 치료에 사용되는 엽산 길항제이다. 그 용도는 수많은 부작용으로 인하여 제한되어 있다(예를 들면, 현기증, 탈모증, 위장 내 증상, 감염 가능성 증가). 상기와 같은 부작용 및 MTX 및 MTX 유도체의 효과를 개선하기 위하여, MTX의 매크로분자(고분자) 전송 형태는 활성 물질을 인조 폴리머에 결합하는 방법으로 구현되어 왔다. 예를 들면, 폴리(에틸렌 글리콜) (Riebesseel K.; Biedermann, E.; Loser, R.; Breiter, N.; Hanselmann, R. et al., Bioconjugate Chem. 2002, 13, 773-785), HPMA 공중합체 (Subr, V.; Strohal, J. et al. 제어된 릴리즈 1997, 49, 123-132) 또는 인간 혈청 알부민 (HAS) (Wunder, A.; Muller-Ladner et al., J Immunol 2003, 170, 4793-4801; Wunder, A.; Stehle, G. et al., Int. J. Oncol. 1997, 11, 497-507)등이 있다. 그러나, 자유(free) MTX와 비교하여 낮은 부작용 및 충분히 개선된 효과를 갖는 MTX 또는 MTX 유도체를 포함하는 새로운 시스템에 대한 수요는 여전히 있다.

발명의 상세한 설명

<3> 이와 같은 기술적인 문제점은 청구항에 기재된 실시예들로 해결될 것이다. 특히, 전체 일반 구조식의 메토틱렉사트 유도체는 다음과 같다.



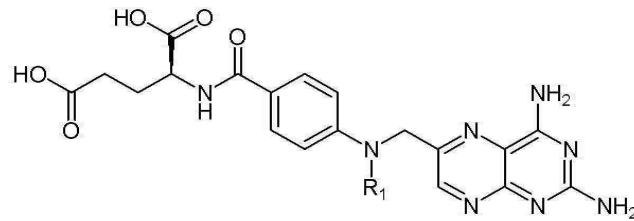
<4>

<5> 여기서 $R_1 = H$ 또는 CH_3 , $R_2 = H$ 또는 $COOH$, $P_1P_3 = L-$ 또는 D-아미노산, X_{aa} 는 가용성-조정 아미노산(solubility-mediating amino acid)이며, $m = 0$ 내지 6, $n = 0$ 내지 5, $o = 0$ 내지 2, $p = 1$ 내지 10, 및 PM은 단백질 결합기이다.

<6> 본 발명에 따르면, 일체화된 그리고 가수분해적으로 또는 효소적으로 분해 가능한 소정의 브레이킹 포인트에 의하여 제어된 방법에 따라 활성 물질 또는 스페이서-활성 물질 유도체를 생체 내로 릴리즈할 수 있으며, 이에 따라 본 발명에 따른 메토크사트 유도체는 프로드러그를 구성한다.

<7> 본 발명에 따른 MTX 유도체는 항종양 또는 항류머티즘 메토크사트 요소, 스페이서 분자, 펩티드 체인 및 이질 이중 기능성 크로스 링커(heterobifunctional crosslinker)로 구성된다. 상기와 같은 구조는 아래에 상세히 설명될 것이다.

<8> 본 발명에 의한 항종양 MTX 요소는 다음의 구조식을 갖는 활성 물질이다.

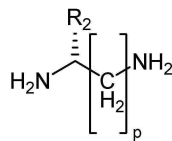


<9>

<10> 여기서 $R_1 = CH_3$ 또는 H이다.

<11> 상기한 바람직한 활성 물질은 메토크사트이다.

<12> 본 발명의 상기한 스페이서 분자는 다음의 일반 구조식을 가진 디아민(diamine)이다.



<13>

<14> 여기서

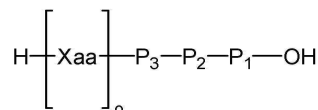
<15> $R_2 = H$ 또는 $COOH$

<16> $p = 1$ 내지 10.

<17> 바람직한 스페이서들은 에틸렌디아민($R_2 = H$, $p = 1$) 및 $p = 4$ 또는 5에서의 스페이서이다. 특히 바람직한 스페이서는 L-리신 ($R_2 = COOH$, $p = 4$)이다.

<18> 본 발명에 있어서, 펩티드는 효소적으로 분해 가능한 시퀀스 및 N-터미널 용해성-조정 요소로 구성되며, 그리고 다음과 같은 일반 구조식을 구비하고 있다.

<19>



<20>

<21> 여기서,

<22> $P_1 - P_3 = L-$ 또는 D-아미노산들

<23> X_{aa} = 알칼리성 사이드 체인을 가진 아미노산

<24> $o = 0-2$.

<25> 본 발명에 있어서, 아미노 산 P₁은 아미노산 리신, 메티오닌, 알라닌, 프롤린 및 글리신으로부터 선택된다. 그리고 아미노산 P₂는 아미노산 류신, 페닐알라닌, 메티오닌, 알라닌, 프롤린 및 타이로신으로부터 선택된다. 그리고 아미노산 P₃는 아미노산 D-알라닌, 알라닌, D-발린, 발린, 류신 및 페닐알라닌으로부터 선택된다. P₁의 위치에서 바람직한 아미노산은 리신, 알라닌 및 메티오닌이다. P₂ 위치에서 바람직한 아미노산은 페닐알라닌, 메티오닌, 알리닌 및 타이로신이다. P₃ 위치에서 바람직한 아미노산은 D-알라닌, 알라닌, D-발린 및 페닐알라닌이다.

<26> 특히 바람직한 펩티드 시퀀스는 다음의 표에 리스트되어 있다.

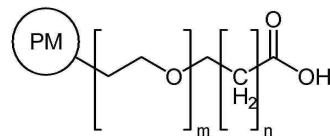
<27>

<28>

P ₃	P ₂	P ₁
D-Ala	Phe	Lys
Ala	Phe	Lys
D-Val	Leu	Lys
Val	Leu	Lys
Ala	Phe	Met
Phe	Ala	Met
Ala	Met	Met
Phe	Met	Met

<29> 본 발명에 따르면, 용해성 조정기 Xaa는 아미노산 아르기닌, 리신 및 히스티딘으로부터 선택된다. 특히 바람직한 기(group)는 아르기닌이다.

<30> 본 발명에 있어서, 이질 이중 기능성 크로스링커는 다음과 같은 일반 구조식을 갖는 단백질 결합기를 갖는 카르복실산이다.



<31>

<32> 여기서,

<33> m = 0 내지 6

<34> n = 0 내지 5

<35> PM = 단백질 결합기.

<36> 상기 단백질 결합기(PM)는 2-디티오피리딘기, 할로젠 아세트아미드기, 할로젠 아세테이트기, 이황화물기, 아크릴산 에스테르기, 모노알킬 말레산 에스테르기, 모노알킬 메일아민산 아미드기, N-히르록시 숙신이미딜 에스테르기, 이소티오시아네이트기, 아지리딘기 또는 메일인이미드기로부터 바람직하게 선택된다. 특히 바람직한 단백질 결합기는 메일인이미드기(maleinimide group)이다.

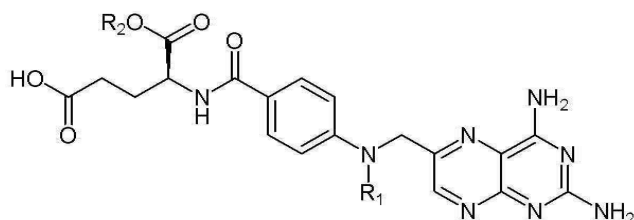
<37> 바람직한 크로스링커는 m=3 및 n=1 뿐만 아니라 m=0 및 n=4로 특징된다.

<38> 본 발명에 따르면, 활성 물질 및 스페이서 분자는 활성 물질의 γ-카르복실기와 스페이서 분자의 제1 아미노기 사이에서 아미노 결합에 의하여 결합되어 있다. 상기 스페이서 분자 및 상기 크로스링커-펩티드 유니트 사이의 결합은 스페이서 분자의 제2 아미노기와 크로스링커-펩티드 유니트의 C-터미널 카르복실기 사이에서 아미드 결합으로 구성된다. 그리고 크로스링커와 펩티드 체인 사이의 결합은 펩티드 체인의 N-터미널 및 크로스링커의 카르복실기 사이의 아미드 결합으로 구성된다.

<39> 본 발명에 따른 MTX 유도체의 중요한 특성은 스페이서 분자와 크로스링커 사이의 결합이 효소적으로 분해될 수 있기 때문에, 이에 따라 종양 조직 또는 류머티즘 조직에서 활성 물질 또는 스페이서 활성 물질 유도체의 릴리즈가 제어 가능하다는 것이다. 카텝신 또는 플라스민과 같은 프로테아제는 다수의 인간 종양 및 류머티즘 조직

에서 과도하게 발현하여, 프로드러그의 목표 지향, 효소 활성화에 대한 이상적인 적용을 가능하게 한다. (Yan, S. et al., *Biol. Chem.* **1998**, *2*, 113-123; Leto, G. et al., *Clin. Exp. Metastasis* **2004**, 91-106; Sloane, B. .F.; Yan, S. et al., *Seminars in Cancer Biology*, **2005**, *15*, 149-157; Dano, K.; Behrendt, N. et al., *Thrombosis & Haemostasis* **2005**, *93*, 676-681; Hashimoto, Y.; Kakegawa, H. et al., *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2001**, *283*, 334-339; Ikeda, Y.; Ikata, T. et al., *J. Med. Invest.* **2000**, *47*, 61-75). 더구나, 본 발명에 의한 MTX 유도체는 류머티즘 관절염을 앓고 있는 환자의 실험적 종양 호모제네이트 및 활액 용액에 있어서 빠른 분해를 보여준다.

<40> 본 발명에 의한 MTX 유도체는 바람직하기로는 다음의 일반 구조식에 의하여 메토틱렉사트 유도체의 농축에 의하여 생산될 수 있다.

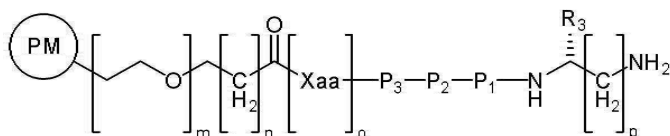


<41>

<42> 여기서,

<43> $R_1 = \text{CH}_3, \text{H}$ 또는 COCF_3

<44> $R_2 = \text{C}(\text{CH}_3)_3$, 다음의 일반 구조식의 크로싱커 펩티드 유닛을 가진 알콕시-치환 벤질기 또는 트리알킬 시릴기



<45>

<46> 여기서,

<47> $R_3 = \text{H}, \text{COOH}$ 또는 COOtBu

<48> $P_1 = \text{리신}, \text{메티오닌}, \text{알라닌}, \text{프롤린}$ 또는 글리신

<49> $P_2 = \text{류신}, \text{페닐알라닌}, \text{메티오닌}, \text{알라닌}, \text{프롤린}$ 또는 티로신

<50> $P_3 = \text{D-알라닌}, \text{알라닌}, \text{D-발린}, \text{발린}, \text{류신}$ 또는 페닐알라닌

<51> $X_{aa} = \text{알칼리성 사이드 체인을 가진 아미노산}$

<52> $m = 0$ 내지 6

<53> $n = 0$ 내지 5

<54> $o = 0$ 내지 2

<55> $p = 1$ 내지 10

<56> PM은 단백질 결합기이다.

<57> 여기서 가능성 있는 친핵성기(possible nucleophilic groups)들은 당업계의 숙련자에게 알려진 보호기(protective groups)에 의해 P_1, P_2 및 X_{aa} 에서 보호되는 방법으로 선택적으로 존재한다.

<58> 본 발명에 따르면, 크로싱커 펩티드 유닛의 카르복실기의 활성화를 위한 시약들, 바람직하게는 O-(아자벤조트리아졸-1-yl)-N,N',N'-테트라메틸우로늄 헥사플루오로포스페이트(HATU), (벤조트리아졸-1-yloxy)tris(디메틸아미노)포스포늄 헥사플루오로포스페이트(BOP), N,N'-디이소프로필 카보디이미드(DIPC), N,N'-디시클로헥실 카보디이미드(DCC) 또는 2-클로로-1-메틸피리디니움 요오드화물은 N-에틸디이소프로필아민(DIEA),

트리알킬아민, 피리딘, 4-디메틸아미노피리딘(DMAP) 또는 히드록시벤조트리아졸(HOBt)과 같은 일반 결정 또는 부속 염기의 추가와 함께 사용한다. 상기의 반응은 예를 들면 바람직하게는 N,N-디메틸 포름아미드와 같은 극성 유기 용매 내에서 수행된다.

- <59> 상기의 반응은 예를 들면 -10℃와 실온 사이의 온도에서 수행되며, 반응 시간은 30분 내지 48시간 사이이다. 중간 제품의 분리는 예를 들면 비극성 용매, 바람직하게는 디에틸에테르로부터 침전을 통하여 얻어진다.
- <60> 본 발명에 따른 제2 합성 단계에 있어서, P₁, P₂ 및 Xaa에서 친핵성 기를 위한 보호기와 함께 보호기 R₂가 제거된다. 이와 같은 분해는 전형적으로는 산을 이용하며, 바람직하게는 트리플루오로아세트산 또는 수소 클로라이드를 이용하여 이루어진다. 본 발명의 바람직한 실시예에 있어서, 제1 합성 단계의 제품은 약 30분 동안 1:1의 비율인 트리플루오로아세트산 및 디클로로메탄의 혼합물을 이용하여 처리된다. 미가공 상태의 제품(raw product)은 비극성 용매, 바람직하게는 디에틸에테르로부터 침전을 통하여 얻어진다.
- <61> 본 발명에 따르면, 미가공 상태의 제품은 결정화 또는 칼럼 크로마토그래피의 방법으로, 바람직하게는 역상 실리카겔(reversed-phase silica gel)에서 얻어진다.
- <62> 본 발명의 바람직한 실시예에 따르면, 메토틱렉사트-γ-tert.-부틸에스테르는 HATU를 결합 시약으로서 이용하여 EMC-D-Ala-Phe-Lys(Boc)-Lys-OH (EMC = 6-메일인이미도카프로익산(maleinimidocaproic acid))으로 농축되고, 그리고 계속해서 트리플루오로아세트산(실시예 1 참조)으로 처리된다.
- <63> 본 발명의 단백질-결합 메토틱렉사트 유도체는 정맥 방법으로, 보다 바람직하게는 정맥 주사의 방법으로 복용된다. 따라서 본 발명에 의한 MTX 유도체는 운반체, 희석제 또는 용액과 같은 일반적인 약학적으로 수용 가능한 보조제를 선택적으로 이용하여 용액, 고형물 또는 라이오필리제이트(lyophilisate)로서 제공된다. 상기와 같은 보조제들은 그 예로서 폴리소르베이트, 글루코스, 락토스, 마니톨, 텍스트란(dextranes), 구연산, 트로메타몰, 트리에탄올아민, 아미노아세트산 또는 합성 폴리머 또는 그 혼합물들이다. 바람직하게는 본 발명에 의한 MTX 유도체는 등장(isotonic) 버퍼 내에서 용해될 때 투여된다. MTX 유도체의 용해도는 200 내지 600g/mol의 분자 무게를 갖는 1,2-프로판디올, 에탄올, 이소프로판올, 글리세롤 또는 폴리(에틸렌 글리콜)과 같은 약학적으로 수용 가능한 용매에 의하여 또는 바람직하게 600g/mol의 분자 무게를 갖는 폴리(에틸렌 글리콜)의 혼합물에 의하여, 또는 Tween 80, 크레포퍼 또는 폴리비닐피롤리돈 또는 그 혼합물과 같은 가용성 매개체에 의하여 선택적으로 개선될 수 있다.
- <64> 본 발명에 의한 MTX 유도체의 중요 특성은 단백질 결합기를 통한 혈청 단백질로의 빠른 공유 결합이다. 이에 따라, 활성 물질의 매크로분자 이송 형태가 얻어진다. 트랜스페린, 알부민 및 LDL과 같은 혈청 단백질은 종양 조직에서 증가된 흡수성(take-up)을 가지며, 류머티즘 조직에서 축적성을 갖는 것으로 알려져 있기 때문에(Kratz F., Beyer U., *Drug Delivery* **1998**, 5, 281-299; Adams, B. K., Al Attia, H. M. et al., *Nuclear Med. Commun.* **2001**, 22, 315-318; Sahin, M., Bernay, I. et al., *Ann. Nuclear Med.* **1999**, 13, 389-395; Liberatore, M., Clemente, M. et al., *J. Nuclear Med.* **1992**, 19, 853-857), 본 발명의 범위 내에서 세포 분열 억제제용으로 내생적인 운반체로서 사용될 수 있다. 바람직한 혈청 단백질은 인간의 혈청 알부민(HAS)을 순환시키며, 상기 혈청 알부민은 평균 농도 30 내지 50g/L를 갖는 인간 혈액의 주요 요소를 구성(Peters T., *Adv. Protein Chem.* **1985**, 37, 161-245)하며, 메일인이미드 또는 디황화물(WO 00/76551)과 같은 티올-결합기를 결합하기에 적절한 단백질 표면상의 자유 시스테인기(시스테인-34-기)를 나타낸다. 본 발명에 의한 메일인이미드 기화 MTX 유도체는 HAS에 대하여 빠른 시간 내에 그리고 선택적으로 결합하는 사실이 실시예 2에 설명되어 있다. 혈청 단백질을 갖는 새로운 MTX 유도체의 반응은 주입액용으로 제공된 알부민, 혈액 또는 혈청과 함께 체외적으로 수행된다.
- <65> 운반체 시스템으로서 합성 폴리머를 갖는 메토틱렉사트 복합물과 비교하여, 본 발명에 의한 MTX 펩타이드 유도체는 화학적으로 분명하게 정의될 수 있는 추가적인 장점을 갖는다.
- <66> 도면은 아래와 같다.
- <67> 도1은 인간 플라스마 및 37℃(λ = 300 nm에서 검출)에서 인간 플라스마에 대한 2분간의 인큐베이션 이후의 EMC-D-Ala-Phe-Lys-Lys(γ-MTX)-OH (3) 및 EMC-D-Ala-Phe-Lys-Lys(γ-MTX)-OH (3)의 크로마토그램을 도시하는 도면이다.
- <68> 도2는 37℃에서 인간 플라스마를 이용한 2분간의 인큐베이션 이후 그리고 30분 동안 EMC (1000 mM)로 사전에 인큐베이트 처리된 인간 플라스마를 이용한 인큐베이션의 5분 이후에 EMC-Arg-Ala-Phe-Met-Lys(γ-MTX)-OH

(C162) (200 mM) 의 크로마토그램을 나타낸 도면.

- <69> 도3은 인간 플라스민($\lambda = 370$ nm에서 검출)을 이용한 4시간의 인큐베이션 이후의 EMC-D-Ala-Phe-Lys-Lys(γ -MTX)-OH의 HSA 복합물의 크로마토그램을 도시하는 도면.
- <70> 도4는 인간 플라스민을 이용한 인큐베이션의 0, 1, 4 및 20 시간 이후 및 버퍼 상태($\lambda = 300$ nm에서 검출)에서 24시간 이후의 EMC-D-Ala-Phe-Lys-Lys(γ -MTX)-OH (3) 의 HSA 복합물의 크로마토그램을 도시하는 도면.
- <71> 도5는 케텡신 B($\lambda = 370$ nm에서 검출)을 이용한 4시간의 인큐베이션 이후의 EMC-D-Ala-Phe-Lys-Lys(γ -MTX)-OH 의 HSA 복합물의 크로마토그램을 도시하는 도면.
- <72> 도6은 케텡신 B를 이용한 인큐베이션의 0, 1, 4, 24 시간 이후 그리고 버퍼 상태($\lambda = 300$ nm에서 검출)에서 24 시간 이후의 EMC-D-Ala-Phe-Lys-Lys(γ -MTX)-OH (3)의 HSA 복합물의 크로마토그램을 도시하는 도면.
- <73> 도7은 OVCAR-3 종양 이종 이식($\lambda = 370$ nm에서 검출)을 이용한 인큐베이션 4시간 이후의 EMC-D-Ala-Phe-Lys-Lys(γ -MTX)-OH 의 HSA 복합물의 크로마토그램을 도시하는 도면.
- <74> 도8은 RA 환자($\lambda = 370$ nm에서 검출)의 활액(synovial fluids)을 이용한 4시간의 인큐베이션 이후의 EMC-Arg-Ala-Phe-Met-Lys(γ -MTX)-OH (C162)의 HSA 복합물의 크로마토그램을 도시하는 도면.
- <75> 도9는 OVCAR-3 모델에서 종양 성장 과정을 도시하는 도면.
- <76> 도10은 콜라겐 유도 관절염 모델에서 RA 스코어의 과정을 도시하는 도면.
- <77> 도11은 조기 치료 프로토콜(면역화 14일 기준 치료 시작)을 이용한 콜라겐 유도 관절염 모델에서 관절염 발생의 과정을 도시하는 도면.
- <78> 도12는 조기 치료 프로토콜(면역화 14일 기준 치료 시작)을 이용한 콜라겐 유도 관절염 모델에서 관절염 스코어의 과정을 도시하는 도면.
- <79> 도13은 조기 치료 프로토콜(면역화 42일 기준 치료 시작)을 이용한 콜라겐 유도 관절염 모델에서 관절염 스코어의 과정을 도시하는 도면.
- <80> 도14는 조기 치료 프로토콜(면역화 30일 기준 치료 시작)을 이용한 콜라겐 유도 관절염 모델에서 관절염 스코어의 과정을 도시하는 도면.
- <81> 도15는 콜라겐 유도 관절염 모델에서 사이토카인, 케모카인 및 효소 농도의 측정 결과를 도시하는 도면이다.
- <82> 이하에 제한을 두지 않고 본 발명의 실시예들을 상세히 설명하면 다음과 같다.

실시예

- <83> 실시예 1
- <84> EMC-D-Ala-Phe-Lys-Lys(γ -MTX)-OH의 제조
- <85> DIEA (27.2 μ L, 159 μ mol) 및 HATU (13.29 mg, 34.96 μ mol)를 연속적으로 150 μ L의 무수 DMF에서 메토티렉사트- α -tert.-부틸 에스테르 (MTX- α -OtBu) (17.85 mg, 34.96 μ mol)의 용액 내에 추가하였다. 초음파 욕조(bath) 내에서 2분간 처리한 이후에, 반응 혼합물을 1.5mL의 무수 DMF 내에서 EMC-D-Ala-Phe-Lys(Boc)-Lys-OH (31.78 μ mol)의 용액에 추가하고, 그리고 실온에서 1시간 동안 저었다. 결과적으로, 반응 혼합물을 100mL의 디에틸 에테르에 더하고, 그리고 침전물을 원심 분리하였으며, 이후에 디에틸 에테르로 세척하고 진공 상태에서 건조시켰다. 보호기를 분해시키기 위하여, 미가공 제품을 5mL의 디클로로메탄/TFA 1:1을 이용하여 1시간 동안 처리하고, 100mL의 디에틸 에테르에 더하고, 침전물을 원심분리 처리하여, 디에틸 에테르를 이용하여 2회 세척하고 진공 상태에서 건조 시켰다. HPLC (C18 역위상(reverse phase), MeCN/물 30:70, 0.1 % TFA)와 요필라이제이션(lyophilization)을 제조한 이후에, 가볍고 황색의 고형 물질 EMC-D-Ala-Phe-Lys-Lys(γ -MTX)-OH를 얻었다.
- <86> ESI-MS (4.0 kV, MeCN): m/z (%) 1122.3 ($[M + H]^+$, 100), 1144.4 ($[M + Na]^+$, 73)
- <87> 실시예 2
- <88> 인간 플라즈마 내에서 EMC-D-Ala-Phe-Lys-Lys(γ -MTX)-OH to HAS의 결합
- <89> 인간 혈액 플라즈마의 샘플을 37°C에서 2분 동안 EMC-D-Ala-Phe-Lys-Lys(γ -MTX)-OH (200 μ M)을 이용하여 인큐

배이션시킴, 증감 용리(gradient elution)(유동: 1.2 mL/min; 용리액(eluent) A: 30 % 20 mM K₂HPO₄ pH 7, 70 % 아세토니트릴(acetonitrile); 용리액 B: 85 % 20 mM K₂HPO₄ pH 7, 15 % 아세토니트릴; 경도(gradient): 20 min 용리액 B 아이소크래틱(isocratic), 25 min 0-100 % 용리액 A 선형(linear), 5 min 용리액 A 아이소크래틱(isocratic))의 방법으로 C₁₈-RP-HPLC 칼럼(column) (Symmetry(상표명) 300-5 4.6 x 250 mm by Waters with pre-column filter)에서 크로마토그래피를 이용하여 분석하였다. MTX 유도체에 대한 300 nm 특성의 파장에서의 검출 결과는 프로드러그 피크의 거의 완전한 감소를 보여주고 있으며, 그리고 알부민(t=32분)의 유보 시간에서 흡수의 정도에 있어서 증가를 보였다. (도1참조)

<90> 그리고, 해당하는 피크 영역에서 24시간 이후의 추가 분석에서, 10% 미만의 MTX 감소가 있었다.

<91> 실시예 3

<92> 인간 플라즈마 내에서 EMC-D-Ala-Phe-Lys-Lys(γ-MTX)-OH to HAS의 결합

<93> 인간 혈액 플라즈마의 샘플을 37℃에서 2분 동안 EMC-D-Ala-Phe-Lys-Lys(γ-MTX)-OH (200 μM)을 이용하여 인큐베이션시킴, 증감 용리(gradient elution)(유동: 1.2 mL/min; 용리액(eluent) A: 30 % 20 mM K₂HPO₄ pH 7, 70 % 아세토니트릴(acetonitrile); 용리액 B: 85 % 20 mM K₂HPO₄ pH 7, 15 % 아세토니트릴; 경도(gradient): 20 min 용리액 B 아이소크래틱(isocratic), 25 min 0-100 % 용리액 A 선형(linear), 5 min 용리액 A 아이소크래틱(isocratic))의 방법으로 C₁₈-RP-HPLC 칼럼(column) (Symmetry(상표명) 300-5 4.6 x 250 mm by Waters with pre-column filter)에서 크로마토그래피를 이용하여 분석하였다. MTX 유도체에 대한 370 nm 특성의 파장에서의 검출 결과는 프로드러그 피크의 거의 완전한 감소를 보여주고 있으며, 그리고 알부민(t=40분)의 유보 시간에서 흡수의 정도에 있어서 증가를 보였다. (도2 참조)

<94> 알부민의 시스테인-34-기를 저지하기 위하여 실시한 5분 동안 EMC(1000 μM)로 미리 인큐베이션 처리하여 얻어진 인간 혈액 플라즈마를 이용하여 반복된 테스트의 결과에 따르면, EMC-Arg-Ala-Phe-Met-Lys(γ-MTX)-OH로 인큐베이션 하는 동안 알부민에 대한 프로드러그의 결합을 보여주지 못하였다. 크로마토그램에서는, 단지 자유 프로드러그가 370 nm에서 검출되었다.

<95> 실시예 4

<96> 카텝신 B 및 플라스민에 의한 EMC-D-Ala-Phe-Lys-Lys(γ-MTX)-OH로부터의 알부민 복합물의 효소의 분해

<97> 알부민 복합물의 제조: 4.00mg의 EMC-D-Ala-Phe-Lys-Lys(γ-MTX)-OH를 실온에서 5% HAS 용액(Octopharm)의 8 mL에 용해 시켰으며, 그리고 2시간 동안 37℃에서 흔들었다. 상기 샘플을 일회용 센트리프리트(상표명) 농축 장치를 이용한 농축 과정을 통하여 700 μM의 농도로 만들었다.

<98> 플라스민의 분해: 100 μL의 알부민 복합물 용액을 500 μL의 버퍼(4 mM 소듐 포스페이트, 150 mM NaCl, pH 7.4)로 희석 시키고, 그리고 20 μL의 인간 플라즈마 플라스민(370 mU)을 추가하고, 상기의 혼합물을 37℃에서 인큐베이션 시켰다. 분해 제품의 확인은 실시예 2에 설명된 HPLC의 방법으로 실시하였다(도 3 및 도 4).

<99> 카텝신 B의 분해: 180 μL의 알부민 복합물 용액을 270 μL의 버퍼(50 mM 용액 아세테이트, 100 mM NaCl, 4 mM EDTA*2 Na, 8 mM L-시스테인, pH 5.0)으로 희석하고, 그리고 90 μL의 인간 케테신 B(2.1U)를 추가하고, 그리고 37℃에서 인큐베이션 처리하였다. 분해 제품의 확인은 실시예 2에 설명된 HPLC의 방법으로 수행하였다(도 5 및 도 6).

<100> 결과: 효소를 이용한 인큐베이션의 1시간 및 4시간 이후에, 4분 까지의 시점에 있어서 분해 제품으로서 H-Lys(γ-MTX)-OH의 형성은 상기 두 가지의 경우에 있어서 관찰 가능하였다. 그리고 시간이 경과하는 동안에, 알부민 복합물의 농도는 감소하였으며, 그리고 분해 제품의 농도는 증가하였다. 분해 제품은 Lys-Lys 결합의 단백질 가수분해로부터 얻어졌다.

<101> 실시예 5

<102> 인간 난소 이종 이식(OVCAR-3)의 호모제네이트에서 HSA-EMC-D-Ala-Phe-Lys-Lys(γ-MTX)-OH의 분해

<103> 종양 이종 이식의 제조: 종양 재료는 외과용 메스를 이용하여 세분화하였으며, 그리고 200 mg의 질량체를 3-4 유리 비드(beads)를 추가하여 800 μL의 버퍼(트리스-버퍼 pH 7.4)를 이용하여 셰이커(shaker) 내에서 이종 이식되었다. 그 이후에 4℃에서 원심 분리가 실시되었으며, 상청액을 200 μL로 나누었다.

<104> 실시예 4에 설명된 알부민 복합물 EMC-D-Ala-Phe-Lys-Lys(γ -MTX)-OH의 용액 100 μ L을 500 μ L의 이중 이식 용액 (이중 이식, 버퍼를 이용하여 1:2로 희석[4 mM 소듐 포스페이트, 150 mM NaCl, pH 7.4])으로 희석시켰으며, 그리고 37°C에서 인큐베이션 처리하였다. 분해 제품의 확인은 실시예 2에 기술된 HPLC 방법으로 실시되었다(도 7).

<105> 결과 : OVCAR-3 종양 이중 이식을 이용한 4시간의 인큐베이션 이후에, H-Lys(γ -MTX)-OH의 형성이 분해 제품으로서 관찰되었다.

<106> 실시예 6

<107> RA 환자의 활액에서의 EMC-Arg-Ala-Phe-Met-Lys(γ -MTX)-OH (C162)의 분해

<108> 알부민 복합물의 제조 : 4.00 mg의 EMC-Arg-Ala-Phe-Met-Lys(γ -MTX)-OH를 실온에서 8 mL의 5% HAS 용액 (Octopharm) 내에 용해시키고 그리고 37°C에서 2시간 동안 흔들었다. 상기 샘플은 일회용 센트리프리프(상표명) 농축기를 이용한 농축에 의하여 700 μ M로 농축하였다.

<109> 그리고 70 μ L의 EMC-Arg-Ala-Phe-Met-Lys(γ -MTX)-OH의 알부민 복합물의 용액을 140 μ L 활액(6명의 류머티즘 관절염 환자의 활액, 증류수로 1:1 희석)으로 희석되었으며, 그리고 37°C에서 인큐베이트되었다. 분해 제품의 확인은 실시예 2에 설명된 HPLC의 방법으로 이루어 졌다(도 8).

<110> 결과 : 류머티즘 관절염 환자의 활액을 이용한 4시간 동안의 인큐베이션 이후에, 분해 제품으로서 H-Lys(γ -MTX)-OH의 형성을 관찰할 수 있었다.

<111> 실시예 7

<112> EMC-D-Ala-Phe-Lys-Lys(γ -MTX)-OH 및 EMC-Arg-Arg-Ala-Met-Lys(γ -MTX)-OH *in vivo* (중양 저해 특성)의 효과

<113> 아래에 리스트로 보여진 그리고 도 9의 생물학상의 데이터는 자유 메토틱렉사트와 비교하여 EMC-D-Ala-Phe-Lys-Lys(γ -MTX)-OH (AW054-EMC) 및 EMC-Arg-Arg-Ala-Met-Lys(γ -MTX)-OH (C175)에 있어서 개선된 생체 내 효과를 보였다.

<114> 동물 : 벗겨진 쥐 NMRI; 종양 모델: OVCAR-3(피하에서 성장하는 난소암)

<115> 치료 : 7, 14, 21, 28일째; i.v. (10 mM 소듐 포스페이트/5% D-글루코오스 버퍼 pH 6.4); 메토틱렉사트 등가에 따른 복용량

<116>

물질	복용량 [mg/Kg]	체중 변화 [%]	T/C [%] 최대값
MTX	4 x 100	+19	69
AW054-EMC	4 x 15	+12	29
C175	3 x 15	+7	40

<117> 실시예 8

<118> EMC-D-Ala-Phe-Lys-Lys(γ -MTX)-OH *in vivo* (항류머티즘 특성)의 효과

<119> 아래에 리스트로 보여진 그리고 도 10의 생물학상의 데이터는 자유 메토틱렉사트와 비교하여 EMC-D-Ala-Phe-Lys-Lys(γ -MTX)-OH (AW054-EMC)에 있어서 개선된 생체 내 효과를 보였다.

<120> 동물 : 쥐(m, DBA/1; 모델: 콜라겐 유도 관절염 모델)

<121> 치료 : 30, 34, 37, 41, 44, 48일째; i.v. (10 mM 소듐 포스페이트/5% D-글루코오스 버퍼 pH 6.4); 메토틱렉사트 등가에 따른 복용량

<122>

물질	복용량 [mg/Kg]	체중 변화 [%]	RA 스코어 태그 55
제어		+9.5	8.10
MTX	6 x 35	+6.9	8.30
AW054-EMC	6x 20	-0.2	5.00

<123> 아래에 리스트로 보여진 그리고 도 11 내지 도 15 및 테이블 1에 보여진 생물학적 데이터는 메토틡렉사트와 비교하여 EMC-D-Ala-Phe-Lys-Lys(γ-MTX)-OH (AW054-EMC)에 있어서 개선된 생체 내 효과를 보였다.

<124> 동물 : 쥐(m, DBA/1; :모델 : 콜라겐 유도 관절염 모델)

<125> 치료 : 14, 42 및 32일째를 기준으로 1주당 2회; i.v. (10 mM 소디움 포스페이트/5% D-글루코오스 버퍼 pH 6.4); 메토틡렉사트 등가에 따른 복용량

<126> 물질 및 복용량은 도 11 내지 도 15에 표시되어 있다.

<127> 6일 치료 이후에 혈청내의 단백질 농도의 측정은 제조자의 프로토콜에 따라 ELISA(R&D 시스템 비스바텐 독일 회사로부터 상업적으로 구입이 가능함)를 이용하여 수행하였다.

<128> 다음의 테이블 1은 MTX를 이용한 치료에 대한 반응 또는 초기의 치료 프로토콜에 있어서 NaCl 제어와 비교하여 AW054의 서로 다른 복용량을 보여준다. AW054를 이용한 치료방법은 테스트 마지막 단계에서 발달된 관절염에 있어서 발생 빈도를 줄이는 결과를 가져왔으며, 그리고 평균 관절염 스코어를 감소시켰으며, 관절염의 제1 발생 시점까지의 시간을 연장하였으며, 상당히 진행된 상태의 관절염을 개선하고 또는 심지어 축소를 가져왔다.

<129> 표 1

(±표준 편차)	NaCl 제어 n=29	MTX 35mg/kg n=15	AW054 21mg/kg n=14	AW054 42mg/kg n=11
시험 말기에 있어 관절염의 발생률 (%)	29 (100)	9 (60)	9 (64)	2 (18)
시험 말기에 있어 평균 관절염 수치	11.1(±3.1)	3.1 (±3.4)	3.7 (±4.3)	0.8 (±2.4)
여러 날들의 치료 후 소생된 관절염의 발생 때까지의 평균기간	8.3 (±5.7)	17.3(±10.8)	6.8 (±7.6)	11.5 (±11.1)
질병 발생 후 개선 또는 달성된 감소	0 (0)	8 (53)	10 (71)	8 (73)

<131> 상기 실시예들로부터 알 수 있듯이 인간 혈액 플라스마를 이용한 인큐베이션 이후에 해당하는 알부민 복합물은 2분 뒤에 형성되었다. 상기 복합물은 충분한 플라스마 안정성을 보여주었으며, 인간 플라스민 및 카텡신 B에 있어서 효율적인 분해가 관측되었다. 이와 같은 분해는 예를 들면 H-Lys(γ-MTX)-OH를 형성하게 되며, 상기의 형성에 따라 낮은 분자 분해 제품을 만들 수 있게 된다. 그러나 이와 같은 분해 제품은 MTX 및 리신 내로 더 이상 분해되지 않으며, 그에 따른 생체 내 테스트는 본 발명에 따른 MTX-리신 유도체가 그 자체로 활성도가 높다는 것을 보여준다. 메토틡렉사트와 비교하여, 훨씬 많은 복용량과 함께 증가된 효율을 보여준다. 콜라겐 유도 관절염 모델의 경우에 있어서, 해당하는 메토틡렉사트 등가 복용량의 약 20%에 해당한다. 그리고, 그러한 유도체는 장시간 동안 활성 상태이며, SDF-1 및 IL-10과 같은 혈청 농도가 현저히 감소하였다.

산업상 이용 가능성

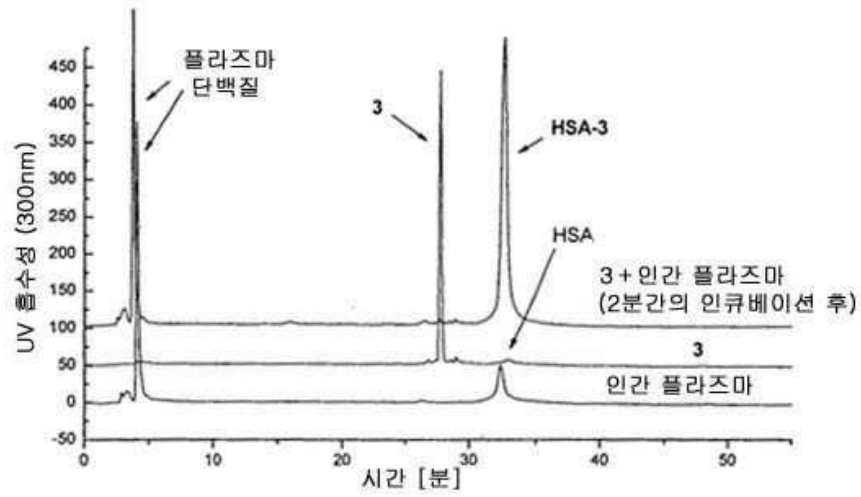
<132> 본 발명에 따른 MTX 유도체의 중요한 특성은 스페이스 분자와 크로스링커 사이의 결합이 효소적으로 분해될 수 있기 때문에, 이에 따라 종양 조직 또는 류머티즘 조직에서 활성 물질 또는 스페이스 활성 물질 유도체의 릴리즈가 제어 가능하다는 것이며, 카텡신 또는 플라스민과 같은 프로테아제는 다수의 인간 종양 및 류머티즘 조직에서 과도하게 발현하여, 프로드러그의 목표 지향, 효소 활성화에 대한 이상적인 적응을 가능하게 한다.

<133> 또한 알부민 복합물은 충분한 플라스마 안정성을 보여주었으며, 인간 플라스민 및 카텡신 B에 있어서 효율적인 분해가 관측되었는 바, 이와 같은 분해는 예를 들면 H-Lys(γ-MTX)-OH를 형성하게 되며, 상기의 형성에 따라 낮은 분자 분해 제품을 만들 수 있게 되나 이와 같은 분해 제품은 MTX 및 리신 내로 더 이상 분해되지 않으며, 그에 따른 생체 내 테스트는 본 발명에 따른 MTX-리신 유도체가 그 자체로 활성도가 높다는 것 및 메토틡렉사트와 비교하여, 훨씬 많은 복용량과 함께 증가된 효율을 보여주며, 그러한 유도체는 장시간 동안 활성 상태이며, SDF-1 및 IL-10과 같은 혈청 농도가 현저히 감소함으로써 암 및 관절염과 같은 질병들에 효과적으로 사용할 수

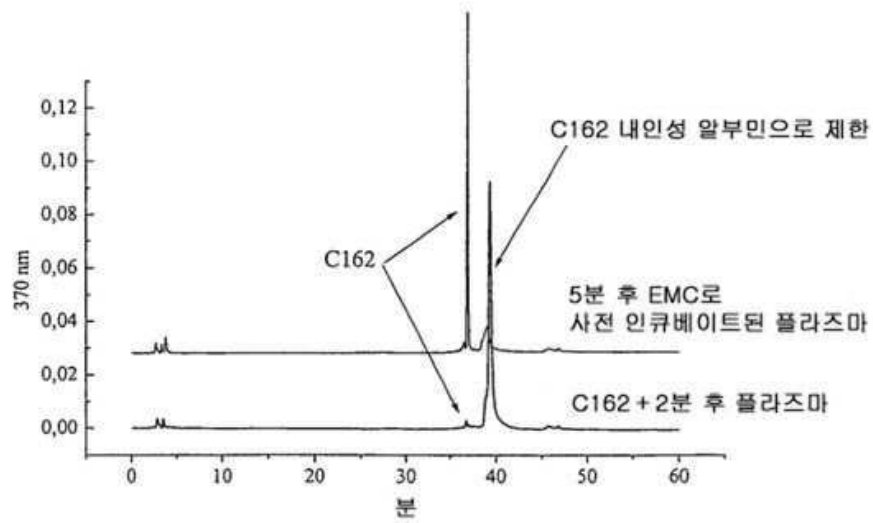
있다.

도면

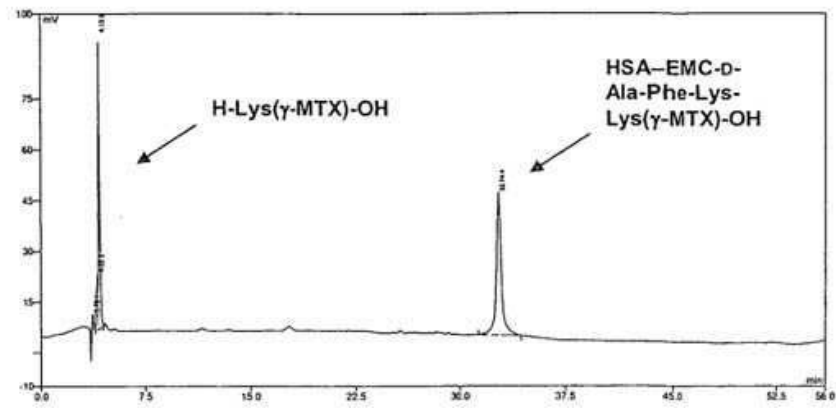
도면1



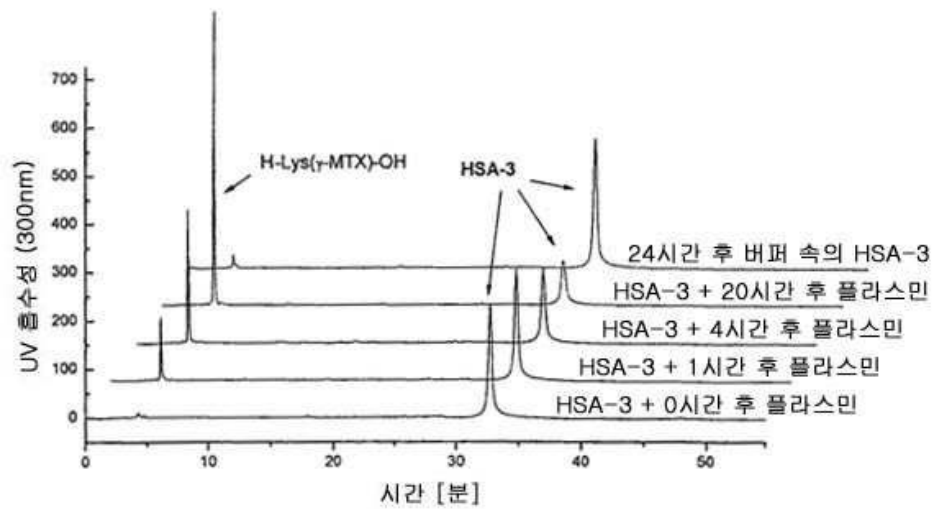
도면2



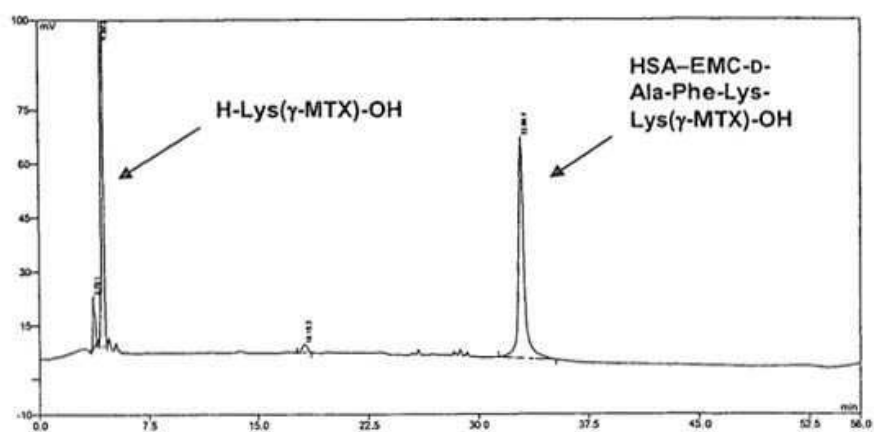
도면3



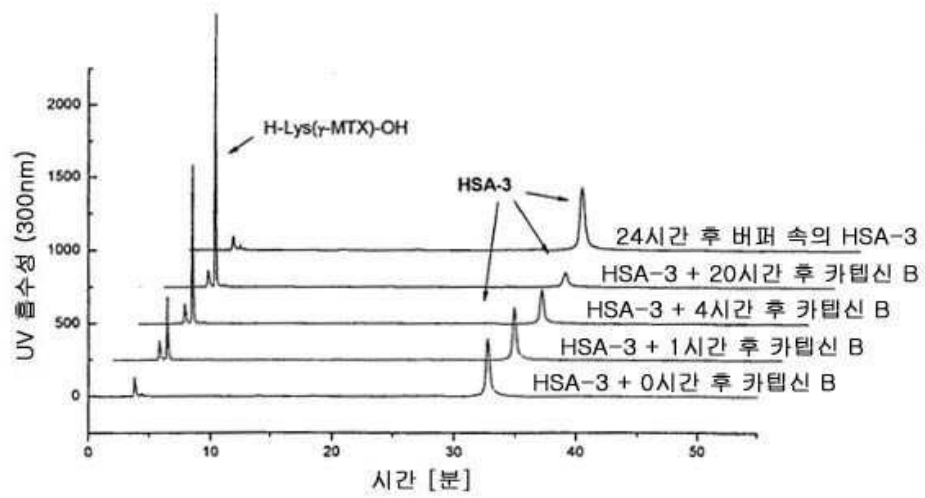
도면4



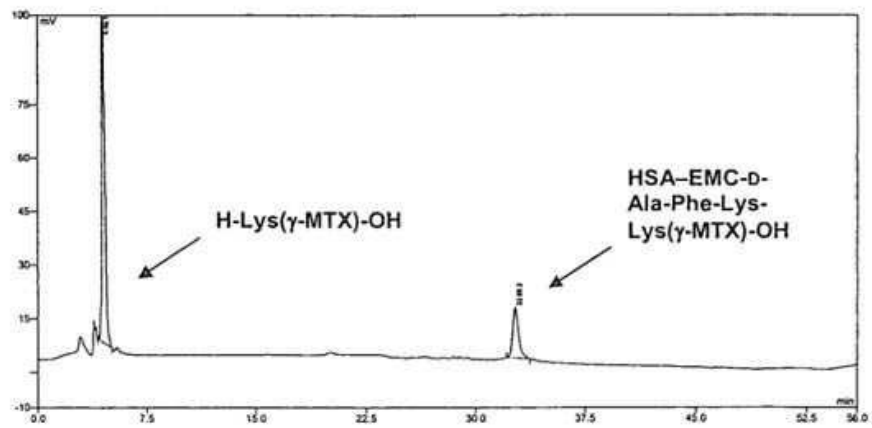
도면5



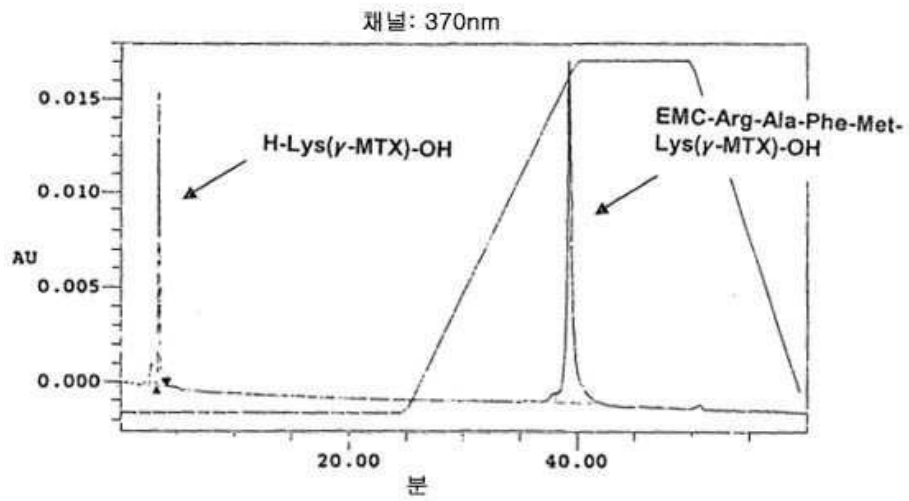
도면6



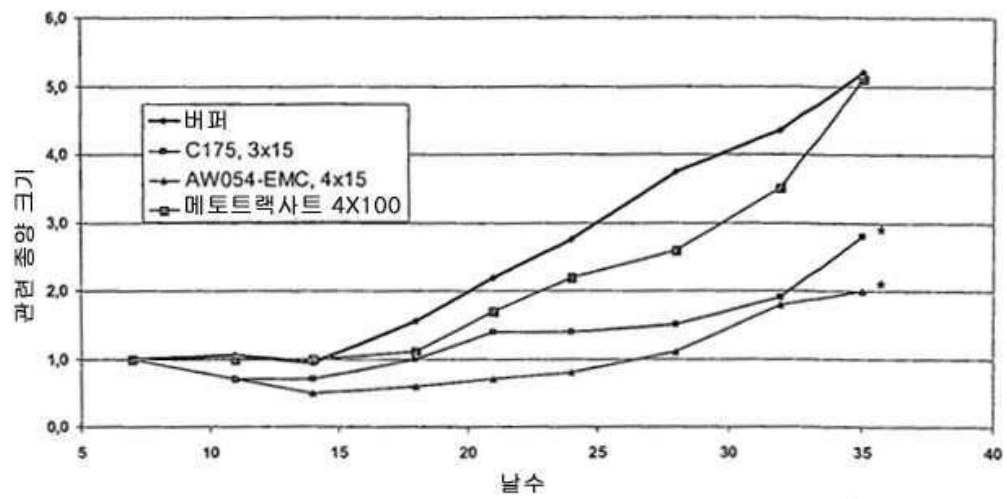
도면7



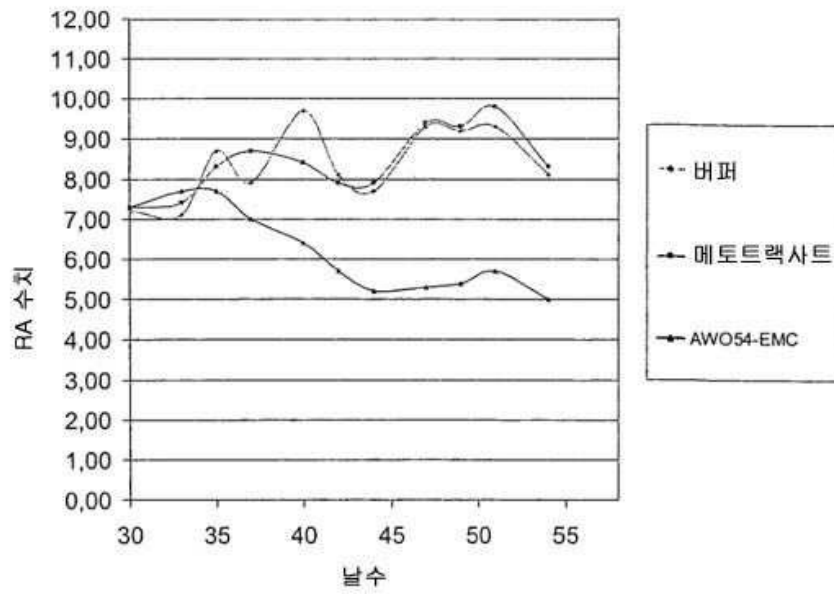
도면8



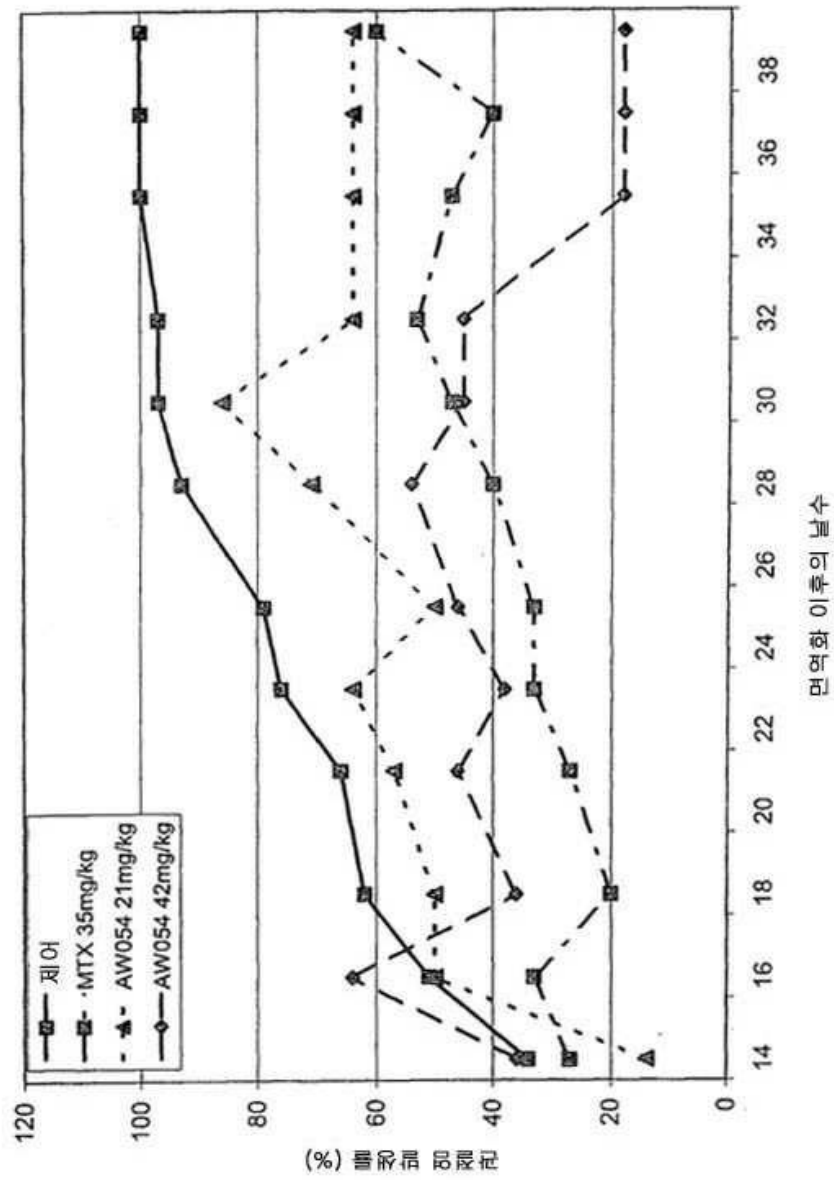
도면9



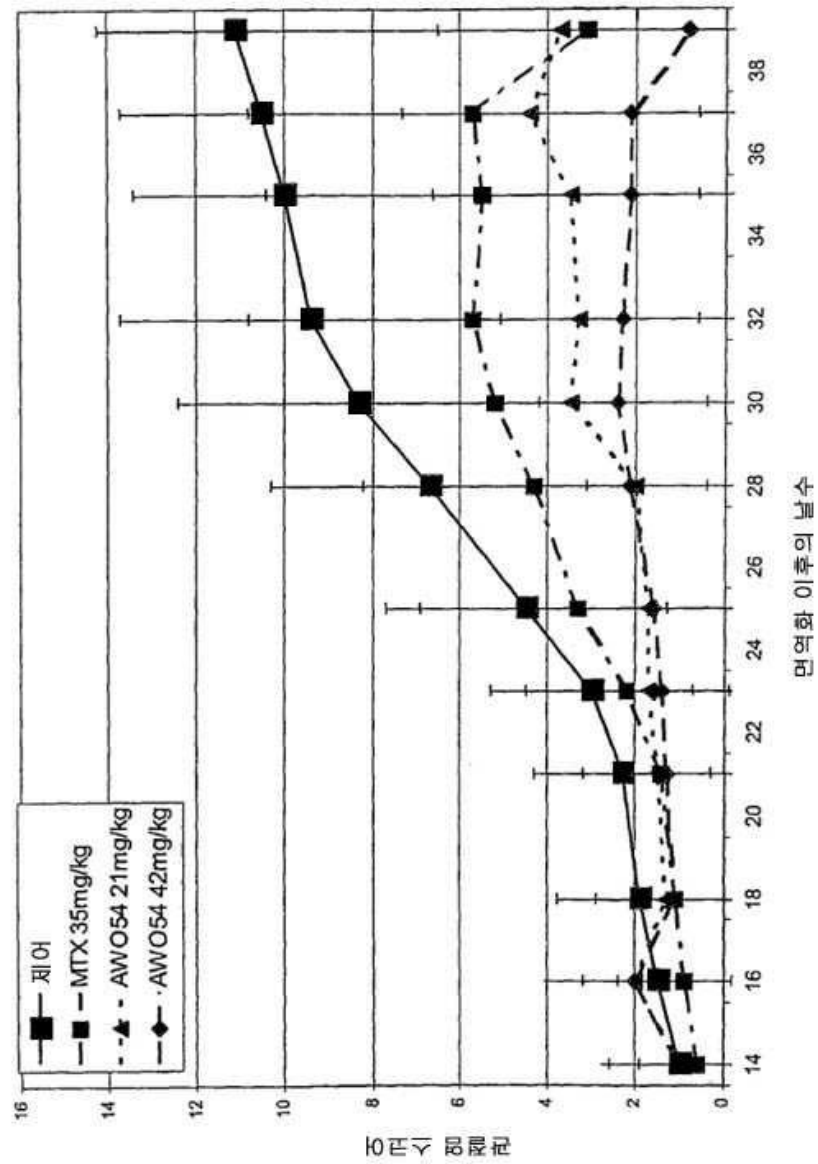
도면10



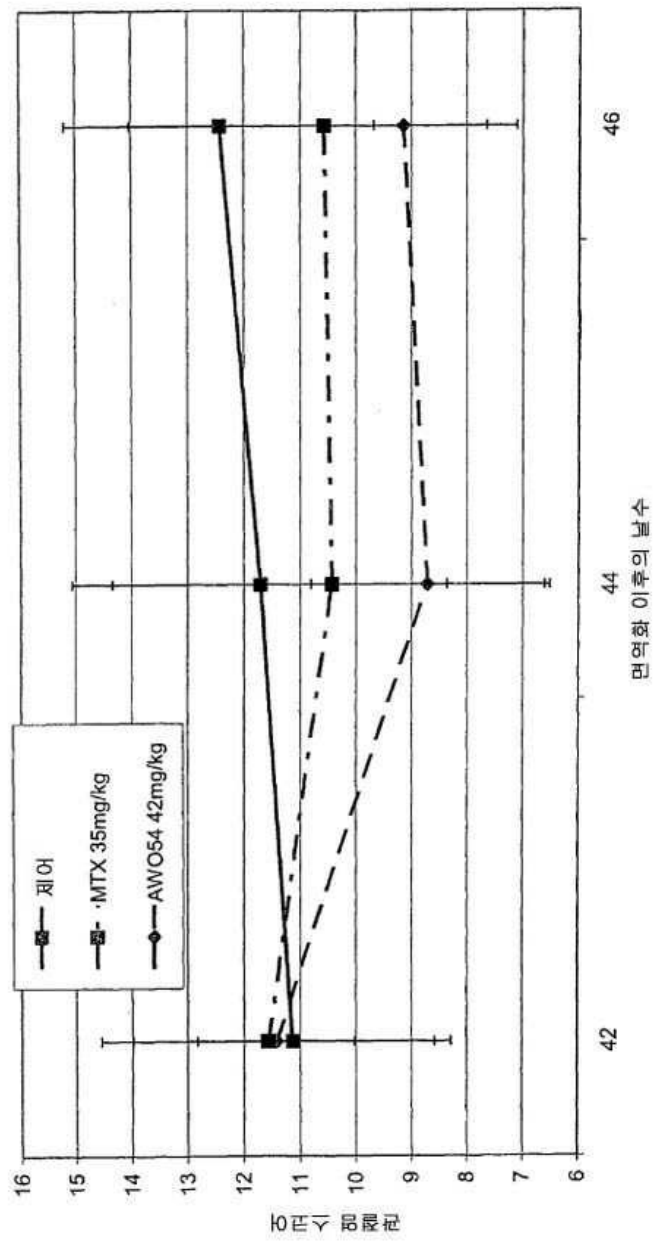
도면11



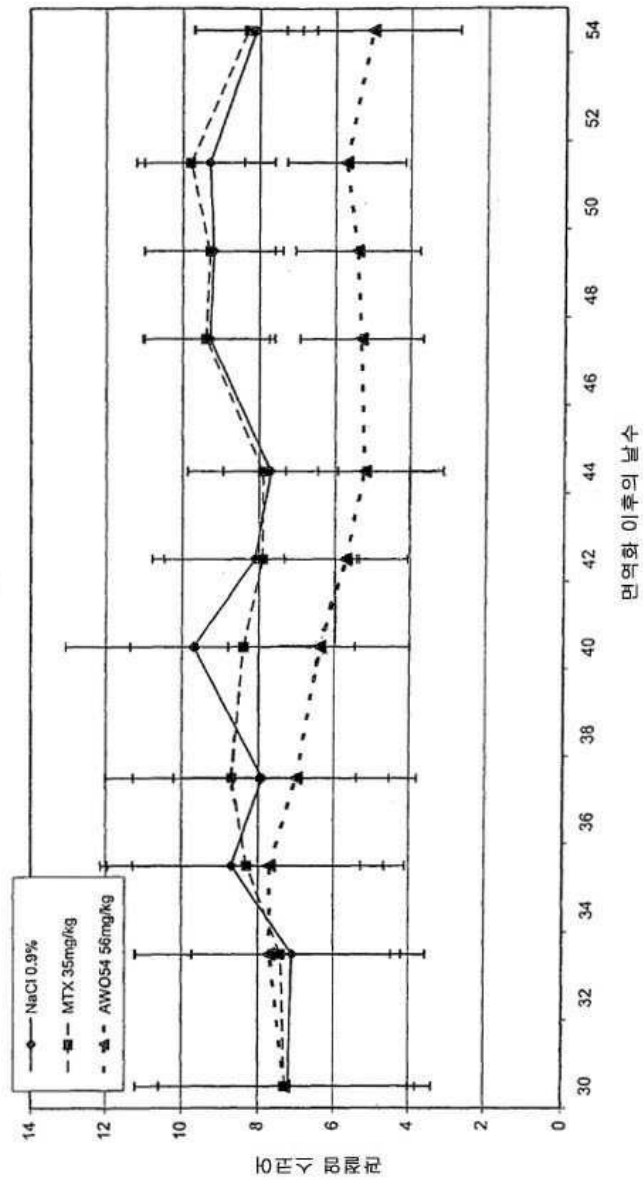
도면12



도면13



도면14



도면15

