



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2019-0133252
(43) 공개일자 2019년12월02일

- (51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 47/60 (2017.01) A61K 31/4745 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01) C08G 65/329 (2006.01)
C08G 65/333 (2006.01)
- (52) CPC특허분류
A61K 47/60 (2017.08)
A61K 31/4745 (2013.01)
- (21) 출원번호 10-2019-7032879
- (22) 출원일자(국제) 2018년04월19일
심사청구일자 2019년11월06일
- (85) 번역문제출일자 2019년11월06일
- (86) 국제출원번호 PCT/CN2018/083746
- (87) 국제공개번호 WO 2018/192550
국제공개일자 2018년10월25일
- (30) 우선권주장
201710263113.4 2017년04월21일 중국(CN)
(뒷면에 계속)

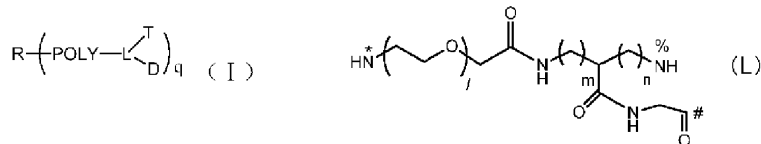
- (71) 출원인
브라이트제네 바이오-메디컬 테크놀로지 코., 엘티디.
중국, 장쑤 215123, 바이오-베이 쑤저우 인더스트리얼 파크 쑤저우 쑹후 스트리트, 넘버 218, 빌딩 씨25
- (72) 발명자
위안 지옌둥
중국 215123 장쑤 쑤저우 인더스트리얼 파크 쑤저우 쑹후 스트리트 넘버 218 바이오-베이 빌딩 씨25
- 황 양칭
중국 215123 장쑤 쑤저우 인더스트리얼 파크 쑤저우 쑹후 스트리트 넘버 218 바이오-베이 빌딩 씨25
(뒷면에 계속)
- (74) 대리인
유미특허법인

전체 청구항 수 : 총 17 항

(54) 발명의 명칭 멀티 암 표적 항암 콘주게이트

(57) 요약

본 발명은, 구조식(I)로 나타내는 구조를 가지는 다분지 약물 콘주게이트 또는 그의 약학적으로 허용되는 염에 관한 것이다.



(식 중, R은 유기 중심이며, POLY는 폴리머이며, L은 다가 링커이며, T는 표적 분자이며, D는 활성제이며, q는 3~8이 임의의 정수이다. 다만, L에 있어서, 기호 「*」은, 다가 링커 L과 표적 분자 T의 결합점을 나타내고, 「#」은, 다가 링커 L과 활성제 D의 결합점을 나타내고, 「%」는, 다가 링커 L과 POLY의 결합점을 나타내고, i는 2~20이 임의의 정수이며, m, n은 각각 0~10이 임의의 정수이다. T는, iRGD, cRGD, tLyp-1, Lyp-1, RPARPAR, Angiopep2 또는 GE11이다. D는 캅토테신계 약물이다.)

(52) CPC특허분류

A61P 35/00 (2018.01)

C08G 65/329 (2013.01)

C08G 65/33396 (2013.01)

(72) 발명자

송 원승

중국 215123 장쑤 쑤저우 인터스트리얼 파크 쑤저우
우 쑹후 스트리트 넘버 218 바이오-베이 빌딩 씨25

딩 하이평

중국 215123 장쑤 쑤저우 인터스트리얼 파크 쑤저우
우 쑹후 스트리트 넘버 218 바이오-베이 빌딩 씨25

(30) 우선권주장

201710263114.9 2017년04월21일 중국(CN)

201710263126.1 2017년04월21일 중국(CN)

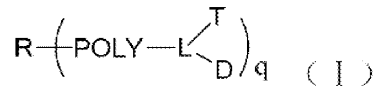
명세서

청구범위

청구항 1

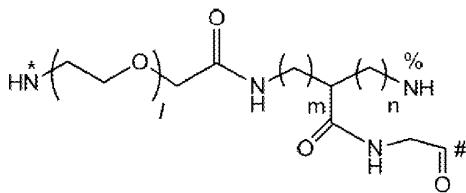
하기 구조식(I)을 가지는, 다분지 약물 콘쥬게이트 또는 그의 약학적으로 허용되는 염:

[화학식 1]



(상기 구조식(I) 중에서, R은 유기 중심이며, POLY는 폴리머이며, L은 다가 링커이며, T는 표적 분자이며, D는 활성제이며, q는 3~8이 임의의 정수이고, 다만, L은

[화학식 2]

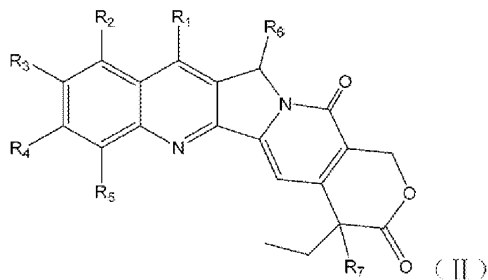


(상기 식 중에서, 기호 「*」는, 다가 링커 L과 표적 분자 T의 결합점을 나타내고, 「#」은, 다가 링커 L과 활성제 D의 결합점을 나타내고, 「%」는, 다가 링커 L과 POLY의 결합점을 나타내고, l은 2~20의 임의의 정수이며, m, n은 각각 0~10의 임의의 정수임)이며,

T는, 「알기닌-글리신-아스파라긴산」의 서열을 포함하는 RGD 펩티드, tLyp-1, Lyp-1, RPARPAR, Angiopep2, 또는 GE11이며,

D는 하기 식(II)으로 표시되는 캄토테신계 약물이고,

[화학식 3]



(상기 식(II) 중에서, R₁~R₅는 각각 독립적으로, 수소, 할로젠, 아실기, 알킬기, 치환 알킬기, 알콕시기, 치환 알콕시기, 알케닐기, 알키닐기, 시클로알킬기, 하이드록시기, 시아노기, 니트로기, 아지드기, 아미드기, 히드라진, 아민기, 치환 아민기, 하이드록시카르보닐기, 알콕시카르보닐기, 알콕시카르보닐옥시기, 카르바모일옥시기, 아릴술폰닐옥시기, 알킬술폰닐옥시기로 이루어지는 군으로부터 선택되고, R₆는 H 또는 OR₆이며, R₆은, 알킬기, 알케닐기, 시클로알킬기, 할로겐화 알킬기, 또는 하이드록시알킬기이며, R₇은 하이드록시기임)).

청구항 2

제1항에 있어서,

T는 cRGD 또는 iRGD인, 다분지 약물 콘쥬게이트 또는 그의 약학적으로 허용되는 염.

청구항 3

제1항에 있어서,

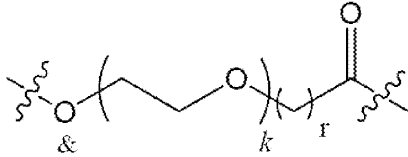
POLY는 폴리에틸렌글리콜인, 다분지 약물 콘주게이트 또는 그의 약학적으로 허용되는 염.

청구항 4

제3항에 있어서,

POLY는,

[화학식 4]



인, 다분지 약물 콘주게이트 또는 그의 약학적으로 허용되는 염:

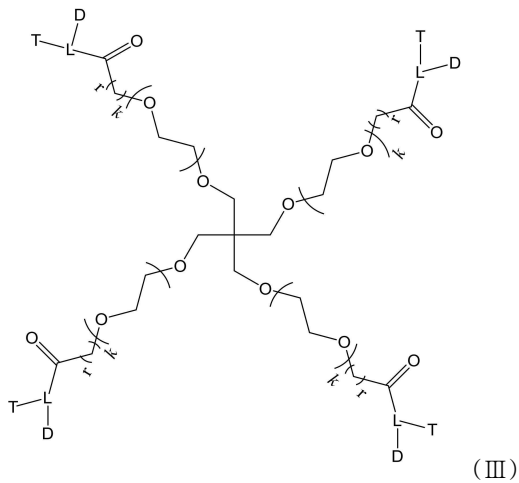
(상기 식 중에서, 「 \sim 」은 원자의 결합점을 나타내고, 「&」가 부여된 산소 원자는, 유기 중심 「R」과 결합하는 원자이며, k는 50~200의 범위 내의 어느 하나의 정수이며, r은 1~10 중 어느 하나의 정수임).

청구항 5

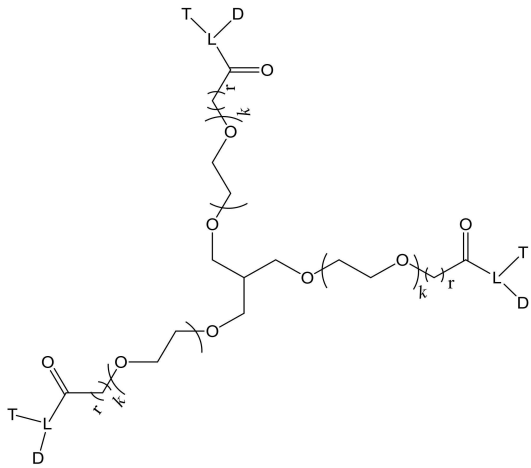
제4항에 있어서,

하기 구조식(III), 구조식(IV) 또는 구조식(V)으로 표시되는, 다분지 약물 콘주게이트 또는 그의 약학적으로 허용되는 염:

[화학식 5]

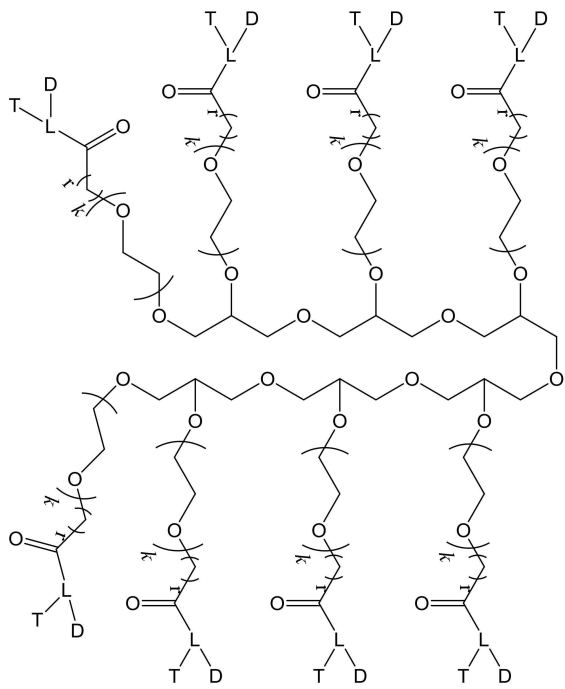


[화학식 6]



(IV)

[화학식 7]



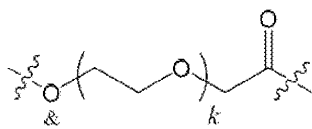
(V).

청구항 6

제5항에 있어서,

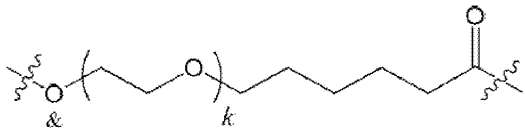
POLY는,

[화학식 8]



또는

[화학식 9]

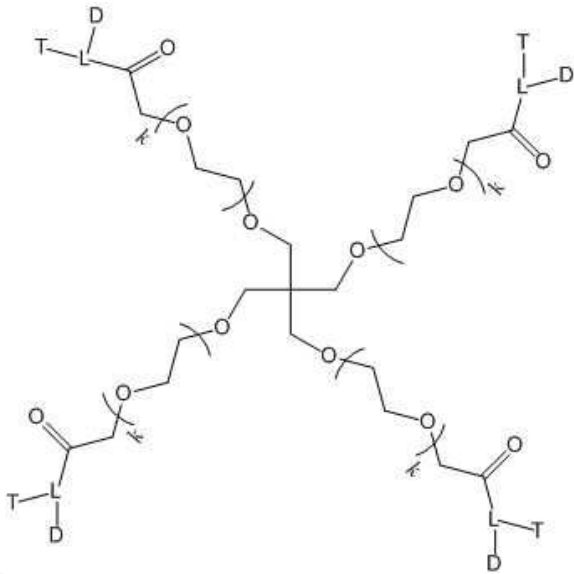


인, 다분지 약물 콘쥬게이트 또는 그의 약학적으로 허용되는 염.

청구항 7

제6항에 있어서,

[화학식 10]



인, 다분지 약물 콘쥬게이트 또는 그의 약학적으로 허용되는 염.

청구항 8

제7항에 있어서,

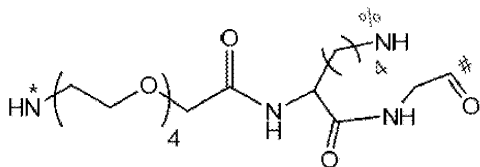
k의 평균값이 113인, 다분지 약물 콘쥬게이트 또는 그의 약학적으로 허용되는 염.

청구항 9

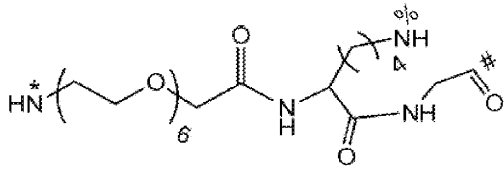
제8항에 있어서,

L은,

[화학식 11]

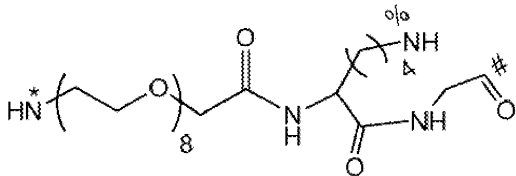


[화학식 12]



또는,

[화학식 13]



인, 다분지 약물 콘주게이트 또는 그의 약학적으로 허용되는 염.

청구항 10

제9항에 있어서,

D는 이리노테칸, SN-38, 10-하이드록시캠토테신 또는 루비테칸인, 다분지 약물 콘주게이트 또는 그의 약학적으로 허용되는 염.

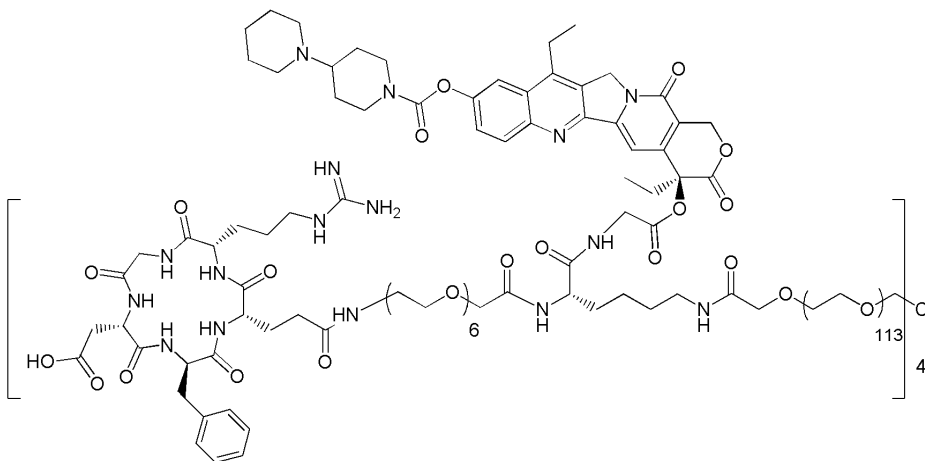
청구항 11

제10항에 있어서,

하기 식으로 표시되는 것인, 다분지 약물 콘주게이트 또는 그의 약학적으로 허용되는 염:

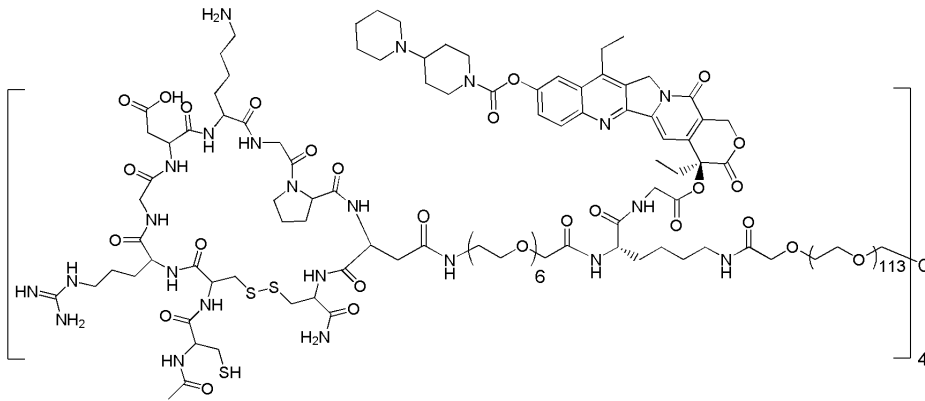
화합물 a

[화학식 14]



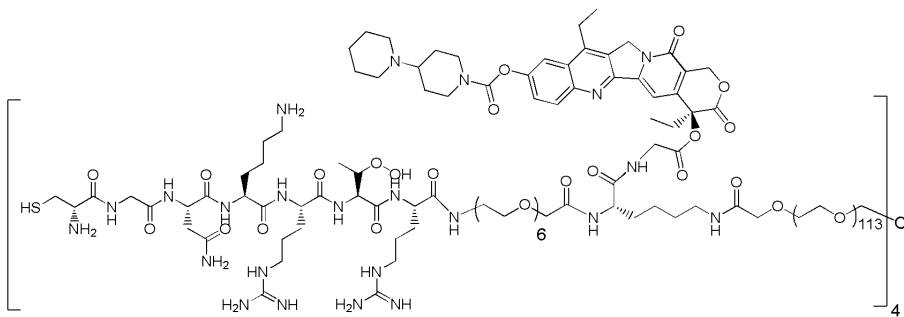
화합물 b

[화학식 15]



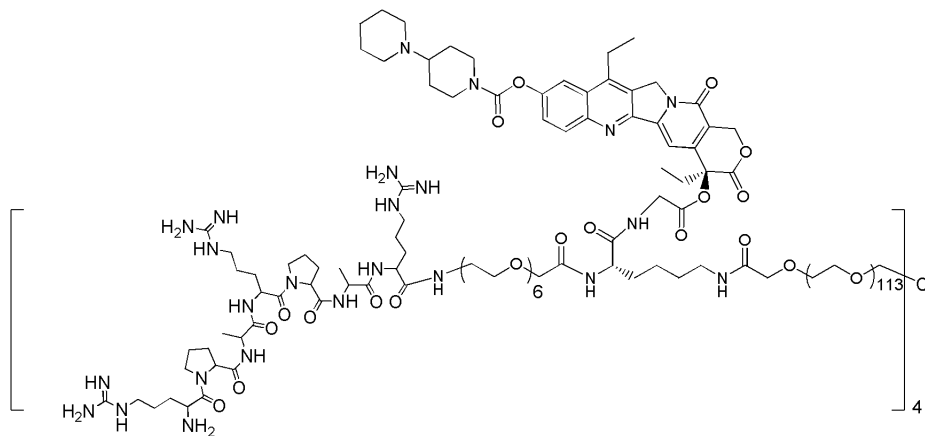
화합물 c

[화학식 16]



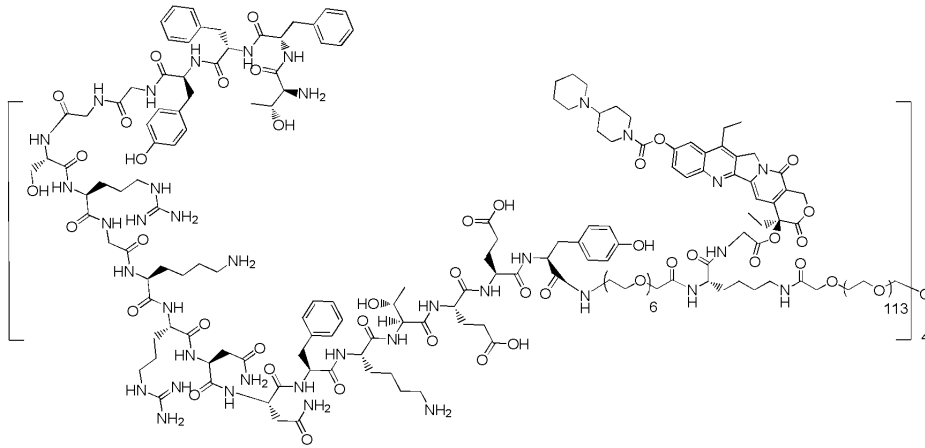
화합물 d

[화학식 17]



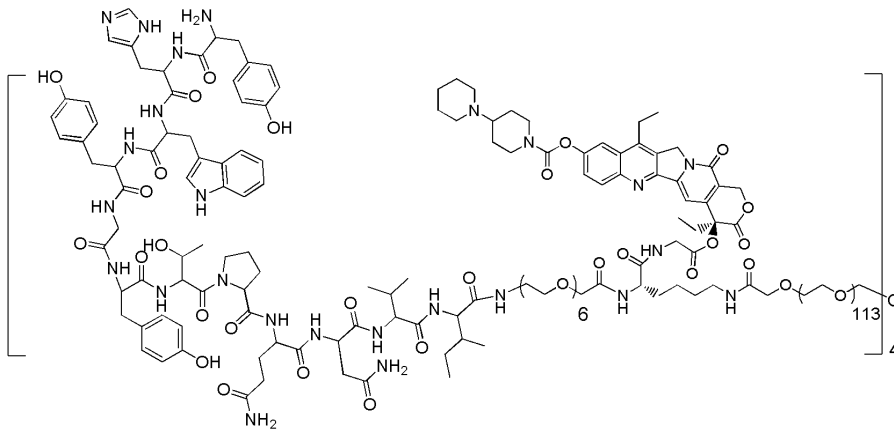
화합물 e

[화학식 18]



화합물 f

[화학식 19]



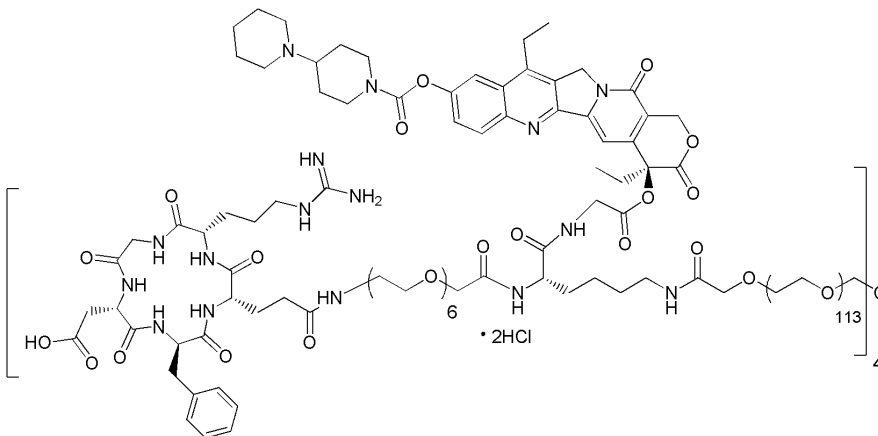
청구항 12

제11항에 있어서,

하기 식으로 표시되는 것인, 다분지 약물 콘주게이트 또는 그의 약학적으로 허용되는 염:

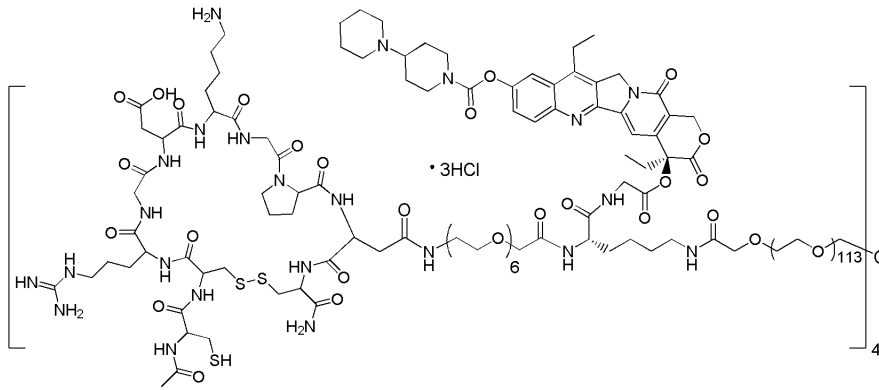
화합물 A

[화학식 20]



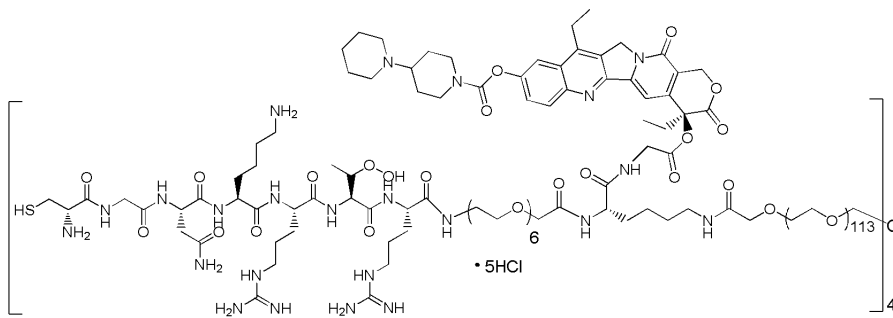
화합물 B

[화학식 21]



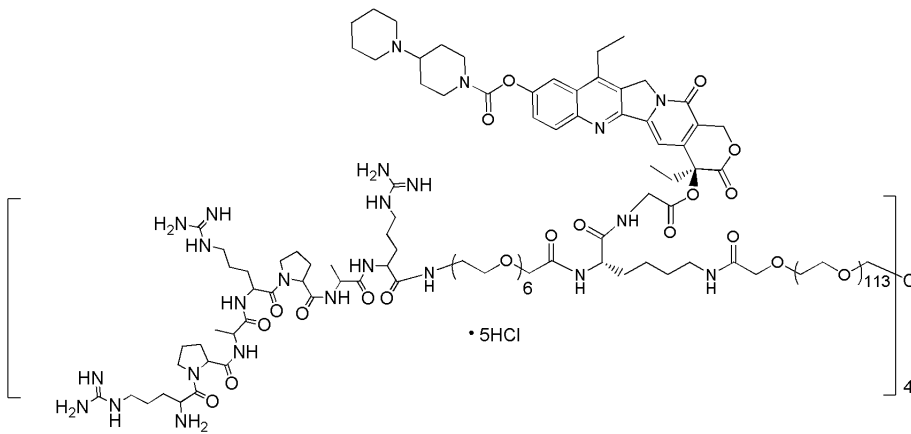
화합물 C

[화학식 22]



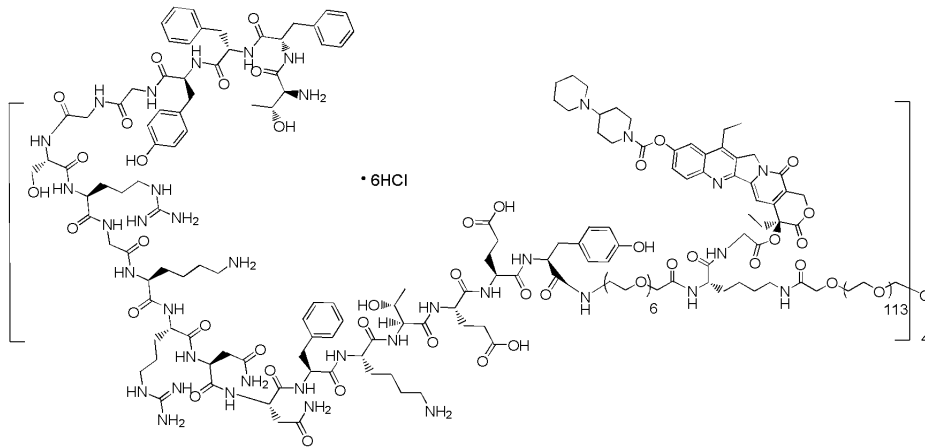
화합물 D

[화학식 23]



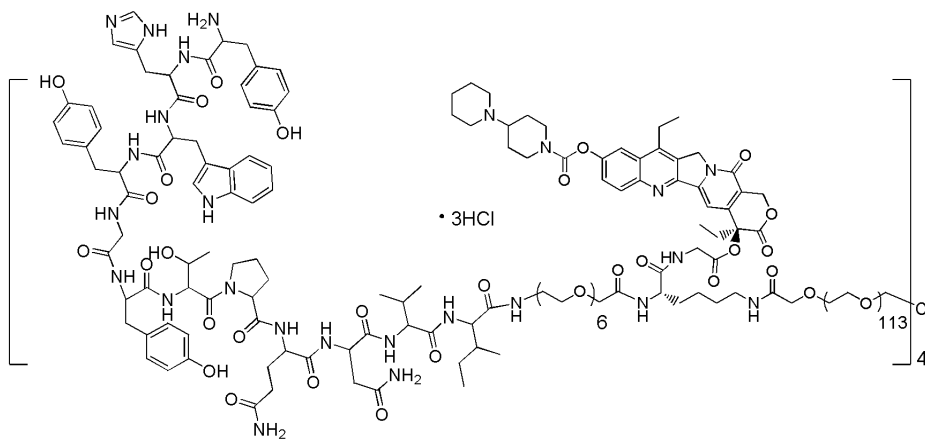
화합물 E

[화학식 24]



화합물 F

[화학식 25]



청구항 13

제1항 내지 제12항 중 어느 한 항에 기재된 다분지 약물 콘주게이트, 및 약학적으로 허용되는 부형제(賦形劑)를 포함하는, 약학적으로 허용되는 조성물.

청구항 14

제1항 내지 제12항 중 어느 한 항에 기재된 다분지 약물 콘주게이트의, 암을 치료하기 위한 약물의 제조를 위한 사용.

청구항 15

제1항 내지 제12항 중 어느 한 항에 기재된 다분지 약물 콘주게이트의, 결장암, 폐암, 유방암, 난소암, 췌장암, 위암, 신경교종(glioma), 및, 유방, 난소, 결장, 신장, 담관, 폐 및 뇌의 악성 육종(肉腫), 암 및 림프종(lymphoma)을 치료하기 위한 약물의 제조를 위한 사용.

청구항 16

제13항에 기재된 조성물의, 암을 치료 하기 위한 약물의 제조를 위한 사용.

청구항 17

제13항에 기재된 조성물의, 결장암, 폐암, 유방암, 난소암, 췌장암, 위암, 신경교종, 및, 유방, 난소, 결장, 신장, 담관, 폐 및 뇌의 악성 육종, 암 및 림프종을 치료하기 위한 약물의 제조를 위한 사용.

발명의 설명

기술 분야

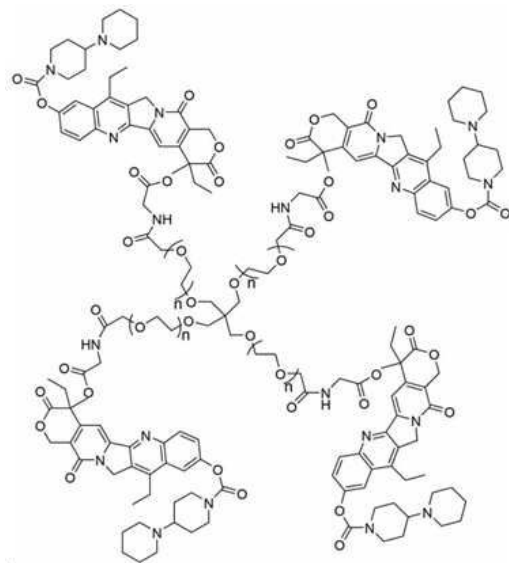
[0001] 본 발명은 멀티 암(multi-arm) 폴리머로 수식(修飾)된 표적 항암 콘쥬게이트에 관한 것이며, 더욱 상세하게는, 본 발명은, 멀티 암 폴리머를 통하여, 표적 분자와 항암 약물을 연결하여 이루어지는 콘쥬게이트에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 최근, 생리 활성 물질의 안정성 및 송달(送達)을 개선하기 위한 다양한 방법이 제안되어 있다. 의약품용 시약의 제조 및 송달과 관련된 과제로서, 상기 의약품용 시약의 좋지 못한 수용성(水溶性), 독성, 낮은 바이오 어베일러빌리티(availability), 불안정함, 및 약제의 신속한 생체내 분해성을 예로 들 수 있다. 의약품용 시약의 송달을 개선하기 위해 많은 방법이 설계되어 있지만, 결점이 없는 단일 방법은 없다. 예를 들면, 통상 사용되는 약물 송달 방법은, 리포솜(riposome), 폴리머 매트릭스, 또는 단분자(單分子) 미셀 내에서의 약물 캡슐화, 폴리에틸렌글리콜과 같은 수용성 폴리머로의 공유 결합, 유전자 표적화제의 사용, 염류의 구조 등 중에서 적어도 1개 또는 복수의 문제점을 해결하는 것을 목적으로 한다.

[0003] W02005028539, W02010019233, W02011063156, W02011063158에는, 제III상 임상 시험 단계의 약물인 nktr 102이 개시되어 있고, 상기 약물은 주로 전이성 유방암에 사용되며, Nektar Therapeutics에서 연구 개발된 것이다. 상기 약물은, 약물의 담지(擔持)를 높이기 위한 수용성 다분자 폴리머 약물 전구체(前驅體)이며, 그 구조는 하기와 같다.

[0004] [화학식 1]



[0005] [0006] 상기 화합물은, 수용성을 높이고, 약물 담지량을 증가시키도록, 멀티 암 PEG를 통하여 이리노테칸과 연결하여 이루어지는 것이며, 항암 작용이 변함없는 전제 하에서는, 부작용은 저감된다. 그러나, 상기 약물은, 예를 들면, 표적 지향성이 좋지 못하고, 특정한 암 세포에 작용할 수 없으며, 암 세포를 죽임과 동시에 정상 세포의 성능에도 영향을 미치므로, 불량 반응의 발생율은 여전히 높은 결점이 있다.

선행기술문헌

특허문헌

- [0007] (특허문헌 0001) W02005028539 A
- (특허문헌 0002) W02010019233 A

(특허문헌 0003) W02011063156 A

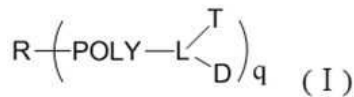
(특허문헌 0004) W02011063158 A

발명의 내용

[0008] [발명의 개요]

[0009] 본 발명은, 표적 지향성을 가지는 새로운 다분지 약물 콘주게이트에 관한 것이며, 상기 콘주게이트는, 3개 이상의 분지를 가지고, 하기 식으로 표시된다.

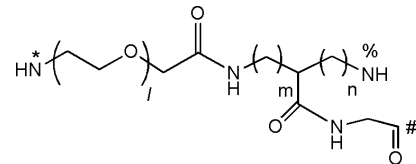
[0010] [화학식 2]



[0011]

[0012] 식 중, R은 유기 중심이며, POLY는 폴리머이며, L은 다가 링커이며, T는 표적 분자이며, D는 활성제이며, q는 3~8의 임의의 정수이다. 또한, L은 하기 식으로 표시되는 것이다.

[0013] [화학식 3]

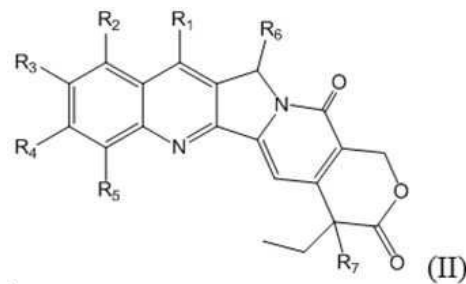


[0014]

[0015] 기호 「*」는, 다가 링커 L과 표적 분자 T의 결합점을 나타내고, 「#」은, 다가 링커 L과 활성제 D의 결합점을 나타내고, 「%」는, 다가 링커 L과 POLY의 결합점을 나타내고, l은 2~20의 임의의 정수이며, m, n은 각각 0~10의 임의의 정수이다.

[0016] D는 식(II)으로 표시되는 캄토테신계 약물이다.

[0017] [화학식 4]



[0018]

[0019] 식 중, R₁~R₅는 각각 독립적으로, 수소, 할로젠, 아실기, 알킬기, 치환 알킬기, 알콕시기, 치환 알콕시기, 알케닐기, 알키닐기, 시클로알킬기, 하이드록시기, 시아노기, 니트로기, 아지드기, 아미드기, 히드라진, 아민기, 치환 아민기, 하이드록시카르보닐기, 알콕시카르보닐기, 알콕시카르보닐옥시기, 카르바모일옥시기, 아릴술포닐옥시기, 알킬술포닐옥시기로 이루어지는 군으로부터 선택되고, R₆는, H 또는 OR₈이며, R₈은, 알킬기, 알케닐기, 시클로알킬기, 할로겐화 알킬기, 또는 하이드록시 알킬기이며, R₇은, 하이드록시기, 아미노기, 또는 티올기이다.

[0020] POLY는 폴리머이며, L은 다가 링커이며, T는 표적 분자이며, D는 활성제이며, 4자는 모두 상기 다분지 약물 콘주게이트의 「분지」를 구성한다. 상기 다분지 약물 콘주게이트의 각 분지는, 다른 분지와는 서로 독립하고 있다. 각 분지는, 유기 중심인 「R」로부터 연장되는 것이다. 그리고, 통상, 상기 콘주게이트의 각 분지는 모두 동일하다.

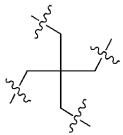
[0021] 이하, 구조식(I) 중의 각 변수에 대하여 상세하게 설명한다.

[0022] 유기 중심인 「R」에 대하여, 구조식(I)에 있어서, 「R」은 1~100 개의 원자를 포함하는 유기 중심기이다. 바람직하게는, R은 3~50 개의 원자를 포함하고, 보다 바람직하게는 R은 약 3~30 개의 원자를 포함한다. R은, 사용되는 특별한 중심 분자에 의해, 탄소 원자로 이루어지는 중심기라도 되며, 예를 들면, O, S, N, P 등의 헤테로 원자를 1개 또는 복수 개를 선택적으로 포함해도 된다. R은 직쇄, 분지 또는 환형(環形) 중 어느 것이라도 되고, 적어도 3개의 독립된 폴리머 지쇄(支鎖)로 분지된다. 구조식(I)에 있어서, 「q」는, 「R」로부터 갈라져 나온 폴리머 지쇄의 수에 대응한다.

[0023] 유기 중심 「R」은, 1개의 분자로부터 유도되는 것이며, 상기 분자는, 복수의 폴리머 결합 부위를 제공하고, 그 수가, 폴리머 지쇄의 수와 거의 동일하다. 보다 바람직하게는, 다분지 폴리머 구조의 주된 중심의 분자식은, 폴리머 분지로서 바람직한, 하이드록시기, 티오기, 또는 아미노기를 가지는 폴리하이드록시 화합물, 폴리술퍼드 화합물, 또는 폴리아민 화합물의 잔기를 적어도 3개 이상 가진다. 1개의 「폴리하이드록시 화합물」은, 복수(2개 이상)의 이용 가능한 하이드록시기를 함유하는 분자이다. 1개의 「폴리술퍼드 화합물」은, 복수(2개 이상)의 이용 가능한 티오기를 함유하는 분자이다. 1개의 「폴리아민 화합물」은, 복수(2개 이상)의 이용 가능한 아민기를 함유하는 분자이다. 폴리머 분지수에 의해, 폴리하이드록시 화합물, 폴리아민 화합물 또는 폴리술퍼드 화합물의 모체(POLY와 공유 결합하기 전의 상태)는, 전형적으로는, 하이드록시기, 티오기 또는 아민기를 3~25 개 가지고, 보다 바람직하게는 하이드록시기, 티오기 또는 아민기를 3~10 개 가지고, 가장 바람직하게는 POLY와의 공유 결합에 바람직한 하이드록시기, 티오기 또는 아민기를 3개~약 8개(예를 들면, 3, 4, 5, 6, 7 또는 8) 가진다.

[0024] 폴리하이드록시 화합물 또는 폴리아민 화합물의 경우, 중심의 모체는, 폴리머와 작용하기 전에, 전형적으로는, 구조식 R-(OH)_p 또는 R-(NH₂)_q를 1개 가진다. 구조식(I)에 있어서, p값은 q값에 대응하는 것이다. 그 이유는, 모체의 유기 분자 중의 각 기능성기, 전형적으로는 -OH 및 -NH₂는, 위치가 영향을 받기 쉬우며, 또는 반응이 발생하기 쉬운 경우, 폴리머 분지인 POLY와 공유 결합하게 되는 것으로 여겨지고 있다. 구조식(I) 중, POLY에 연결한 후, R 모체의 폴리하이드록시 화합물의 하이드록시기는 모두 1개의 폴리머 분지로 변화되고, 상기 R은 연결 후의 잔기이다. 예를 들면, 유기 중심 분자가 펜타에리트리톨로부터 유도된 경우, 폴리하이드록시 화합물의 모체는, 구조식 C(CH₂OH)₄를 가지고, 유기 중심기 R은 하기 식으로 표시된다.

[0025] [화학식 5]



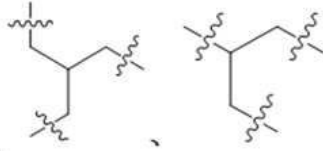
[0026]

[0027] 폴리머 중심으로서 바람직한 예시적인 폴리하이드록시 화합물은, 예를 들면, 에틸렌글리콜, 알칸디올, 하이드로카르빌글리콜, 알킬렌하이드로카르빌글리콜, 하이드로카르빌시클로알킬글리콜, 1,5-나프틸렌글리콜, 4,8-비스(하이드록시메틸)트리시클로데칸, 시클로알킬렌글리콜, 디하이드록시알칸, 트리하이드록시알칸, 테트라하이드록시알칸 등의 1~10 개의 탄소 원자 및 1~10 개의 하이드록시기를 가지는 지방족 폴리하이드록시 화합물이 있다. 지환식 폴리하이드록시 화합물은, 만니톨, 소르비톨, 이노시톨, 크실리톨, 류코시드, 트레이톨, 아라비톨, 에리트리톨, 갈락티톨, 리보오스, 아라비노오스, 크실로오스, 릭소오스, 람노오스, 갈락토오스, 글루코오스, 프룩토오스, 소르보오스, 만노오스, 피라노오스, 알트로오스, 탈로오스, 타가토오스, 피라노시드, 수크로오스, 락토오스, 말토오스 등의 직쇄형 또는 폐환식의 당류 및 당 알코올을 예로 들 수 있다. 또한, 카테콜, 하이드로카르빌카테콜, 피로갈롤, 플로로글루신페놀, 1,2,4-벤젠트리올, 레조르신, 하이드로카르빌레조르신, 디하이드로카르빌레조르신, 오르시놀 일수화물, 올리브 페놀, 하이드로퀴논, 하이드로카르빌하이드로퀴논, 페닐하이드로퀴논 등의 방향족 폴리하이드록시 화합물을 사용할 수도 있다. 그 외에 사용 가능한 폴리하이드록실 화합물 중심으로서, 크라운 에테르, 시클로텍스트린, 텍스트린, 또는 다른 탄수화물을 포함할 수 있다.

[0028] 구조식(I) 중, q는, 대응하는 「R」에 연결되어 있는 폴리머 분지의 수를 나타내고, 구체적으로 3~20이라도 된다. 전형적으로는, 「q」가 구체적인 수치가 3, 4, 5, 6, 7, 8이라도 된다. 구체적으로는, 「R」을 중심으로 하여 3개, 4개, 5개, 6개, 7개, 8개의 폴리머 지쇄로 분지되어도 된다.

[0029] 일부 실시형태에 있어서, 「R」은 3개의 폴리머 분지를 가지고, 「R」은, 바람직하게는,

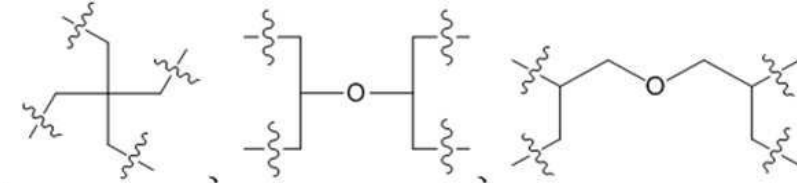
[0030] [화학식 6]



[0031]
[0032] 이다.

[0033] 일부 실시형태에 있어서, 「R」은 4개의 폴리머 분지를 가지고, 「R」은, 바람직하게는,

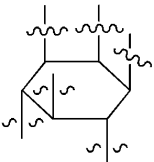
[0034] [화학식 7]



[0035]
[0036] 이다.

[0037] 일부 실시형태에 있어서, 「R」은 6개의 폴리머 분지를 가지고, 「R」은, 바람직하게는,

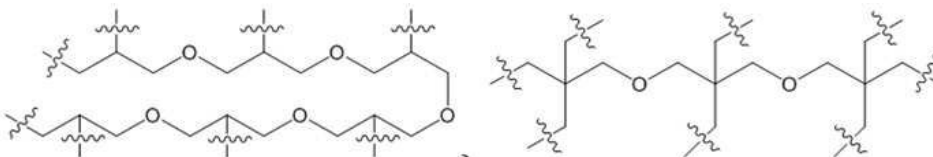
[0038] [화학식 8]



[0039]
[0040] 이다.

[0041] 일부 실시형태에 있어서, 「R」은 8개의 폴리머 분지를 가지고, 「R」은, 바람직하게는,

[0042] [화학식 9]



[0043]
[0044] 이다.

[0045] 폴리머, 「POLY」에 대하여, 구조식(I) 중, 「POLY」는 폴리머이며, 각 폴리머 분지에서의 POLY는 독립적으로 선택되는 것이며, 바람직하게는 각 폴리머는 동일한 폴리머이며, 보다 바람직하게는 각 구조식(I) 중의 폴리머 분지는 동일하다. 바람직한 폴리머는 수용성이며, 임의의 수용성 폴리머를 본 발명의 콘주게이트의 형성에 사용할 수 있다. 본 발명으로 일컫는 폴리머는, 임의의 기하학적 형태 또는 형상이라도 된다. 대표적인 폴리머는, 폴리에틸렌글리콜, 폴리프로필렌글리콜, 폴리비닐피롤리돈, 폴리(하이드록시알킬메타크릴산 아민), 폴리(하이드록시알킬메타크릴레이트), 폴리스카라이드, 폴리(α-하이드록시산), 폴리아크릴산, 폴리아세트산 비닐, 폴리포스파진, 폴리옥사졸린, 폴리(N-아크릴로일모르폴린) 등을 포함하지만, 이들로 한정되지 않는다.

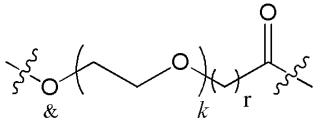
[0046] 전형적인 화합물로서는, 「POLY」는 폴리에틸렌글리콜(PEG)이며, 직쇄, 분지, 포크형 등의 임의의 기하학적 형태 또는 형상이라도 된다. 여기서 사용되는 「폴리에틸렌글리콜」은, 임의의 수용성 폴리에틸렌옥사이드를 포함하는 것을 의미한다. 전형적으로는, 본 발명에서 사용되는 PEG는, 「(CH₂CH₂O)_k-」 또는 「(CH₂CH₂O)_k-CH₂CH₂-」의 2개의 구조로부터 선택되는 1개를 포함하고, 1개 또는 복수 개의 말단산소가 예를 들면, 1개의 합성 변환 중에 치환되었는지에 의해 결정된다. 변수 k의 수치 범위는 5~약 500이며, 또한 이들 말단기 및 전체적인 PEG의 구조는 변경되어도 된다. 상기 폴리에틸렌글리콜 구조는 통상, 일부의 말단 잔기를 더욱 함유하고, POLY의 말단기


와 유사하게, H, NH₂, OH, CO₂H, C₁₋₆ 알킬기(예를 들면, 메틸기, 에틸기, 프로필기), C₁₋₆ 알콕시기(예를 들면, 메톡시기, 에톡시기), 아실기, 또는 아릴기를 말단으로 할 수 있다.

[0047] 본 발명에서는, 바람직한 「POLY」는 선형 폴리에틸렌글리콜이다. 전형적인 구조는,

[0048] [화학식 10]

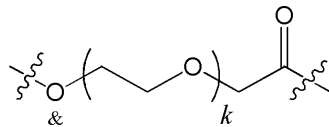
[0049]



[0050] (식 중, 「」은, 원자의 결합점을 나타내고, 「&」가 부여된 산소 원자는, 유기 중심 「R」과 결합하는 원자이다. 다만, k의 수치 범위는 약 5~500이며, 가장 바람직하게는 50~200이며, r은 1~10의 임의의 정수이다.)이며, 보다 바람직하게는, 본 발명의 「POLY」는,

[0051] [화학식 11]

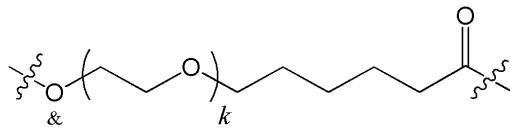
[0052]



[0053] 혹은

[0054] [화학식 12]

[0055]



[0056] 이다.

[0057] 본 발명의 「POLY」는 또한,

[0058] [화학식 13]

[0059]



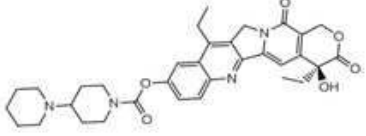
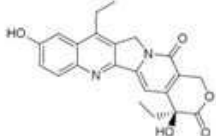
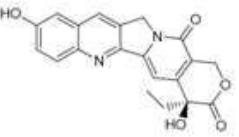
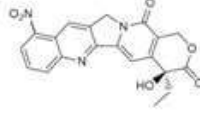
[0060] 등이라도 된다.

[0061] 본 명세서에서 기재하는 활성제 「D」는, 캠토테신계 항암제이며, 캠토테신계 약물은, 임상에서 사용되는 토포이소머라아제 I 저해제이며, 고효성이면서, 수용성이 좋지 못하고, 정상인 생체 조직으로의 독성 부작용이 큰 등의 결점을 가지므로, 캠토테신계 항암제의 임상 응용이 크게 제한되고 있다.

[0062] D의 구조 중의 R₇은, 예를 들면, 하이드록실기, 아미노기, 또는 티올기 등의 다가 링커 L과 공유 결합하는 기이며, 바람직하게는 하이드록시기이다. 활성제 D가 다가 링커 L에 연결할 때, 생물학적 활성은 큰 폭으로 손실되지 않는 것이 요구된다.

[0063] 본 발명에서는, 활성제는, 이리노테칸, SN-38, 10-하이드록시캠토테신, 루비테칸인 것이 바람직하다. 그 상세한 것은 하기 표에 나타낸다.

[0064] [표 1]

	이리노데칸	SN-38
구조식		
	10-하이드록시캄토테신	루비데칸
구조식		

[0065]

[0066]

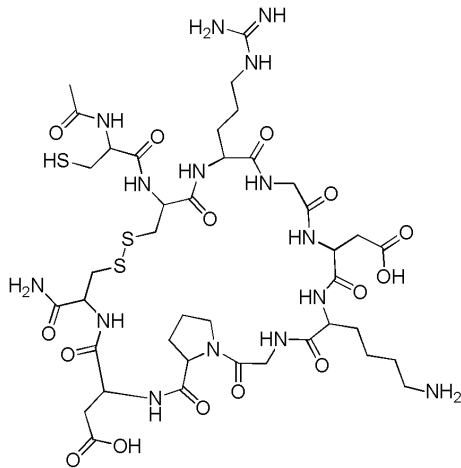
본 발명에서는, 「T」는 표적 분자이며, 의약 용도를 가져도 되고 가지지 않아도 된다. 상기 표적 분자의 작용은, 상기 콘주게이트의 목표 조직에서의 농도를 더욱 높이고, 생리 활성 또는 의약 용도를 향상시키도록, 표적 지향성을 향상시키는 것에 있다. 「T」는, 단기능 표적 분자라도 되고, 다기능 표적 분자라도 된다. 일부 구체적인 실시형태에 있어서, 「T」는, 2개 이상의 표적 분자로 이루어지는 표적 부분이라도 된다. 일부 구체적인 실시형태에 있어서, 「T」는, 「알기닌-글리신-아스파라긴산」의 서열을 포함하는 RGD 펩티드라도 된다. RGD 펩티드는, 인테그린과 그 수용체 단백질이 상호 작용하는 인식 부위이다. 바람직한 RGD 펩티드로서는, iRGD 및 cRGD 등을 예로 들 수 있다. T는, Lyp-1, Lyp-1, RPARPAR, Angiopep2 또는 GE11이라도 된다.

[0067]

iRGD의 구조는 하기와 같다.

[0068]

[화학식 14]

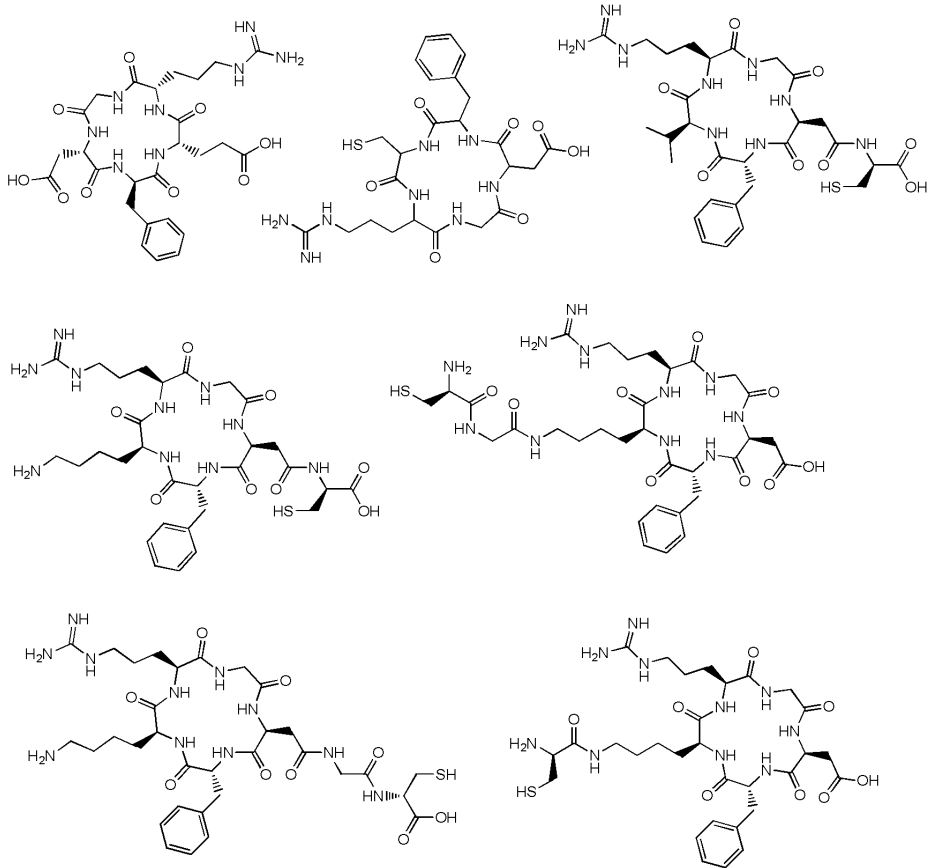


[0069]

[0070]

cRGD는 일련의 화합물이며, 전형적인 화합물은 하기의 것을 포함한다.

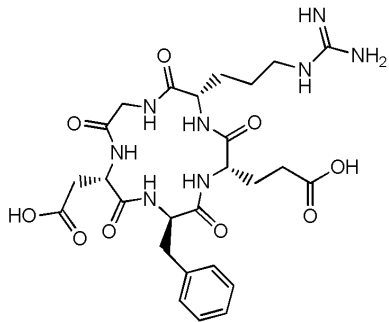
[0071] [화학식 15]



[0072]

[0073] 바람직한 cRGD는,

[0074] [화학식 16]

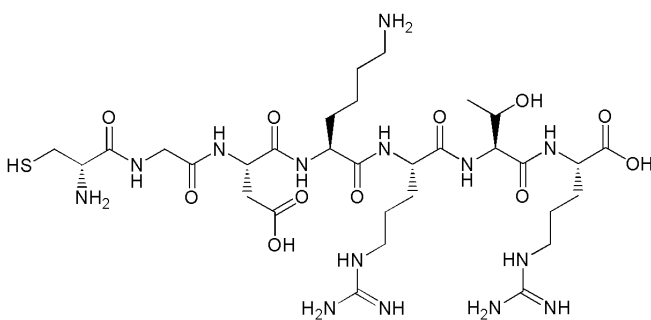


[0075]

[0076] 이다.

[0077] tLyp-1의 구조는 하기와 같다.

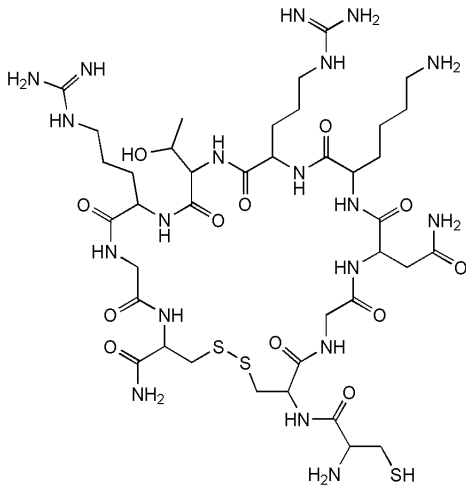
[0078] [화학식 17]



[0079]

[0080] Lyp-1의 구조는 하기와 같다.

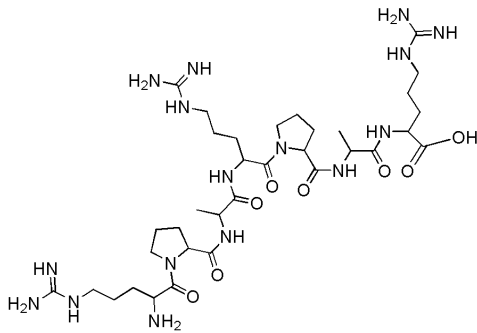
[0081] [화학식 18]



[0082]

[0083] RPARPAR의 폴리펩티드 서열은, 알기닌-프롤린-알라닌-알기닌-프롤린-알라닌-알기닌이며, 그 구조는 하기와 같다.

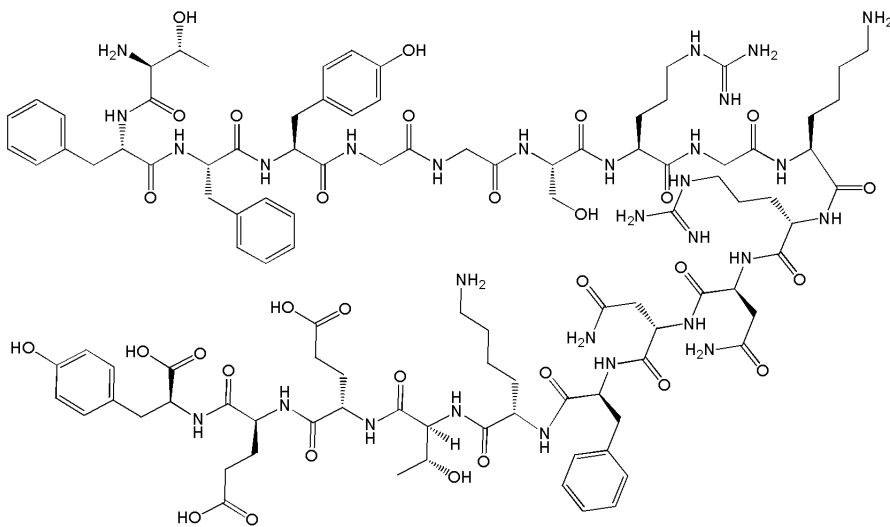
[0084] [화학식 19]



[0085]

[0086] Angiopep2의 폴리펩티드 서열은, TFFYGGSRGKRNNFKTEEY이며, 그 구조는 하기와 같다.

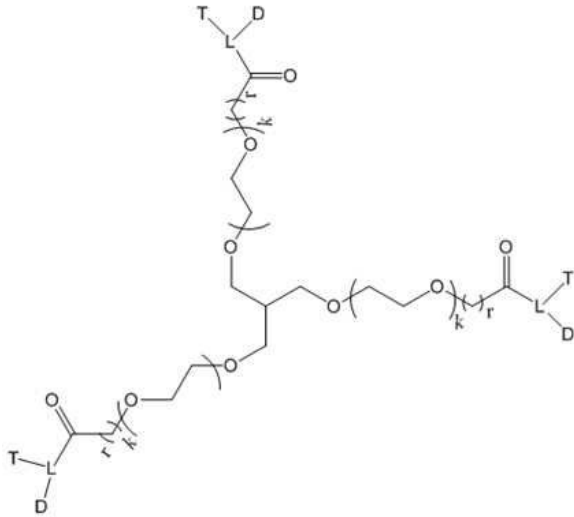
[0087] [화학식 20]



[0088]

[0089] GE11의 폴리펩티드 서열은, YHWYGYTPQNV이며, 그 구조는 하기와 같다.

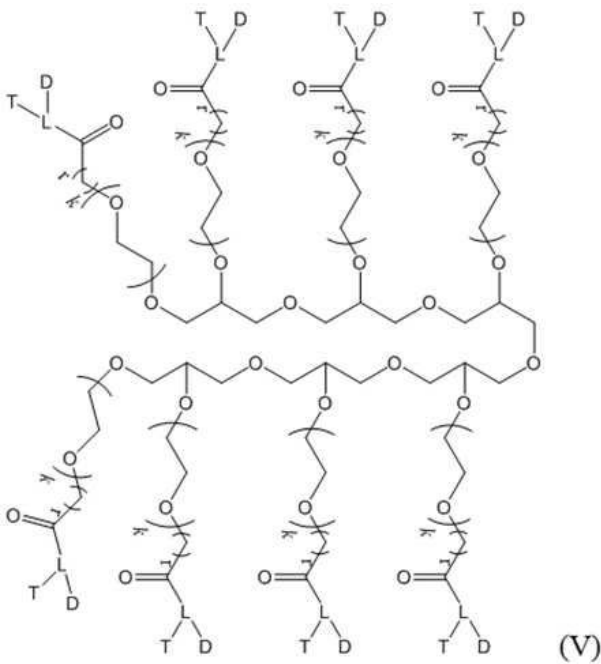
[0100] [화학식 23]



[0101]

[0102] 8암 타입:

[0103] [화학식 24]



[0104]

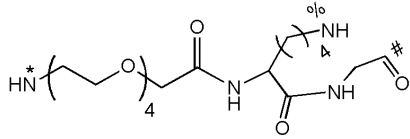
[0105] 상기한 식에 있어서, k의 수치 범위는 약 5~500이며, 가장 바람직하게는 50~200이며, r은 1~10의 임의의 정수이다.

[0106] 본 발명에서는, 식(III)의 화합물이 바람직하다. 식(III)에 있어서, k는, 113인 것이 바람직하다. 이 분야의 기술자라면, 고분자 분야에서는, k가 상기 폴리머의 중합도를 나타내고, 상기 폴리머의 분자량에 의해 결정되며, 절대적인 수치가 아닌 것, 예를 들면, k가 113일 때, 평균값이 113을 의미하는 것으로 이해할 수 있을 것이다.

[0107] 보다 바람직한 실시형태에 있어서, 본 발명의 콘쥬게이트의 표적 부분 「T」는, iRGD, cRGD, tLyp-1, Lyp-1, RPARPAR, Angiopep2 또는 GE11로 이루어지는 군으로부터 선택되는 1종이며, 활성제 「D」는, 이리노테칸, SN-38, 10-하이드록시캠토테신, 루비테칸으로 이루어지는 군으로부터 선택되는 1종이다.

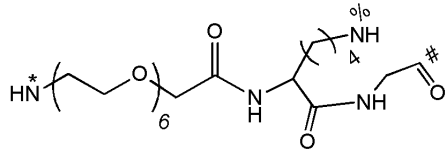
[0108] 보다 바람직한 실시형태에 있어서, L은,

[0109] [화학식 25]



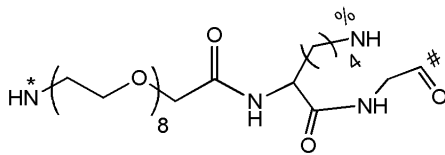
[0110]

[0111] [화학식 26]



[0112]

[0113] [화학식 27]



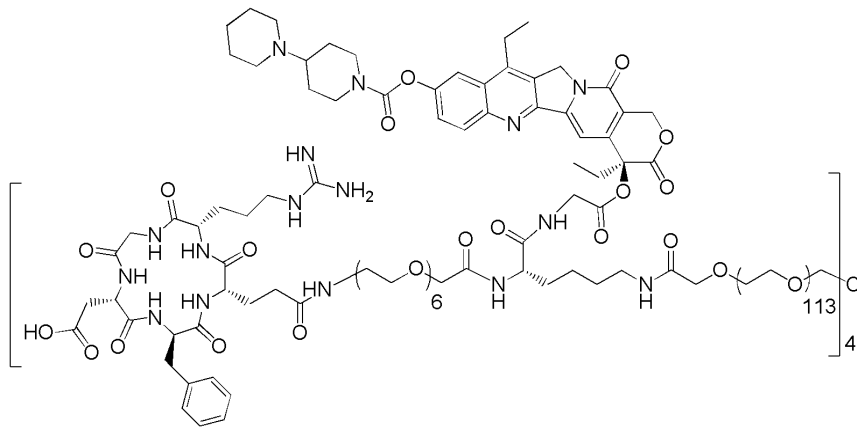
[0114]

[0115] 로 이루어지는 군으로부터 선택되는 1종이다.

[0116] 식(III)에 기초하여, 일부 실시형태에 있어서, 본 발명의 화합물은 하기와 같이 된다.

[0117] 화합물 a: D는 이리노테칸이며, T는 cRGD이다.

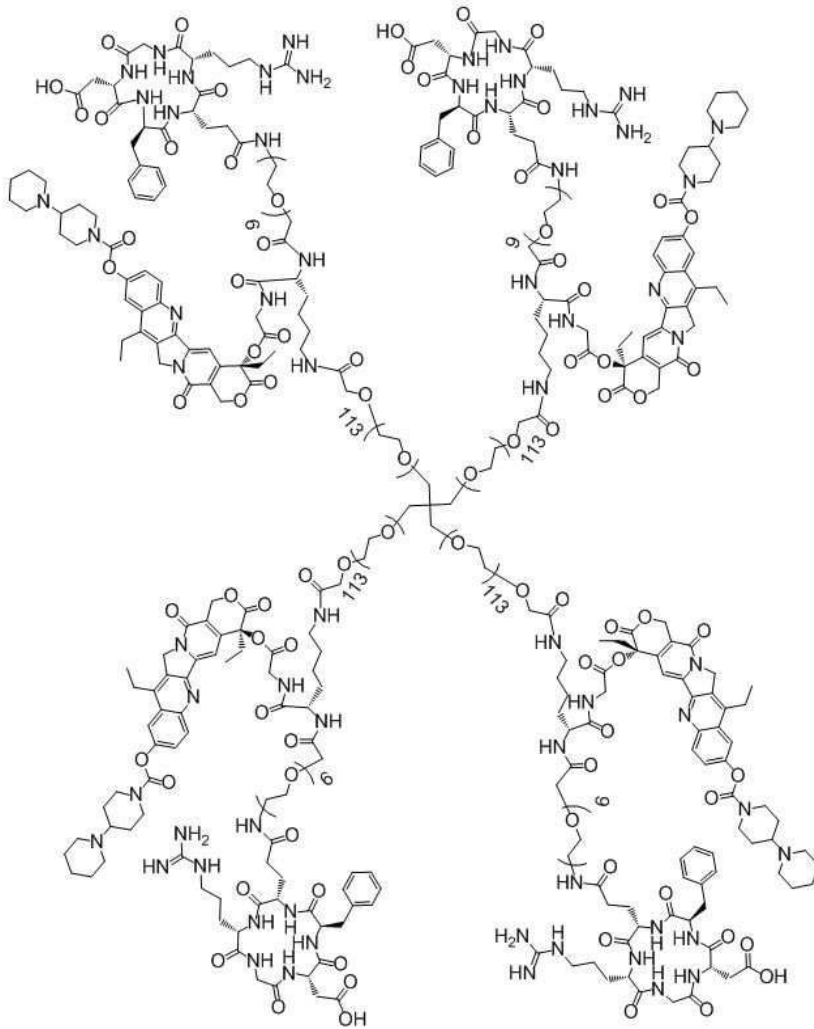
[0118] [화학식 28]



[0119]

[0120] 보다 구체적으로는, 화합물 a는 하기 형태와 같이 표시할 수도 있다.

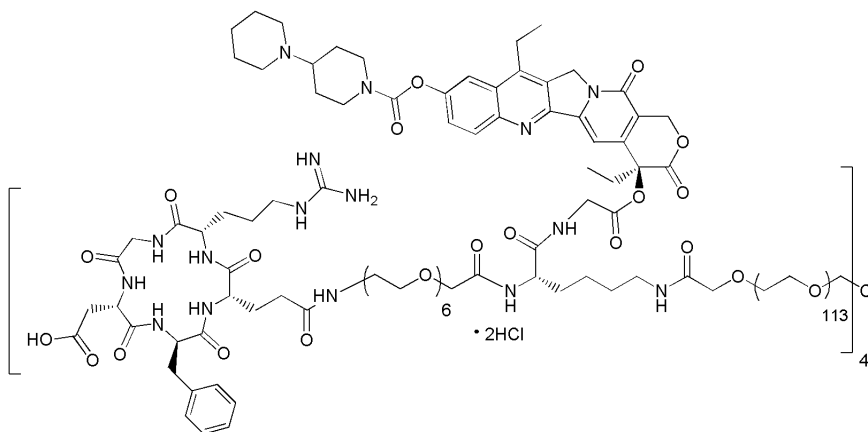
[0121] [화학식 29]



[0122]

[0123] 화합물 A는, 화합물 a의 염산염이다.

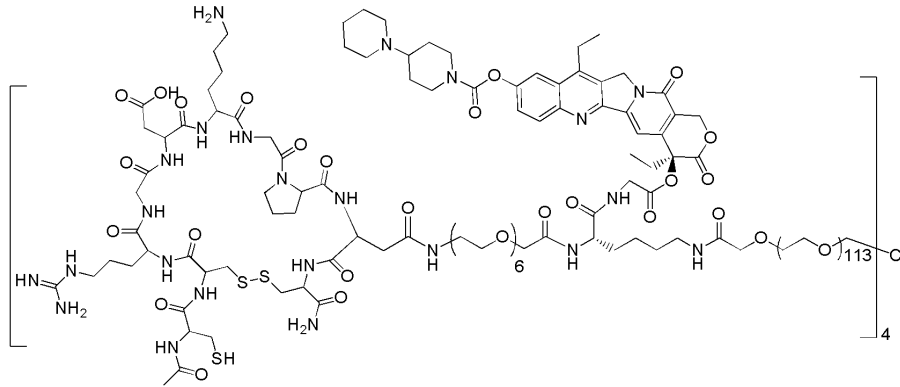
[0124] [화학식 30]



[0125]

[0126] 화합물 b: D는 이리노테칸이며, T는 iRGD이다.

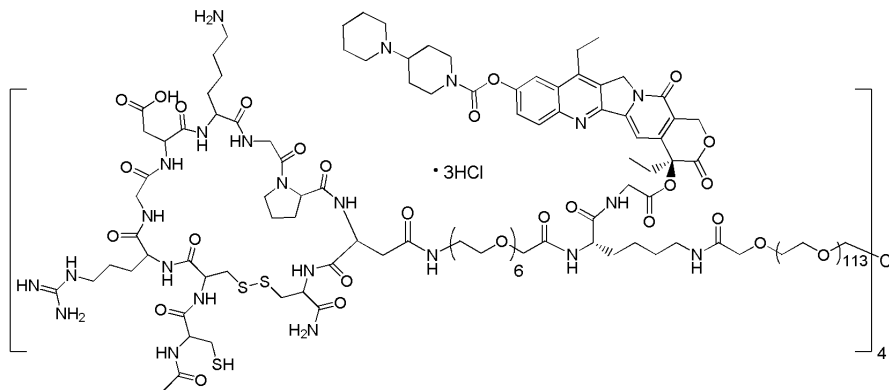
[0127] [화학식 31]



[0128]

[0129] 화합물 B는, 화합물 b의 염산염이다.

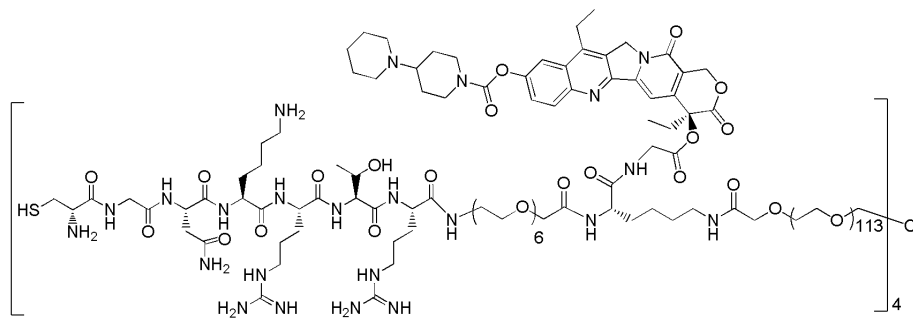
[0130] [화학식 32]



[0131]

[0132] 화합물 c: D는 이리노테칸이며, T는 tLyP-1이다.

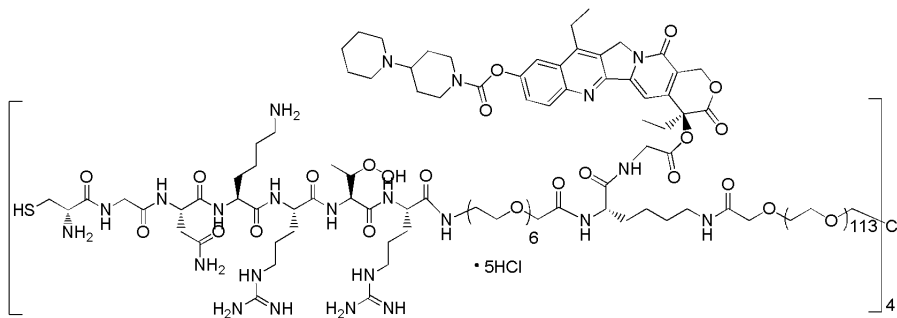
[0133] [화학식 33]



[0134]

[0135] 화합물 C는, 화합물 c의 염산염이다.

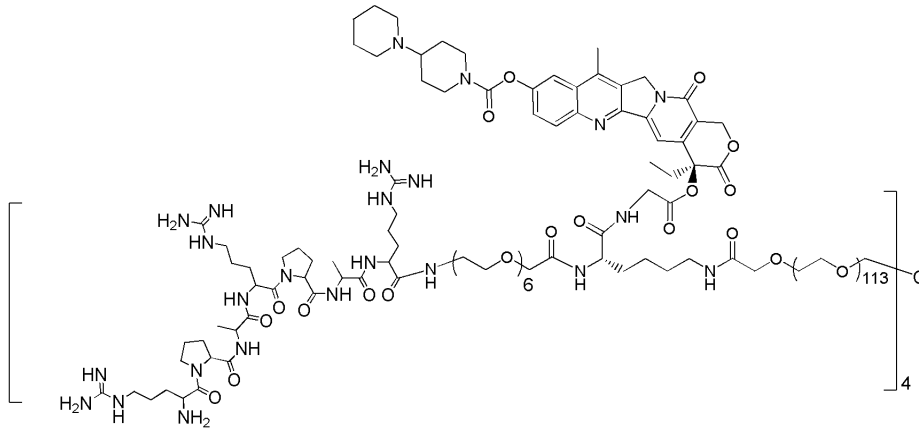
[0136] [화학식 34]



[0137]

[0138] 화합물 d: D는 이리노테칸이며, T는 RPARPAR이다.

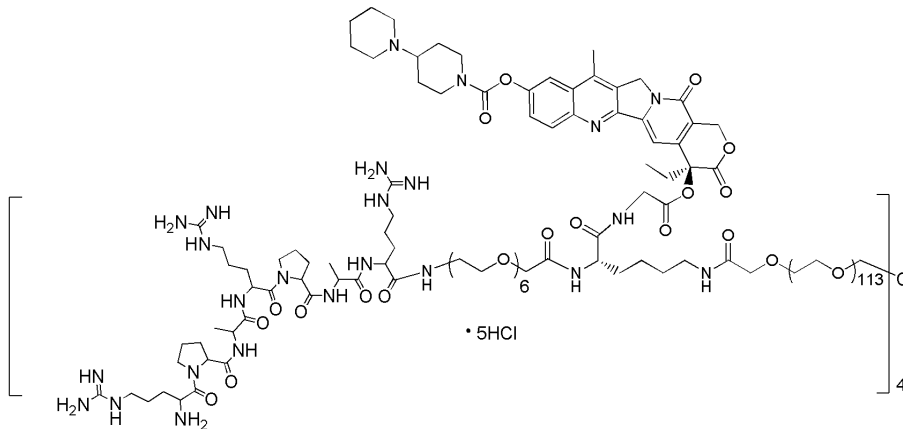
[0139] [화학식 35]



[0140]

[0141] 화합물 D는, 화합물 d의 염산염이다.

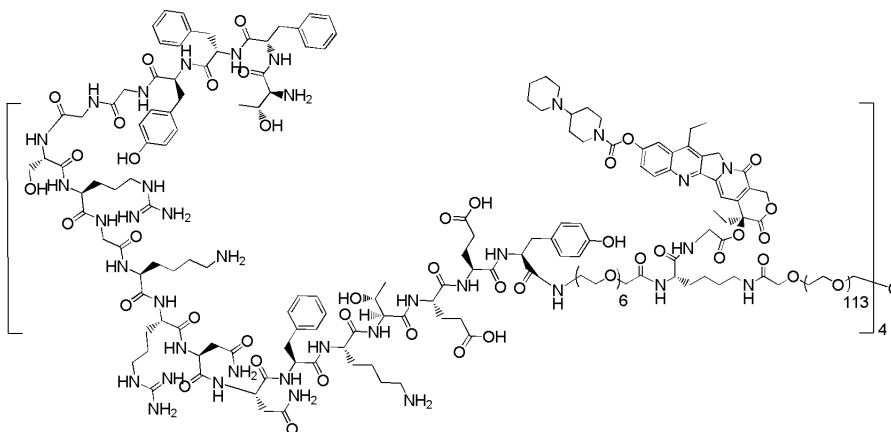
[0142] [화학식 36]



[0143]

[0144] 화합물 e: D는 이리노테칸이며, T는 Angiopep-2이다.

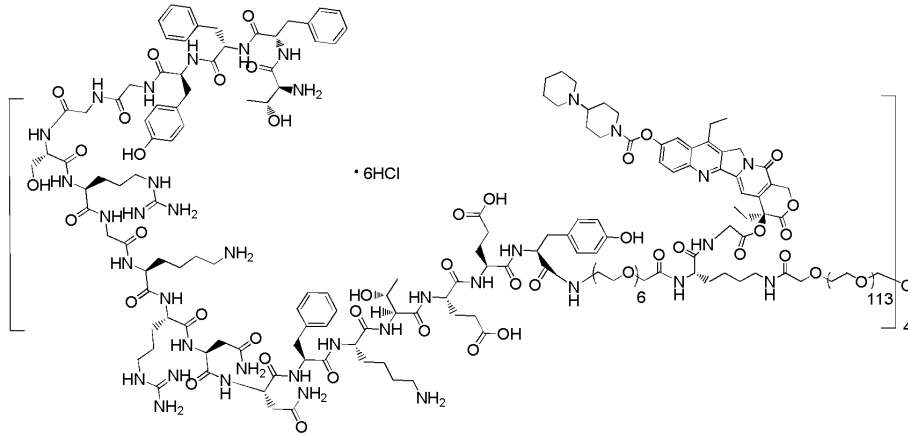
[0145] [화학식 37]



[0146]

[0147] 화합물 E는, 화합물 e의 염산염이다.

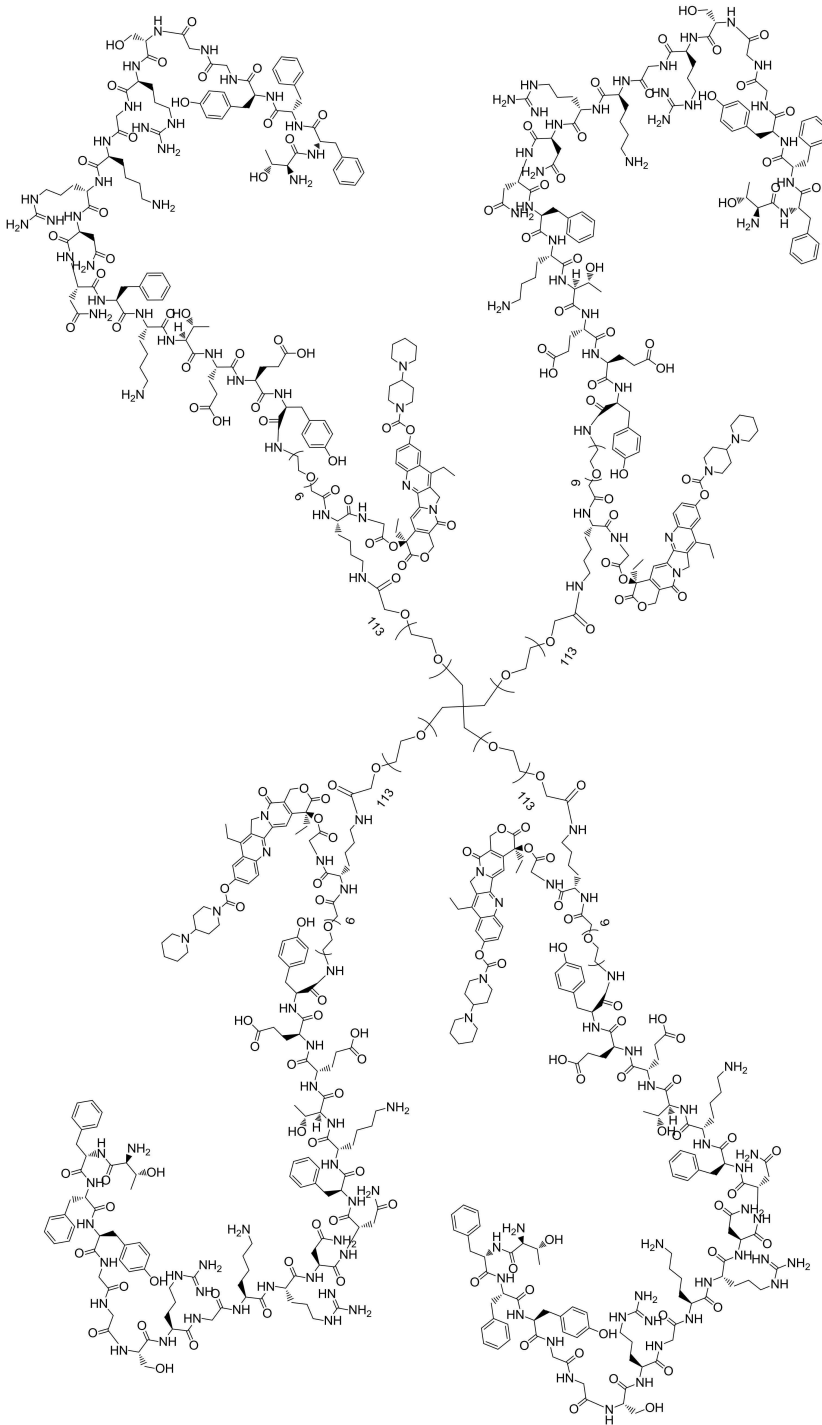
[0148] [화학식 38]



[0149]

[0150] 보다 구체적으로는, 화합물 e는 하기 형태와 같이 표시할 수 있다.

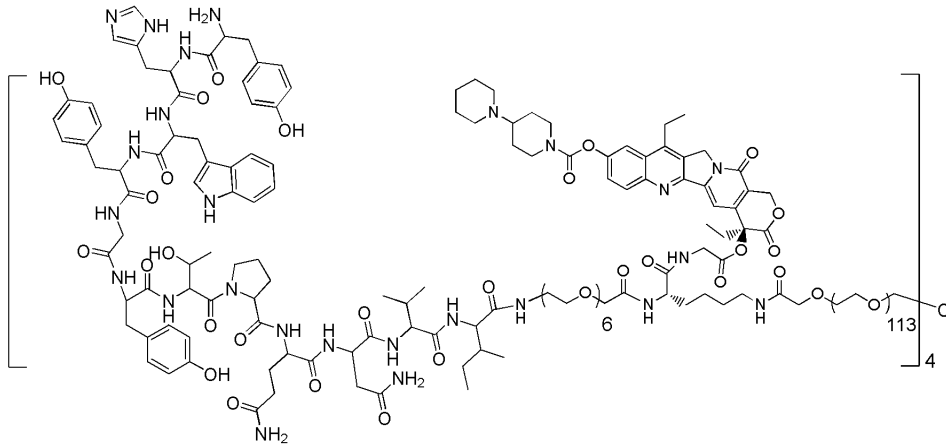
[0151] [화학식 39]



[0152]

[0153] 화합물 f: D는 이리노테칸이며, T는 GE11이다.

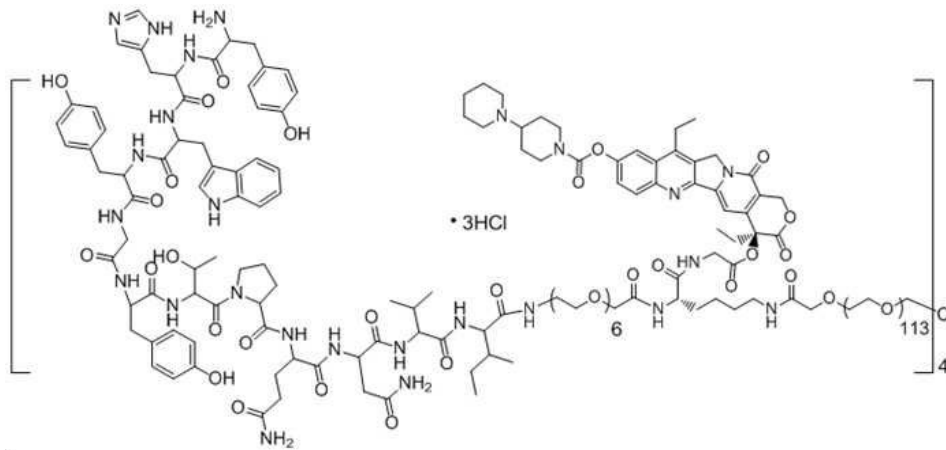
[0154] [화학식 40]



[0155]

[0156] 화합물 F는, 화합물 f의 염산염이다.

[0157] [화학식 41]

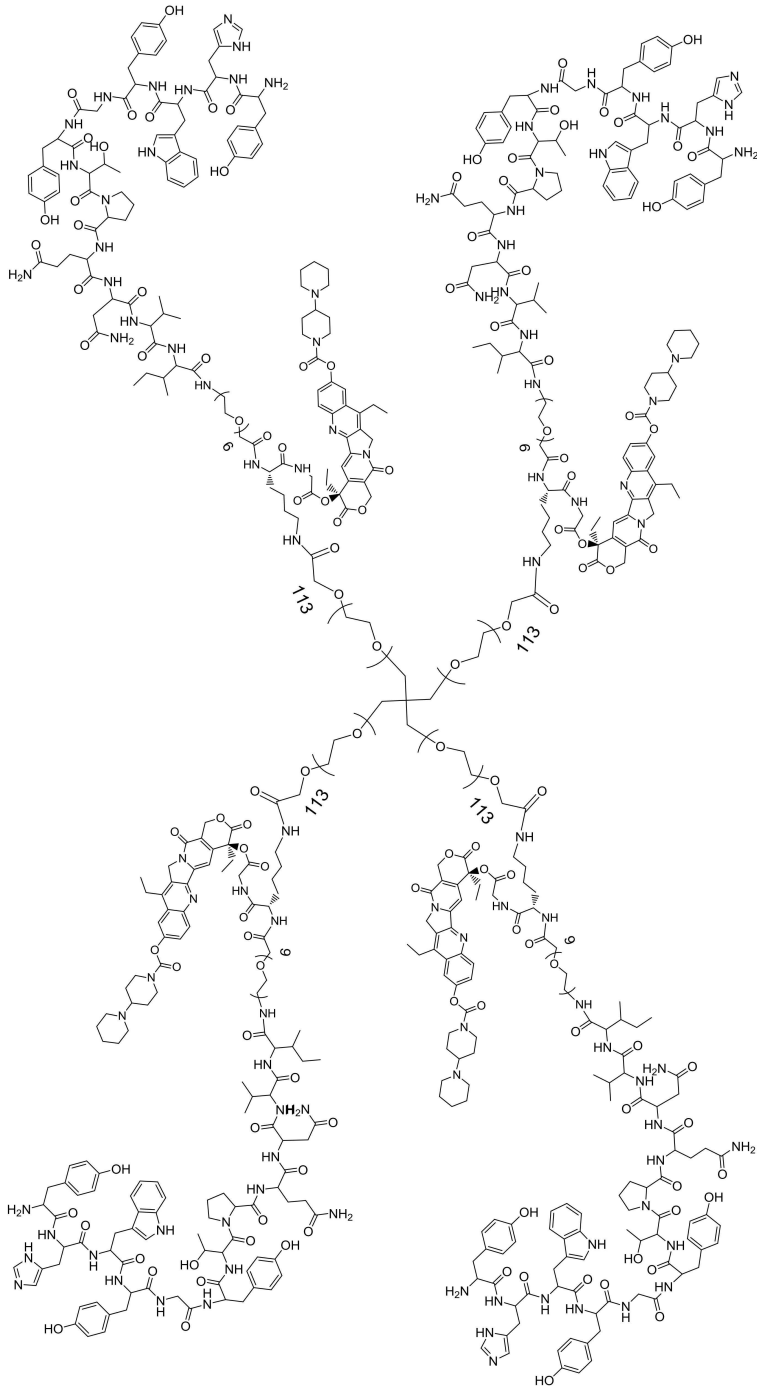


[0158]

[0159] 화합물 F

[0160] 보다 구체적으로는, 화합물 f는 하기 형태와 같이 표시할 수도 있다.

[0161] [화학식 42]



[0162]

[0163] 그리고, 염을 형성할 때, 본 발명의 콘쥬게이트의 분자와 HCl이 각각 염을 형성한다. 예를 들면, 화합물 A, 화합물 B, 화합물 C, 화합물 D에서는, 각 분자에 2분자의 HCl을 가지므로, 분자 전체로서는, 8개의 HCl을 가지게 된다. 화합물 E에서는, 각 분자에 6분자의 HCl을 가지므로, 분자 전체로서는, 24분자의 HCl을 가지게 된다. 화합물 F에서는, 각 분자에 3분자의 HCl을 가지므로, 분자 전체로서는, 12개의 HCl을 가지게 된다.

[0164] 본 발명의 주지(主旨)에 의하면, 상기 개시되어 있는 구체적인 화합물 외에, 이 분야의 기술자는, 또한 본 발명에 기재된 실시형태 및 제조 방법을 따라, 보다 많은 콘쥬게이트를 제조할 수 있다. 예를 들면,

[0165] ① D가 SN-38이며, T가 각각 iRGD, cRGD, tLyp-1, Lyp-1, RPARPAR, Angiopep2 또는 GE11인 콘쥬게이트, ② D가 10-하이드록시캅토테신이며, T가 각각 iRGD, cRGD, tLyp-1, Lyp-1, RPARPAR, Angiopep2 또는 GE11인 콘쥬게이트, ③ D가 루비테칸이며, T가 각각 iRGD, cRGD, tLyp-1, Lyp-1, RPARPAR, Angiopep2 또는 GE11인 콘쥬게이트가 있다.

[0166] 본 발명의 콘주게이트는 전형적인 약물 전구체이며, 가수분해작용 또는 효소분해작용에 의해, 활성제 D가 방출되고, 모체로부터 분리하고, 생리 활성을 발휘한다. 본 발명의 콘주게이트는 고담지 능력을 나타내므로, 총투여량을 저감하여, 예를 들면, 암 등의 특수한 질환을 치료할 수 있다. 즉, 본 발명의 콘주게이트 활성제 담체는, 공유결합으로 복수 종류의 활성제 분자와 효과적으로 연결할 수 있기 때문에, 일정량의 콘주게이트당, 보다 많은 양의 치료 제형(즉, 활성제 부분)을 투여하는 것이 허용된다. 본 발명의 콘주게이트는, 수용성 폴리머의 수식에 의해, 실질적으로 친수성이 되고, 특히 활성제가 수난가용성(水難可溶性) 약물인 경우, 콘주게이트의 바이오 어베일러빌리티를 향상시킬 수 있다. 본 발명의 콘주게이트는, 커플링되어 있지 않은 약물에 비해, 보다 강한 작용을 나타내고, 인간 또는 다른 동물의 체내 조직에 풍부하게 존재할 수 있다.

[0167] 본 발명에서의 콘주게이트 약물 전구체는, 특히 활성제가 1개의 항암 화합물인 경우, 다양하며 독특한 성질을 가진다. 이와 같은 약물 전구체는, 종양의 증식을 보다 고효율적으로 억제할 수 있다. 사용하는 이와 같은 소분자는, 항암 특성을 가지는 것으로서 알려져 있는 소분자이다. 그러나, 상기한 바와 같이 다분지 폴리머와 결합함으로써, 그 치료 효과 및 약물 대사 동태학은 상기 소분자(예를 들면, 항암 화합물 자체)에 비해, 크게 개량되었다. 대상이 될 수 있는 고형 종양의 종류로서는, 결장암, 유방암, 난소암, 췌장암, 위암, 신경교종(glioma), 및, 유방, 난소, 결장, 신장, 담관, 폐 및 뇌의 악성 육종, 암 및 림프종(lymphoma)을 예로 들 수 있다.

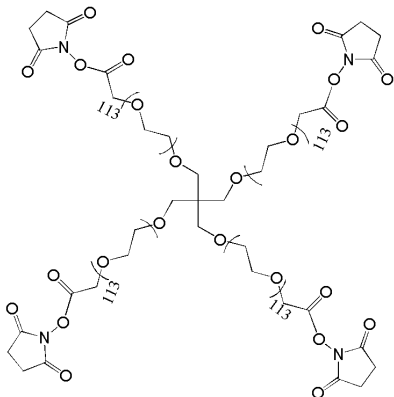
[0168] 상기한 바와 같이, 본 발명은, 멀티 암 폴리머로 수식된 표적 항암 콘주게이트에 관한 것이다. 그 중, 수용성 폴리머에 의한 수식은, 상기 콘주게이트의 수용성을 높이고, 약물 담지량을 높일 수 있다. 표적 분자는, 표적 지향성을 높이고, 상기 콘주게이트의 목표 조직에 있어서의 농도를 더욱 향상시킬 수 있다. L은, 임의의 연결 링커이며, 그 작용은, 표적 분자와 항암 약물을 연결하고 나서, 표적 분자, 항암 약물 및 폴리머 암을 더욱 연결하여, 콘주게이트를 하나로 하는 것이다.

[0169] 본 발명의 콘주게이트의 약학적으로 허용되는 염은, 염산염인 것이 바람직하고, 약화학 분야의 일반적인 수단에 의해 염을 형성할 수 있고, 또한 트리플루오로 아세트산염, 황산염, 인산염, 아세트산염 등이라도 된다.

[0170] 또한, 본 발명은 상기 콘주게이트의 제조 방법을 제공한다. 본 발명의 콘주게이트의 제조 과정에서는, POLY 및 유기 중심 R은 실질적으로 멀티 암 폴리머를 형성하고 있다. 본 발명의 바람직한 실시예에서는, 상기 멀티 암 폴리머는 멀티 암 폴리에틸렌글리콜이며, 시판 중인 원료로부터 얻을 수 있고, 예를 들면, 북경건개과기(北京健凱科技)유한회사에서 다양한 종류의 4암, 3암, 8암 폴리에틸렌글리콜 유도체를 구입할 수 있다. 시판하고 있는 이들 멀티암 PEG는, 반응에 직접적으로 참여할 수 있다.

[0171] 식(III)의 콘주게이트를 제조할 때, 바람직하게 사용되는 4암 폴리에틸렌글리콜은 하기 식에 나타낸다.

[0172] [화학식 43]



[0173] 이 바람직한 4암 폴리에틸렌글리콜은 4ARM-PEG20K-SCM으로 불리우고 있으며, 그 분자량이 약 20kDa이다. 마찬가지로, 식(IV) 및 식(V)의 콘주게이트를 제조할 때, 사용되는 3암 및 8암 폴리에틸렌글리콜의 분자량도 약 20kDa인 것이 바람직하다.

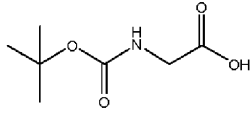
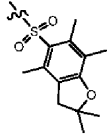
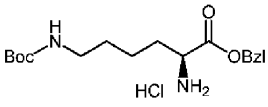
발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0175] 이하, 본 발명에 대하여 상세하게 설명한다. 그리고, 본 발명은 다양한 다른 형태로 구체화되어도 되고, 본 명세서에 기재된 실시예로 한정되어서는 안된다. 이들 실시예를 기재하는 목적은, 개시 내용을 보다 완전하게 또

한 전면적으로 하기 위해서이다. 사용한 시약 및 원료에 대하여, 제조 방법을 개시한 것 이외는 모두 시판되는 것을 입수한 것이며, 예를 들면, 4ARM-PEG20K-SCM은 북경건개과기유한회사로부터 구입한 것이다.

[0176] 기술용어 설명

[0177] [표 2]

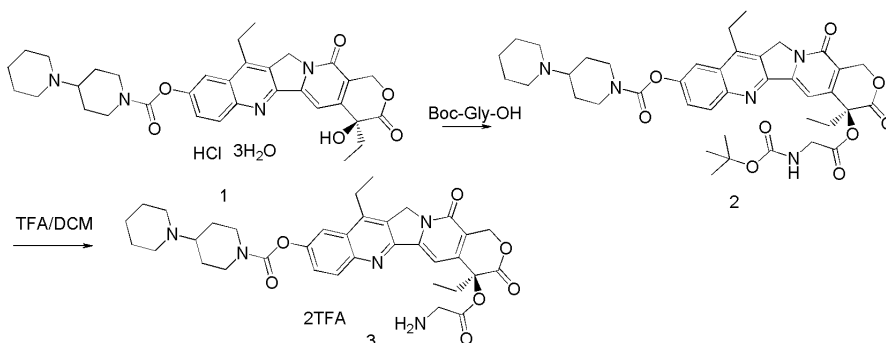
약칭	기술용어의 설명	약칭	기술용어의 설명
DMF	N,N -디메틸포름아미드	TFA	트리플루오로아세트산
DCM	디클로로메탄	TBME	tert -부틸메틸에테르
Boc-Gly-OH		Fmoc-OSU	탄산 9 -플루오레닐메틸 N -숙신이미달
DMAP	4 -디메틸아미노피리딘	DME	에틸렌글리콜디메틸에테르
DCC	디시클로헥실카르보디이미드	HOBt	1 -하이드록시벤조트리아졸
IPA	이소프로판올	THF	테트라하이드로퓨란
EA	아세트산 에틸	DI EA	N,N -디이소프로필에틸아민
DEPC	시아노포스폰산 디에틸	DEA	트리에틸아민
Pbf		H-Lys(Boc)-OBzl	
DIC	N,N' -디이소프로필카르보디이미드	TFE	트리플루오로에탄올
DPPA	디페닐인산 아지드	SPPS	고상 유기합성
NMM	N -메틸모르폴린	TIS	트리아이소프로필실란
MTBE	tert -부틸메틸에테르		

[0178]

실시예 1

[0179]

[0180] [화학식 44]



[0181]

[0182] 화합물 2의 제작

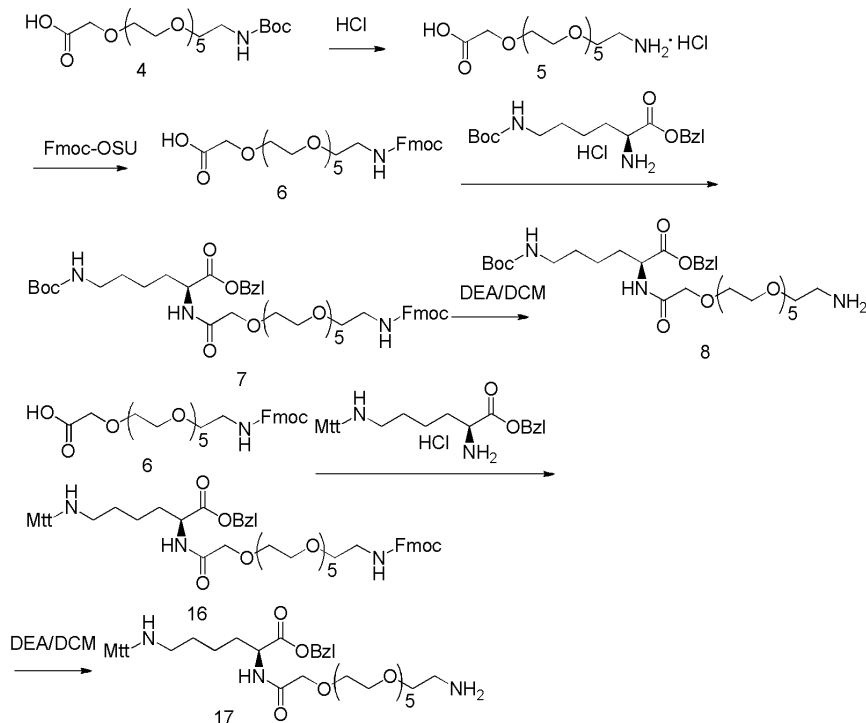
[0183] 250mL의 환저(丸底) 플라스크에, 3.50g의 화합물 1(1.0eq), 52.5ml의 DMF를 첨가하고, 60℃로 가열하여 용해하고, 5~10 min 후에 DMF를 감압 하에서 증류 제거하고, 300ml의 n-헵탄을 가하고 감압 증류하고, 3회 반복하고, 원심분리하여 탈수한 후, 105ml의 DCM, 1.08g의 Boc-Gly-OH(1.2eq), 63mg의 DMAP(0.1eq)를 가하고, 1.59g의 DCC(1.5eq)를 적하(適下)하여 10ml의 DCM의 용액에 용해하고, 20℃에서 4시간 반응시키고, TLC에 의한 모니터링으로 반응이 종료한 것을 확인한 후, 여과하고, 나머지가 25% 체적이 될 때까지 농축하고 120ml의 IPA를 가하고, 75%의 용매를 증류 제거하고, 150ml의 n-헵탄을 가하고, 실온에서 1시간 교반하고, 여과하고, n-헵탄으로 2회 세정하고, 건조하여, 담황색의 고체로서, 4.02g의 화합물 2를 얻었다.

[0184] 화합물 3의 제작

[0185] 100mL의 3구 플라스크에, 4.02g의 화합물 2, 50ml의 DCM을 가하고, 교반하여 용해시킨 후에 11.6ml의 TFA를 적하하고, 실온에서 2h 반응시키고, TLC에 의한 모니터링으로 반응이 종료한 것을 확인한 후, 150ml의 아세토니트릴을 가하고, 120ml의 용매를 감압 증류한 후에 320ml의 TBME 용액에 투입하고, 30min 교반하고, 여과하고, 케이크를 TBME로 세정하여, 담황색의 고체로서, 4.00g의 화합물 3을 얻었다.

[0186] 실시예 2

[0187] [화학식 45]



[0188]

[0189] 화합물 5의 제작

[0190] 250mL의 3구 플라스크에, 6.9g의 화합물 4, 30ml의 EA를 가하고, 교반하여 용해시킨 후에 0℃까지 강온(降溫)시키고, 40ml의 0.3M의 HCl/EA를 가하고, 보온하여 2h 반응시키고, TLC에 의한 모니터링으로 반응이 종료한 것을 확인한 후, 농축 건조(乾固)시켜, 화합물 5를 얻고, 이것을 직접적으로 다음 반응에 제공했다.

[0191] 화합물 6의 제작

[0192] 화합물 5(1.0eq)를 50ml의 정제수(精製水)로 용해하고, 3.96g의 탄산수소나트륨(2.0eq)을 가하고, 50ml의 DME로 5.30g의 Fmoc-OSU(1.0eq)를 용해하고, 화합물 5의 바이알병(vial bottle)에 가하고, 25ml의 THF를 추가하고, 실온에서 2시간 교반하고, TLC에 의한 모니터링으로 반응이 종료한 것을 확인한 후, 유기용매를 증류 제거하고, EA로 불순물을 추출하고, 희염산으로 수상(水相)을 pH 3~4로 조정하고, EA로 2회 추출하고, 유기층을 합병하고, 1회 수세(水洗)하고, 포화 식염수로 세정한 후에, 무수 황산나트륨으로 건조시키고, 농축하여, 담황색의 유상물(油狀物)로서, 8.4g의 화합물 6을 얻었다.

[0193] 화합물 7의 제작

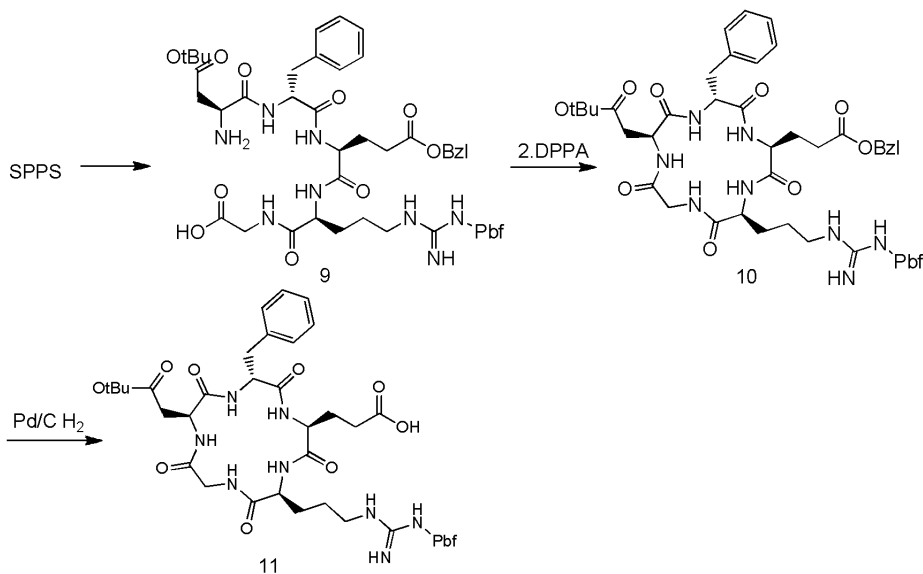
[0194] 100ml의 바이알병에, 4.00g의 화합물 6(1.0eq), 2.92g의 H-Lys(Boc)-OBzl·HCl, 40ml의 DCM을 가하여 용해하고, 2.76g의 DIEA(3.0eq), 1.74g의 DEPC(1.5eq)를 가하고, 실온에서 2시간 교반하고, TLC에 의한 모니터링으로 반응이 종료한 것을 확인한 후, 아세트산 수용액에 의한 세정, 탄산수소나트륨 용액에 의한 세정을 행하고, 1회 수세하고, 포화 식염수로 1회 세정한 후에 무수 황산나트륨으로 건조시키고, 농축하여, 7.0g의 담황색의 유상물인 화합물 7을 얻고, 이것을 정제하지 않고 직접적으로 다음 반응에 제공했다(동일한 방법에 의해 화합물 16을 제작).

[0195] 화합물 8의 제작

[0196] 140ml의 25%의 DEA/DCM으로 7.0g의 화합물 7을 용해하고, 실온에서 6시간 교반하고, TLC에 의한 모니터링으로 반응이 종료한 것을 확인한 후, 농축 건조시키고, 100ml, 50ml의 EA를 가하고, 희염산으로 pH 3~4로 조정하고, 분액(分液)하고, 수상을 EA로 2회 추출한 후에, 농축 건조시켜, 담황색의 고체로서, 3.5g의 화합물 8을 얻었다(동일한 방법에 의해 화합물 17을 제작).

[0197] 실시예 3 보호기를 연결한 표적 분자 cRGD(화합물 11)의 제작

[0198] [화학식 46]



[0199]

[0200] 화합물 9의 제작

[0201] Fmoc 보호법에 기초한 2Cl-Trt Resin을 사용하고, 커플링제로서 HOBt/DIC를 사용하고, DMF를 반응 용매로 하고, 닐히드린법에 의해 반응을 모니터링하고, Fmoc-Gly-OH, Fmoc-Arg(Pbf)-OH, Fmoc-Glu(OBzl)-OH, Fmoc-D-Phe-OH, Fmoc-Asp(OtBu)OH의 순서로 보호 아미노산을 수지에 연결하고, Fmoc를 제거하고, DMF에 의한 세정, DCM에 의한 세정을 행하고, 메탄올 세정 후에 건조시키고, 개열제(開裂劑)로서 아세트산/TFE/DCM=1/2/7을 가하고, 2시간 반응시켜, 병행한 MTBE로 침전시키고, 세정, 건조하여, 오프 화이트(off white)의 고체로서, 화합물 9를 얻었다.

[0202] 화합물 10의 제작

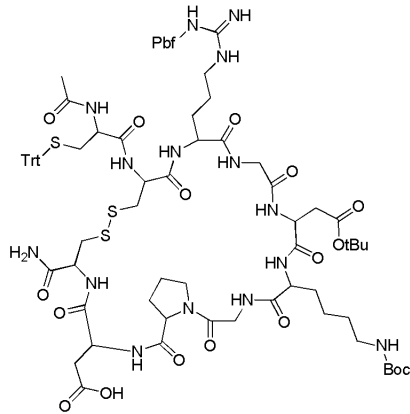
[0203] 2L의 3구 플라스크에, 14.0g의 화합물 9(1.0eq)를 가하고, 1L의 DMF를 가하고, 0℃까지 강온시키고, 9.2g의 탄산수소나트륨(8.0eq)을 가하고, 용해하여 투명하게 된 후에 15.1g의 DPPA(4.0eq)를 가하고, 하룻밤 보온하고, TLC에 의한 모니터링으로 반응이 종료한 것을 확인한 후, 5L의 물에 투입하고, EA로 2회 추출하고, 수세하고, 포화 염화나트륨으로 세정한 후에 무수 황산나트륨으로 건조시키고, 농축하여, 오프 화이트의 고체로서, 11.5g의 화합물 10을 얻었다.

[0204] 화합물 11의 제작

[0205] 1L의 수소화 반응술에, 11.5g의 화합물 10, 1L의 메탄올, 2.5g의 Pd/C를 가하고, 하룻밤 수소 첨가하고, TLC에 의한 모니터링으로 반응이 종료한 것을 확인한 후, 여과하고, 농축하여, 희색의 고체로서, 11.0g의 화합물 11을 얻었다.

[0206] 실시예 4 보호기를 연결한 표적 분자 iRGD(화합물 20)의 제작

[0207] [화학식 47]



20

[0208]

[0209]

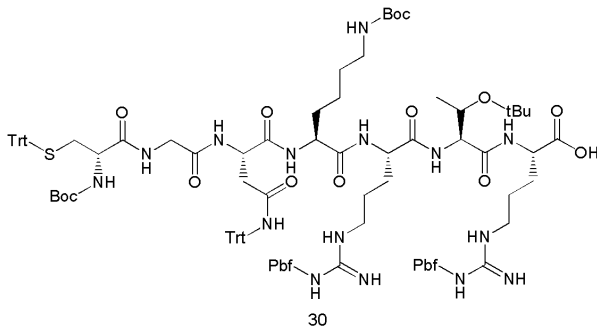
Fmoc-Sieber Resin을 사용하고, 커플링제로서 HOBt/DIC를 사용하고, DMF를 반응 용매로 하고, 닐히드린법에 의해 반응을 모니터링하고, Fmoc-Cys(Acm)-OH, Fmoc-Asp(Alloc)OH, Fmoc-Pro-OH, Fmoc-Gly-OH, Fmoc-Lys(Boc)-OH, Fmoc-Asp(OtBu)OH, Fmoc-Gly-OH, Fmoc-Arg(Pbf)-OH, Fmoc-Cys(Acm)-OH의 순서로 보호 아미노산을 수지에 연결하고, DMF로 세정한 후에, 트리플루오로아세트산 탈륨(2.0eq)을 가하여 18시간 교반하고, 이어서 DMF로 세정하고, Fmoc를 제거하고, Fmoc-Cys(Trt)-OH를 축합시키고, DMF로 세정하고, Fmoc를 제거하고, 아세트산 피리딘을 가하여 20min 반응시키고, DMF로 세정하고, 3eq의 Pd(PPh₃)₄의 CHCl₃:AcOH:NMM(18:1:0.5) 용액을 가하고, 2h 반응시켜, Alloc을 제거하고, 이어서, 클로로포름(6*20ml)으로 세정하고, 20% HOAc의 DCM 용액, DCM 및 DMF로 세정하고, DMF에 의한 세정을 더욱 행하고, DCM에 의한 세정을 행하고, 메탄올에 의한 세정을 한 후에 건조시키고, 1% TFA/DCM을 가하고, 2시간 반응시키고, 빙랭한 MTBE로 침전시키고, 세정, 건조하여, 오프 화이트의 고체로서, 화합물 20을 얻었다.

[0210]

실시예 5 보호기를 연결한 표적 분자 tLyP-1(화합물 30)의 제작

[0211]

[화학식 48]



30

[0212]

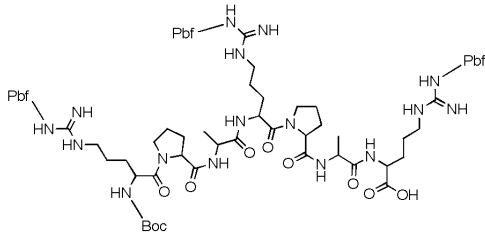
[0213]

2Cl-Trt Resin을 사용하고, 커플링제로서 HOBt/DIC를 사용하고, DMF를 반응 용매로 하고, 닐히드린법에 의해 반응을 모니터링하고, Fmoc-Arg(Pbf)-OH, Fmoc-Thr(tBu)-OH, Fmoc-Arg(Pbf)-OH, Fmoc-Lys(Boc)-OH, Fmoc-Asn(Trt)-OH, Fmoc-Gly-OH, Boc-Cys(Trt)-OH의 순서로 보호 아미노산을 수지에 연결하고, 개열제로서 아세트산/TFE/DCM=1/2/7을 가하고, 2시간 반응시키고, 빙랭한 MTBE로 침전시키고, 세정, 건조하여, 오프 화이트의 고체로서, 화합물 30을 얻었다.

[0214]

실시예 6 보호기를 연결한 표적 분자 RPARPAR(화합물 40)의 제작

[0215] [화학식 49]



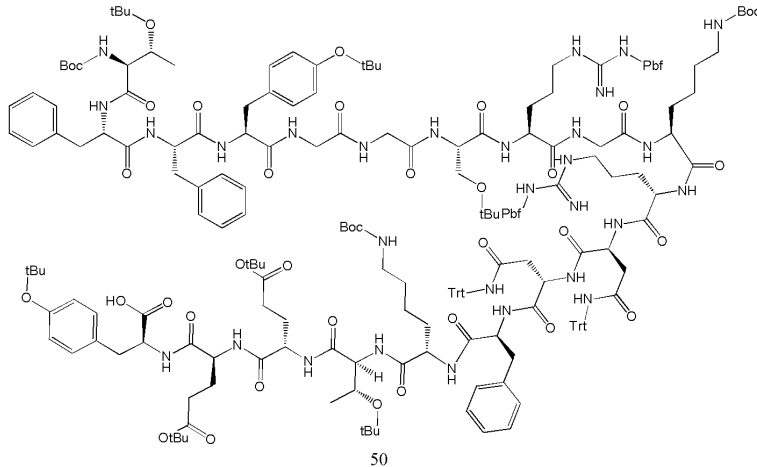
[0216]

40

[0217] 2Cl-Trt Resin을 사용하고, 커플링제로서 HOBT/DIC를 사용하고, DMF를 반응 용매로 하고, 닐히드린법에 의해 반응을 모니터링하고, Fmoc-Arg(Pbf)-OH, Fmoc-Ala-OH, Fmoc-Pro-OH, Fmoc-Arg(Pbf)-OH, Fmoc-Ala-OH, Fmoc-Pro-OH, Boc-Arg(Pbf)-OH의 순서로 보호 아미노산을 수지에 연결하고, 개열제로서 아세트산/TFE/DCM=1/2/7을 가하고, 2시간 반응시키고, 빙랭한 MTBE로 침전시키고, 세정, 건조하여, 오프 화이트의 고체로서, 화합물 40을 얻었다.

[0218] 실시예 7 보호기를 연결한 표적 분자 Angiopep-2(화합물 50)의 제작

[0219] [화학식 50]



[0220]

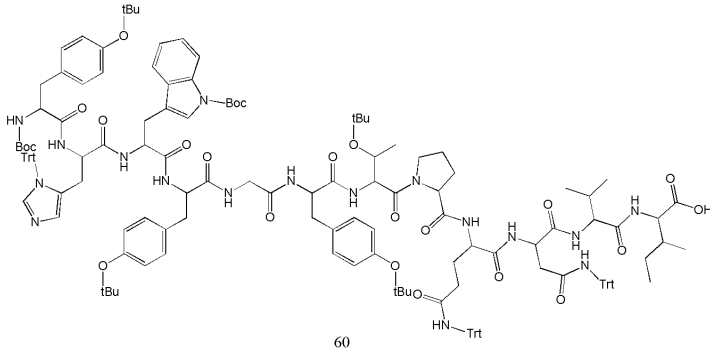
50

[0221] Angiopep-2의 서열은 TFFYGGSRGKRNNFKTEEY이다.

[0222] 2Cl-Trt Resin을 사용하고, 커플링제로서 HOBT/DIC를 사용하고, DMF를 반응 용매로 하고, 닐히드린법에 의해 반응을 모니터링하고, Fmoc-Tyr(tBu)-OH, Fmoc-Glu(OtBu)-OH, Fmoc-Glu(OtBu)-OH, Fmoc-Thr(tBu)-OH, Fmoc-Lys(Boc)-OH, Fmoc-Phe-OH, Fmoc-Asn(Trt)-OH, Fmoc-Asn(Trt)-OH, Fmoc-Arg(Pbf)-OH, Fmoc-Lys(Boc)-OH, Fmoc-Gly-OH, Fmoc-Arg(Pbf)-OH, Fmoc-Ser(tBu)-OH, Fmoc-Gly-OH, Fmoc-Gly-OH, Fmoc-Tyr(tBu)-OH, Fmoc-Phe-OH, Fmoc-Phe-OH, Boc-Thr(tBu)-OH의 순서로 보호 아미노산을 수지에 연결하고, 개열제로서 아세트산/TFE/DCM=1/2/7을 가하고, 2시간 반응시키고, 빙랭한 MTBE로 침전시키고, 세정, 건조하여, 오프 화이트의 고체로서, 화합물 50을 얻었다.

[0223] 실시예 8 보호기를 연결한 표적 분자 GE11(화합물 60)의 제작

[0224] [화학식 51]



[0225]

[0226] GE11의 서열은 YHWYGYTPQNVI이다.

[0227]

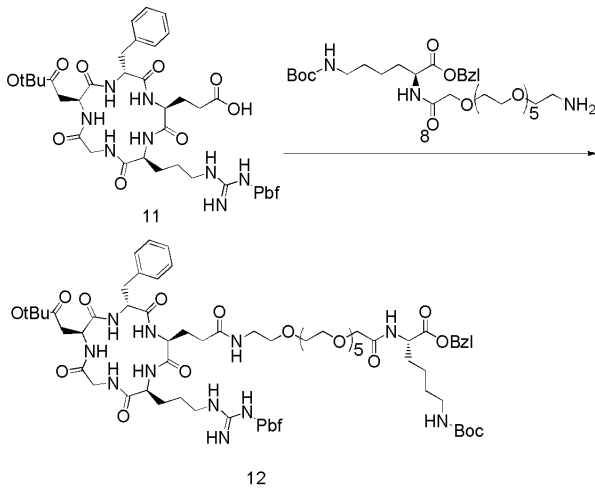
2Cl-Trt Resin을 사용하고, 커플링제로서 HOBT/DIC를 사용하고, DMF를 반응 용매로 하고, 닐히드린법에 의해 반응을 모니터링하고, Fmoc-Ile-OH, Fmoc-Val-OH, Fmoc-Asn(Trt)-OH, Fmoc-Gln(Trt)-OH, Fmoc-Pro-OH, Fmoc-Thr(tBu)-OH, Fmoc-Tyr(tBu)-OH, Fmoc-Gly-OH, Fmoc-Tyr(tBu)-OH, Fmoc-Trp(Boc)-OH, Fmoc-His(Trt)-OH, Boc-Tyr(tBu)-OH의 보호된 아미노산을 순서대로 수지에 연결하고, 개열제로서 아세트산/TFE/DCM=1/2/7을 가하고, 2시간 반응시키고, 병랭한 MTBE로 침전시키고, 세정, 건조하여, 오프 화이트의 고체 60을 얻었다.

[0228]

실시예 9 화합물 a와 화합물 A의 제작

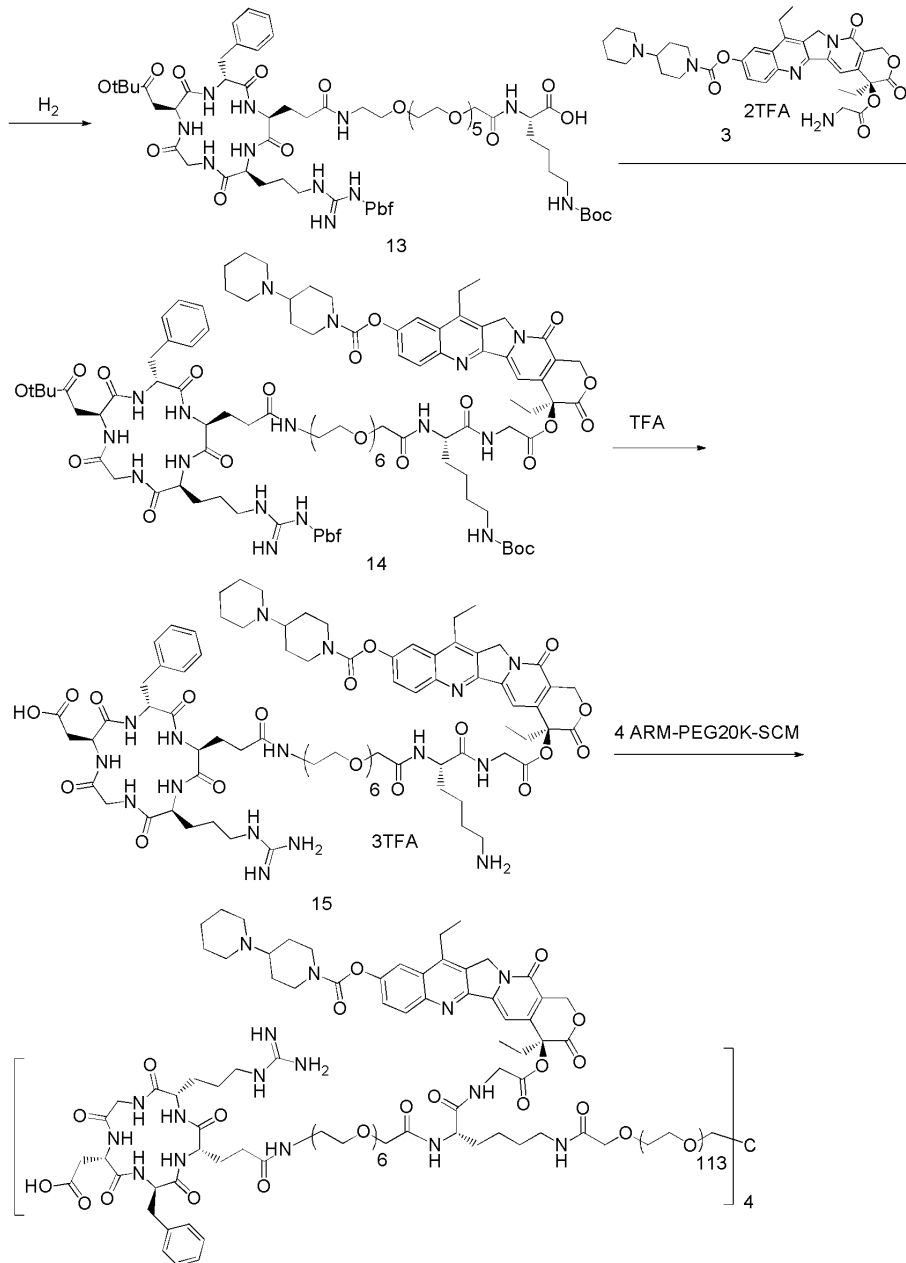
[0229]

[화학식 52]



[0230]

[0231] [화학식 53]



[0232]

[0233] 화합물 12의 제작

[0234] 5ml의 바이알병에, 480mg의 화합물 11(1.0eq), 380mg의 화합물 8(1.1eq), 1ml의 DMF, 203mg의 DIEA(3.0eq), 128mg의 DEPC(1.5eq)를 가하고, 실온에서 2h 반응시키고, TLC에 의한 모니터링으로 반응이 종료한 것을 확인한 후, 10mL의 물에 투입하고, EA로 2회 추출하고, 희염산에 의한 세정을 행하고, 탄산수소나트륨 용액에 의한 세정, 포화 염화나트륨에 의한 세정을 행한 후에 무수 황산나트륨으로 건조시키고, 농축하여, 0.8g의 젤리상(狀)의 고체인 화합물 12를 얻고, 이것을 직접적으로 다음 반응에 제공했다.

[0235] 화합물 13의 제작

[0236] 200ml의 수소화 반응솔에, 0.8g의 화합물 10, 30mL의 메탄올, 0.28g의 Pd/C를 가하고, 하룻밤 수소 첨가하고, TLC에 의한 모니터링으로 반응이 종료한 것을 확인한 후, 여과, 농축하여, 희색의 고체로서, 0.66g의 화합물 13을 얻었다.

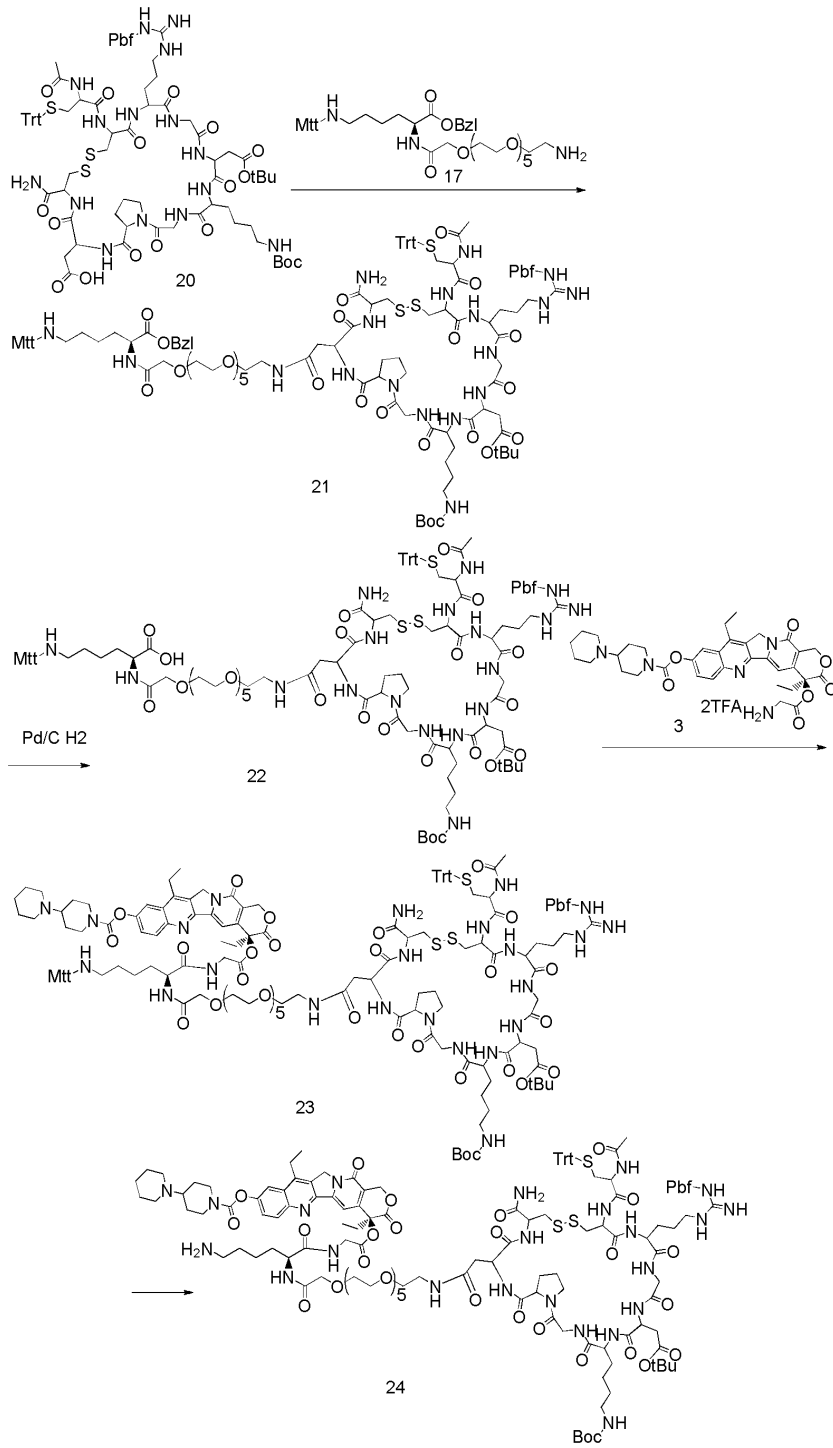
[0237] 화합물 14의 제작

[0238] 100ml의 바이알병에, 6.60g의 화합물 13(1.0eq), 3.59g의 화합물 3(1.05eq), 66ml의 DMF, 1.16g의 DIEA(3.0eq), 1.10g의 DEPC(1.5eq)를 가하고, 실온에서 2h 반응시키고, TLC에 의한 모니터링으로 반응이 종료

한 것을 확인한 후, 700ml의 TBME에 투입하고, 슬러리(slurry)상(狀)으로 하고 감압 여과하고, 고체를 150의 DCM으로 용해한 후에 1.5L의 TBME에 투입하고, 슬러리상으로 하고 감압 여과하고, 건조하여, 회색의 분말로서, 9.0g의 화합물 14를 얻고, 이것을 직접적으로 다음 반응에 제공했다.

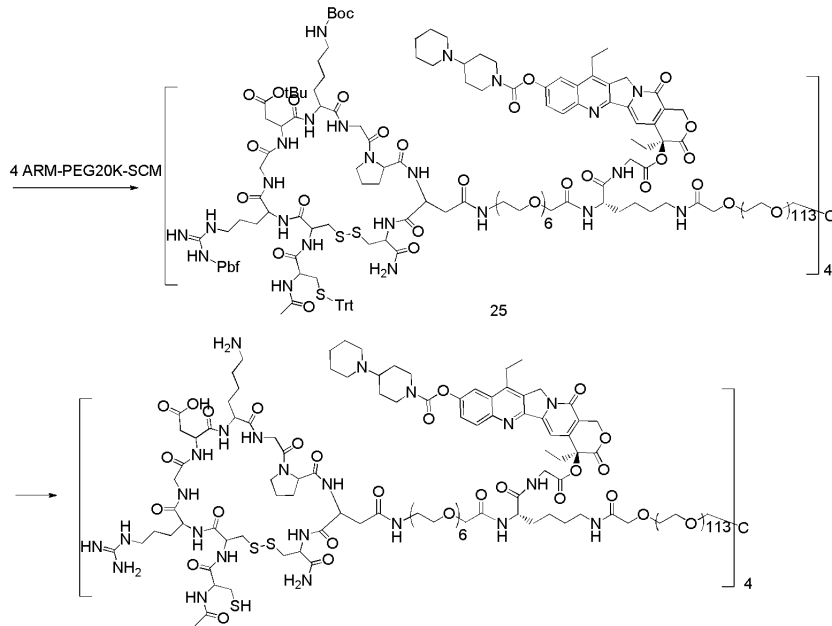
- [0239] 화합물 15의 제작
- [0240] 250ml의 바이알병에, 9.0g의 화합물 14를 가하고, 개열제로서 92.5% TFA/2.5% 물/2.5% TIS를 가하고, 실온에서 2h 교반하고, 빙랭한 MTBE로 침전시키고, 원심 분리하고, 세정하고, 조(粗)생성물에 역상 HPLC에 의한 정제, 동결 건조를 거쳐, 담황색의 플록(flock)으로서, 5.0g의 화합물 15를 얻었다.
- [0241] 화합물 a의 제작
- [0242] 바이알병에 2.3g의 화합물 15(4.5eq), 6.0g의 4ARM-PEG20K-SCM(1.0eq), 60ml의 DMF, 0.27g의 TEA(9.0eq)를 가하고, 실온에서 반응시키고, HPLC에서 반응이 현저하게 진전하지 않게 된 것을 모니터링한 후에, 1000mL의 TBME에 투입하고, 슬러리상으로 하고, 감압 여과하고, 건조하여 7.6g의 분말상 조생성물 a를 얻고, HPLC에 의한 정제 후에 탈염하고, 농축하여 유기용매를 제거하고, 동결 건조하여, 오프 화이트의 분말로서, 3.4g의 화합물 a를 얻었다.
- [0243] 화합물 A의 제작
- [0244] 화합물 a의 분말상 조생성물을 얻은 후에, HPLC로 정제하여 탈염하고, 농축하여 유기용매를 제거하고, 희염산으로 pH=5~6으로 조정하고, 동결 건조를 거쳐, 황녹색의 분말로 만들어, 3.4g의 화합물 A를 얻었다. MALDI-TOF에 의해 검출한 결과, 분자량은 25480.27이었다.
- [0245] 실시예 10 화합물 b와 화합물 B의 제작

[0246] [화학식 54]



[0247]

[0248] [화학식 55]



[0249]

[0250] 화합물 21의 제작

[0251] 100ml의 바이알병에, 5.00g의 화합물 20(1.0eq), 2.36g의 화합물 17(1.1eq), 50ml의 DMF, 1.11g의 DIEA(3.0eq), 0.71g의 DEPC(1.5eq)를 가하고, 실온에서 2h 반응시키고, TLC에 의한 모니터링으로 반응이 종료한 것을 확인한 후, 300mL의 물에 투입하고, EA로 2회 추출하고, 아세트산 수용액에 의한 세정, 탄산수소나트륨 용액에 의한 세정, 포화 염화나트륨에 의한 세정을 행한 후에 무수 황산나트륨으로 건조시키고, 농축하여, 7.18g의 담황색의 고체인 21을 얻고, 이것을 직접적으로 다음 반응에 제공했다.

[0252] 화합물 22의 제작

[0253] 200ml의 수소화 반응술에, 7.00g의 화합물 21, 120mL의 메탄올, 0.35g의 Pd/C를 가하고, 하룻밤 수소 첨가하고, TLC에 의한 모니터링으로 반응이 종료한 것을 확인한 후, 여과, 농축하여, 회색의 고체로서, 7.05g의 화합물 22를 얻었다.

[0254] 화합물 23의 제작

[0255] 100ml의 바이알병에, 7.00g의 화합물 22(1.0eq), 2.22g의 화합물 3(1.05eq), 70ml의 DMF, 1.10g의 DIEA(3.0eq), 0.70g의 DEPC(1.5eq)를 가하고, 실온에서 2h 반응시키고, TLC에 의한 모니터링으로 반응이 종료한 것을 확인한 후, 700ml의 TBME에 투입하고, 슬러리상으로 한 후, 감압 여과하고, 100의 DCM으로 고체를 용해시킨 후에, 1.0L의 TBME에 투입하고, 슬러리상으로 하고 감압 여과하고, 건조시켜, 회색의 분말로서, 8.60g의 화합물 23을 얻고, 이것을 직접적으로 다음 반응에 제공했다.

[0256] 화합물 24의 제작

[0257] 8.60g의 화합물 23에, 개열제로서의 아세트산/TFE/DCM=1/2/7을 200ml 가하고, 2시간 반응시키고, 빙랭한 MTBE로 침전시키고, 세정, 건조, 및 HPLC 정제를 거쳐, 2.10의 오프 화이트 고체 24를 얻었다.

[0258] 화합물 25의 제작

[0259] 50ml의 바이알병에, 1.23g의 화합물 24(4.5eq), 2.00g의 4ARM-PEG20K-SCM(1.0eq), 20ml의 DMF, 0.09g의 TEA(9.0eq)를 가하고, 실온에서 반응시키고, HPLC에 의한 모니터링으로 반응이 현저하게 반응하지 않게 된 것을 확인한 후에, 400mL의 TBME에 투입하고, 슬러리상으로 하고, 감압 여과하고, 건조하여 3.05g의 화합물 25를 얻고, 이것을 직접적으로 다음 반응에 제공했다.

[0260] 화합물 b의 제작

[0261] 50ml의 바이알병에, 3.0g의 화합물 25, 30ml의 개열제로서의 92.5% TFA/2.5% 물/2.5% TIS를 가하고, 실온에서 2h 교반하고, 빙랭한 MTBE로 침전시키고, 원심분리, 세정하고, 조생성물을 역상 HPLC에 의해 정제한 후에 탈염

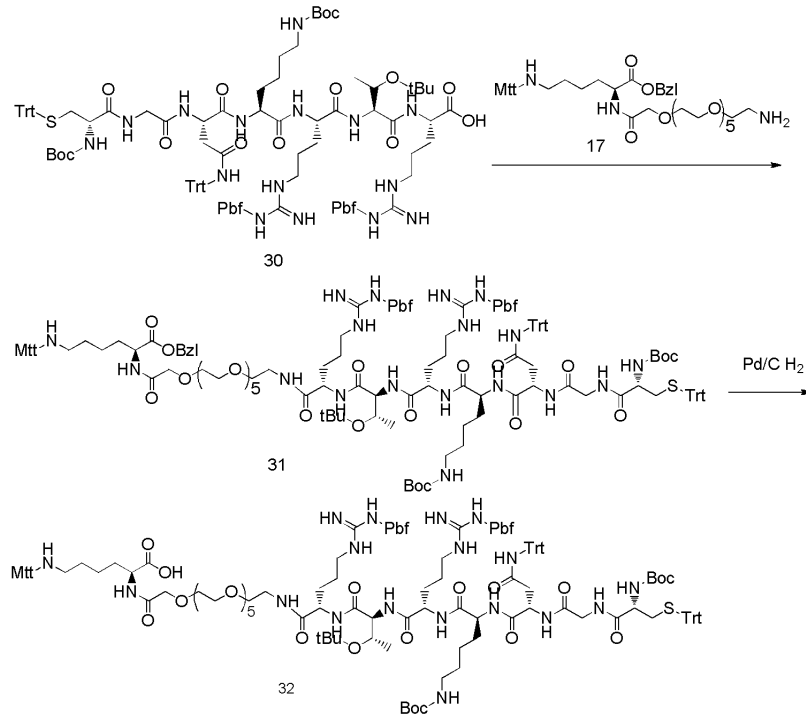
하고, 농축하여 유기용매를 제거하고, 동결 건조하여, 오프 화이트의 분말로서, 1.02g의 화합물 b를 얻었다.

[0262] 화합물 B의 제작

[0263] 화합물 b 조생성물을 역상 HPLC에 의해 정제한 후에 탈염하고, 농축하여 유기용매를 제거하고, 희염산으로 pH=5~6으로 조정하고, 동결 건조를 거쳐, 황녹색의 분말로서, 1.02g의 화합물 B를 얻었다. MALDI-TOF에 의해 검출한 결과, 분자량은 29013.19였다.

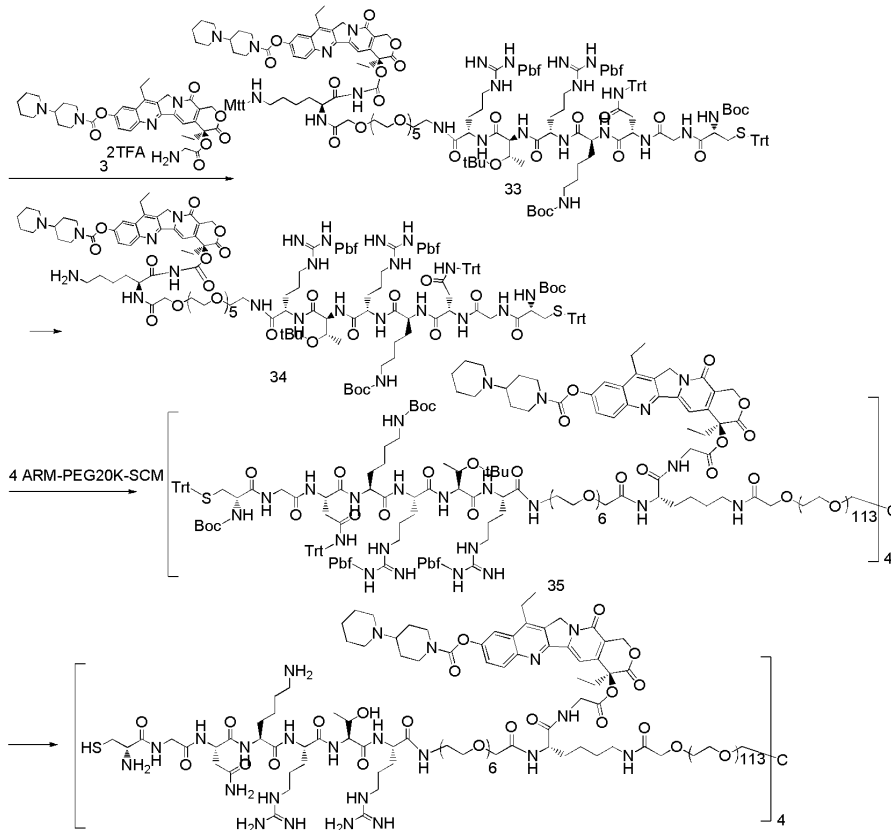
[0264] 실시예 11 화합물 c와 화합물 C의 제작

[0265] [화학식 56]



[0266]

[0267] [화학식 57]



[0268]

[0269] 화합물 31의 제작

[0270] 100ml의 바이알병에, 5.60g의 화합물 30(1.0eq), 2.39g의 화합물 17(1.1eq), 60ml의 DMF, 1.03g의 DIEA(3.0eq), 0.65g의 DEPC(1.5eq)를 가하고, 실온에서 2h 반응시키고, TLC에 의한 모니터링으로 반응이 종료한 것을 확인한 후, 300mL의 물에 투입하고, EA로 2회 추출하고, 아세트산 수용액에 의한 세정, 탄산수소나트륨 용액에 의한 세정을 행하고, 포화 염화나트륨에 의한 세정을 행한 후에 무수 황산나트륨으로 건조시키고, 농축하여, 담황색의 고체로서, 7.08g의 화합물 31을 얻고, 이것을 직접적으로 다음 반응에 제공했다.

[0271] 화합물 32의 제작

[0272] 200ml의 수소화 반응술에, 7.05g의 화합물 31, 150mL의 메탄올, 0.35g의 Pd/C를 가하고, 하룻밤 수소 첨가하고, TLC에 의한 모니터링으로 반응이 종료한 것을 확인한 후, 여과, 농축하여, 회색의 고체로서, 6.95g의 화합물 32를 얻었다.

[0273] 화합물 33의 제작

[0274] 100ml의 바이알병에, 6.80g의 화합물 32(1.0eq), 1.89g의 화합물 3(1.05eq), 70ml의 DMF, 0.94g의 DIEA(3.0eq), 0.59g의 DEPC(1.5eq)를 가하고, 실온에서 2h 반응시키고, TLC에 의한 모니터링으로 반응이 종료한 것을 확인한 후, 700ml의 TBME에 투입하고, 슬러리상으로 한 후, 감압 여과하고, 100의 DCM으로 고체를 용해한 후에, 1.0L의 TBME에 투입하고, 슬러리상으로 하고 감압 여과하고, 건조시켜, 회색의 분말로서, 8.20g의 화합물 33을 얻고, 이것을 직접적으로 다음 반응에 제공했다.

[0275] 화합물 34의 제작

[0276] 8.20g의 화합물 33에, 개열제로서의 아세트산/TFE/DCM=1/2/7을 160ml 가하고, 2시간 반응시키고, 빙랭한 MTBE로 침전시키고, 세정, 건조, 및 HPLC 정제를 거쳐, 오프 화이트의 고체로서, 5.6g의 화합물 34를 얻었다.

[0277] 화합물 35의 제작

[0278] 50ml의 바이알병에, 0.75g의 화합물 34(4.5eq), 1.00g의 4ARM-PEG20K-SCM(1.0eq), 10ml의 DMF, 0.05g의 TEA(9.0eq)를 가하고, 실온에서 반응시키고, HPLC에 의한 모니터링으로 반응이 현저하게 반응하지 않게 된 것을 확인한 후에, 200mL의 TBME에 투입하고, 슬러리상으로 하고 감압 여과하고, 건조하여, 1.69g의 화합물 35를 얻

고, 이것을 직접적으로 다음 반응에 제공했다.

[0279] 화합물 c의 제작

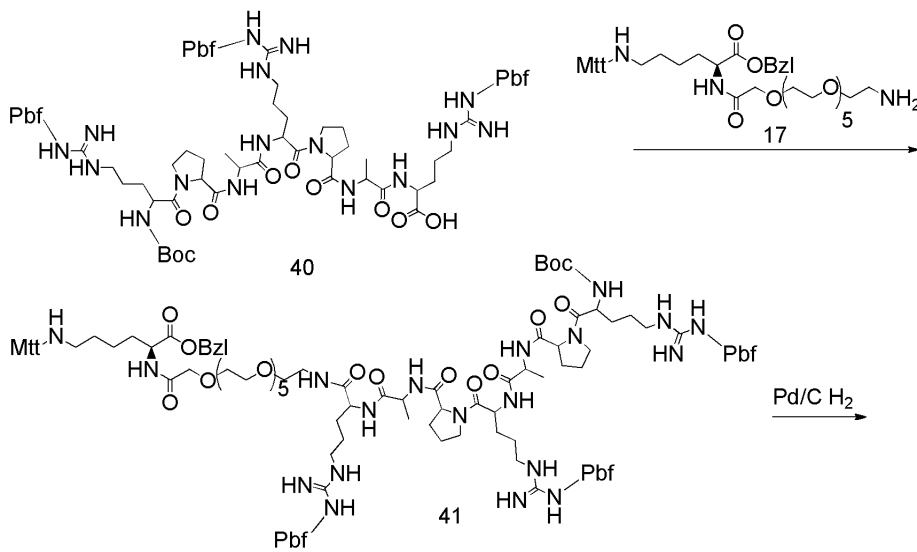
[0280] 50ml의 바이알병에, 1.65g의 화합물 25, 20ml의 개열제로서의 92.5% TFA/2.5% 물/2.5% TIS를 가하고, 실온에서 2h 교반하고, 병행한 MTBE로 침전시키고, 원심분리하고, 세정하고, 조생성물을 역상 HPLC에 의해 정제한 후에 탈염하고, 농축하여 유기용매를 제거하고, 동결 건조하여, 오프 화이트의 분말로서, 0.84g의 화합물 c를 얻었다.

[0281] 화합물 C의 제작

[0282] 화합물 c의 조생성물을 역상 HPLC에 의해 정제한 후에 탈염하고, 농축하여 유기용매를 제거하고, 희염산으로 pH=5~6으로 조정하고, 동결 건조를 거쳐, 황녹색의 분말로서, 0.84g의 화합물 C를 얻었다. MALDI-TOF에 의해 검출한 결과, 분자량은 28076.21이었다.

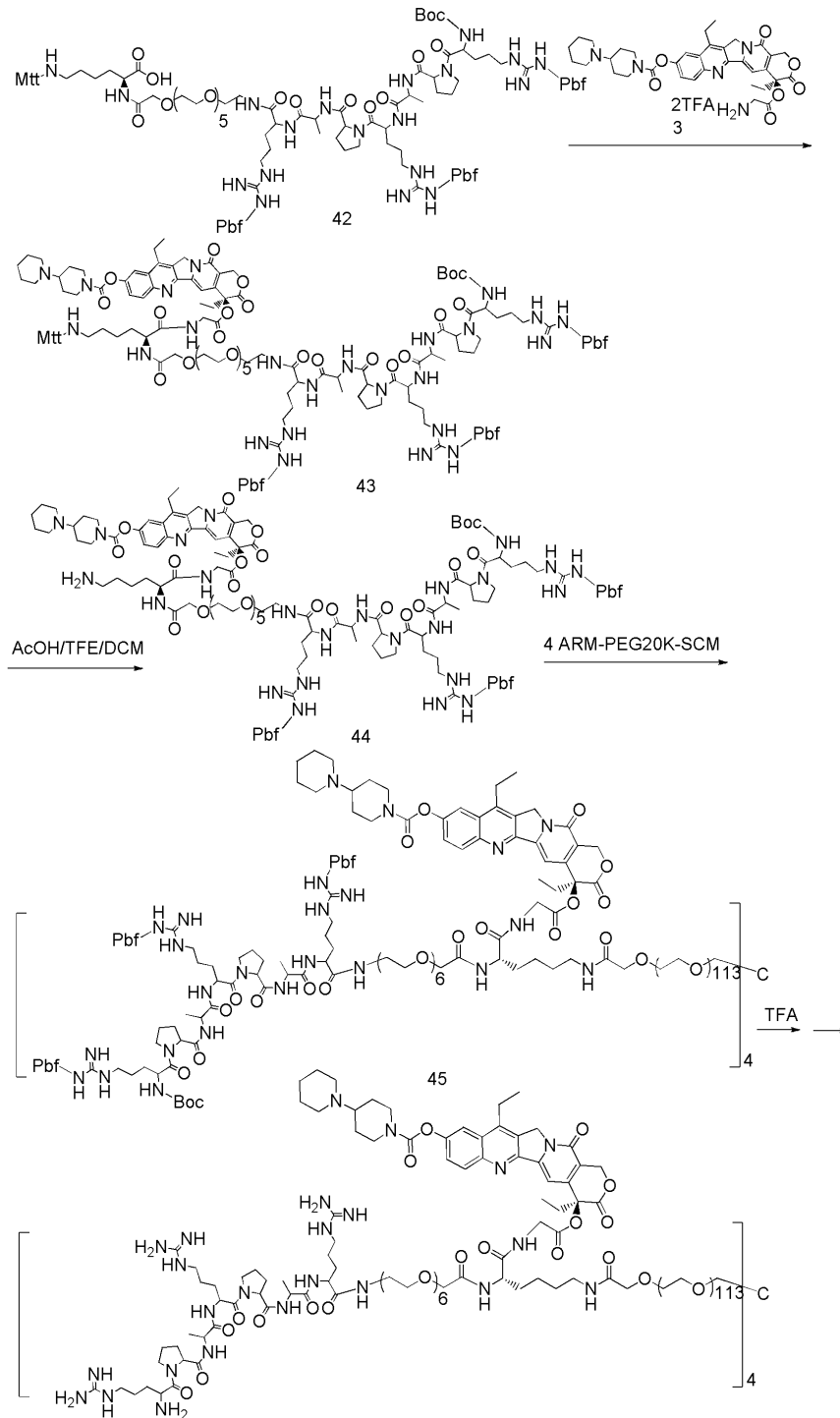
[0283] 실시예 12 화합물 d와 화합물 D의 제작

[0284] [화학식 58]



[0285]

[0286] [화학식 59]



[0287]

[0288]

화합물 41의 제작

[0289]

100ml의 바이알병에, 6.20g의 화합물 40(1.0eq), 3.30g의 화합물 17(1.1eq), 62ml의 DMF, 1.43g의 DIEA(3.0eq), 0.90g의 DEPC(1.5eq)를 가하고, 실온에서 2h 반응시키고, TLC에 의한 모니터링으로 반응이 종료한 것을 확인한 후, 310mL의 물에 투입하고, EA로 2회 추출하고, 아세트산 수용액에 의한 세정, 탄산수소나트륨 용액에 의한 세정을 행하고, 포화 염화나트륨에 의한 세정을 행한 후에 무수 황산나트륨으로 건조시키고, 농축하고, 담황색의 고체인 화합물 41을 8.84g 얻고, 이것을 직접적으로 다음 반응에 제공했다.

[0290]

화합물 42의 제작

[0291]

200ml의 수소화 반응솔에, 8.80g의 화합물 41, 150mL의 메탄올, 0.44g의 Pd/C를 가하고, 하룻밤 수소 첨가하고, TLC에 의한 모니터링으로 반응이 종료한 것을 확인한 후, 여과, 농축하여, 회색의 고체로서, 8.84g의 화합물 42

를 얻었다.

[0292] 화합물 43의 제작

[0293] 100ml의 바이알병에, 8.50g의 화합물 42(1.0eq), 2.77g의 화합물 3(1.05eq), 85ml의 DMF, 1.38g의 DIEA(3.0eq), 0.87g의 DEPC(1.5eq)를 가하고, 실온에서 2h 반응시키고, TLC에 의한 모니터링으로 반응이 종료한 것을 확인한 후, 850mL의 TBME에 투입하고, 슬러리상으로 하고 감압 여과하고, 110의 DCM으로 고체를 용해한 후에 1.1L의 TBME에 투입하고, 슬러리상으로 하고 감압 여과하고, 건조시켜, 회색의 분말로서, 9.86g의 화합물 43을 얻고, 이것을 직접적으로 다음 반응에 제공했다.

[0294] 화합물 44의 제작

[0295] 9.80g의 화합물 43에, 개열제로서의 아세트산/TFE/DCM=1/2/7을 200ml 가하고, 2시간 반응시키고, 빙랭한 MTBE로 침전시키고, 세정, 건조, HPLC 정제를 거쳐, 오프 화이트의 고체로서, 5.92g의 화합물 44를 얻었다.

[0296] 화합물 45의 제작

[0297] 50ml의 바이알병에, 0.60g의 화합물 34(4.5eq), 1.00g의 4ARM-PEG20K-SCM(1.0eq), 10ml의 DMF, 0.05g의 TEA(9.0eq)를 가하고, 실온에서 반응시키고, HPLC에 의한 모니터링으로 반응이 현저하게 반응하지 않게 된 것을 확인한 후에, 200mL의 TBME에 투입하고, 슬러리상으로 하고, 감압 여과, 건조하여, 1.45g의 화합물 45를 얻고, 이것을 직접적으로 다음 반응에 제공했다.

[0298] 화합물 d의 제작

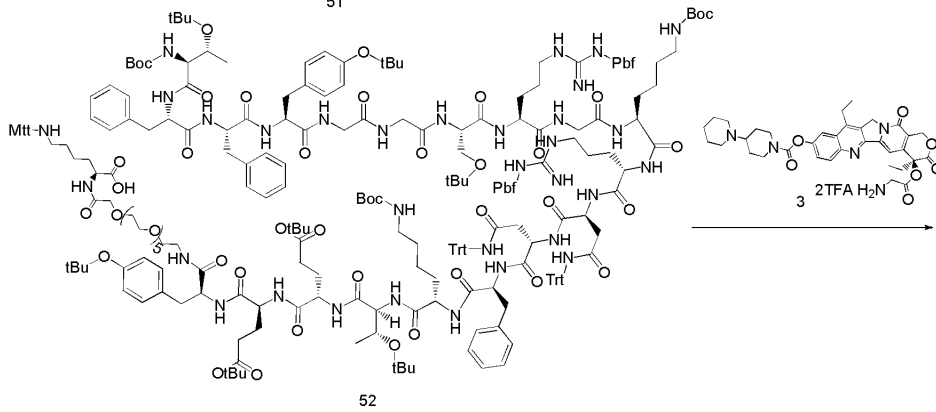
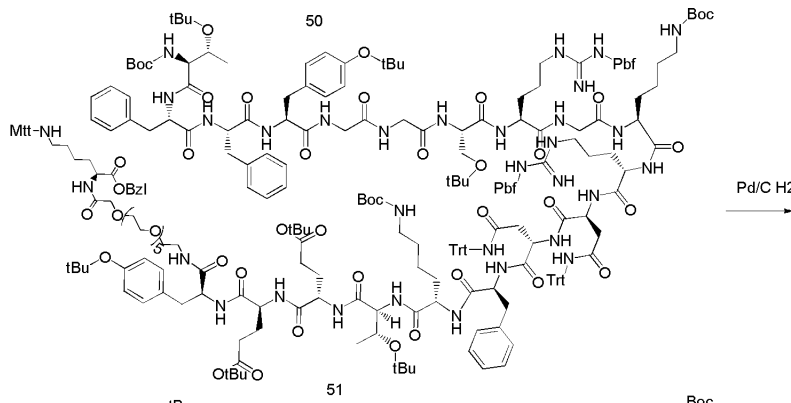
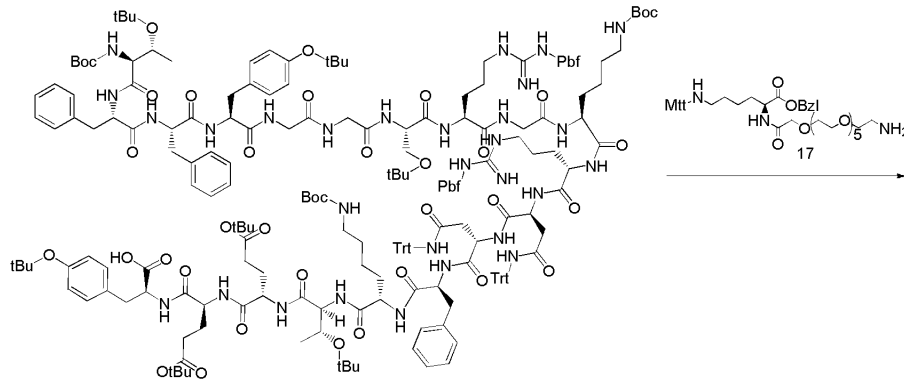
[0299] 50ml의 바이알병에, 1.45g의 화합물 45, 15ml의 개열제로서의 92.5% TFA/2.5% 물/2.5% TIS를 가하고, 실온에서 2h 교반하고, 빙랭한 MTBE로 침전시켜, 원심분리, 세정하고, 조생성물을 역상 HPLC에 의해 정제한 후에 탈염하고, 농축하여 유기용매를 제거하고, 동결 건조하여, 오프 화이트의 분말로서, 0.57g의 화합물 d를 얻었다.

[0300] 화합물 D의 제작

[0301] 화합물 d의 조생성물을 역상 HPLC에 의해 정제한 후에 탈염하고, 농축하여 유기용매를 제거하고, 희염산으로 pH=5~6으로 조정하고, 동결 건조를 거쳐, 황녹색의 분말로서, 0.57g의 화합물 D를 얻었다. MALDI-TOF에 의해 검출한 결과, 분자량은 27963.54였다.

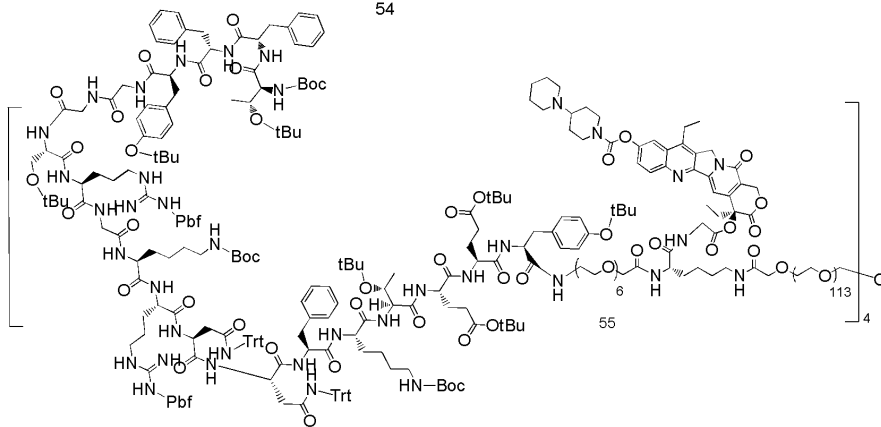
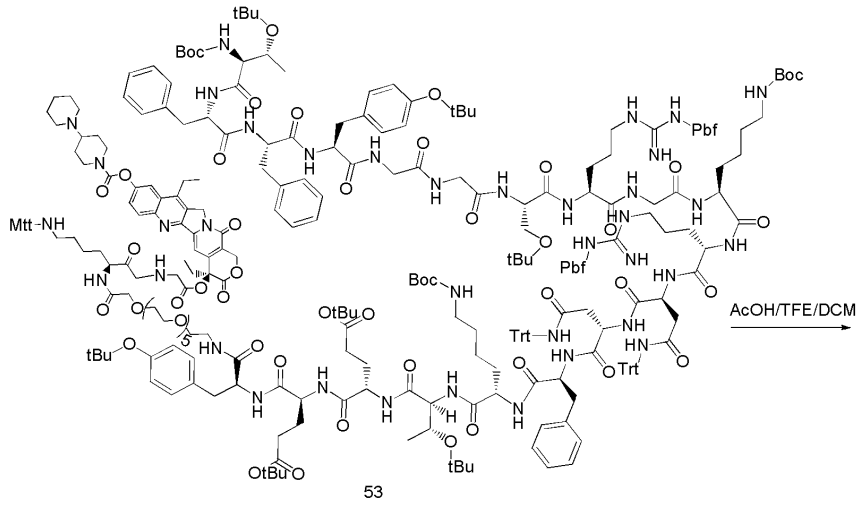
[0302] 실시예 13 화합물 e와 화합물 E의 제작

[0303] [화학식 60]



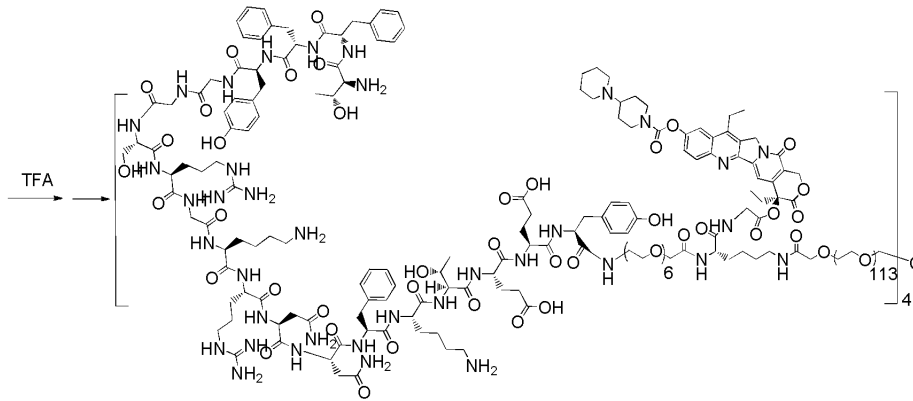
[0304]

[0305] [화학식 61]



[0306]

[0307] [화학식 62]



[0308]

[0309] 화합물 51의 제작

[0310] 100ml의 바이알병에, 6.20g의 화합물 50(1.0eq), 1.39g의 화합물 17(1.1eq), 62ml의 DMF, 0.60g의 DIEA(3.0eq), 0.38g의 DEPC(1.5eq)를 가하고, 실온에서 2h 반응시키고, TLC에 의한 모니터링으로 반응이 종료한 것을 확인한 후, 10mL의 물에 투입하고, EA로 2회 추출하고, 아세트산 수용액에 의한 세정, 탄산수소나트륨 용액에 의한 세정, 포화 염화나트륨에 의한 세정을 행한 후에 무수 황산나트륨으로 건조시키고, 농축하여, 젤리상의 고체로서, 6.5g의 화합물 51을 얻고, 이것을 직접적으로 다음 반응에 제공했다.

[0311] 화합물 52의 제작

[0312] 200ml의 수소화 반응술에, 6.53g의 화합물 51, 150mL의 메탄올, 0.33g의 Pd/C를 가하고, 하룻밤 수소 첨가하고, TLC에 의한 모니터링으로 반응이 종료한 것을 확인한 후, 여과, 농축하고, 회색의 고체로서, 6.50g의 화합물 52를 얻었다.

[0313] 화합물 53의 제작

[0314] 100ml의 바이알병에, 6.50g의 화합물 52(1.0eq), 1.08g의 화합물 3(1.05eq), 65ml의 DMF, 0.54g의 DIEA(3.0eq), 0.34g의 DEPC(1.5eq)를 가하고, 실온에서 2h 반응시키고, TLC에 의한 모니터링으로 반응이 종료한 것을 확인한 후, 650mL의 TBME에 투입하고, 슬러리상으로 하고 감압 여과하고, 100ml의 DCM으로 고체를 용해한 후에 1.0L의 TBME에 투입하고, 슬러리상으로 하고 감압 여과하고, 건조하여, 6.71g의 회색의 분말 53을 얻고, 이것을 직접적으로 다음 반응에 제공했다.

[0315] 화합물 54의 제작

[0316] 2.5g의 화합물 53에, 개열제로서의 아세트산/TFE/DCM=1/2/7을 50ml 가하고, 2시간 반응시키고, 병행한 MTBE로 침전시키고, 세정, 건조, 및 HPLC 정제를 거쳐, 오프 화이트의 고체로서, 0.97g의 화합물 54를 얻었다.

[0317] 화합물 55의 제작

[0318] 50ml의 바이알병에, 2.91g의 화합물 54(4.5eq), 3.00g의 4ARM-PEG20K-SCM(1.0eq), 30ml의 DMF, 0.13g의 TEA(9.0eq)를 가하고, 실온에서 반응시키고, HPLC에 의한 모니터링으로 반응이 현저하게 반응하지 않게 된 것을 확인한 후에, 300mL의 TBME에 투입하고, 슬러리상으로 하고, 감압 여과, 건조하여, 5.83g의 55를 얻고, 이것을 직접적으로 다음 반응에 제공했다.

[0319] 화합물 e의 제작

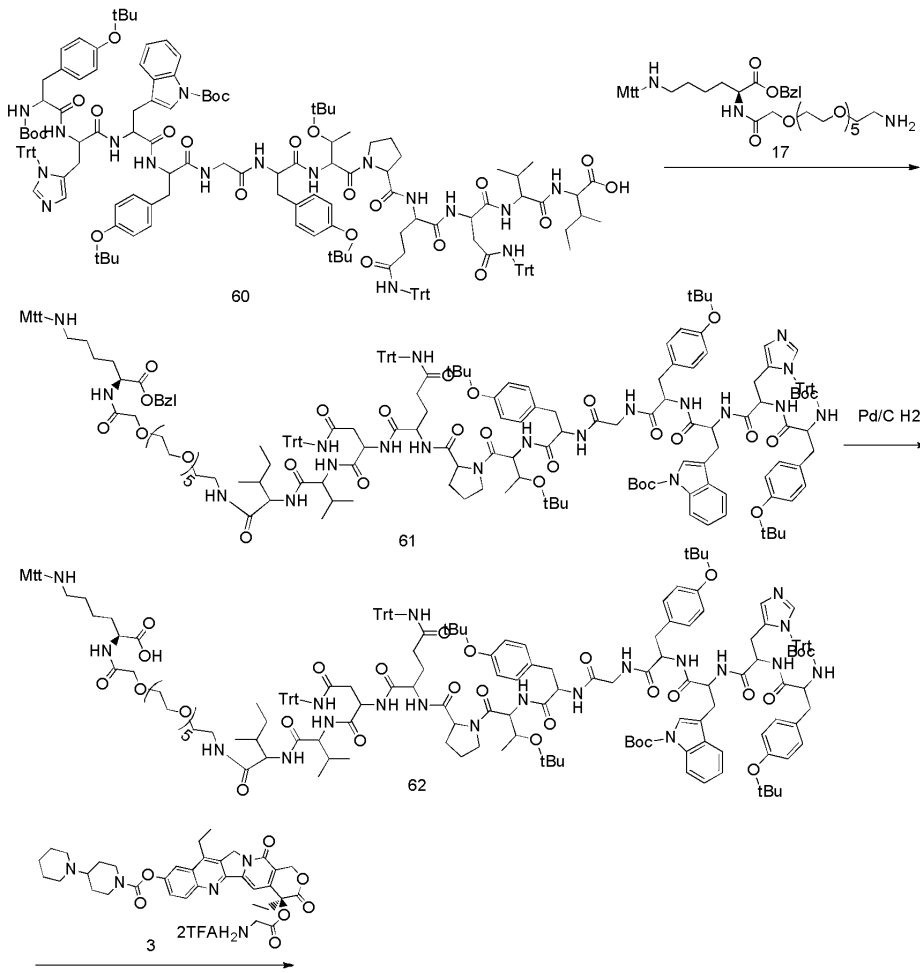
[0320] 50ml의 바이알병에, 2.04g의 화합물 55, 30ml의 개열제로서의 92.5% TFA/2.5% 물/2.5% TIS를 가하고, 실온에서 2h 교반하고, 병행한 MTBE로 침전시키고, 원심분리, 세정하고, 조생성물을 역상 HPLC에 의해 정제한 후에 탈염하고, 농축하여 유기용매를 제거하고, 동결 건조를 거쳐, 0.42g의 오프 화이트의 분말 E를 얻었다.

[0321] 화합물 E의 제작

[0322] 화합물 e의 조생성물을 역상 HPLC에 의해 정제한 후에 탈염하고, 농축하여 유기용매를 제거하고, 희염산으로 pH=5~6으로 조정하고, 동결 건조를 거쳐, 0.42g의 황녹색의 분말 E를 얻었다. MALDI-TOF에 의해 검출한 결과, 분자량은 33812.65였다.

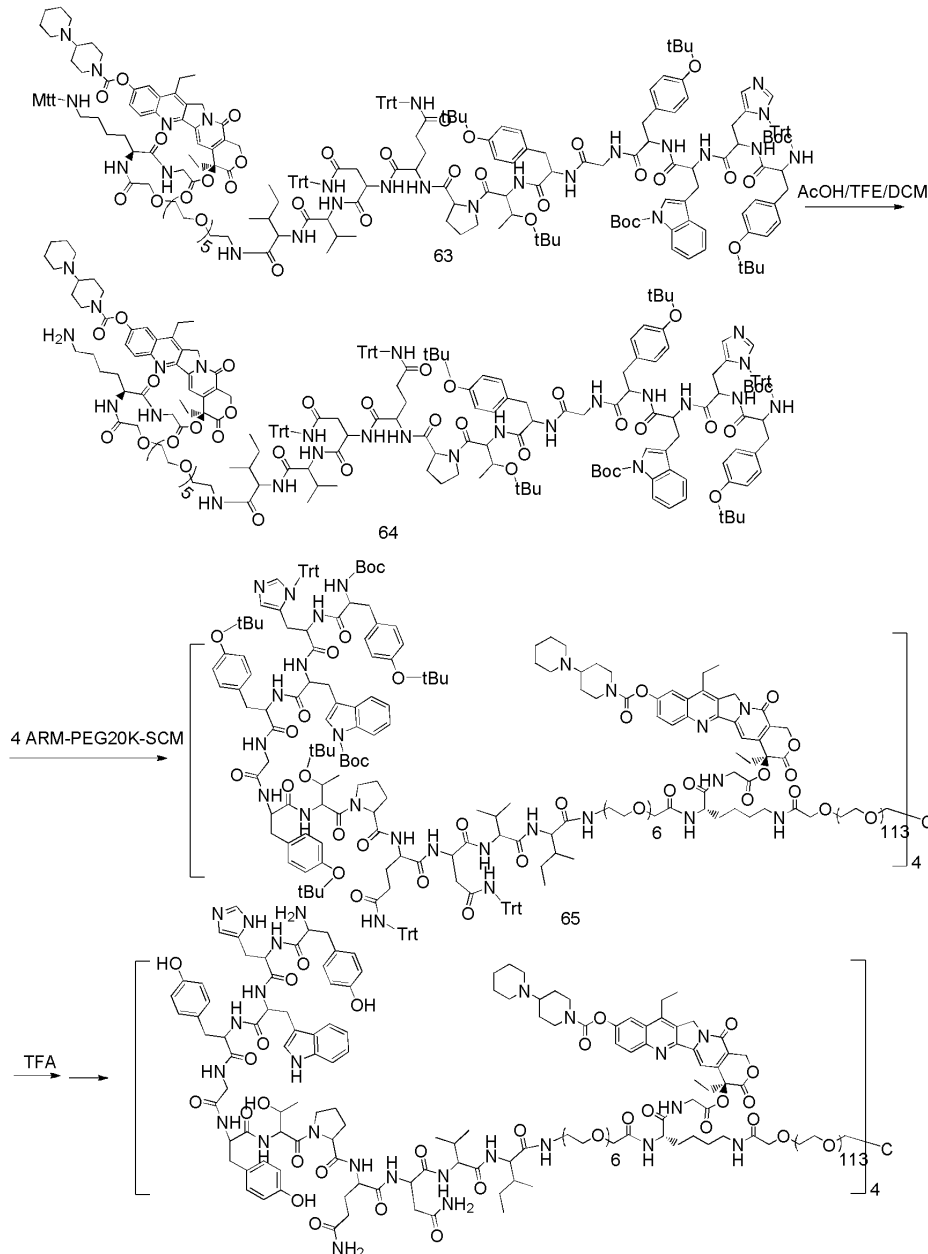
[0323] 실시예 14 화합물 f와 화합물 F의 제작

[0324] [화학식 63]



[0325]

[0326] [화학식 64]



[0327]

[0328] 화합물 61의 제작

[0329] 100ml의 바이알병에, 5.00g의 화합물 60(1.0eq), 1.66g의 화합물 17(1.1eq), 50ml의 DMF, 0.72g의 DIEA(3.0eq), 0.45g의 DEPC(1.5eq)를 가하고, 실온에서 2h 반응시키고, TLC에 의한 모니터링으로 반응이 종료한 것을 확인한 후, 10mL의 물에 투입하고, EA로 2회 추출하고, 아세트산 수용액에 의한 세정, 탄산수소나트륨 용액에 의한 세정을 행하고, 포화 염화나트륨에 의한 세정을 행한 후에 무수 황산나트륨으로 건조시키고, 농축하여, 6.14g의 젤리상의 고체 61을 얻고, 이것을 직접적으로 다음 반응에 제공했다.

[0330] 화합물 62의 제작

[0331] 200ml의 수소화 반응솔에, 6.10g의 화합물 61, 150mL의 메탄올, 0.31g의 Pd/C를 가하고, 하룻밤 수소 첨가하고, TLC에 의한 모니터링으로 반응이 종료한 것을 확인한 후, 여과, 농축하여, 회색의 고체로서, 5.98g의 화합물 62를 얻었다.

[0332] 화합물 63의 제작

[0333] 100ml의 바이알병에, 5.95g의 화합물 62(1.0eq), 1.36g의 화합물 3(1.05eq), 60ml의 DMF, 0.68g의 DIEA(3.0eq), 0.43g의 DEPC(1.5eq)를 가하고, 실온에서 2h 반응시키고, TLC에 의한 모니터링으로 반응이 종료

한 것을 확인한 후, 600mL의 TBME에 투입하고, 슬러리상으로 하고 감압 여과하고, 100ml의 DCM으로 고체를 용해한 후에 1.0L의 TBME에 투입하고, 슬러리상으로 하고 감압 여과하고, 건조하여 회색의 분말로서, 6.53g의 화합물 63을 얻고, 이것을 직접적으로 다음 반응에 제공했다.

- [0334] 화합물 64의 제작
- [0335] 6.50g의 화합물 63에, 개열제로서의 아세트산/TFE/DCM=1/2/7을 130ml 가하고, 2시간 반응시키고, 빙랭한 MTBE로 침전시키고, 세정, 건조, 및 HPLC 정제를 거쳐, 오프 화이트의 고체로서, 3.63g의 화합물 64를 얻었다.
- [0336] 화합물 65의 제작
- [0337] 50ml의 바이알병에, 2.06g의 화합물 64(4.5eq), 3.00g의 4ARM-PEG20K-SCM(1.0eq), 30ml의 DMF, 0.13g의 TEA(9.0eq)를 가하고, 실온에서 반응시키고, HPLC에 의한 모니터링으로 반응이 현저하게 반응하지 않게 된 것을 확인한 후에, 300ml의 TBME에 투입하고, 슬러리상으로 하고 감압 여과하고, 건조하여, 4.67g의 화합물 65를 얻고, 이것을 직접적으로 다음 반응에 제공했다.
- [0338] 화합물 f의 합성
- [0339] 200ml의 바이알병에, 4.60g의 화합물 65, 100ml의 개열제로서의 92.5% TFA/2.5% 물/2.5% TIS를 가하고, 실온에서 2h 교반하고, 빙랭한 MTBE로 침전시키고, 원심분리, 세정하고, 조생성물을 역상 HPLC에 의해 정제한 후에 탈염하고, 농축하여 유기용매를 제거하고, 동결 건조하여, 오프 화이트의 분말로서, 1.34g의 화합물 f를 얻었다.
- [0340] 화합물 F의 합성
- [0341] 화합물 f의 조생성물을 역상 HPLC에 의해 정제한 후에 탈염하고, 농축하여 유기용매를 제거하고, 회염산으로 pH=5~6으로 조정하고, 동결 건조를 거쳐, 황녹색의 분말로서, 1.34g의 화합물 F를 얻었다. MALDI-TOF에 의해 검출한 결과, 분자량은 30907.82였다.
- [0342] 본 발명의 실시예 15~19에서 사용되는 시료, 시약, 설비 등은 하기와 같다.
- [0343] 이리노테칸(원약)은 구입품이다.
- [0344] nktr-102의 제작 방법에 대하여, CN102711837A에 개시되어 있는 방법을 참조하면 된다. 구체적으로는 하기와 같다.
- [0345] 실시예 1에서의 화합물 3(829mg, 4.5eq)을 250mL의 바이알병에 첨가하고, DCM(50mL), 트리에틸아민(221mg, 9.0eq)을 가하고, 용해 후에 4ARM-PEG20K-SCM(5.00g, 1.0eq)을 이 바이알병에 가하였다. HPLC에 의한 모니터링으로 반응이 현저하게 반응하지 않게 된 것 확인한 후에, 감압 증류하여 약 20mL의 DCM을 제거하고, 용액을 300mL의 TBME에 투입하고, 교반하여 침전시키고, 여과하여, 5.4g의 조생성물을 얻고, 조생성물을 HPLC에 의해 정제, 탈염하고, 회염산으로 pH 5~6으로 조정하고, 동결 건조를 거쳐, 2.71g의 담녹색의 분말 nktr-102를 얻었다.
- [0346] 생리식염수는, 상해화원장부약업(上海華源長富藥業)(집단)유한공사에서 구입한 것이다. 1ml의 무균 시린지(syringe)는, 상해강덕래(上海康德萊)기업발전집단 주식회사(상해, 중국)로부터 구입한 것이다. MDA-MB-231은, 10% 우태아 혈청FBS(GIBCO, USA)을 포함하는 DMEM 배지(GIBCO, USA)에서 배양하고, 5% CO₂를 포함하는 37℃의 인큐베이터에서 배양했다. 매트리지엘(BD Matrigel) Matrigel은, 미국 BD사에서 구입한 것이다.
- [0347] 생물학적 안전 캐비닛(형식번호: AC2-6E1)은, ESCO로부터 구입하고, CO₂ 수밀성(水密性) 인큐베이터(형식번호: 3111)은, Thermo Scientific Forma로부터 구입하고, 도립(倒立) 현미경(형식번호: CKX41SF)은, Olympus로부터 구입하고, 전기 흡인 장치(형식번호: YX930D)은, 상해의료기계공업(집단)유한공사로부터 구입하고, 천평(METTLER TOLEDO AB135-S)은, METTLER TOLEDO로부터 구입하고, 저속 원심기(형식번호: LD5-2A)는, 북경뢰발이(北京雷勃爾) 원심기 유한공사로부터 구입하고, 전자 디지털 디지털 캘리퍼스(형식번호: SF2000)은, 계림광륙수자측공(桂林廣陸數字测控) 주식회사로부터 구입한 것이다.
- [0348] 본 발명의 실시예 15~19에서는, 모든 실험 동물의 조작은, 동물 사용 및 관리 가이드 라인에 엄격하게 따른다. 종양 관련 파라미터의 계산은, 중국 CFDA에 의한 『세로 상해성 항종양 약물의 비임상 연구 기술을 위한 가이드 라인』을 참조하였고, 중국 SFDA에 의한 『세로 상해성 항종양 약물의 비임상 연구 기술을 위한 가이드 라인』(2006년 11월)에 기초하여, T/C(%)≤40%, 또한 통계학분석에 의해 p<0.05의 것이 유효하다.

- [0349] 종양 체적(TV)의 계산 공식은 하기와 같다.
- [0350] $TV(\text{mm}^3)=1 \times w^2/2$
- [0351] (식 중, 1은 종양 장경(長徑)(mm)을 나타내고, w는 종양 단경(短徑)(mm)을 나타낸다.)
- [0352] 상대 종양 체적(RTV)의 계산 공식은, $RTV=TV_t/TV_{\text{initial}}$ 이다.
- [0353] (식 중, TV_{initial} 은, 군분류하여 투여했을 때 측정된 종양 체적을 나타내고, TV_t 는, 투여 기간 중, 각 측정 시의 종양 체적을 나타낸다.)
- [0354] 상대 종양 증식율(%T/C)의 계산 공식은, $\%T/C=100\% \times (RTV_T/RTV_C)$ 이다.
- [0355] (식 중, RTV_T 는 치료 군의 RTV를 나타내고, RTV_C 는 용매 대조군의 RTV를 나타낸다.)
- [0356] 종양 증식 억제율 TGI(%)의 계산 공식은, $TGI=100\% \times [1-(TV_{t(T)}-TV_{\text{initial}(T)}) / (TV_{t(C)}-TV_{\text{initial}(C)})]$ 이다.
- [0357] (식 중, $TV_{t(T)}$ 는, 치료군의 각 측정 시의 종양 체적을 나타내고, $TV_{\text{initial}(T)}$ 는, 군분류하여 투여했을 때의 치료군의 종양 체적을 나타내고, $TV_{t(C)}$ 는, 용매 대조군의 각 측정 시의 종양 체적을 나타내고, $TV_{\text{initial}(C)}$ 는, 군분류하여 투여했을 때의 용매 대조군의 종양 체적을 나타낸다.)
- [0358] 동물의 체중 저감율의 계산 공식은, 동물의 체중 저감율= $100\% \times (BW_{\text{initial}}-BW_t)/BW_{\text{initial}}$ 이다.
- [0359] (식 중, BW_t 는, 투여 기간 중, 각 측정 시의 동물 체중을 나타내고, BW_{initial} 은, 군분류하여 투여했을 때의 동물 체중을 나타낸다.)
- [0360] 종양 중량 억제율 IR(%)의 계산 공식은, $IR(\%)=100\% \times (W_C-W_T)/W_C$ 이다.
- [0361] (식 중, W_C 는 대조군의 종양 중량을 나타내고, W_T 는 치료군의 종양 중량을 나타낸다.)
- [0362] Microsoft Office Excel 2007 소프트웨어를 사용하여 실험 데이터를 계산하고, 및 관련 통계 처리를 행하였다. 데이터는 특별히 한정되지 않는 한, 평균값±표준오차(Mean±SE)로서 표시하고, 군끼리의 비교는 t-검정으로 행하고, P<0.05의 경우에 유의차 있음으로 인정된다.
- [0363] 실시예 15 인간 결장암 HT-29 세포주의 누드마우스(nude mouse) 이식 종양 모델에서의 일련의 화합물의 생체 내 약효 평가
- [0364] 시료: 이리노테칸, nktr-102, 본 발명의 12종의 화합물.
- [0365] 시약: McCoy's 5A 배양액, 우태아 혈청(FBS), 트립신, 페니실린-스트렙토마이신 2중 특이성 항체, 주사용수, 생리식염수, 락트산, 소르비톨.
- [0366] 실험 동물: 암컷 BALB/c 누드마우스(마리수: 150마리; 주령: 6~7 주)를 Beijing Vital River Laboratory Animal Technology Co., Ltd.로부터 구입하고, 온도 20~25 °C, 상대 습도 40%~70%, 12시간 명(明), 12시간 암(暗)의 조명 조건, 동물이 자유롭게 물·먹이를 섭취하는 SPF 동물 사육실에서 사육했다. 사육하고 약 1주일 후, 수의사에 의한 검사에서 신체 상황이 양호한 것으로 판단된 마우스를 금번의 실험용 마우스로 했다. 군분류 전에 마커에 의해 꼬리의 밑둥치에 표시하고, 군분류 후에 각 동물을 이어컷의 방법에 의해 표시했다.
- [0367] 가이식성 종양주: 중국 과학원 전형 배양물 보존 위원회 세포뱅크(CAS, 본 실험실에서는 액체 질소 중에 동결 보존)로부터 입수한 인간 결장암 세포 HT-29.
- [0368] HT-29 세포 배양: 5% CO₂, 37°C의 배양 조건 하에서, HT-29 세포를, 10% 우태아 혈청 함유 McCoy's 5A 배양액 중에서 통상의 세포 배양을 행하고, 0.25% 트립신 소화법에 의해 계대했다. 세포의 증식 상황에 따라, 계대를 주 2~3 회 행하고, 계대율을 1:4~1:6으로 했다.
- [0369] 동물 모델의 구축: 지수 증식기의 HT-29 세포를 채취하고, 세포수 계측 후에 무혈청 McCoy's 5A 배지에 재현탁하고, 세포 농도를 4×10^7 세포/mL로 조정하고, 피펫으로 세포를 풀고, 균일하게 분산시킨 후에 50mL의 원심관에 넣고, 원심관을 아이스박스에 넣었다. 세포 현탁액을 1mL의 시린지로 채취하고, 누드마우스의 우측 전방 겨드랑

이 피하에 주사를 놓고, 각 동물에 100 μL (4×10^6 세포/마리) 접종하고, HT-29의 누드마우스 이식 종양 모델을 구축했다. 접종 후에 정기적으로 동물의 상태 및 종양의 증식 상태를 관찰하고, 전자 디지털 캘리퍼스를 사용하여 종양 직경을 측정하고, 데이터를 직접적으로 Excel표에 입력하고, 종양 체적을 계산했다. 종양 체적이 100 ~ 300 mm^3 으로 된 후에, 건강 상태가 양호하며, 종양 체적이 유사한 동물을 90마리 선택하고, 난괴법에 의해 15 조(組)로 나누었다(n=6). 실험 개시 후에 종양 직경을 주 2회 측정하고, 종양 체적을 계산하고, 또한 동물 체중을 칭량(秤量)하여 기록했다.

[0370] 용매의 조제: 0.5g의 소르비톨을 칭량하여 50mL의 원심관에 넣고, 원심관에 50mL의 주사용수를 가하고, 고형물이 완전히 용해할 때까지 선회(旋回) 진동하여, 농도 1%의 소르비톨 수용액(w/V)을 조제하고, 4°C의 냉장고에 보존해 두었다.

[0371] 이리노테칸 투여 제제의 조제: 12.0mg의 이리노테칸을 칭량하고, 0.15ml의 1% 락트산을 가하고, 약물이 완전히 용해할 때까지 선회 진동하고, 또한 2.85ml의 1% 소르비톨 수용액을 각각 가하고, 선회 진동하여 균일하게 혼합하고, 용액 중의 1% 락트산, 1% 소르비톨 수용액의 비율을 약 5:95(v/v)로 했다. 용액 중의 이리노테칸의 유효 농도를 약 $4.0\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 로 했다.

[0372] nktr-102 투여 제제의 조제: 매회의 투여에 앞서, 101.5mg의 nktr-102를 정확하게 칭량하고, 2.5ml의 생리식염수를 가하고, 약물이 완전히 용해할 때까지 선회 진동하고, 용액 중의 이리노테칸의 유효 농도를 $4.0\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 로 했다.

[0373] 본 발명의 화합물 투여 제제의 조제: 매회의 투여에 앞서, 각각 120.3mg의 화합물 a와 화합물 A, 137.0mg의 화합물 b와 화합물 B, 132.6mg의 화합물 c와 화합물 C, 132.0mg의 화합물 d와 화합물 D, 159.6mg의 화합물 e와 화합물 E, 145.9mg의 화합물 f와 화합물 F를 정확하게 칭량하고, 2.5ml의 생리식염수를 가하고, 약물이 완전히 용해할 때까지 선회 진동하고, (필요에 따라) 초음파 진동하여 약물을 완전히 용해시켜, 용액 중의 이리노테칸의 유효 농도를 $4.0\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 로 했다.

[0374] 동물의 군분류 및 투여 태양: 군분류하는 날에 초회의 투여를 시작하고, 약 21일 후에 실험을 종료시켜, 투여 용량을 모두 $10\text{mL} \cdot \text{kg}^{-1}$ 로 했다. 이리노테칸 함유량 기준에서의 유효량을 모두 $40\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 로 했다. 제1군은 용매 대조군이며, 미정맥 주사에 의해 생리식염수를 4일 1회, 합계하여 3회(Q4D×3) 투여했다. 제2군~제15군은 각각 미정맥 주사에 의해 공시 시료인 이리노테칸, nktr-102, 화합물 a, 화합물 A, 화합물 b, 화합물 B, 화합물 c, 화합물 C, 화합물 d, 화합물 D, 화합물 e, 화합물 E, 화합물 f 및 화합물 F를, 4일에 1회, Q4D×3로 투여했다.

[0375] 실험의 최종일에, 체중을 칭량하고, 종양 직경을 측정된 후에 동물을 안락사 시켰다(CO₂). 종양 조직을 꺼내고, 측정했다. 인간 암 이종(異種) 이식 종양 모델에 대하여, 실험 평가 지표로서 상대 종양 증식율(%T/C)을 추천한다. 상대 종양 증식율이 낮을수록, 종양 억제 효과가 양호한 것을 의미하고, 결과는 표 1에 나타낸다.

[0376] [표 3]

표 1 상대종양증식율(%T/C)

군별	시료	동물수	상대종양체적 (RTV)	상대종양증식율 (%T/C)
1	블랭크 용매	6	15.04	-
2	이리노데칸	6	9.52	69%
3	nktr-102	6	5.23	34.70%
4	화합물 a	6	2.57*	17.08%#
5	화합물 A	6	2.55*	16.95%#
6	화합물 b	6	3.00*	20.01%#
7	화합물 B	6	2.91*	19.41%#
8	화합물 c	6	3.18*	21.29%#
9	화합물 C	6	3.18*	21.29%#
10	화합물 d	6	2.69*	17.98%#
11	화합물 D	6	2.76*	18.45%#
12	화합물 e	6	3.40*	22.70%#
13	화합물 E	6	3.43*	22.90%#
14	화합물 f	6	3.71*	24.73%#
15	화합물 F	6	3.56*	23.73%#

* 블랭크 용매, 이리노데칸 및 nktr-102군의 RTV와 비교, P<0.05.

블랭크 용매, 이리노데칸 및 nktr-102군의 %T/C와 비교, P<0.05.

[0377]

[0378]

실험 결과에 의하면, 본 발명의 화합물은, 인간 결장암 HT-29의 누드마우스 이식 종양 모델에서의 종양의 생체 내 증식에 대하여, 양호한 억제 작용을 가지고, 또한 이리노데칸 및 nktr-102보다 우수한 것을 알았다.

[0379]

실시에 16 인간 유방암 MDA-MB-231의 누드마우스 이종 이식 모델에서의 억제 작용

[0380]

시료: 이리노데칸, nktr-102, 본 발명의 12종의 화합물.

[0381]

실험 동물: 암컷 BALB/c 누드마우스이며, 150마리 접종하고, 실험에서 90마리를 사용했다. 연령은 6~8 주이며, 체중은, 20~22 g±20%의 체중 평균값이다. 동물제공처는, 상해 서보(西普)-필개(必凱) 실험동물유한공사(BK)이며, 허가증번호는 SCXK(호)2008-0016이다. 모든 실험 동물을 SPF 레벨의 실험실에서 사육했다. 실험자는 일상의 케어 및 실험 연구를 담당했다. 각 케이지에 실험 번호, 실험군별, 실험자의 이름, 마우스 품종 및 성별 등의 정보가 기재되어 있는 신분 카드가 부착되어 있고, 마우스는 이어링에 의해 마킹했다.

[0382]

랜덤한 군분류: 종양 체적이 150~200 mm³으로 된 후에, 각군에 마우스 6마리, 각 군 내의 종양 체적 및 마우스 체중이 균일하도록, 난괴법에 의해 15군으로 군분류했다. 각 군의 종양 체적의 평균값과, 모든 실험 동물의 종양 체적의 평균값의 차가 ±10% 이하였다.

[0383]

사육 조건:

[0384]

거주 조건: IVC 시스템, 각 케이지에 6마리

[0385]

온도: 20℃~26℃

[0386]

습도: 40%±70%

[0387]

광조사: 12시간마다 밤낮 교대

[0388]

조사 래트·마우스 사료는, 북경 과옥(科澳) 사료 유한공사에서 구입하고, 자유롭게 섭취시켰다. 음료수는, 도시 수도수(水道水)이며, 여과, 고압 멸균하여 음수시켰다. 까는 재료는, 상해 무생(茂生) 유도체과기 유한공로부터 구입한 오수수대(corn cob)이며, 고압 멸균하여 사용했다. 주 2회 까는 재료를 교환했다. 실험 전에 마우

스에 적어도 1주일의 환경 적응 기간을 주었다.

[0389] 다른 화학 시약 및 재료: 상해 중국 과학원 세포생물연구소로부터 구입한 인간 유방암 MDA-MB-231.

[0390] 인간 유방암 MDA-MB-231의 누드마우스 피하 이식 종양 모델을 구축하고, 각마리에 대하여 1×10^6 개의 세포를 접종했다. 투여 용량을 모두 $10\text{mL} \cdot \text{kg}^{-1}$ 로 했다. 이리노테칸 함유량 기준에서의 유효량을 모두 $40\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 로 했다. 제1군은 용매 대조군이며, 미정맥 주사에 의해 생리식염수를 4일에 1회, 합계하여 3회(Q4D×3) 투여했다. 제2군~제15군은 각각 미정맥 주사에 의해 공시 시료인 이리노테칸, nktr-102, 화합물 a, 화합물 A, 화합물 b, 화합물 B, 화합물 c, 화합물 C, 화합물 d, 화합물 D, 화합물 e, 화합물 E, 화합물 f 및 화합물 F를, 4일에 1회, Q4D×3으로 투여했다.

[0391] 시료의 조제는 실시예 15를 참조. 단회 투여에 필요한 용량은 3mL이다.

[0392] 실험 방법: MDA-MB-231 세포를, 10% 우태아 혈청 FBS(GIBCO, USA)를 포함하는 DMEM 배지에서 배양했다. 세포를 5% CO₂를 포함하는 37°C의 인큐베이터에서 배양했다. 세포 접종법에 의한 종양 누드마우스 피하 이식 모델의 구축은, 지수 증식 기의 종양 세포를 채취하고, 세포수 계측 후에 1×PBS에 재현탁하고, 세포 현탁액 농도를 $1 \times 10^7/\text{mL}$ 로 조정했다. 1mL의 시린지(침No.4)로 누드마우스의 우배부(右背部) 피하에 종양 세포를, $1 \times 10^6/0.1\text{mL}$ /마우스로 접종했다. 종양 체적이 100~200 mm³으로 된 시점에서, 각 군의 종양 차가 평균값의 10% 미만으로 되도록, 각 군에 마우스 6마리로 난괴법에 의해 동물을 랜덤하게 15군으로 군분류했다. 군분류하는 날을 Day1으로 하고, 군분류하는 날에 투여했다. 실험 기간을 3주일로 하고, 실험 기간 중, 동물 체중 및 종양 사이즈를 주 2회 측정했다. 매일 임상 증상을 관찰하여 기록했다. 실험의 최종일에, 동물을 죽이고, 체중을 칭량하고, 종양을 꺼내고, 칭량, 촬영하여 기록했다. 결과를 표 2에 나타낸다.

[0393] [표 4]

표 2 상대종양증식율(%T/C)

군별	시료	동물수	상대종양체적 (RTV)	상대종양증식율 (%T/C)
1	블랭크 용매	6	12.78	-
2	이리노테칸	6	6.25	45.23%
3	nktr-102	6	4.63	33.42%
4	화합물 a	6	1.25*	9.32%#
5	화합물 A	6	1.26*	9.39%#
6	화합물 b	6	1.72*	12.82%#
7	화합물 B	6	1.70*	12.67%#
8	화합물 c	6	1.56*	11.63%#
9	화합물 C	6	1.64*	12.22%#
10	화합물 d	6	1.87*	13.94%#
11	화합물 D	6	1.90*	14.16%#
12	화합물 e	6	1.78*	13.27%#
13	화합물 E	6	1.69*	12.60%#
14	화합물 f	6	1.88*	14.02%#
15	화합물 F	6	1.93*	14.39%#

* 블랭크 용매, 이리노테칸 및 nktr-102군의 RTV와 비교, P<0.05.

블랭크 용매, 이리노테칸 및 nktr-102군의 %T/C와 비교, P<0.05.

[0394]

[0395] 실험 결과에 의하면, 본 발명의 화합물은, 인간 유방암 MDA-MB-231의 누드마우스 이식 종양에 대하여 양호한 억

제 작용을 가지고, 또한 이리노테칸 및 nktr-102보다 우수한 것을 알았다.

- [0396] 실시예 17 인간 췌장암 MIA Paca-2의 nude마우스 이종 이식 모델에서의 억제 작용
- [0397] 시료: 이리노테칸, nktr-102, 본 발명의 12종의 화합물.
- [0398] 실험 동물: 암컷 BALB/c nude마우스이며, 150마리 접종하고, 실험에서 90마리를 사용했다. 연령은 6~8 주이며, 체중은 $20 \sim 22 \text{ g} \pm 20\%$ 의 체중 평균값이다. 동물제공처는, 상해 서보(西普)-필개(必凱) 실험동물유한공사(BK)이며, 허가증번호는 SCXK (호)2008-0016이다. 모든 실험 동물을 SPF 레벨의 실험실에서 사육했다. 실험자는 일상의 케어 및 실험 연구를 담당했다. 각 케이지에 실험 번호, 실험군별, 실험자 이름, 마우스 품종 및 성별 등의 정보가 기재되어 있는 신분 카드가 부착되어 있고, 마우스는 이어링에 의해 마킹했다. 종양 체적이 $150 \sim 200 \text{ mm}^3$ 으로 된 후에, 각 군에 마우스 6마리, 각 군 내의 종양 체적 및 마우스 체중이 균일하도록, 난괴법에 의해 15군으로 군분류했다. 각 군의 종양 체적의 평균값과, 모든 실험 동물의 종양 체적의 평균값의 차가 $\pm 10\%$ 이하였다.
- [0399] 사육 조건:
- [0400] 거주 조건: IVC 시스템, 각 케이지에 6마리
- [0401] 온도: $20^\circ\text{C} \sim 26^\circ\text{C}$
- [0402] 습도: $40\% \pm 70\%$
- [0403] 광조사: 12시간마다 밤낮 교대
- [0404] 조사 래트·마우스 사료는, 북경 과옥(科澳) 협력 사료 유한공사로부터 구입하고, 자유롭게 섭취시켰다. 음료수는, 도시 수도수이며, 여과, 고압 멸균하여 음수시켰다. 까는 재료는, 상해 무생(茂生) 유도체 과기 유한공사로부터 구입한 옥수숫대이며, 고압 멸균하여 사용했다. 주에 2회 까는 재료를 교환했다. 실험 전에 마우스에 적어도 1주일의 환경 적응 기간을 주었다.
- [0405] 다른 화학 시약 및 재료: 상해 중국 과학원 세포생물연구소로부터 구입한 인간 췌장암 MIA Paca-2.
- [0406] 인간 췌장암 MIA Paca-2의 nude마우스 피하 이식 종양 모델을 구축하고, 각 마리에 대하여 3×10^6 개의 세포를 접종했다. 투여 용량을 모두 $10 \text{ mL} \cdot \text{kg}^{-1}$ 로 했다. 이리노테칸 함유량 기준에서의 유효량을 모두 $40 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 로 했다. 제1군은 용매 대조군이며, 미정맥 주사에 의해 생리식염수를 4일에 1회, 합계하여 3회(Q4D×3) 투여했다. 제2군~제15군은 각각 미정맥 주사에 의해 공시 시료인 이리노테칸, nktr-102, 화합물 a, 화합물 A, 화합물 b, 화합물 B, 화합물 c, 화합물 C, 화합물 d, 화합물 D, 화합물 e, 화합물 E, 화합물 f 및 화합물 F를, 모두 4일에 1회, Q4D×3으로 투여했다.
- [0407] 시료의 조제는 실시예 15를 참조. 단위 투여에 필요한 용량은 3mL이다.
- [0408] 실험 방법: MIA Paca-2 세포를, 10% 우태아 혈청 FBS(GIBCO, USA) 및 2.5% HS를 포함하는 DMEM 배지에서 배양했다. 세포를 5% CO₂를 포함하는 37°C의 인큐베이터에서 배양했다.
- [0409] 세포 접종법에 의한 종양 nude마우스 피하 이식 모델의 구축: 지수 증식기의 종양 세포를 채취하고, 세포수 계측 후에 1×PBS에 재현탁하고, 세포 현탁액 농도를 $3 \times 10^7 / \text{ml}$ 로 조정했다. 1mL의 시린지(침No.4)로 nude마우스의 우배부 피하에 종양 세포를, $3 \times 10^6 / 0.1 \text{ ml} / \text{마우스}$ 로 접종했다.
- [0410] 종양 체적이 $100 \sim 200 \text{ mm}^3$ 으로 된 시점에서, 각 군의 종양차가 평균값의 10% 미만으로 되도록, 각 군에 마우스 6마리로 난괴법에 의해 동물을 랜덤하게 15군으로 군분류했다. 군분류하는 날을 Day1으로 하고, 군분류하는 날에 투여했다.
- [0411] 실험 기간을 3주일로 하고, 실험 기간 중, 동물 체중 및 종양 사이즈를 주 2회 측정했다. 매일 임상 증상을 관찰하여 기록했다. 실험의 최종일에, 동물을 죽이고, 체중을 칭량하고, 종양을 꺼내고, 칭량, 촬영하여 기록했다. 결과를 표 3에 나타낸다.

[0412] [표 5]

표 3 상대종양증식율(%T/C)

군별	시료	동물수	상대종양체적 (RTV)	상대종양증식율 (%T/C)
1	블랭크 용매	6	11.82	-
2	이리노데칸	6	8.01	61.08%
3	nktr-102	6	5.37	37.15%
4	화합물 a	6	2.38*	13.02%#
5	화합물 A	6	2.45*	13.41%#
6	화합물 b	6	2.90*	15.86%#
7	화합물 B	6	2.87*	15.70%#
8	화합물 c	6	2.65*	13.71%#
9	화합물 C	6	2.66*	13.76%#
10	화합물 d	6	3.12*	16.06%#
11	화합물 D	6	3.07*	15.80%#
12	화합물 e	6	2.78*	14.31%#
13	화합물 E	6	2.84*	14.62%#
14	화합물 f	6	2.69*	14.70%#
15	화합물 F	6	2.71*	14.81%#

* 블랭크 용매, 이리노데칸 및 nktr-102군의 RTV와 비교, P<0.05.

블랭크 용매, 이리노데칸 및 nktr-102군의 %T/C와 비교, P<0.05.

[0413]

[0414]

실험 결과에 의하면, 본 발명의 화합물은, 인간 췌장암 MIA Paca-2의 누드마우스 이식 종양에 대하여 양호한 억제 작용을 가지고, 또한 이리노데칸 및 nktr-102보다 우수한 것을 알았다.

[0415]

실시에 18 인간 위암 NCI-N87 세포주의 누드마우스 이식 종양 모델에서의 종양의 생체내 증식에 대한 억제 작용

[0416]

시료: 이리노데칸, nktr-102, 본 발명의 12종의 화합물.

[0417]

시약: RPMI-1640 배양액, 우태아 혈청(FBS), 트립신, 페니실린-스트렙토마이신 2중 특이성 항체, 생리식염수.

[0418]

실험 동물: 암컷 BALB/c 누드마우스(마리수: 150마리; 주령: 6~8 주)를 Beijing Vital River Laboratory Animal Technology Co., Ltd.로부터 구입하고, 온도 20~25 °C, 상대 습도 40~70%, 12시간 명, 12시간 암의 조명 조건, 동물이 자유롭게 물·먹이를 섭취하는 소주 청소(聖蘇) 신약 개발 유한공사의 SPF 동물 사육실에서 사육하였다. 사육하고 약 1주일 후, 수의사에 의한 검사로 신체 상황이 양호한 것으로 판단된 마우스를 금번의 실험용 마우스로 했다. 군분류 전에 마커에 의해 동물의 꼬리의 밀둥치에 표시하고, 군분류 후에 각동물을 이어 컷의 방법에 의해 표시했다.

[0419]

가이식성 종양주: 중국 과학원 전형 배양물 보존 위원회 세포뱅크(CAS, 본 실험실에서는 액체 질소 중에 동결 보존)로부터 입수한 인간 위암 세포 NCI-N87.

[0420]

실험 방법

[0421]

NCI-N87 세포 배양 : 5% CO₂, 37°C의 배양 조건 하에서, NCI-N87 세포를, 10% 우태아 혈청 함유 RPMI-1640 배양액 중에서 통상 세포 배양하고, 0.25% 트립신 소화법에 의해 계대했다. 세포의 증식 상황에 따라, 계대를 주 1~2 회 행하고, 계대율을 1:2~1:6으로 했다.

[0422]

동물 모델의 구축: 지수 증식기의 NCI-N87 세포를 채취하고, 세포수 계측 후에 무혈청 RPMI-1640 배지에 재현탁하고, 세포 농도를 5×10⁷ 세포/mL로 조정하고, 피펫으로 세포를 풀고, 균일하게 분산시킨 후에 50mL의 원심관에 넣고, 원심관을 아이스박스에 넣었다. 세포 현탁액을 1mL의 시린지로 채취하고, 누드마우스의 우측 전방 겨드랑

이 피하에 주사를 놓고, 각 동물에 100 μL(5×10⁶ 세포/마리) 접종하고, NCI-N87의 누드마우스 이식 종양 모델을 구축했다. 접종 후에 정기적으로 동물의 상태 및 종양의 증식 상태를 관찰하고, 전자 디지털 캘리퍼스를 사용하여 종양 직경을 측정하고, 데이터를 직접적으로 Excel표에 입력하고, 종양 체적을 계산했다. 종양 체적이 100~300 mm³으로 된 후에, 건강 상태가 양호하며, 종양 체적이 유사한 동물을 90마리 선택하고, 난괴법에 의해 15조로 나누었다(n=6). 실험 개시 후에 종양 직경을 주 2회 측정하고, 종양 체적을 계산하고, 또한 동물 체중을 칭량하여 기록했다.

[0423] 시료의 조제는 실시예 15를 참조. 단위 투여에 필요한 용량은 3mL이다.

[0424] 동물군분류 및 투여: 군분류하는 날에 초회의 투여를 시작하고, 21일 후에 실험을 종료시켜, 투여 용량을 모두 10mL·kg⁻¹로 했다. 제1군은 용매 대조군이며, 미정맥 주사에 의해 블랭크 용매를 4일에 1회, 합계하여 3회(Q4D×3) 투여했다. 제2군~제15군은 각각 미정맥 주사에 의해 공시 시료인 이리노테칸, nktr-102, 화합물 a, 화합물 A, 화합물 b, 화합물 B, 화합물 c, 화합물 C, 화합물 d, 화합물 D, 화합물 e, 화합물 E, 화합물 f 및 화합물 F를, (이리노테칸 함유량 기준으로) 40mg·kg⁻¹의 투여량으로, Q4D×3으로 투여했다.

[0425] 실험 종료 후, 체중을 칭량하고, 종양 직경을 측정한 후에 동물을 안락사시켰다(CO₂). 종양 조직을 꺼내서 칭량하고, 결과를 표 4에 나타낸다.

[0426] [표 6]

표 4 상대종양증식율(%T/C)

군별	시료	동물수	상대종양체적 (RTV, mm ³)	평균상대종양증식율 (%T/C)
1	블랭크 용매	6	3.01	-
2	이리노테칸	6	8.02	65.15%
3	nktr-102	6	6.14	50.91%
4	화합물 a	6	2.80*	23.27%#
5	화합물 A	6	2.87*	23.86%#
6	화합물 b	6	3.30*	27.43%#
7	화합물 B	6	3.25*	27.01%#
8	화합물 c	6	3.44*	28.61%#
9	화합물 C	6	3.49*	29.03%#
10	화합물 d	6	3.41*	28.37%#
11	화합물 D	6	3.27*	27.21%#
12	화합물 e	6	3.79*	31.51%#
13	화합물 E	6	3.80*	31.60%#
14	화합물 f	6	3.59*	29.87%#
15	화합물 F	6	3.54*	29.45%#

* 블랭크 용매, 이리노테칸 및 nktr-102군의 RTV와 비교, P<0.05.

블랭크 용매, 이리노테칸 및 nktr-102군의 %T/C와 비교, P<0.05.

[0427]

[0428] 실험 결과에 의하면, 본 발명의 화합물은, 인간 위암 NCI-N87 세포주의 누드마우스 이식 종양 모델에서의 종양의 증식에 대하여 양호한 억제 작용을 가지고, 또한 이리노테칸 및 nktr-102보다 우수한 것을 알았다.

[0429] 실시예 19 동소성 누드마우스 U87MG 뇌 모델의 생존율에 대한 영향

[0430] 시료: 이리노테칸, nktr-102, 본 발명의 12종의 화합물.

[0431] 시약: RPMI-1640 배양액, 트립신, 페니실린-스트렙토마이신 2중 특이성 항체, 생리식염수.

- [0432] 실험 동물: 암컷 BALB/c 누드마우스(마리수: 150마리; 주령: 6~8 주)을 Beijing Vital River Laboratory Animal Technology Co., Ltd.로부터 구입하고, 온도 20~25 °C, 상대 습도 40%~70%, 12시간 명, 12시간 암의 조명 조건, 동물이 자유롭게 물·먹이를 섭취하는 SPF 동물 사육실에서 사육했다. 사육하여 약 1주일 후, 수의 사에 의한 검사로 신체 상황이 양호한 것으로 판단된 마우스를 금번의 실험용 마우스로 했다. 군분류 전에 마커에 의해 꼬리의 밑등처에 표시하고, 군분류 후에 각 동물을 이어컷의 방법에 의해 표시했다.
- [0433] 가이식성 종양주: 중국 과학원 전형 배양물 보존 위원회 세포뱅크(CAS, 본 실험실에서는 액체 질소 중에 동결 보존)로부터 입수한 신경교종 세포 U87MG.
- [0434] 실험 방법:
- [0435] NCI-N87 세포 배양: 5% CO₂, 37°C의 배양 조건 하에서, NCI-N87 세포를 RPMI-1640 배양액 중에서 통상의 세포 배양을 행하고, 0.25% 트립신 소화법에 의해 계대했다. 세포의 증식 상황에 따라, 계대를 주 1~2 회 행하고, 계대율을 1:2~1:6으로 했다.
- [0436] 동물 모델의 구축: 지수 증식기의 NCI-N87 세포를 채취하고, 세포수 계측 후에 무혈청 RPMI-1640 배지에 재현탁하고, 세포 농도를 1×10^8 세포/mL로 조정하고, 피펫으로 세포를 풀고, 균일하게 분산시킨 후에 50mL의 원심관에 넣고, 원심관을 아이스박스에 넣었다. 세포 현탁액을 1mL의 시린지로 채취하고, 동물 정위 고정 장치의 보조에 의해, 마이크로인젝션법으로 인간 신경교종 세포 U87MG 세포 $1 \mu\text{L} (1 \times 10^5 \text{ 세포/마리})$ 를 생체외에서 배양하고, 동소성 U87MG 뇌신경교종 모델을 구축하고, 접종 후에 정기적으로 동물의 상태를 관찰했다. 접종 후 12일째에, 동물을 90마리 선택하고, 난괴법에 의해 15조로 나누었다(n=6).
- [0437] 투여 제제의 조제: 시료의 조제는 실시예 15를 참조. 단회 투여에 필요한 용량은 3mL이다.
- [0438] 동물군분류 및 투여: 군분류하는 날에 초회의 투여를 시작하고, 21일 후에 실험을 종료시켜, 투여 용량을 모두 $10\text{mL} \cdot \text{kg}^{-1}$ 로 했다. 제1군은 용매 대조군이며, 미정맥 주사에 의해 블랭크 용매를 4일에 1회, 합계하여 3회(Q4D×3) 투여했다. 제2군~제15군은 각각 미정맥 주사에 의해 공시 시료인 이리노테칸, nktr-102, 공시 화합물을, $40\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ (이리노테칸 함유량 기준으로)의 투여량으로, Q4D×3으로 투여했다.
- [0439] 데이터 기록, 계산 공식: 동물의 생존 시간을 기록했다. Microsoft Office Excel 2007 소프트웨어를 사용하여 실험 데이터를 계산하고, 또한 관련 통계 처리를 행하였다. 2군의 비교는 t 검정으로 행하였다. 결과를 표 5에 나타낸다.

[0440] [표 7]

표 5 동물생존시간(일)

군별	시료	동물수	생존시간	생존기간중앙값
1	블랭크 용매	6	16 - 22	20
2	이리노데칸	6	22 - 32	27
3	nktr-102	6	25 - 37	31
4	화합물 a	6	34 - 46	40*
5	화합물 A	6	34 - 46	40*
6	화합물 b	6	34 - 41	38*
7	화합물 B	6	34 - 41	38*
8	화합물 c	6	34 - 45	38*
9	화합물 C	6	34 - 45	38*
10	화합물 d	6	30 - 39	35*
11	화합물 D	6	30 - 39	35*
12	화합물 e	6	33 - 44	39*
13	화합물 E	6	33 - 44	39*
14	화합물 f	6	30 - 42	38*
15	화합물 F	6	30 - 42	38*

* 블랭크 용매, 이리노데칸 및 nktr-102군의 생존기간중앙값과 비교, $P < 0.05$.

[0441]

[0442]

실험 결과에 의하면, 본 발명의 화합물은, 신경교종에 대하여 양호한 억제 작용을 가지고, 또한 이리노데칸 및 nktr-102보다 우수한 것을 알았다.