

(19) 대한민국특허청(KR)  
(12) 특허공보(B1)

(51) Int. Cl.<sup>5</sup>  
A61K 39/395

(45) 공고일자 1991년08월06일  
(11) 공고번호 특1991-0005887

(21) 출원번호	특1988-0015383	(65) 공개번호	특1989-0007724
(22) 출원일자	1988년11월22일	(43) 공개일자	1989년07월05일
(30) 우선권주장	124,313 1987년11월23일 미국(US)		
(71) 출원인	브리스톨-마이어즈 스쿼브 컴페니 아이삭 자아코브스키 미합중국 뉴욕주 뉴욕시 파아크 에베뉴 345 우편번호:10154		
(72) 발명자	피터 디. 센터 미합중국 워싱턴주 시애틀시 에스 421 서밋 에베뉴 이스트 211		
(74) 대리인	박장원		

심사관 : 정진수 (책자공보 제2413호)

(54) 약물-모노클로날 항체 결합체

요약

내용 없음.

대표도

도1

명세서

[발명의 명칭]

약물-모노클로날 항체 결합체

[도면의 간단한 설명]

제1도는 MMC를 그의 상응하는 전구약물로부터 방출시키는 경로를 도시한 도면.

제2도는 본 발명에 따른 대표적인 약물-모노클로날 항체 결합체의 합성을 도시한 도면.

제3도는 본 발명에 따른 전구약물로서의 유도체들의 HPLC 비교 분석 결과를 도시한 도면.

[발명의 상세한 설명]

본 출원은 본 출원인이 동일자로 출원한 피터 디센터씨의 발명 "항종양 전구약물" 과 관련된 출원임을 밝혀둔다.

본 발명은 종양 세포에 세포독성 물질을 전달하는 방법에 관한 것이다. 지난 수년간 세포독성 물질의 담체로서 종양 관련 모노클로날 항체를 이용하는 것이 커다란 관심의 대상이 되어 왔다(Moller, 1982). 이 연구의 주 목적은 바람직스럽지 않으면서 빈번히 발생하는 독성 부작용을 감소시키면서 항암약물의 효율을 증진시키는데 있어 왔다. 항체가 종양에 항암약물을 전달시키는 항체-약물 결합체를 이용함으로써 이 목적을 달성하려는 연구가 수행되거나 제안되었다.

이러한 접근이 효과적인 것이 되기 위해서는 항체가 고도로 종양 선택적이어야 할 것과 약물이 활성적이고 세포독성적인 형태로 전달되어야 할 필요가 있다. 메도트렉세이트(Endo, 1987) 다우노마이신(Gallego 등, 1984), 미토마이신 C(MMC)(Ohkawa 등, 1986) 및 빈카알칼로이드류(vinca alkaloids)(Rowland 등, 1986)와 같은 약물을 항체에 결합시켜 유도된 결합체를 항종양 활성연구에 이용하여 왔다. 여러 경우에 있어서, 이러한 결합체의 돌발적인 활동은 약물이 항체에 공유적으로 결합될 때 감소된 활성 탓으로 돌릴 수 있다. 예컨대 가수분해와 같은 느린 비특이적 방출을 수행하는 비교적 안정한 화학결합에 의한 항체와 약물의 결합을 설명한 많은 예가 기술분야에 존재한다.

약물이 항체로부터 방출될 때, 그러나 화학적으로 변형된 형태로 방출되면, 부가적인 문제점이 발생할 수 있다. 비록 약물의 활성부위가 접근 가능하다고 해도, 화학적으로 변형된 약물은 훨씬 덜 강력할 수 있다.

이러한 관점 때문에 새로운 결합 전략, 즉 약물의 그의 활성 수준을 최대로 발휘하면서 화학적으로 변형되지 않은 형태로 항체로부터 방출될 수 있는 새로운 약물-항체 결합체를 개발할 필요가 생겼다. 연구결과, 미토마이신 C(MMC), 미토마이신 A(MMA), 및 다우노마이신의 벤질카르바메이트디술라이드 유도체들과 같은 전구약물 화합물들은 피술라이드 결합이 환원될 때 화학적으로 변형되지

않은 약물을 방출시키는 것으로 나타났다(Senter, 상기 특허출원 참고 : 제1도).

본 발명자는 많은 고상 종양이 산소-결핍 환경에서 존재하고 글루타치온, NADH 및 NADPH와 같은 환원제를 높은 수준으로 갖는 것으로 나타났기 때문에 약물 방출은 디설파이드 결합 환원에 의존하는 전구 약물 전락이 약물을 종양관련 항체와 함께 종양에 전달하는데 이상적으로 적합하리라고 여겼다 (Sartorelli, 1996). 이러한 환원제들은 디설파이드 결합을 환원시킴으로써 벤질카르바메이트디설파이드 약물 결합체로부터 유리 약물을 방출시킬 수 있다.

약물-항체 결합체에 벤질카르바메이트디설파이드 링커(linkers)를 사용하는 것은 항체가 수용체-중개 엔도사이토시스에 의해 세로내로 테이크-업 되는 경우에도 이용될 수 있다. 글루타치온과 같은 세포내 티올류는 다음 디설파이드로 연결된 결합체를 환원시킬 수 있다.

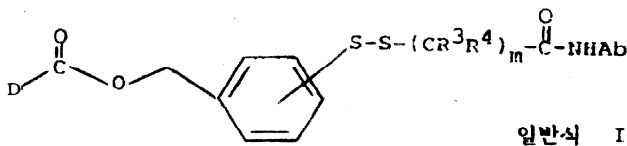
본 발명은 약물-항체 결합체로서 여기서 항체와 약물은 MMC-항체 결합체의 경우에는 디설파이드벤질카르바메이트를 이용하고, 에토포시드-항체 결합체의 경우에는 디설파이드벤질카르보네이트를 이용하여 연결되어 있다.

다른 측면에서, 본 발명은 포유동물에게 본 발명에 따른 약물-모노클로날 항체 결합체를 투여함으로써 포유류의 종양 세포부위에 활성 항종양 약물을 전달하는 방법이다.

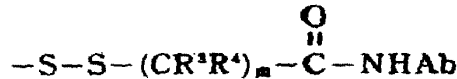
상기의 상호 참고 출원에서 디설파이드-결합의 환원은 약물 분해 과정을 개시시키고 이로 인해 모약물, 즉 변형되지 않은 약물이 활성적이고, 세포 독성적인 형태로 방출된다는 것이 증명되었다. 더욱이, 약물 방출 속도는 디설파이드를 입체적으로 방해함으로써 조절될 수 있다. 상호-참고 출원에 기재된 화학을 이용하여, 커다란 약물활성 손실은 없었다. 실질적으로 동일한 방법론이 국소지향 면역요법에 있어 아민기 함유 약물, 등가 히드록실기 함유 약물 및 단백질 독소를 항체가 결합시키는 데 효과적인 것으로 밝혀졌다.

본 발명은 다음의 일반식을 갖는 항종양 약물-모노클로날 항체 결합체이다.

[일반식 1]



상기 일반식 중 : D는 항종양 약물 부분으로서 그의 기본 골격(backbone)에 일반식 R<sup>1</sup>NH-로 나타내지는 1차 아미노기, 일반식 R<sup>1</sup>R<sup>2</sup>N-으로 나타내지는 2차 아미노기, 및 일반식 R<sup>1</sup>O-로 나타내지는 알코올기 중에서 유도된 화학 반응성 관능기를 부속적으로 가지고, 이에 의해 약물의 기본 골격이 디설파이드벤질 옥시카르보닐기에 결합되며 : R<sup>1</sup>은 D가 1차 아미노기, 2차 아미노기, 및 알코올기 중에서 유도되는 경우 상기 약물의 기본 골격을 이루며, 여기서 2차 아미노기의 경우, R<sup>1</sup> 및 R<sup>2</sup>는 독립적이고 : R<sup>2</sup>는 R<sup>1</sup>과 R<sup>2</sup>가 독립적인 경우, 탄소원자를 1-3개 갖는 1-3개의 알콕시기와 1-3개의 할로기 중에서 선택된 치환체로 치환되거나 치환되지 않고, 측쇄를 갖거나 직쇄인 탄소원자 1-10개의 알킬기 : 탄소원자를 1-3개 갖는 1-3개의 알킬기, 탄소원자를 1-3개 갖는 1-3개의 알콕시기, 및 1-3개의 할로기 중에서 선택된 치환체로 치환되거나 치환되지 않은 페닐 : 및 치환되거나 치환되지 않은 페닐알킬로서, 이 때 페닐부분은 치환되는 경우, 상기 치환페닐의 경우 정의된 바와 같이 치환되고 알킬부분은 탄소원자를 1-3개 갖는 폴리알킬렌기인 페닐알킬 중에서 선택되며 : R<sup>1</sup>과 R<sup>2</sup>는 2차 아민으로부터 유도된 관능기에서 함께 취해질 경우, 상기 2차 아미노기를 구성하는 질소원자에 화학적으로 결합된 2가지를 가지며 약물 부분 D의 기본 골격을 나타내고 : R<sup>3</sup> 및 R<sup>4</sup>는 H 및 탄소원자를 1-3개 갖는 알콕시기 및 1-3개의 할로기 중에서 선택된 치환체로 치환되거나 치환되지 않고, 측쇄를 갖거나 직쇄인 탄소원자 1-10개를 갖는 알킬기 : 탄소원자를 1-3개 갖는 1-3개의 알킬기, 탄소원자를 1-3개 갖는 1-3개의 알콕시기 및 1-3개의 할로기 중에서 선택된 치환체로 치환되거나 치환되지 않은 페닐 : 및 치환되거나 치환되지 않은 페닐알킬로서, 이때 페닐부분은 치환되는 경우, 상기 치환페닐의 경우 정의된 바와 같이 치환되고 알킬부분은 탄소원자를 1-3개 갖는 폴리알킬렌기인 페닐알킬 중에서 독립적으로 선택되며 : m은 1에서 10까지의 정수 중 하나이고 : Ab는 부속 아미노기를 갖는 모노클로날 항체를 나타내고 : 벤질카르바메이트 부분의 페닐 고리상의



기의 치환방향은 오르토- 및 파라-위치 중에서 선택된다.

상기 아미노기 함유 약물의 대표적인 예로는 미토마이신-C, 미토마이신-A, 다우노마이신, 아드리아마이신, 아미노프테린, 악티노마이신, 블레오마이신, 및 이들의 유도체를 들 수 있고 : 상기 알코올기 함유약물의 대표적인 예는 에토포시드이다.

이들의 약명으로는 다음을 이용하였다 : MMC, 미토마이신 C :MMA, 미토마이신 A : DAU, 다우노마이신, PBS, 인산완충 식염수 : HPLC, 고압액체 크로마토그래피 : DDT, 디티오프레이톨 : 및 Ab, 모노클로날 항체.

다른 측면에서 본 발명은 일반식 R<sup>1</sup>NH-로 나타내는 1차 아미노기, 일반식 R<sup>1</sup>R<sup>2</sup>N-으로 나타내는 2차 아미노기, 및 일반식 R<sup>1</sup>O로 나타내는 알코올기(이때 R<sup>1</sup> 및 R<sup>2</sup>는 상기 정의된 바와 같음)중에서 선택한 화학 반응성 관능기를 그의 기본 골격에 부속적으로 갖는 활성 항종양 약물을 글루타치온, NADH, 및 NADPH 중 적어도 하나를 포함하는 내인성 환원제를 향상된 수준으로 갖는 포유동물의 종양 세포

부위에 전달하는 방법으로서 : (a) 일반식 1의 항종양 약물-모노클로날 항체 결합체의 항종양 유효량을 포유동물에게 투여하고, (b) 항종양 약물-모노클로날 항체 결합체를 내인성 환원 조건에 접하게하고, (c) 항종양 약물-모노클로날 항체 결합체를 환원적으로 분해시켜 결합체로부터 유리 약물을 방출시키는 단계로 이루어진다.

본 발명에 따른 결합체는 숙주, 예컨대 실험 동물 숙주와 같은 포유동물 숙주를 치료하는 본 발명의 방법에 약리적 조성물로서 이용될 수 있다. 약리적 조성물은 항종양 유효량 즉, 본 발명에 따른 결합체의 종양발육 억제량과 약리적으로 허용되는 담체, 및 임의로 종래의 약리적으로 허용되는 부형제 및 보조제로 이루어진다.

본 발명의 면역 결합체의 항체 성분으로는 종양 관련 항원에 특이적으로 결합하는 것이면 어느 항체이든 무방하다. 이러한 항체의 예로는, 암종, 흑색종, 임파종 및 뼈와 연조직 육종, 및 기타 종양에서 발견되는 항원에 특이적으로 결합하는 항체를 들 수 있으나 이에 한정되는 것은 아니다. 세포 표면엔 연관된 기간동안 결합된 채 남아있거나 내면화되는 항체가 바람직하다. 이 항체들은 폴리클로날이거나, 바람직하게는 모노클로날일 수 있으며 기술분야에서 공히 확립된 기술을 이용하여 제조할 수 있다[R. A. Deweger 외, "Eradication of Murine Lymphoma And Melanoma Cells by Chlorambucil-Antibody Complexes, Immunological Rev. 62, pp.29-45(1982)(종양 특이 폴리클로날 항체 제조 및 결합체에서의 사용) 및 M. Yeh 외., "Cell Surface Antigens of Human Melanoma Identified By Monoclonal Antibodies" Proc. Natl. Acad. Sci. 76, p2927(1979) 및 J. P. Brown 외 "Structural Characterization of Human Melanoma-Associated Antigen p97 With Monoclonal Antibodies" J. Immunol. 127(no. 2), pp 539-546(1981)(종양 특이 모노클로날 항체) 참고].

고체 조성물은 위장관으로 부터의 흡수율이 낮은 것으로 생각되기 때문에 액체 조성물이 보다 바람직할 것으로 생각되어 약리적 담체는 대체로 액체 조성물을 제공하기 위해 액상이 될 것이다. 본 발명에 따른 결합체는 멸균 가용성 결합체나 멸균수 또는 기타 액상 매질에 용해 및 현탁시킬 수 있는 조성물 형태로 제공되어 경구 투여 또는 비경구 투여를 위한 용액 및 현탁액 그리고 유제를 제공할 수 있다. 경구 투여에 적합한 액상 담체의 예로는 물, 알코올, 폴리프로필렌글리콜, 폴리에틸렌글리콜 및 이들의 두 가지 이상의 혼합물을 들 수 있다. 비경구용으로 적합한 액체 담체의 예로는 주사용수, 생리식염수, 및 기타 적합한 멸균 주사 매질을 들 수 있다. 일반적으로 적당한 완충 등장액을 제공하는 액상 담체와 함께 이용하기에 적합한 완충액으로는 오르토인산나트륨중탄산나트륨, 구연산나트륨, N-메틸글루카민, L(+)-리신 및 L(+)-아르기닌을 들 수 있으나 이들은 완충제의 몇몇 대표적인 예에 지나지 않는다.

약리적 조성물은 적어도 일반식 1의 결합체 한가지 또는 한가지 이상의 상기 혼합 화합물과 다른 항종양제와의 혼합물을 함유하게 될 것이다. 일반식 1의 화합물의 항종양 유효량은 특정한 적용, 사용된 특정 결합체의 형태 및 강도, 그리고 조성물에 있어서의 결합체의 목적하는 농도에 따라 크게 다르거나 조정될 수 있다. 일반적으로, 활성성분의 양은 조성물 총 중량에 기초했을 때 약 0.5-90중량%에 범위가 될 것이다.

종양이 있는 포유류 숙주, 예컨대 실험 동물 숙주를 치료하기 위한 치료 용도에서, 본 발명의 결합체는 종양 발육을 억제할 수 있는 유효량만큼 투여될 것이며, 여기서 종양 발육 억제량은 약 0.1-약 15mg/동물의 체중/일이 될 것이다. 실제로 결합체의 바람직한 투여량은 치료받는 동물의 요구사항, 사용한 조성물 및 투여 경로에 따라 크게 변할 것이다. 본 발명과 관련된 분야의 숙련가들은 예컨대 숙주동물의 연령, 체중 및 성별 ; 식이 ; 투여시기 ; 배설률 ; 숙주의 상태 ; 병의 위중도 ; 등과 같이 항-신생물 제제의 작용을 변형시키는 여러 인자들을 참작할 것이다. 투여는 최대 관용 투여량 범위내에서 일시에 또는 주기적으로 수행할 수 있다. 주어진 조건에서의 최적 투여(또는 적용)율은 통상적인 투여량 결정시험을 이용하면 이 분야의 숙련가에 의해 용이하게 규명될 수 있을 것이다.

다음의 실시예들은 본 발명의 이용범위를 예시한 것으로서 본 발명의 범위를 제한하고자 함이 아니다. 별도의 지시가 없는 한 모든 부와 백분율은 중량을 기준으로 한 것이고 온도는 섭씨로 나타냈다. 화합물과 결합체는 제1도 및 제2도에 따라 번호를 설정했다.

#### [실험]

인간의 폐 암종상의 당지질 항원과 반응하는 L6(IgG2a)로 나타내지는 정제 모노클로날 항체 단백질 A(Hellstrom 외, 1986)는, K. E. Hellstrom 박사와 I. Hellstrom 박사(Oncogen, Seattle)가 제공하였다. 인체 종양 세포주 A549는 J. Catino 박사(Bristol-Myers Co. Wallingford)가 제공하였다.

#### [결합체 결합 분석]

면역 결합체를 생육 배지에 연속적으로 희석하고 100 $\mu$ l 생육 배지에서  $1 \times 10^6$  세포와 함께 4 $^{\circ}$ C에서 정치시켰다. 1시간 뒤, 세포를 2회 세척하고 1 : 40으로 희석된 염소의 항 마우스 IgG-FITC(Boehringer-Mannheim)가 함유된 100 $\mu$ l 배지에 4 $^{\circ}$ C에서 20분간 재현탁시켰다. 세포를 세척하고 Coulter Epics V 형광세포 분석기를 이용하여 분석하였다. 각 실험시, 비-결합체 양성 결합 대조군으로서 유사하게 희석된 MAb를 이용하였다.

#### [생체의 세포독성 분석]

McCoy's 완전 배지 0.4ml 중의 A549 세포를 12-웰 조직 배양판에 1000 세포/웰로 옮기고 37 $^{\circ}$ C에서 밤새 배양하였다. 세포를 RPMI 배지로 세척하고 McCoy 배지 0.4ml 중의 결합체를 첨가하였다. 주기적인 간격(1, 3, 6 및 24hr)으로, 세포를 RPMI로 세척하여 결합되지 않은 결합체나 약물을 제거하고, 신선한 McCoy 배지를 첨가하여 37 $^{\circ}$ C에서 총 24시간동안 연속 배양시켰다. 집락(colony)을 크리스탈 바이올렛으로 염색하여 Optimax 40.10 영상 분석기로 그 수를 세었다.

#### [일반 공정-1 및 2의 제조]

1ml 건조 디옥산 중의 0.044ml의 피리딘(0.55mmd)과 파라-또는 오르토-메르캅토벤질 알코올

137mg(0.55mmol)과 각각의 용액을 0.5ml의 디옥산 중의 트리클로로메틸클로포르메이트 0.032ml(0.275mmol)의 교반 용액에 3분 동안 첨가하였다. 15분간 교반시킨 후, 디옥산 4ml 중의 MMC(92mg, 0.275mmol) 및 트리에틸아민(0.153ml, 1.1mmol) 용액을 신속히 첨가하였다. 5분 후, 용매를 증발시키고,  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  중의 잔사 용액을 포화  $\text{NaHCO}_3$ ,  $\text{NaCl}$ 로 추출하고 건조시켰다( $\text{MgSO}_4$ ). 먼저 석유에테르(300ml) 중의 30% 에틸아세테이트로 비극성 물질을 분리한 다음, 카르바메이트를 클로로포름 중의 5% 메탄올로 용리시켜  $2 \times 20\text{cm SiO}_2$  컬럼상에서 플래쉬 크로마토그래피에 의해 생성물을 정제하였다. 생성물 1과 2는 각각 무정형의 청색 고체로 얻어졌으며 이를 3ml의  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ 에 용해시켜 석유에테르 30ml에 적가하였다. 1과 2 각각의 경우, 고체 생성물은 다음의 특성을 가졌다.

MMC 벤질카르바메이트디설파이드 1 :

수율 92% 청색 분말 ; 융점  $99^\circ$  (분해) ;  $^1\text{H-NMR}(\text{pyr-d}_5)$   $\delta$  1.95(s, 3H,  $\text{CH}_3$ ), 3.15(s, 3H,  $\text{OCH}_3$ ), 3.4-4.2(m, 6H), 4.6-5.0(m, 2H), 5.20(s, 2H,  $\text{ArCH}_2$ ), 5.6(dd, 1H), 6.9-7.8(m, 7H,  $\text{ArH}$ ), 8.35-8.5(m, 1H,  $\text{ArH}$ ) ; IR(KBr)  $\nu$  340, 2920, 1890, 1600, 1552 $\text{cm}^{-1}$  ; 자외선/가시광선( $\text{CH}_3\text{OH}$ )  $\lambda$  최대 356nm( $\log \epsilon=4.31$ ).

MMC 벤질카르바메이트디설파이드 2 :

수율 63% 청색 분말 ; 융점  $96-98^\circ\text{C}$  ;  $^1\text{H-NMR}(\text{pyr-d}_5)$   $\delta$  1.90(s, 3H,  $\text{CH}_3$ ), 3.07(s, 3H,  $\text{OCH}_3$ ), 3.4-3.55(m, 2H), 3.8-4.05(m, 3H), 4.6-5.0(m, 3H), 4.85(s, 3H), 5.35-5.70(m, 3H), 6.8-7.7(m, 7H,  $\text{ArH}$ ), 8.35(d, 1H,  $\text{ArH}$ ) ; IR(KBr)  $\nu$  3400, 1692, 1600, 1552 $\text{cm}^{-1}$  ; 자외선/가시광선( $\text{CH}_3\text{OH}$ )  $\lambda$  최대 ( $\log \epsilon=4.32$ ).

[히드록시숙신이미드에스테르 6의 제조]

5ml 아세톤 중의 125mg(0.205mmol)이 1의 용액에 3-메르캅토프로피온산  $18\mu\text{l}$ (0.205mmol)를 첨가하였다. 3-메르캅토프로피온산  $18\mu\text{l}$ 를 1시간 후 추가로 첨가하고 총 1-1/2시간 후에 반응을 완결시켰다. 용매를 진공하에서 제거하고 용리액으로 염화메틸렌 중의 10% 메탄올을 이용하여 플래쉬크로마토그래피( $\text{SiO}_2$ )로 잔사를 정제하였다. 추가 정제하지 않고 이 산(5)을 다음 단계에서 사용하였다.

2ml 건조 DMF 중의 디시클로헥실카르보디이미드(77mg, 0.372mmol), N-히드록시숙신이미드(43mg, 0.372mmol) 및 산(5, 0.186mmol)의 용액을 3시간 교반시켰다. 침전물 여과하고 에틸아세테이트로 세척하였다. 용매를 진공하에서 제거한 후, 용리액으로서 염화메틸렌 중의 10% 이소프로판올을 이용하여 예비 TLC( $\text{SiO}_2$ )에 의해 잔사를 정제하였다. 히드록시숙신이미드에스테르(6)은 미세한 청색 고체(26mg)로서 얻어졌다.  $^1\text{H-NMR}(360\text{MHz}, \text{CDCl}_3)$   $\delta$  1.75(s, 3H,  $\text{CH}_3$ ), 2.85(s, 4H, 숙신이미드  $\text{CH}_2$ ), 2.8-3.1(m, 4H), 3.81(s, 3H,  $\text{OCH}_3$ ), 3.20(m, 1H), 3.27-3.55(m, 3H), 3.70(q, 1H), 4.0(br, s, 1H), 4.33(t, 1H), 4.6-5.4(m, 6H), 7.4(q, 4H,  $\text{ArH}$ ).

[히드록시숙신이미드에스테르 8의 제조]

히드록시숙신이미드에스테르 8은 6의 합성에서와 같이 피리딜디설파이드 1과 2-메르캅토-2-메틸프로피온산으로부터 제조하였다. 미세한 청색 고체(55mg)가 100mg 개시와 함께 얻어졌다.  $^1\text{H-NMR}(220\text{MHz}, \text{CDCl}_3)$   $\delta$  1.68(s, 6H,  $2\text{CH}_3$ ), 1.7(s, 3H,  $\text{CH}_3$ ), 2.83(s, 4H, 숙신이미드  $\text{CH}_2$ ), 3.20(s, 3H,  $\text{OCH}_3$ ), 3.25-3.75(m, 6H), 4.2-5.3(m, 6H), 7.40(q, 4H,  $\text{ArH}$ ).

[히드록시숙신이미드에스테르 10의 제조]

히드록시숙신이미드에스테르 10은 6의 합성에서와 같이 피리딜디설파이드 2와 2-메르캅토-2-메틸프로피온산으로부터 제조하였다. 생성물 10은 청색 고체(10mg)로서 2의 개시와 더불어 얻어졌다.  $^1\text{H-NMR}(220\text{MHz}, \text{CDCl}_3)$   $\delta$  1.53(s, 3H,  $\text{CH}_3$ ), 1.61(s, 3H,  $\text{CH}_3$ ), 1.78(s, 3H,  $\text{CH}_3$ ), 2.90(s, 4H, 숙신이미드  $\text{CH}_2$ ), 3.20(s, 3H,  $\text{OCH}_3$ ), 3.4-3.8(m, 6H), 4.21(t, 1H), 4.40(d, 1H), 4.50(br, s, 2H), 4.90(q, 1H), 5.2-5.4(m, 4H), 7.2-7.4(m, 2H,  $\text{ArH}$ ), 7.80(d, 2H,  $\text{ArH}$ ), 7.80(d, 2H,  $\text{ArH}$ ).

[약물-항체 결합체 11-13의 제조]

아세토니트릴 중의 히드록시숙신이미드에스테르 6, 8, 10(2.9-3.7mM)의 용액을 100mM NaCl이 함유된 1.5ml의 50mM 붕산 완충액(pH 8.5) 중의 L6 항체(2.61mg/ml)에  $30^\circ\text{C}$ 에서 첨가하였다. 히드록시숙신이미드에스테르 8과 10(20배 총 몰 초과)을 10분 간격으로 4회 동량첨가하고 6(10배 총 몰 초과)은 0 및 10분에 2회 동량 첨가하였다. 40분 후, 원심분리에 의해 침전물을 제거하고  $4^\circ\text{C}$ 에서 상등액을 PBS에 대해 밤새 투석하였다. 투석물을 0.5g SM-2 폴리스티렌 비이드(BioRad)로  $4^\circ\text{C}$ 에서 10분간 온화하게 회전시킨 다음 여과하여 항체에 공유적으로 결합되지 않은 것은 모두 제거하였다. 결합체를 HPLC로 분석하자(후술) 유리 약물이나 유리-약물 유도체가 존재하지 않는 것으로 나타났다. 이렇게 얻어진 결합체의 조성물을 365nm( $\epsilon=21086$ )에서 약물 흡수도에 의해 측정하고 280nm(Abs) 280nm, 1mg/ml=1.4)에서 항체 흡수도를 측정하였으며 이는 다음과 같았다 ; 11, 0.86mg/ml Ab(총 1.29mg), 약물/Ab=4.38/1 ; 12, 0.70mg/ml Ab(총 1.05mg), 약물/Ab=5.14/1 ; 13, 1.07mg/ml Ab(총 1.65mg), 약물/Ab=5.25/1.

약물 성분이 알코올 함유 약물인 에토포시드, 즉, 카르바메이트 결합보다는 카르보네이트 결합에 의해 디설파이드 벤질부분에 결합되는 에토포시드인 항종양 약물-항체 결합체는 먼저 MMC를 에토포시드(162mg, 0.275mmol)로 대치함으로써 에토포시드 벤질카르보네이트디설파이드를 제공한 다음, 결합

체 제조의 나머지 단계에서 MMC 벤질카르바메이트디술파이드 대신 결과적인 에토포시드벤질카르보네이트를 이용하는 전술한 단계에 따라 제조한다. 물론, 전술한 실시예들 중 MMC 대신 MMA, 다우노마이신, 아드리아마이신 및 기타의 아미노기 함유 약물을 이용할 수도 있다.

[결합체의 안전성]

결합체 11-13을 RPMI와 10% 송아지 태아 혈청이 함유된 생육 배지 동부피로 희석하였다. 이 용액을 37°C에서 정치시켰다. 일부(0.25ml)를 주기적으로 단백질-A 컬럼(0.25ml)에 적용시키고 컬럼을 PBS로 세척하여 결합되지 않은 물질을 모두 제거하였다. 결합된 결합체들을 150mM NaCl(0.5ml)이 함유된 100mM 초산으로 용리시키고 재빨리 중화하였다. 분광 광도계 분석을 이용하여 결합체의 조성물을 측정하였다.

[결합체와 디티오프레이톨과의 반응]

PBS 중의 약물-항체 결합체 11-13의 용액에 디티오프레이톨을 첨가하였다(최종 농도 0.2mM). 실온에서 19시간 후에, 10cm Whatman Partasil 5 ODS-3 역상(C-18) 컬럼을 이용하여 HPLC, 그리고 다음의 구배계에 의해 분취액을 분석하였다 : 0.1% 아세트이트(pH 6) 중 30% CH<sub>3</sub>OH-95% CH<sub>3</sub>OH, 6분간 ; 8분 계속 ; 유속 2ml/분 ; 340nm에서 모니터.

[결과 및 토의]

[결합체의 제조]

디술파이드와 티올-치환산과의 교환 및 이어 N-히드록시숙신이미드를 이용한 산의 에스테르화로 이루어진 2단계 공정으로 미토마이신 C 벤질카르바메이트피리딜디술파이드 1 및 2로부터 히드록시숙신이미드에스테르 6, 8 및 10을 제조하였다(제2도). pH 8.5에서의 히드록시숙신이미드에스테르와 L6과의 반응으로부터 항체-MMC 결합체 11-13이 생성되었다. 이 결합체에는 비공유적으로 결합된 MMC는 없었으며 HPLC와 자외선/가시광선 분광 광도계에 의해 특징지어졌다. 기재된 화학을 이용하여 MMC 분자 6개를 L6에 결합시킬 수 있었다. 추측컨대, 항체상의 아미노기가 활성화된 약물의 히드록시숙신이미드에스테르를 대치하여 항체와 약물 유도체 사이에 아마이드 결합이 생성된다고 여겨진다.

[결합체로부터의 미토마이신 C의 방출]

벤질카르바메이트피리딜디술파이드 약물 유도체가 디술파이드 결합의 환원에 의해 약물을 방출시키는 능력은 자세히 연구되어 왔다(Senter 상술). 결합체 11-13에 있어서의 디술파이드 결합의 분해 반응의 추정 기작은 MMC의 방출을 야기시키게 될 것이다.

L6-MMC 결합체의 11은 과량의 디티오프레이톨에 의해 환원되었으며, 이 반응을 HPLC로 모니터하였다. 정통한 믿음만한 시료와 비교하여 입증된 바와 같이, MMC의 방출이 일어나는 것이 관찰되었다(제3도). 환원제의 부재하에서는, 이 반응 조건에서 PBS 중의 결합체는 완전히 안정하였다.

디술파이드 결합의 입체적 방해가 약물 항체 결합체의 안정성에 어떤 효과를 미치는지를 결정하는 것은 흥미로운 일이었다. 방해된 디술파이드가 있는 리신-A 사슬 면역 독소가 방해되지 않은 유사한 면역 독소보다 생체외에서 더욱 안정하다는 것은 이미 보고된 바 있다(Worrel 등, 1986).

RPMI 및 10% 송아지 태아 혈청이 함유된 생육 배지와 PBS의 1 : 1 용액에서 결합체를 37°C로 정치시켰다. 단백질-A 친화 컬럼상에서 결합체를 재분리시킨 후, 항체에 결합된 채 남아있는 약물의 약을 측정하였다. 24시간 후, 11, 12 및 13이 결합 약물을 각각 40%, 21% 및 9% 씩 방출시킨 것으로 밝혀졌다. 그러므로, 결합체의 안정성은 디술파이드 결합이 방해되는 정도를 증가시킴으로써 향상시킬 수 있다.

[결합체의 결합 및 생체외 세포독성]

결합체를 A549 폐 암종 세포주 상의 수용체에 결합할 수 있는 능력에 대해 시험하였다. 형광 활성화 세포 분류 결과 세 가지 모두의 결합체가 변형되지 않은 항체와 마찬가지로 세포에 잘 결합된 것을 나타냈다. 약물결합에 이용된 화학은 항체의 결합성에 별다른 영향을 미치지 않았다.

A549 세포주 상의 결합체의 세포독성 활성을 일정기간의 노출 시간동안 측정하였다(표1). 가장 적게 방해받은 결합체 11은 단 3시간의 노출 후에 상당한 성장 저해를 보인 반면, 더 많이 방해받은 결합체 12와 13은 상당한 기간이 지나서야 세포독성 효과를 관찰할 수 있었다. 24시간 후 세 가지 결합체는 모두 세포독성이 높았다. 24시간의 노출 후에 측정된 결합체 11, 12 및 13의 IC-50 값은 각각 55nM, 64nM 및 59nM 이었다. 24시간이 지난 후의 유리 MMC의 IC-50 값은 50nM 이었다. 그러므로, 결합체 화학은 약물의 활성을 유지한다.

참고문헌

Endo, N., Kato, Y., Takeda, Y., Saito, M., Umenoto, N., Kishida, K., 및 Hara, T. Invitro cytotoxicity of a human serum-albumin-mediated conjugate of methotrexate with anti-MM46 monoclonal antibody. *Cancer Research* 47, 1076-1080(1987).

Gallego, J., Price, M. R., 및 Baldwin, R. W. Preparation of four daunomycin-monoclonal antibody 791T/36 conjugated with antitumor activity. *Int. J. Cancer*, 33, 737-744(1984).

Hellstrom, I., Beaumier, P. L. 및 Helstrom, K. E. Antitumor effects of Lb, and IgG2A antibody that reacts with most human carcinomas *Proc. Natl. Acad. Sci.* 83, 7059-7063(1986).

Moller, G.(Ed) : Antibody carriers of drugs and toxins in tumor therapy. *Immunol, Rev.*, 62(1982).

Ohkawa, K., Tsukada, Y., Hibi, N., Umemoto, No., 및 Hara, T. Selevtive in vitro and invivo

growth inhibition against human yolk sac tumor cell lines by purified antibody against human  $\alpha$ -fetoprotein conjugated with mitomycin C via human serum albumin. Cancer Immunol, Immunother. 23, 81-86(1986).

Rowland, G. F., Simmonds, R. G., Gore, V. A., Marsden, C. H. 및 Smith, W. Drug localisation and growth inhibition studies of vindesine-mono-clonal anti-CEA conjugated in a human tumor xenograft. Cancer Immunol, Immunother. 21, 183-187(1986).

Satorelli, A. C. The role of mitomycin antibiotics in the chemotherapy of solid tumors., Biochem. Pharm. 35, 67-69(1986).

Worrell, N. R., Cumber, A. J., Parnell, G. D., Mirza, A., Forrester, J. A. 및 Ross, W. C. J. Effect of linkage variation of pharmacokinetics of ricin A chain-antibody conjugates in normal rats. Anti-cancer Drug Design 1, 179-188, (1986).

[표 1]

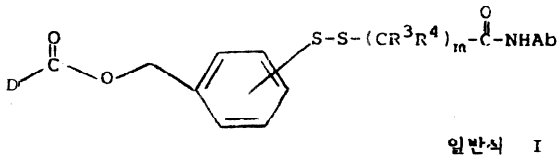
결합체 11-13을 10 $\mu$ g/ml L6에서 노출시킨 후의 A549 집락 형성의 저해 백분율. 노출 시간의 효과

결합체	집락 형성 저해 %			
	1h	3h	6h	24h
11	15%	45%	70%	95%
12	12%	45%	0%	95%
13	10%	10%	0%	95%

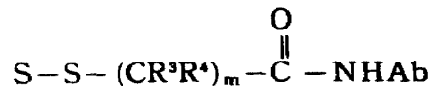
(57) 청구의 범위

청구항 1

다음의 일반식을 갖는 항종양 약물-모노클로날 항체 결합체 :



상기 일반식 중, D는 항종양 약물 부분으로서 그의 기본 골격에 일반식 R<sup>1</sup>NH-로 나타내지는 1차 아미노기, 일반식 R<sup>2</sup>N-으로 나타내지는 2차 아미노기, 및 일반식 R<sup>1</sup>O-로 나타내지는 알코올기 중에서 유도된 화학 반응성 관능기를 부속적으로 가지고, 이에 의해 약물의 기본 골격이 디술파이드벤질옥시카르보닐기에 결합되며 ; R<sup>1</sup>은 D가 1차 아미노기, 2차 아미노기, 및 알코올기 중에서 유도되는 경우 상기 약물의 기본 골격을 이루며, 여기서 2차 아미노기의 경우, R<sup>1</sup> 및 R<sup>2</sup>는 독립적이고 ; R<sup>2</sup>는 R<sup>1</sup>과 R<sup>2</sup>가 독립적인 경우, 탄소원자를 1-3개 갖는 1-3개의 알콕시기와 1-3개의 할로기 중에서 선택된 치환체로 치환되거나 치환되지 않고, 측쇄를 갖거나 적쇄인 탄소원자 1-10개의 알킬기 ; 탄소원자를 1-3개 갖는 1-3개의 알킬기, 탄소원자를 1-3개 갖는 1-3개의 알콕시기, 및 1-3개의 할로기 중에서 선택된 치환체로 치환되거나 치환되지 않은 페닐 ; 및 치환되거나 치환되지 않은 페닐알킬로서 이때 페닐부분은 치환되는 경우, 상기 치환페닐의 경우 정의된 바와 같은 치환되고 알킬 부분은 탄소원자를 1-3개 갖는 폴리알킬렌기인 페닐알킬 중에서 선택되며 ; R<sup>1</sup>과 R<sup>2</sup>는 2차 아민으로부터 유도된 관능기에서 함께 취해질 경우, 상기 2차 아미노기를 구성하는 질소원자에 화학적으로 결합된 2가지를 가지며 약물 부분 D의 기본 골격을 나타내고 ; R<sup>3</sup>과 R<sup>4</sup>는 H 및 탄소원자를 1-3개 갖는 알콕시기 및 1-3개의 할로기 중에서 선택된 치환체로 치환되거나 치환되지 않고, 측쇄를 갖거나 적쇄인 탄소원자 1-10개를 갖는 알킬기 ; 탄소원자를 1-3개 갖는 1-3개의 알킬기, 탄소원자를 1-3개 갖는 1-3개의 알콕시기 및 1-3개의 할로기 중에서 선택된 치환체로 치환되거나 치환되지 않은 페닐 ; 및 치환되거나 치환되지 않은 페닐알킬로서, 이때 페닐 부분은 치환되는 경우, 상기 치환 페닐의 경우 정의된 바와 같이 치환되고 알킬 부분은 1-3개의 탄소 원자를 갖는 폴리알킬렌기인 페닐알킬 중에서 독립적으로 선택되며 ; m은 1에서 10까지의 정수 중 하나이고 ; Ab는 부속 아미노기를 갖는 모노클로날 항체를



나타내며 ; 벤질카르바메이트 부분의 페닐 고리상의 방향은 오르토- 및 파라위치 중에서 선택된다.      기의 치환

청구항 2

제1항에 있어서, 약물 부분 D가, 1차 아민 함유 약물 및 2차 아민 함유 약물 중에서 선택됨을 특징으로 하는 항종양 약물-모노클로날 항체 결합체.

청구항 3

제2항에 있어서, 약물 부분 D가 미토마이신-C, 미토마이신-A, 다우노마이신, 아드리아마이신, 아미노프테린, 악티노마이신, 블레오마이신 및 이들의 유도체 중에서 선택됨을 특징으로 하는 항종양 약

물-모노클로날 항체 결합체.

**청구항 4**

제1항에 있어서, 약물 부분 D가 알코올기 함유 약물인 것이 특징인 항종양 약물-모노클로날 항체 결합체.

**청구항 5**

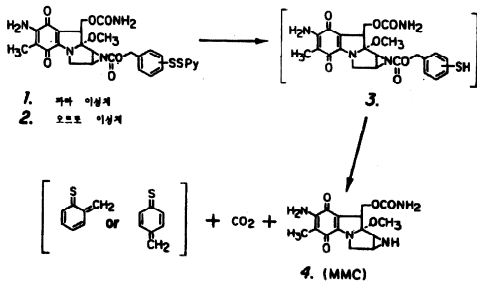
제4항에 있어서, 약물 부분 D가 에토포시드인 것이 특징인 항종양 약물-모노클로날 항체 결합체.

**청구항 6**

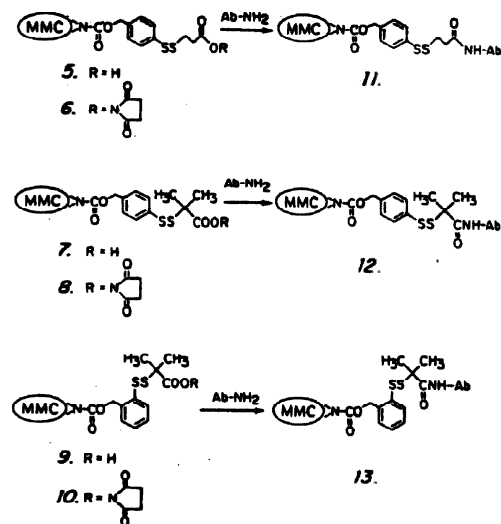
(a) 제1항에 따른 항종양 약물-모노클로날 항체 결합체의 항종양 유효량을 비인간 실험동물에 투여 하고, (b) (a) 단계로부터의 항종양 약물-모노클로날 항체 결합체를 내인성 환원 조건에 접하게 하여 (c) 항종양 약물-모노클로날 항체를 환원적으로 분해시켜 이 결합체로부터 유리 약물을 방출시키는 단계로 이루어짐을 특징으로 하는, NADH, NADPH 및 글루타치온중 적어도 하나를 포함하는 내인성 환원제를 높은 수준으로 갖는 비인간 실험동물의 종양세포 부위에, 일반식 R<sup>1</sup>-NH-로 나타내지는 1차 아미노기, 일반식 R<sup>1</sup>R<sup>2</sup>N-으로 나타내지는 2차 아미노기, 일반식 R<sup>1</sup>O로 나타내지는 알콜기(이때 R<sup>1</sup> 및 R<sup>2</sup>는 상기 정의된 바와 같음) 중에서 선택된 화학 반응성 관능기를 그의 기본 골격에 부수적으로 갖는 활성 항종양 약물을 전달하는 방법.

**도면**

**도면1**



**도면2**



도면3

