



(19) 대한민국특허청(KR)

(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2017년07월18일

(11) 등록번호 10-1759359

(24) 등록일자 2017년07월12일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

C07D 215/12 (2006.01) A61K 47/48 (2006.01)

C07D 417/14 (2006.01)

(21) 출원번호 10-2012-7005701

(22) 출원일자(국제) 2010년08월02일

심사청구일자 2015년06월30일

(85) 번역문제출일자 2012년03월02일

(65) 공개번호 10-2012-0047998

(43) 공개일자 2012년05월14일

(86) 국제출원번호 PCT/US2010/044078

(87) 국제공개번호 WO 2011/017249

국제공개일자 2011년02월10일

(30) 우선권주장

61/230,932 2009년08월03일 미국(US)

61/232,883 2009년08월11일 미국(US)

(56) 선행기술조사문현

WO2009012958 A2

WO2008138561 A

(73) 특허권자

메다렉스, 엘.엘.씨.

미국, 08540 뉴저지, 프린스톤, 루트 206 앤드 프로빈스 라인 로드

(72) 발명자

청, 형

미국 95035 캘리포니아주 밀피타스 코튼우드 드라이브 521 메다렉스, 인코포레이티드 내

충, 창

미국 95035 캘리포니아주 밀피타스 코튼우드 드라이브 521 메다렉스, 인코포레이티드 내

(뒷면에 계속)

(74) 대리인

양영준, 김영

전체 청구항 수 : 총 19 항

심사관 : 김유림

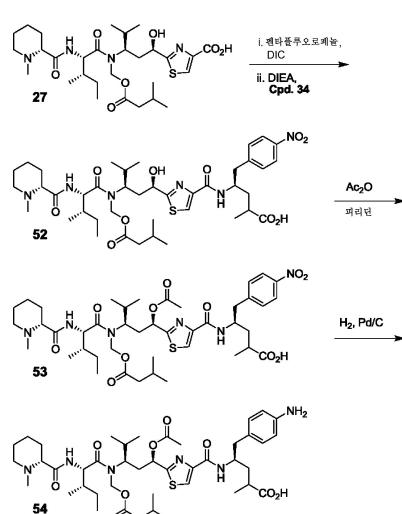
(54) 발명의 명칭 항중식성 화합물, 그의 접합체, 그를 위한 방법, 및 그의 용도

**(57) 요약**

화학식 II로 표시되는 구조를 갖는 항중식성 화합물 (여기서 n, R<sup>1</sup>, R<sup>2</sup>, R<sup>3</sup>, R<sup>4</sup> 및 R<sup>5</sup>는 본원에 정의된 바와 같음)은, 임의로 항체와 같은 리간드에 접합된 경우, 종양을 치료하는데 사용될 수 있다.

**대 표 도 - 도6**

반응식 6



(72) 발명자

강워, 샌지브

미국 95035 캘리포니아주 밀피타스 코튼우드 드라  
이브 521 메다렉스, 인코포레이티드 내

장, 천

미국 95035 캘리포니아주 밀피타스 코튼우드 드라  
이브 521 메다렉스, 인코포레이티드 내

---

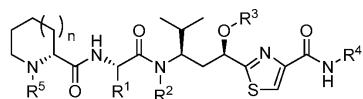
## 명세서

### 청구범위

#### 청구항 1

하기 화학식 II로 표시되는 구조를 갖는 화합물 또는 그의 제약상 허용되는 염.

<화학식 II>

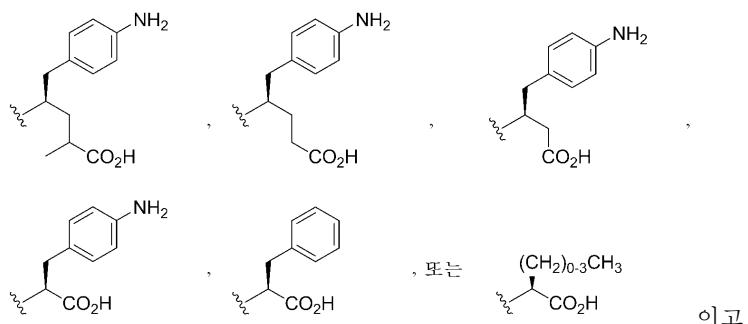


상기 식에서,

n은 0, 1 또는 2이고;

R<sup>1</sup>, R<sup>2</sup> 및 R<sup>3</sup>은 독립적으로 H, C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub> 알킬, C<sub>2</sub>-C<sub>10</sub> 알케닐, C<sub>2</sub>-C<sub>10</sub> 알키닐, 아릴, 헤테로아릴, (CH<sub>2</sub>)<sub>1-2</sub>O(C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub> 알킬), (CH<sub>2</sub>)<sub>1-2</sub>O(C<sub>2</sub>-C<sub>10</sub> 알케닐), (CH<sub>2</sub>)<sub>1-2</sub>O(C<sub>2</sub>-C<sub>10</sub> 알키닐), (CH<sub>2</sub>)<sub>1-2</sub>OC(=O)(C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub> 알킬), (CH<sub>2</sub>)<sub>1-2</sub>OC(=O)(C<sub>2</sub>-C<sub>10</sub> 알케닐), (CH<sub>2</sub>)<sub>1-2</sub>OC(=O)(C<sub>2</sub>-C<sub>10</sub> 알키닐), C(=O)(C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub> 알킬), C(=O)(C<sub>2</sub>-C<sub>10</sub> 알케닐), C(=O)(C<sub>2</sub>-C<sub>10</sub> 알키닐), 시클로지방족, 헤테로시클로지방족, 아릴알킬, 또는 알킬아릴이고;

R<sup>4</sup>는

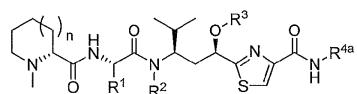


R<sup>5</sup>는 H, C<sub>1</sub>-C<sub>5</sub> 알킬, C<sub>2</sub>-C<sub>5</sub> 알케닐, C<sub>2</sub>-C<sub>5</sub> 알키닐, CO(C<sub>1</sub>-C<sub>5</sub> 알킬), CO(C<sub>2</sub>-C<sub>5</sub> 알케닐) 또는 CO(C<sub>2</sub>-C<sub>5</sub> 알키닐)이다.

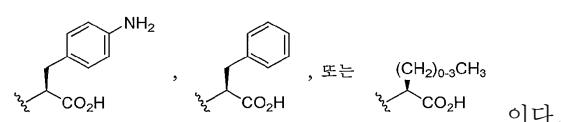
#### 청구항 2

제1항에 있어서, 하기 화학식 II-a로 표시되는 구조를 갖는 화합물.

<화학식 II-a>



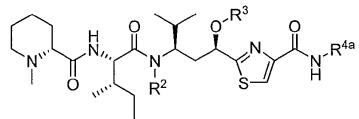
상기 식에서, R<sup>4a</sup>는



#### 청구항 3

제2항에 있어서, 하기 화학식 II-a'로 표시되는 구조를 갖는 화합물.

<화학식 II-a'>



상기 식에서,

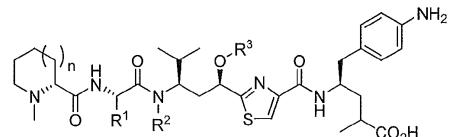
$R^2$ 는 H,  $C_1-C_5$  알킬,  $C_2-C_5$  알케닐,  $CH_2O(C_1-C_5$  알킬),  $CH_2O(C_2-C_5$  알케닐),  $CH_2O(C=O)(C_1-C_5$  알킬) 또는  $CH_2OC(=O)(C_2-C_5$  알케닐)이고;

$R^3$ 은 H,  $C_1-C_5$  알킬,  $C_2-C_5$  알케닐,  $C(=O)C_1-C_5$  알킬 또는  $C(=O)C_2-C_5$  알케닐이다.

#### 청구항 4

제1항에 있어서, 하기 화학식 II-b로 표시되는 구조를 갖는 화합물.

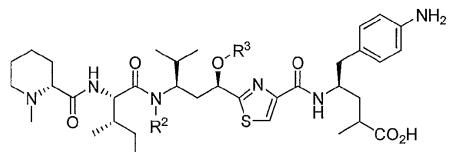
<화학식 II-b>



#### 청구항 5

제4항에 있어서, 하기 화학식 II-b'로 표시되는 구조를 갖는 화합물.

<화학식 II-b'>



상기 식에서,

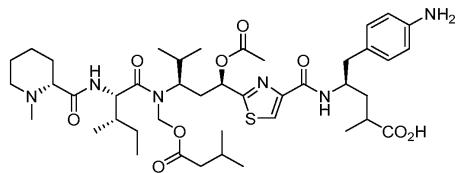
$R^2$ 는 H,  $C_1-C_5$  알킬,  $C_2-C_5$  알케닐,  $CH_2O(C_1-C_5$  알킬),  $CH_2O(C_2-C_5$  알케닐),  $CH_2O(C=O)(C_1-C_5$  알킬) 또는  $CH_2OC(=O)(C_2-C_5$  알케닐)이고;

$R^3$ 은 H,  $C_1-C_5$  알킬,  $C_2-C_5$  알케닐,  $C(=O)C_1-C_5$  알킬 또는  $C(=O)C_2-C_5$  알케닐이다.

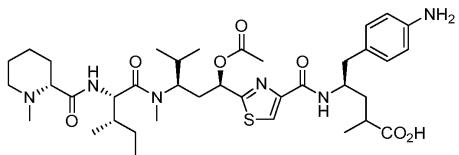
#### 청구항 6

하기 화학식 III-a, III-b, III-c, III-d, III-e, III-f, III-g, III-h, III-i, III-j, III-k, III-l, III-m, III-n, III-o, III-p, III-q, III-r, III-s, III-t, III-u, III-v, III-w, III-x, 또는 III-y에 따른 구조를 갖는 화합물.

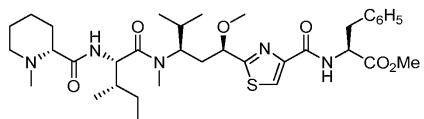
&lt;화학식 III-a&gt;



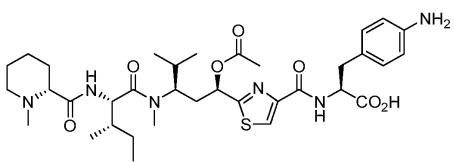
&lt;화학식 III-b&gt;



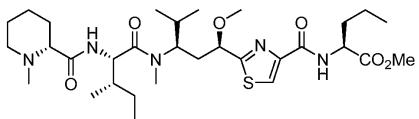
&lt;화학식 III-c&gt;



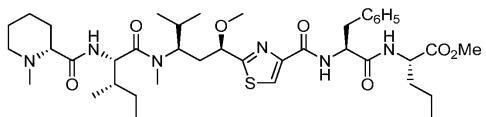
&lt;화학식 III-d&gt;



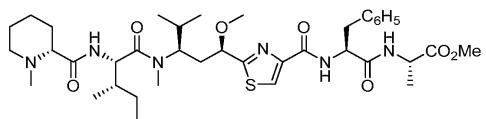
&lt;화학식 III-e&gt;



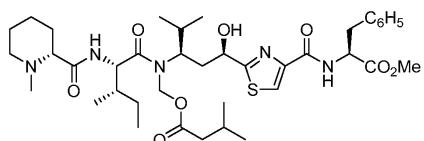
&lt;화학식 III-f&gt;



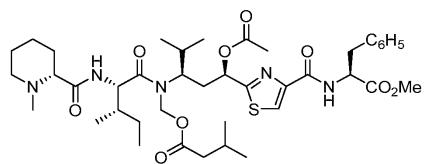
&lt;화학식 III-g&gt;



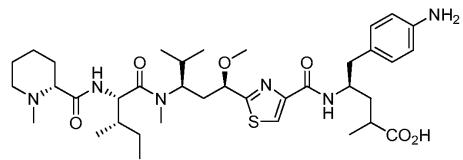
&lt;화학식 III-h&gt;



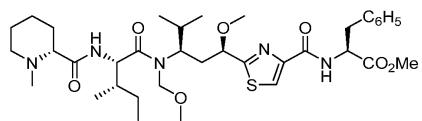
&lt;화학식 III-i&gt;



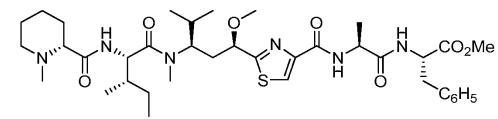
&lt;화학식 III-j&gt;



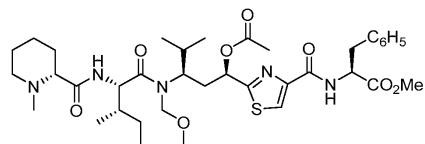
&lt;화학식 III-k&gt;



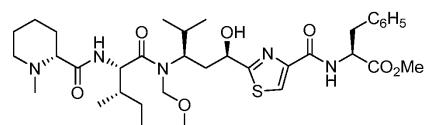
&lt;화학식 III-l&gt;



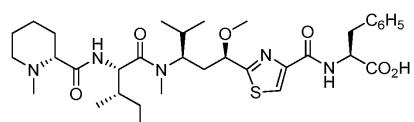
&lt;화학식 III-m&gt;



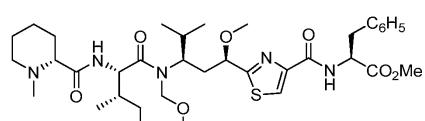
&lt;화학식 III-n&gt;



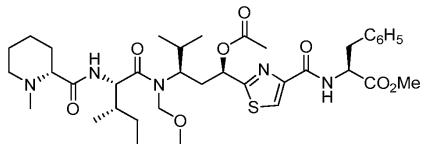
&lt;화학식 III-o&gt;



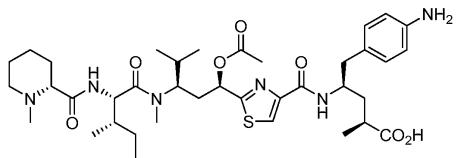
&lt;화학식 III-p&gt;



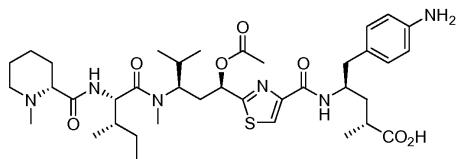
&lt;화학식 III-q&gt;



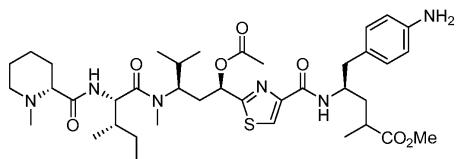
&lt;화학식 III-r&gt;



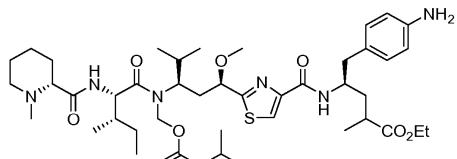
&lt;화학식 III-s&gt;



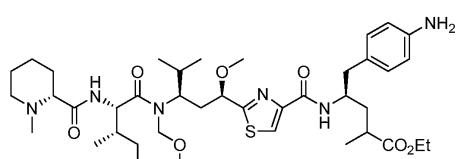
&lt;화학식 III-t&gt;



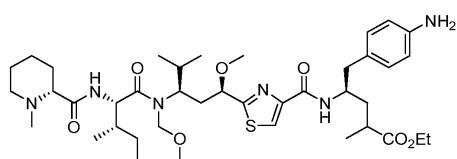
&lt;화학식 III-u&gt;



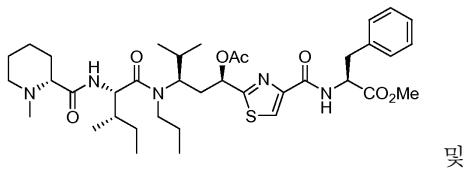
&lt;화학식 III-v&gt;



&lt;화학식 III-w&gt;

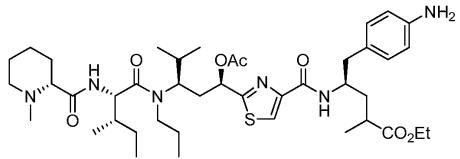


&lt;화학식 III-x&gt;



및

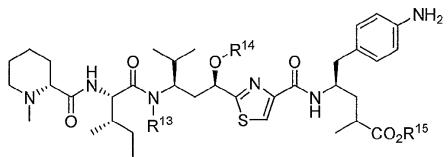
&lt;화학식 III-y&gt;



청구항 7

하기 화학식 II-c로 표시되는 구조를 갖는 화합물.

&lt;화학식 II-c&gt;



상기 식에서,  $R^{13}$ 은 Me, n-Pr,  $CH_2OMe$  또는  $CH_2OC(=O)CH_2CH(Me)_2$ 이고;  $R^{14}$ 는 Me 또는  $C(=O)Me$ 이고;  $R^{15}$ 는 H 또는  $C_1-C_5$  알킬이다.

청구항 8

항체에 접합된 제1항에 따른 화합물을 포함하는 접합체.

청구항 9

하기 화학식 IV로 표시되는 구조를 갖는 접합체.

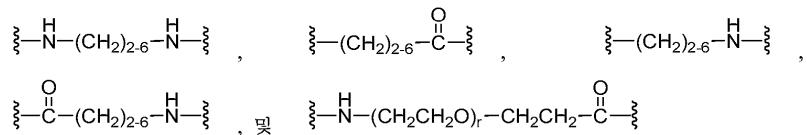
&lt;화학식 IV&gt;

 $[D(X^D)_a C(X^Z)_b]_m Z$ 

상기 식에서,

D는 제1항에 따른 화합물이고;

Z는 항체이고;

 $X^D$  및  $X^Z$ 는

로부터 선택되는 스페이서 기이고, 여기서 아래첨자 r은 1 내지 24이고;

C는 Val-Cit, Ala-Val, Val-Ala-Val, Lys-Lys, Ala-Asn-Val, Val-Leu-Lys, Cit-Cit, Val-Lys, Ala-Ala-Asn, Lys, Cit, Ser, 및 Glu로 이루어진 군으로부터 선택된 어느 하나의 아미노산 서열이고;

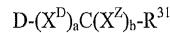
a 및 b 각각은 독립적으로 0 또는 1이고;

m은 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 또는 10이다.

### 청구항 10

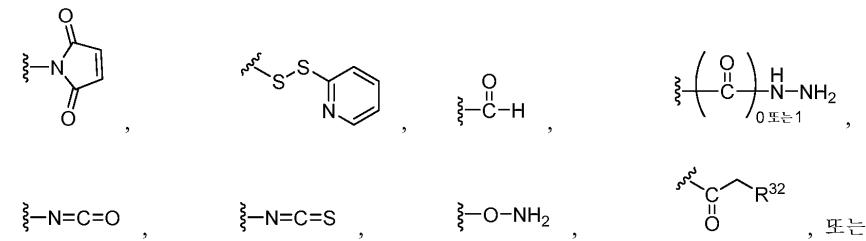
하기 화학식 V-a로 표시되는 구조를 갖는 화합물.

<화학식 V-a>



상기 식에서,

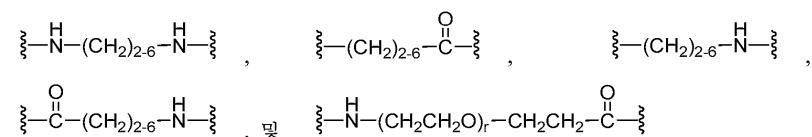
$R^{31}$ 은



$R^{32}$ 은  $C_1, Br, F, 메실레이트$  또는  $토실레이트$ 이고,  $R^{33}$ 은  $C_1, Br, I, F, OH, -O-N-$ 숙신  
이미딜,  $-O-(4-니트로페닐)$ ,  $-O-$ 펜타플루오로페닐, 또는  $-O-$ 테트라플루오로페닐이고;

D는 제1항에 따른 화합물이고;

$X^D$  및  $X^Z$ 는



로부터 선택되는 스페이서 기이고, 여기서 아래첨자 r은 1 내지 24이고;

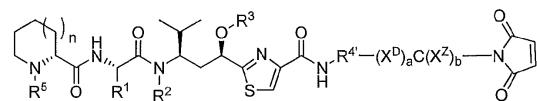
C는 Val-Cit, Ala-Val, Val-Ala-Val, Lys-Lys, Ala-Asn-Val, Val-Leu-Lys, Cit-Cit, Val-Lys, Ala-Ala-Asn, Lys, Cit, Ser, 및 Glu로 이루어진 군으로부터 선택된 어느 하나의 아미노산 서열이고;

a 및 b 각각은 독립적으로 0 또는 1이다.

### 청구항 11

하기 화학식 V-b로 표시되는 구조를 갖는 화합물.

<화학식 V-b>



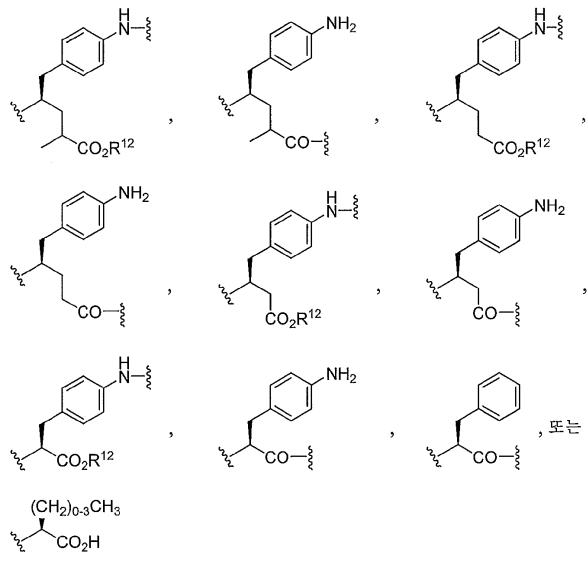
상기 식에서,

n은 0, 1 또는 2이고;

$R^1$ ,  $R^2$  및  $R^3$ 은 독립적으로  $H, C_1-C_{10}$  알킬,  $C_2-C_{10}$  알케닐,  $C_2-C_{10}$  알키닐, 아릴, 헤테로아릴,  $(CH_2)_{1-2}O(C_1-C_{10})$  알킬,  $(CH_2)_{1-2}O(C_2-C_{10})$  알케닐,  $(CH_2)_{1-2}O(C_2-C_{10})$  알키닐,  $(CH_2)_{1-2}OC(=O)(C_1-C_{10})$  알킬,  $(CH_2)_{1-2}OC(=O)(C_2-C_{10})$  알케닐,  $(CH_2)_{1-2}OC(=O)(C_2-C_{10})$  알키닐,  $C(=O)(C_1-C_{10})$  알킬,  $C(=O)(C_2-C_{10})$  알케닐,  $C(=O)(C_2-C_{10})$  알키닐, 시클로지

방족, 헤테로시클로지방족, 아릴알킬 또는 알킬아릴이고;

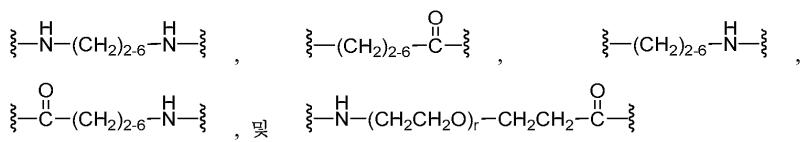
$R^4$  은



여기서  $R^{12}$ 는 H,  $C_1-C_5$  알킬,  $C_2-C_5$  알케닐 또는  $C_2-C_5$  알카닐이고;

$R^5$ 는 H,  $C_1-C_5$  알킬,  $C_2-C_5$  알케닐,  $C_2-C_5$  알카닐,  $CO(C_1-C_5$  알킬),  $CO(C_2-C_5$  알케닐) 또는  $CO(C_2-C_5$  알카닐)이고;

$X^D$  및  $X^Z$ 는



로부터 선택되는 스페이서 기이고, 여기서 아래첨자 r은 1 내지 24이고;

C는 Val-Cit, Ala-Val, Val-Ala-Val, Lys-Lys, Ala-Asn-Val, Val-Leu-Lys, Cit-Cit, Val-Lys, Ala-Ala-Asn, Lys, Cit, Ser, 및 Glu로 이루어진 군으로부터 선택된 어느 하나의 아미노산 서열이고;

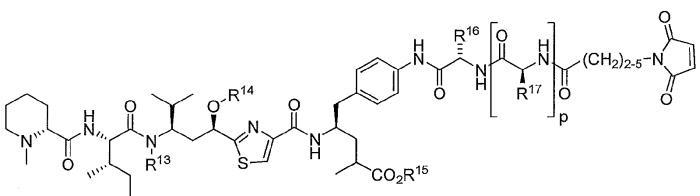
a 및 b는 독립적으로 0 또는 1이고;

여기서 기  $R^4$ 은 그의 카르복실 또는 아민 기를 통해 a가 1인 경우에는 기  $X^D$ 에, 또는 a가 0인 경우에는 기 C에 연결된다.

## 청구항 12

하기 화학식 V-d로 표시되는 구조를 갖는 화합물.

<화학식 V-d>



상기 식에서,  $R^{13}$ 은 Me, n-Pr,  $CH_2OMe$  또는  $CH_2OC(=O)CH_2CH(Me)_2$ 이고;  $R^{14}$ 는 Me 또는  $C(=O)Me$ 이고;  $R^{15}$ 는 H 또는

$C_1$ - $C_5$  알킬이고;  $R^{16}$ 은  $(CH_2)_4NH_2$  또는  $(CH_2)_3NHC(=O)NH_2$ 이고;  $R^{17}$ 은  $C(Me)_2$  또는  $Me$ 이고;  $p$ 는 0 또는 1이다.

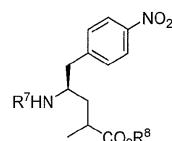
### 청구항 13

치료 유효량의 제1항에 따른 화합물 또는 그의 항체와의 접합체를 포함하는, 암을 앓고 있는 대상체에서 암을 치료하기 위한 제약 조성물.

### 청구항 14

하기 화학식 VIII-a에 따른 구조를 갖는 화합물.

<화학식 VIII-a>

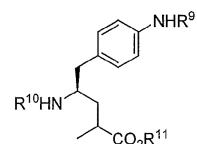


상기 식에서,  $R^7$ 은 H, 또는 Boc (t-부톡시카르보닐), Troc (2,2,2-트리클로로에톡시 카르보닐), Bpoc ((1-메틸-1-(4-비페닐)에톡시카르보닐)), Cbz (벤질옥시 카르보닐), Aloc (알릴옥시카르보닐), 및 Fmoc (9-플루오레닐메톡시카르보닐)로부터 선택되는 아민 보호기이고,  $R^8$ 은 H,  $C_1$ - $C_{10}$  알킬,  $C_2$ - $C_{10}$  알케닐,  $C_2$ - $C_{10}$  알키닐, 아릴, 시클로지방족, 알킬시클로지방족, 아릴알킬 또는 알킬아릴이다.

### 청구항 15

하기 화학식 VIII-b에 따른 구조를 갖는 화합물.

<화학식 VIII-b>

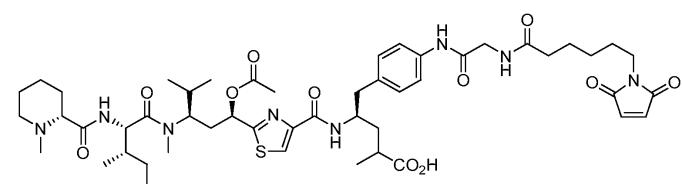


상기 식에서,  $R^9$  및  $R^{10}$ 은 독립적으로 H, 또는 Boc (t-부톡시카르보닐), Troc (2,2,2-트리클로로에톡시 카르보닐), Bpoc ((1-메틸-1-(4-비페닐)에톡시카르보닐)), Cbz (벤질옥시 카르보닐), Aloc (알릴옥시카르보닐), 및 Fmoc (9-플루오레닐메톡시카르보닐)로부터 선택되는 아민 보호기이고,  $R^{11}$ 은 H,  $C_1$ - $C_{10}$  알킬,  $C_2$ - $C_{10}$  알케닐,  $C_2$ - $C_{10}$  알키닐, 아릴, 시클로지방족, 알킬시클로지방족, 아릴알킬 또는 알킬아릴이다.

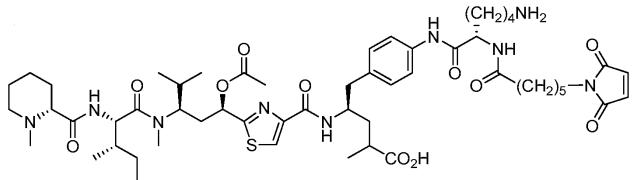
### 청구항 16

하기 화학식 VI-a 내지 VI-t로 이루어진 군으로부터 선택되는 구조를 갖는 화합물.

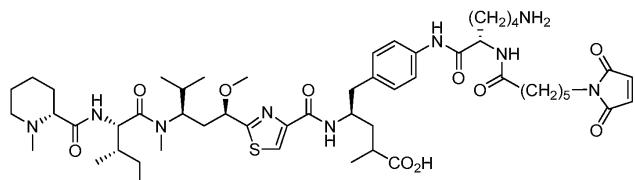
<화학식 VI-a>



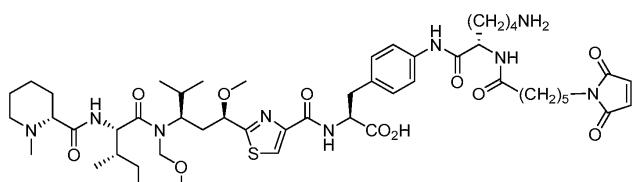
&lt;화학식 VI-b&gt;



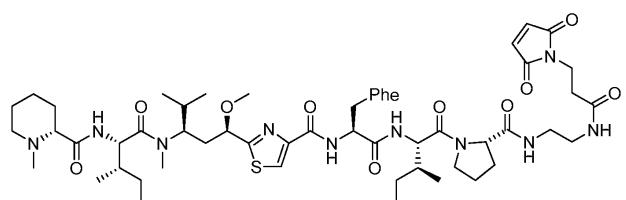
&lt;화학식 VI-c&gt;



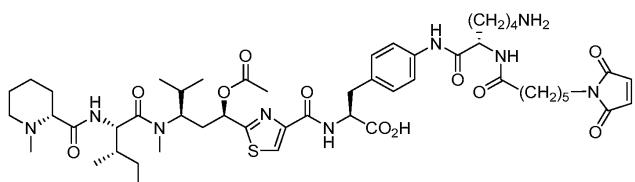
&lt;화학식 VI-d&gt;



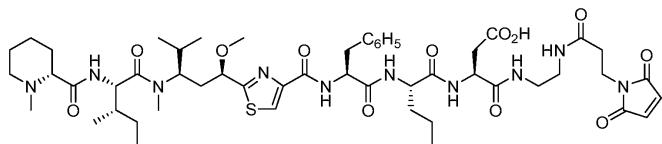
&lt;화학식 VI-e&gt;



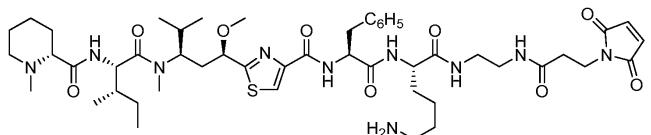
&lt;화학식 VI-f&gt;



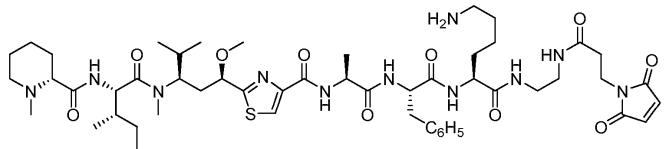
&lt;화학식 VI-g&gt;



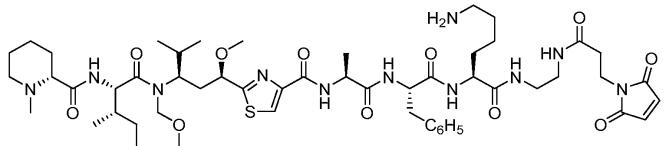
&lt;화학식 VI-h&gt;



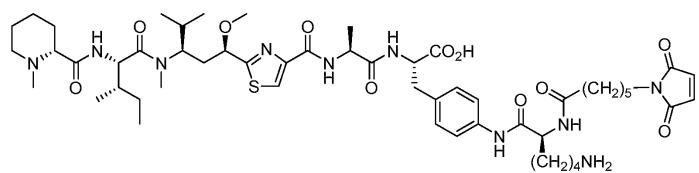
&lt;화학식 VI-i&gt;



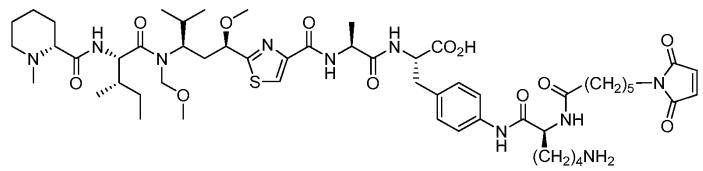
&lt;화학식 VI-j&gt;



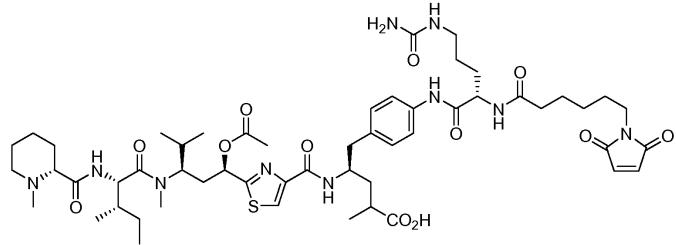
&lt;화학식 VI-k&gt;



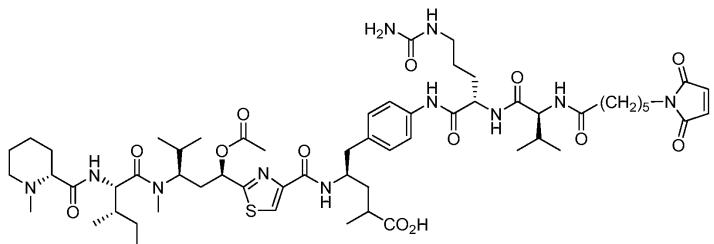
&lt;화학식 VI-l&gt;



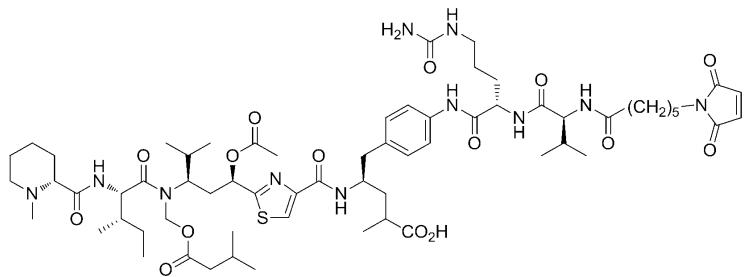
&lt;화학식 VI-m&gt;



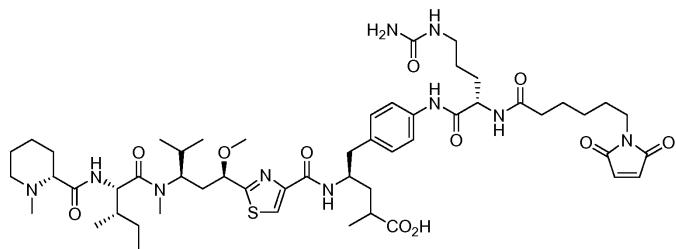
&lt;화학식 VI-n&gt;



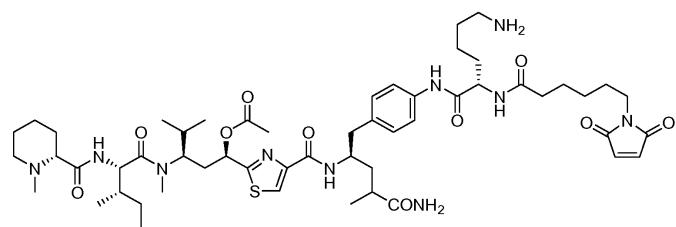
&lt;화학식 VI-o&gt;



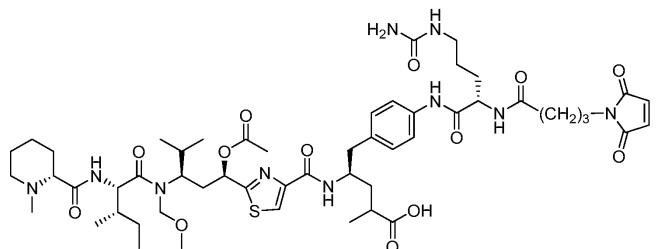
&lt;화학식 VI-p&gt;



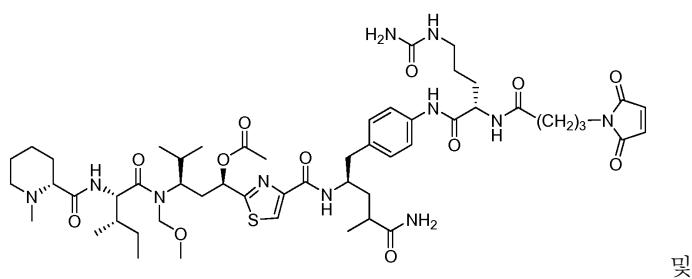
&lt;화학식 VI-q&gt;



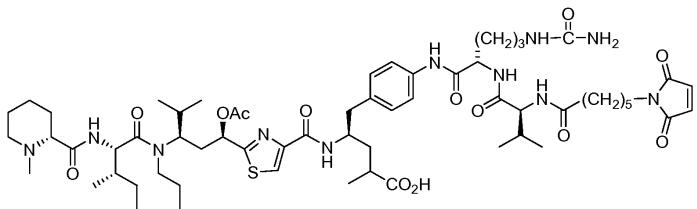
&lt;화학식 VI-r&gt;



&lt;화학식 VI-s&gt;



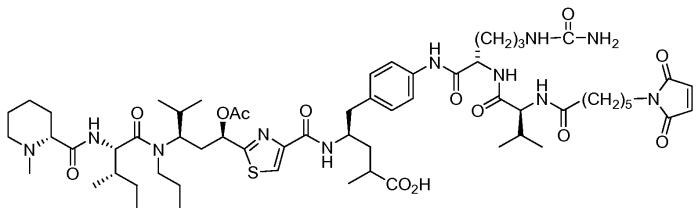
&lt;화학식 VI-t&gt;



청구항 17

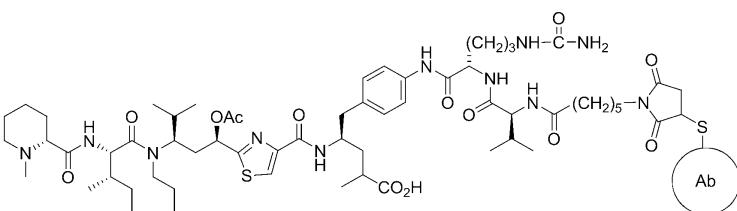
제16항에 있어서, 화학식 VI-t로 표시되는 구조를 갖는 화합물.

&lt;화학식 VI-t&gt;



청구항 18

하기 구조를 갖는 접합체.



상기 구조에서, Ab는 항체이다.

청구항 19

제18항에 있어서, 항체 Ab가 항-메소텔린 항체인 접합체.

### 발명의 설명

#### 기술 분야

[0001]

본 발명은 튜부리신과 구조적으로 관련된 화합물, 그의 리간드와의 접합체, 이러한 화합물 및 접합체의 제조 및 이용 방법, 및 이러한 화합물 및 접합체를 포함하는 조성물에 관한 것이다.

#### 배경 기술

[0002]

튜부리신은 본래 믹소박테리아 아르칸기움 게피라(*Archangium gephyra*) 또는 안기오코쿠스 디시포르미스(*Angiococcus disciformis*)의 배양물로부터 단리된 세포독소로, 각각의 유기체는 상이한 튜부리신 혼합물을 생산한다 (문헌 [Sasse et al., 2000]; [Reichenbach et al., 1998]). 이들의 결정 구조 및 생합성 경로는 밝혀져 있으며 (문헌 [Steinmetz et al., 2004]), 이들의 생합성 유전자의 서열이 밝혀졌다 (문헌 [Hoefle et al., 2006b]). 튜부리신의 생합성 전구체인 전튜부리신 또한 그 고유의 상당한 활성을 보유하는 것으로 밝혀졌다 (문헌 [Ullrich et al., 2009]). (첫번째 저자 또는 본 발명자들 및 년수에 의해 본원에서 인용되는 문헌의 완전한 인용문은 본 명세서의 말미에 열거됨).

[0003]

튜부리신은 포톱신, 돌라스타틴 및 크립토피신을 포함하는, 자연 발생 항유사분열 폴리펩티드 및 텝시펩티드 그

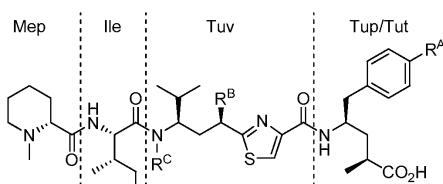
룹에 속한다 (문헌 [Hamel 2002]). 폴리펩티드 또는 템시펩티드 이외의 항유사분열제가 또한 존재하며, 예를 들어 파클리탁셀, 메이탄신 및 에포탈론이 있다. 유사분열 동안 세포의 미세소관은 재편성되어 유사분열 방추를 형성하는데, 이는 미세소관 구성 단백질  $\alpha$ - 및  $\beta$ -튜불린의 신속한 조립 및 분리에 요구되는 과정이다. 분자적 수준에서의 정확한 차단 메카니즘은 작용제마다 서로 다를 수 있지만, 항유사분열제는 이러한 과정을 차단하고, 세포가 유사분열되는 것을 막는다. 튜부리신은 튜불린이 미세소관으로 조립되는 것을 막아, 영향을 받은 세포가  $G_2/M$  기에서 축적되고 아폽토시스를 겪게 만든다 (문헌 [Khalil et al., 2006]). 반대로, 파클리탁셀은 미세소관에 결합하여 그의 분해를 막음으로써 동일한 결과를 야기한다.

[0004]

튜부리신은 1개의 단백질생성 아미노산 서브유닛 및 3개의 비-단백질생성 아미노산 서브유닛: N-메틸피페콜린산 (Mep), 이소류신 (Ile), 튜부발린 (tuv), 및 튜부페닐알라닌 (Tup, 이하의 화학식 I에서  $R^A$ 가 H) 또는 튜부티로신 (Tut,  $R^A$ 가 OH)으로 구축된 테트라펩티딜 스캐폴드를 갖는다. 약 12개의 자연 발생 튜부리신 (A, B 등으로 명명됨)이 공지되어 있고, 이들의 구조적 변이 부위는 화학식 I 및 표 1에 나타낸 바와 같이 잔기  $R^A$ ,  $R^B$  및  $R^C$ 이다:

[0005]

&lt;화학식 I&gt;



[0006]

표 1

자연 발생 튜부리신			
튜부리신	$R^A$	$R^B$	$R^C$
A	OH	OC(=O)Me	CH <sub>2</sub> OC(=O)i-Bu
B	OH	OC(=O)Me	CH <sub>2</sub> OC(=O)n-Pr
C	OH	OC(=O)Me	CH <sub>2</sub> OC(=O)Et
D	H	OC(=O)Me	CH <sub>2</sub> OC(=O)i-Bu
E	H	OC(=O)Me	CH <sub>2</sub> OC(=O)n-Pr
F	H	OC(=O)Me	CH <sub>2</sub> OC(=O)Et
G	OH	OC(=O)Me	CH <sub>2</sub> OC(=O)CH=CH <sub>2</sub>
H	H	OC(=O)Me	CH <sub>2</sub> OC(=O)Me
I	OH	OC(=O)Me	CH <sub>2</sub> OC(=O)Me
U	H	OC(=O)Me	H
V	H	OH	H
Z	OH	OH	H
전튜부리신	H	H	Me

[0007]

[0008]

문헌 [Kaur et al., 2006]은 튜부리신 A의 항증식 특성을 연구하였고, 이것이 파클리텍셀 및 빈블라스틴과 같은 다른 항유사분열제 보다 더 강력하며 이종이식 검정에서 다양한 암 세포주에 대해 활성임을 발견하였다. 또한, 튜부리신 A는 정상 세포에서와 달리 암 세포에서 아폽토시스를 유도하였고, 시험관내 검정에서 유의한 잠재적인 항혈관신생 특성을 나타내었다. 또한, 다른 튜부리신의 항유사분열 특성이 평가되고 있고, 일반적으로 비-튜부리신 항유사분열제의 그것과 바람직하게 비슷한 것으로 확인되었다 (예를 들어, 문헌 [Balasubramanian et al., 2009]; [Steinmetz et al., 2004]; [Wipf et al., 2004] 참조). 이러한 이유로, 항암제로서 튜부리신에 대해 상당한 관심이 존재한다 (예를 들어, 문헌 [Domling et al., 2005c]; [Hamel 2002] 참조).

[0009]

문헌 [Balasubramanian et al., 2009]; [Domling et al., 2006]; [Hoefle et al., 2003]; [Neri et al., 2006]; [Peltier et al., 2006]; [Sani et al., 2007]; [Sasse et al., 2007]; [Shankar et al., 2009]; [Shibue et al., 2009]; 및 [Wipf et al., 2004]을 비롯하여 수많은 간행물들이 튜부리신을 합성하기 위한 노

력을 기재하고 있다. 그 밖의 간행물들은 투부리신 유사체 또는 유도체의 제조 및 평가를 통해 구조-활성 관계 (SAR) 연구를 기재한다: 문헌 [Balasubramanian et al., 2008 and 2009]; [Domling 2006]; [Domling et al., 2005a]; [Ellman et al., 2009]; [Hoefle et al., 2001 & 2006a]; [Patterson et al., 2007 & 2008]; [Richter 2008]; [Vlahov et al., 2009]; [Wang et al., 2007]; 및 [Wipf et al., 2007 and 2010]. SAR 연구는 주로 Mep 고리, Tuv 서브유닛의 잔기 R<sup>B</sup> 및 R<sup>C</sup>, 및 Tup/Tut 서브유닛의 방향족 고리 또는 지방족 탄소 쇄에서의 구조적 변이를 연구한다.

[0010] 문헌 [Domling et al., 2005]은 일반적으로 중합체 또는 생체분자로 기재된 파트너 분자 (그러나 파트너 분자로서 실제 예가 폴리에틸렌 글리콜 (PEG)로 한정되는 것은 아님) 와의 투부리신의 접합체를 개시한다. 투부리신의 접합체를 개시하고 있는 다른 문헌으로는 문헌 [Boyd et al., 2008 and 2010]; [Vlahov et al., 2008a, 2008b and 2010]; [Leamon et al., 2008 and 2009]; [Reddy et al., 2009]; 및 [Low et al., 2009]이 있다. 문헌 [Leung et al., 2002]은 생물활성 및 수용해성을 개선시키기 위해 약물 (투부리신을 포함)에 접합될 수 있는 다가음이온 폴리펩티드를 개시한다.

[0011] 문헌 [Davis et al., 2008] 및 [Schluep et al., 2009]은 투부리신이 Tup/Tut 카르복실 기에 결합된 히드라지드-디슬퍼드 링커 모이어티를 통해 시클로덱스트린에 공유적으로 부착되어 있는 시클로덱스트린 기체의 제제를 개시한다.

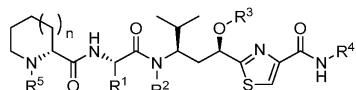
### 발명의 내용

[0012] 발명의 간단한 요약

[0013] 본 발명은 투부리신과 구조적으로 관련이 있고, 많은 암 세포에 대해 세포독성 또는 세포증식 억제성이며, 항유사분열 메카니즘에 의해 작용하는 것으로 여겨지는 신규한 항증식성 화합물을 개시한다. 이를 화합물은 암 세포에 대한 전달을 표적화하기 위해 항체와 같은 리간드에 접합될 수 있다.

[0014] 한 실시양태에서, 본 발명은 하기 화학식 II로 표시되는 구조를 갖는 화합물 또는 그의 제약상 허용되는 에스테르, R<sup>4</sup>의 카르복실 기에서 α-아미노산의 α-아미노 기를 갖는 그의 제약상 허용되는 아미드, 또는 그의 제약상 허용되는 염을 제공하며,

[0015] <화학식 II>



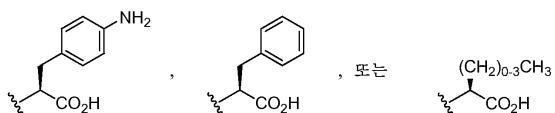
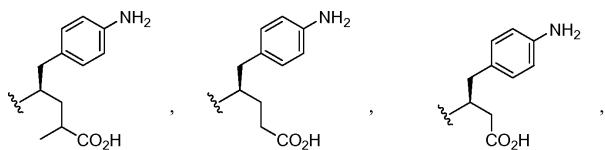
[0016]

[0017] 상기 식에서,

[0018] n은 0, 1 또는 2이고;

[0019] R<sup>1</sup>, R<sup>2</sup> 및 R<sup>3</sup>은 독립적으로 H, 비치환 또는 치환된 C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub> 알킬, 비치환 또는 치환된 C<sub>2</sub>-C<sub>10</sub> 알케닐, 비치환 또는 치환된 C<sub>2</sub>-C<sub>10</sub> 알키닐, 비치환 또는 치환된 아릴, 비치환 또는 치환된 헤테로아릴, 비치환 또는 치환된 (CH<sub>2</sub>)<sub>1-2</sub>O(C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub> 알킬), 비치환 또는 치환된 (CH<sub>2</sub>)<sub>1-2</sub>O(C<sub>2</sub>-C<sub>10</sub> 알케닐), 비치환 또는 치환된 (CH<sub>2</sub>)<sub>1-2</sub>O(C<sub>2</sub>-C<sub>10</sub> 알키닐), (CH<sub>2</sub>)<sub>1-2</sub>OC(=O)(C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub> 알킬), 비치환 또는 치환된 (CH<sub>2</sub>)<sub>1-2</sub>OC(=O)(C<sub>2</sub>-C<sub>10</sub> 알케닐), 비치환 또는 치환된 (CH<sub>2</sub>)<sub>1-2</sub>OC(=O)(C<sub>2</sub>-C<sub>10</sub> 알키닐), 비치환 또는 치환된 C(=O)(C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub> 알킬), 비치환 또는 치환된 C(=O)(C<sub>2</sub>-C<sub>10</sub> 알케닐), 비치환 또는 치환된 C(=O)(C<sub>2</sub>-C<sub>10</sub> 알키닐), 비치환 또는 치환된 시클로지방족, 비치환 또는 치환된 헤테로시클로지방족, 비치환 또는 치환된 아릴알킬, 또는 비치환 또는 치환된 알킬아릴이고;

[0020] R<sup>4</sup>는

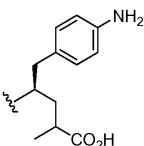


[0021]

[0022]  $R^5$ 는 H,  $C_1-C_5$  알킬,  $C_2-C_5$  알케닐,  $C_2-C_5$  알키닐,  $CO(C_1-C_5$  알킬),  $CO(C_2-C_5$  알케닐) 또는  $CO(C_2-C_5$  알키닐)이다.

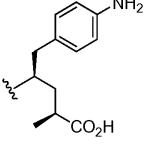
[0023]

바람직한  $R^4$ 는 카르복실에 대해 메틸 기 알파에서 입체화학을 갖는



[0024]

이며, 보다 바람직한 것은 천연 투부리신에 상응하는 것, 즉:



[0025]

이다.

[0026] 본 발명은 또한 화학식 II에 따른 화합물을 합성하는데 유용한 신규 중간체를 제공한다.

[0027]

또 다른 실시양태에서, 본 발명은 암 세포와 같은 표적 세포에의 선택적 전달을 위해 링커 모이어티를 통해 리간드 (바람직하게는 항체, 보다 바람직하게는 모노클로날 항체, 가장 바람직하게는 인간 모노클로날 항체)에 접합된 본 발명의 화합물을 제공한다.

[0028]

또 다른 실시양태에서, 본 발명의 화합물 및 리간드에의 접합에 적합한 링커 모이어티를 포함하는 물질 조성물을 제공한다.

[0029]

또 다른 실시양태에서, 본 발명은 암을 앓고 있는 대상체에게 치료 유효량의 본 발명의 화합물 또는 그의 리간드 (특히 항체)와의 접합체를 투여하는 것을 포함하는, 상기 대상체에서 암 세포의 증식을 억제하는 방법을 제공한다. 또 다른 실시양태에서, 암 세포를 본 발명의 화합물 또는 그의 리간드 (특히 항체)와의 접합체와 암 세포의 성장을 억제하는데 충분한 조건하에서 접촉시키는 것을 포함하는, 암 세포의 증식을 억제하는 방법을 제공한다. 암 세포는 결장직장암, 간암, 전립선암, 유방암, 흑색종, 교모세포종, 폐암, 췌장암, 난소암, 다발성 골수종, 신암, 백혈병 또는 림프종 세포일 수 있다. 리간드가 항체일 경우, 항체는 암 세포에 의해 발현되는 항원에 결합하는 것이 바람직하다.

[0030]

또 다른 실시양태에서, 암을 앓고 있는 대상체에게 치료 유효량의 본 발명의 화합물 또는 그의 리간드 (특히 항체)와의 접합체를 투여하는 것을 포함하는, 상기 대상체에서 암을 치료하는 방법을 제공한다. 또 다른 실시양태에서, 암 치료용 의약을 제조하기 위한 본 발명의 화합물 (또는 그의 리간드 (특히 항체)와의 접합체)의 용도를 제공한다. 이들 실시양태에서, 암은 결장직장암, 간암, 전립선암, 유방암, 흑색종, 교모세포종, 폐암, 췌장암, 난소암, 다발성 골수종, 신암, 백혈병 또는 림프종일 수 있다. 리간드가 항체일 경우, 항체는 암 세포에 의해 발현되는 항원에 결합하는 것이 바람직하다.

[0031]

또 다른 실시양태에서, 암을 앓고 있는 대상체에서 암을 치료하기 위한 의약을 제조하기 위한 본 발명의 화합물 또는 그의 리간드 (특히 항체)와의 접합체의 용도를 제공한다.

### 도면의 간단한 설명

[0032]

도 1a 및 1b는 함께 본 발명의 화합물을 제조하기 위한 반응식 1을 도시한다.

도 2 및 3은 또한 각각 본 발명의 화합물을 제조하기 위한 반응식 2 및 3을 도시한다.

도 4는 본 발명의 화합물에 텐티딜 링커 및 말레이미드 반응성 기를 부착시키는데 적합한 반응식 4를 도시한다.

도 5, 6 및 7은 각각 본 발명의 화합물을 제조하기 위한 반응식 5, 6 및 7을 도시한다.

도 8a, 8b 및 8c는 각각 본 발명의 화합물을 제조하는데 유용한 중간체를 제조하기 위한 반응식 8, 9 및 10을 나타낸다.

도 9 및 10은 각각 도 8a-8c에 나타낸 바와 같은 중간체로 어떻게 본 발명의 화합물을 만들 수 있는지를 설명하는 반응식 11 및 12를 나타낸다.

도 11a 및 11b는 2종의 상이한 유형의 암 세포에 대한 본 발명의 제1 세트의 화합물에 대한  $^3\text{H}$  티미딘 증식 검정의 플롯을 나타낸다.

도 12a 및 12b는 2종의 상이한 유형의 암 세포에 대한 본 발명의 제2 세트의 화합물에 대한 ATP 발광 증식 검정의 플롯을 나타낸다. 도 12c 및 12d는 동일한 2종의 유형의 암 세포에 대한 동일한 제2 세트의 화합물의  $^3\text{H}$  티미딘 증식 검정의 플롯을 나타낸다.

도 13은  $^3\text{H}$  티미딘 증식 검정에서 본 발명의 화합물의 접합체의 신암 세포에 대한 활성을 나타낸다.

도 14는 이종이식 연구에서 본 발명의 화합물의 접합체의 신암 세포에 대한 활성을 나타낸다.

도 15는 본 발명의 화합물을 제조하는데 유용한 중간체를 제조하기 위한 반응식 13을 나타낸다.

도 16은 반응식 13에 따라 제조된 중간체로부터 본 발명의 화합물을 제조하기 위한 반응식 14를 나타낸다.

도 17 및 18은 각각 본 발명의 접합-대비 화합물을 제조하기 위한 반응식 15 및 16을 나타낸다.

도 19는 본 발명의 화합물을 제조하는데 유용한 중간체를 제조하기 위한 반응식 17을 나타낸다.

도 20a 및 20b는 함께 반응식 17의 중간체로부터 본 발명의 화합물을 제조하기 위한 반응식 18을 나타낸다.

도 21은 반응식 18에 사용되는 중간체를 제조하기 위한 반응식 19를 나타낸다.

도 22는 본 발명의 화합물을 제조하는데 사용되는 중간체를 합성하기 위한 반응식 20을 나타낸다.

도 23은 반응식 20의 중간체로부터 본 발명의 화합물을 제조하기 위한 반응식 21을 나타낸다.

도 24는 본 발명의 화합물을 제조하는데 유용한 또 다른 중간체를 제조하기 위한 반응식 22를 나타낸다.

도 25는 반응식 22의 중간체로부터 본 발명의 화합물을 제조하기 위한 반응식 23을 나타낸다.

## 발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0033]

발명의 상세한 설명

[0034]

정의

[0035]

"항체"는 전체 항체 및 그의 임의의 항원 결합 단편 (즉, "항원-결합 부분") 또는 그의 단일쇄를 의미한다. 전체 항체는 디슬피드 결합에 의해 서로 연결된 적어도 2개의 중쇄 (H) 및 2개의 경쇄 (L)를 포함하는 당단백질이다. 각 중쇄는 중쇄 가변 영역 ( $V_{\text{H}}$ ) 및 3개의 도메인,  $C_{\text{H}1}$ ,  $C_{\text{H}2}$  및  $C_{\text{H}3}$ 을 포함하는 중쇄 불변 영역을 포함한다. 각 경쇄는 경쇄 가변 영역 ( $V_{\text{L}}$  또는  $V_{\text{k}}$ ) 및 하나의 단일 도메인  $C_{\text{L}}$ 을 포함하는 경쇄 불변 영역을 포함한다.  $V_{\text{H}}$  및  $V_{\text{L}}$  영역은 보다 보존된 프레임워크 영역 (FR) 사이에 배치된 상보성 결정 영역 (CDR)이라 불리는 초가변 영역으로 추가로 세분될 수 있다. 각각의  $V_{\text{H}}$  및  $V_{\text{L}}$ 은 3개의 CDR 및 4개의 FR을 포함하며, 아미노-에서 카르복시-말단으로 다음과 같은 순서로 배열된다: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, 및 FR4. 가변 영역은 항원과 상호 작용하는 결합 도메인을 함유한다. 불변 영역은 면역계의 다양한 세포 (예를 들어, 이펙터 세포) 및 전통적인 보체 시스템의 제1 성분 (Clq)을 비롯하여 항체의 숙주 조직 또는 인자에 대한 결합을 매개할 수 있다. 항체는 항체가 항원 X에  $5 \times 10^{-8}$  M 이하, 보다 바람직하게는  $1 \times 10^{-8}$  M 이하, 보다 바람직하게는  $6 \times 10^{-9}$  M 이하, 보다 바람직하게는  $3 \times 10^{-9}$  M 이하, 보다 더 바람직하게는  $2 \times 10^{-9}$  M 이하의  $K_D$ 로 결합하는 경우에, 항원 X에 "특이적으로 결합한다"로 일컬어진다. 항체는 키메라 항체, 인간화 항체, 또는 바람직하게는 인간 항체일 수

있다. 중쇄 불변 영역은 글리코실화 유형 또는 정도에 영향을 미치기 위해, 항체 반감기를 연장시키기 위해, 이펩티 세포 또는 보체 시스템과의 상호작용을 증강 또는 감소시키기 위해, 또는 다른 특성을 어느 정도 조절하기 위해 조작될 수 있다. 조작은 하나 이상의 아미노산을 치환, 부가 또는 결실시키는 것에 의해 또는 도메인을 다른 이谬노글로불린 유형으로부터의 도메인으로 치환시키는 것에 의해 또는 상기한 것의 조합에 의해 달성될 수 있다.

[0036] 항체의 "항체 단편" 및 "항원-결합 부분" (또는 간단히 "항체 부분")은 항원에 특이적으로 결합하는 능력을 보유하는 하나 이상의 항체 단편을 의미한다. 항체의 항원-결합 기능은 전장 항체의 단편, 예컨대 (i)  $V_L$ ,  $V_H$ ,  $C_L$  및  $C_{H1}$  도메인으로 이루어진 1가 단편인 Fab 단편; (ii) 헌지 영역에서 디슬피드 가교에 의해 연결된 2개의 Fab 단편을 포함하는 2가 단편인  $F(ab')_2$  단편; (iii) 헌지 영역 부분을 갖는 본질적으로 Fab인 Fab' 단편 (예를 들어, 문헌 [Abbas et al., Cellular and Molecular Immunology, 6th Ed., Saunders Elsevier 2007] 참조); (iv)  $V_H$  및  $C_{H1}$  도메인으로 이루어진 Fd 단편; (v) 항체의 단일 아암의  $V_L$  및  $V_H$  도메인으로 이루어진 Fv 단편, (vi)  $V_H$  도메인으로 이루어진 dAb 단편 (문헌 [Ward et al., (1989) Nature 341:544-546]); (vii) 단리된 상보성 결정 영역 (CDR); 및 (viii) 단일 가변 도메인 및 2개의 불변 도메인을 함유하는 중쇄 가변 영역인 나노바디에 의해 수행될 수 있는 것으로 밝혀졌다. 또한, Fv 단편의 2개의 도메인,  $V_L$  및  $V_H$ 는 개별 유전자에 의해 코딩되지만, 재조합 방법을 이용하여 이들을 단일 단백질 쇄로 만들 수 있는 합성 텁커에 의해 이들을 연결할 수 있으며, 이때  $V_L$  및  $V_H$  영역은 쌍을 형성하여 1가 분자를 형성한다 (단일쇄 Fv, 또는 scFv로 공지되어 있음; 예를 들어, 문헌 [Bird et al., (1988) Science 242:423-426]; 및 [Huston et al., (1988) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85:5879-5883] 참조). 이같은 단일쇄 항체도 또한 용어 항체의 "항원-결합 부분"에 포함된다.

[0037] "단리된 항체"는 상이한 항원 특이성을 갖는 다른 항체를 실질적으로 함유하지 않는 항체를 의미한다 (예를 들어, 항원 X에 특이적으로 결합하는 단리된 항체는 항원 X 이외의 항원에 특이적으로 결합하는 항체를 실질적으로 함유하지 않음). 항원 X에 특이적으로 결합하는 단리된 항체는, 그러나, 다른 항원, 예컨대 다른 종으로부터의 항원 X 분자에 교차 반응성을 가질 수는 있다. 특정 실시양태에서, 단리된 항체는 인간 항원 X에 특이적으로 결합하고, 다른 (비-인간) 항원 X 항원과는 교차 반응하지 않는다. 또한, 단리된 항체는 다른 세포성 물질 및/또는 화학물질을 실질적으로 함유하지 않을 수 있다.

[0038] "모노클로날 항체" 또는 "모노클로날 항체 조성물"은 단일 분자 조성의 항체 분자 제제를 의미하며, 특정 애피토프에 대해 단일 결합 특이성 및 친화성을 나타낸다.

[0039] "인간 항체"는 프레임워크 및 CDR 영역 (및 존재한다면, 불변 영역) 둘 모두가 인간 배선 이谬노글로불린 서열로부터 유래된 가변 영역을 갖는 항체를 의미한다. 인간 항체는 천연 또는 합성 변형을 비롯하여 후기 변형을 포함할 수 있다. 인간 항체는 인간 배선 이谬노글로불린 서열에 의해 코딩되지 않은 아미노산 잔기를 포함할 수 있다 (예를 들어, 시험관내 무작위 또는 부위 특이적 돌연변이유발 또는 생체내 체세포 돌연변이에 의해 도입된 돌연변이). 그러나, "인간 항체"에는 마우스와 같은 또 다른 포유동물 종의 배선으로부터 유래된 CDR 서열이 인간 프레임워크 서열에 이식된 항체는 포함되지 않는다.

[0040] "인간 모노클로날 항체"는 단일 결합 특이성을 나타내는 항체를 의미하며, 프레임워크 및 CDR 영역 둘 모두가 인간 배선 이谬노글로불린 서열로부터 유래된 가변 영역을 갖는다. 한 실시양태에서, 인간 모노클로날 항체는 불멸화 세포에 융합된 인간 중쇄 트랜스진 및 경쇄 트랜스진을 포함하는 게놈을 갖는 트랜스제닉 비인간 동물, 예를 들어 트랜스제닉 마우스로부터 수득된 B 세포를 포함하는 하이브리도마에 의해 생산된다.

[0041] "지방족"은 구체화된 수의 탄소 원자 (예를 들어,  $C_3$  지방족,  $C_1-C_5$  지방족, 또는  $C_1$  내지  $C_5$  지방족"에서와 같고, 후자의 2개의 어구는 1 내지 5개의 탄소 원자를 갖는 지방족 모이어티에 대한 동의어임), 또는 탄소 원자의 수가 분명하게 구체화되지 않은 경우에는, 1 내지 4개의 탄소 원자 (불포화된 지방족 모이어티의 예에서는 2 내지 4개의 탄소)를 갖는 직쇄 또는 분지쇄, 포화 또는 불포화된 비방향족 탄화수소 모이어티를 의미한다.

[0042] "알킬"은 포화된 지방족 모이어티를 의미하며, 적용가능한 탄소 원자의 수를 표기하기 위해 동일한 표기법을 갖는다. 예로서,  $C_1-C_4$  알킬 모이어티에는 메틸, 에틸, 프로필, 이소프로필, 이소부틸, t-부틸, 1-부틸, 2-부틸 등이 포함되지만, 이들로 한정되는 것은 아니다.

[0043] "알케닐"은 적어도 하나의 탄소-탄소 이중 결합을 갖는 지방족 모이어티를 의미하며, 적용가능한 탄소 원자의 수를 표기하기 위해 동일한 표기법을 갖는다. 예로서,  $C_2-C_4$  알케닐 모이어티에는 에테닐 (비닐), 2-프로페닐

(알릴 또는 프로프-2-에닐), 시스-1-프로페닐, 트랜스-1-프로페닐, E- (또는 Z-) 2-부테닐, 3-부테닐, 1,3-부타디에닐 (부트-1,3-디에닐) 등이 포함되지만, 이들로 한정되는 것은 아니다.

[0044] "알키닐"은 적어도 하나의 탄소-탄소 삼중 결합을 갖는 지방족 모이어티를 의미하며, 적용가능한 탄소 원자의 수를 표기하기 위해 동일한 표기법을 갖는다. 예로서, C<sub>2</sub>-C<sub>4</sub> 알키닐 기에는 에티닐 (아세틸레닐), 프로파르길 (프로프-2-이닐), 1-프로피닐, 부트-2-이닐 등이 포함된다.

[0045] "시클로지방족"은 1 내지 3개의 고리를 갖고, 각각의 고리는 3 내지 8개 (바람직하게는 3 내지 6개)의 탄소 원자를 갖는 포화 또는 불포화된 비방향족 탄화수소 모이어티를 의미한다. "시클로알킬"은 각 고리가 포화된 시클로지방족 모이어티를 의미한다. "시클로알케닐"은 적어도 하나의 고리가 적어도 하나의 탄소-탄소 이중 결합을 갖는 시클로지방족 모이어티를 의미한다. "시클로알키닐"은 적어도 하나의 고리가 적어도 하나의 탄소-탄소 삼중 결합을 갖는 시클로지방족 모이어티를 의미한다. 예로서, 시클로지방족 모이어티에는 시클로프로필, 시클로부틸, 시클로펜틸, 시클로펜테닐, 시클로헥실, 시클로헥세닐, 시클로헵틸, 시클로옥틸 및 아다만틸이 포함되지만, 이들로 한정되는 것은 아니다. 바람직한 시클로지방족 모이어티는 시클로알킬 모이어티, 특히 시클로프로필, 시클로부틸, 시클로펜틸 및 시클로헥실이다.

[0046] "헤테로시클로지방족"은 그의 적어도 하나의 고리 내에서 최대 3개 (바람직하게는 1 내지 2개)의 탄소가 N, O, 또는 S로부터 독립적으로 선택된 헤테로원자에 의해 치환된 시클로지방족 모이어티를 의미한다 (여기서 N 및 S는 임의로 산화될 수 있으며 N은 임의로 4급화될 수 있음). 유사하게, "헤테로시클로알킬", "헤테로시클로알케닐", 및 "헤테로시클로알키닐"은 각각 이들의 적어도 하나의 고리가 위와 같이 변형된 시클로알킬, 시클로알케닐, 또는 시클로알키닐 모이어티를 의미한다. 예시적인 헤테로시클로지방족 모이어티에는 아지리디닐, 아제티디닐, 1,3-디옥사닐, 옥세타닐, 테트라하이드로푸릴, 피롤리디닐, 피페리디닐, 피페라지닐, 테트라하이드로파라닐, 테트라하이드로티오피라닐, 테트라하이드로티오피라닐 술폰, 모르폴리닐, 티오모르폴리닐, 티오모르폴리닐 술록시드, 티오모르폴리닐 술폰, 1,3-디옥솔라닐, 테트라하이드로-1,1-디옥소티에닐, 1,4-디옥사닐, 티에타닐 등이 포함된다.

[0047] "알콕시", "아릴옥시", "알킬티오" 및 "아릴티오"는 각각 -O(알킬), -O(아릴), -S(알킬), 및 -S(아릴)을 의미한다. 예로는 각각 메톡시, 폐녹시, 메틸티오와 폐닐티오가 있다.

[0048] "할로겐" 또는 "할로"는 플루오린, 염소, 브로민 또는 아이오딘을 의미한다.

[0049] "아릴"은 모노-, 비- 또는 트리시클릭 고리계를 갖는 탄화수소 모이어티를 의미하며, 여기서 각 고리는 3 내지 7개의 탄소 원자를 갖고, 적어도 하나의 고리는 방향족이다. 고리계의 고리는 서로 융합될 수 있거나 (나프틸에서와 같음) 또는 서로 결합될 수 있으며 (비페닐에서와 같음), 비방향족 고리와 융합 또는 결합될 수 있다 (인다닐 또는 시클로헥실페닐에서와 같음). 추가의 예로서, 아릴 모이어티에는 폐닐, 나프틸, 테트라하이드로나프틸, 인다닐, 비페닐, 폐난트릴, 안트라세닐 및 아세나프틸이 포함되지만, 이들로 한정되는 것은 아니다.

[0050] "헤테로아릴"은 모노-, 비- 또는 트리시클릭 고리계를 갖는 모이어티를 의미하며, 여기서 각 고리는 3 내지 7개의 탄소 원자를 갖고, 적어도 하나의 고리는 N, O, 또는 S로부터 독립적으로 선택된 1 내지 4개의 헤테로원자를 함유하는 방향족 고리이다 (여기서 N 및 S는 임의로 산화될 수 있으며 N은 임의로 4급화될 수 있음). 이같이 적어도 하나의 헤테로원자를 함유하는 방향족 고리는 다른 유형의 고리와 융합될 수 있거나 (벤조푸라닐 또는 테트라하이드로이소퀴놀릴에서와 같음) 또는 다른 유형의 고리와 직접 결합될 수 있다 (페닐피리딜 또는 2-시클로펜틸피리딜에서와 같음). 추가의 예로서, 헤테로아릴 모이어티에는 피롤릴, 푸라닐, 티오페닐 (티에닐), 이미다졸릴, 피라졸릴, 옥사졸릴, 이속사졸릴, 티아졸릴, 이소티아졸릴, 트리아졸릴, 테트라졸릴, 피리딜, N-옥소피리딜, 피리다지닐, 피리미디닐, 피라지닐, 퀴놀리닐, 이소퀴놀리닐, 퀴나졸리닐, 신놀리닐, 퀴노잘리닐, 나프티리디닐, 벤조푸라닐, 인돌릴, 벤조티오페닐, 옥사디아졸릴, 티아디아졸릴, 폐노티아졸릴, 벤즈이미다졸릴, 벤조트리아졸릴, 디벤조푸라닐, 카르바졸릴, 디벤조티오페닐, 아크리디닐 등이 포함된다.

[0051] "치환 또는 비치환된 C<sub>1</sub>-C<sub>5</sub> 알킬" 또는 "임의로 치환된 헤테로아릴"에서와 같은 어구로 "치환 또는 비치환된" 또는 "임의로 치환된"을 사용하여 모이어티가 치환될 수 있다고 표시된 경우, 이같은 모이어티는 독립적으로 선택된 하나 이상의 치환기, 바람직하게는 개수상 1 내지 5개, 보다 바람직하게는 개수상 1 또는 2개의 치환기를 가질 수 있다. 치환기 및 치환 패턴은, 화학적으로 안정하고 당업계에 공지된 기술 뿐만 아니라 본원에서 언급하는 방법에 의해 합성될 수 있는 화합물을 제공하기 위해, 치환기가 부착되는 모이어티에 대해 관심이 있는 당업자가 선택할 수 있다.

[0052]

"아릴알킬", (헵테로시클로지방족)알킬", "아릴알케닐", "아릴알키닐", "비아릴알킬" 등은, 경우에 따라 아릴, 헵테로시클로지방족, 비아릴 등의 모이어티에 의해 치환된, 경우에 따라 알킬, 알케닐, 또는 알키닐 모이어티에서 개방 (불완전) 원자가를 갖는 (예를 들어 벤질, 페네틸, N-이미다조일에틸, N-모르폴리노에틸 등에서와 같음) 알킬, 알케닐, 또는 알키닐 모이어티를 의미한다. 반대로, "알킬아릴", "알케닐시클로알킬" 등은 경우에 따라 알킬, 알케닐 등의 모이어티에 의해 치환된, 경우에 따라 예를 들어 메틸페닐 (톨릴) 또는 알릴시클로헥실에서와 같은 아릴, 시클로알킬 등의 모이어티를 의미한다. "히드록시알킬", "할로알킬", "알킬아릴", "시아노아릴" 등은 경우에 따라 하나 이상의 확인된 치환기 (경우에 따라 히드록실, 할로 등)로 치환된 알킬, 아릴 등의 모이어티를 의미한다.

[0053]

예로서, 허용가능한 치환기에는 알킬 (특히 메틸 또는 에틸), 알케닐 (특히 알릴), 알키닐, 아릴, 헵테로아릴, 시클로지방족, 헵테로시클로지방족, 할로 (특히 플루오로), 할로알킬 (특히 트리플루오로메틸), 히드록실, 히드록시알킬 (특히 히드록시에틸), 시아노, 니트로, 알콕시, -O(히드록시알킬), -O(할로알킬) (특히  $-OCF_3$ ), -O(시클로알킬), -O(헵테로시클로알킬), -O(아릴), 알킬티오, =O, =NH, =N(알킬), =NOH, =NO(알킬), -C(=O)(알킬), -C(=O)H, -CO<sub>2</sub>H, -C(=O)NOH, -C(=O)O(알킬), -C(=O)O(히드록시알킬), -C(=O)NH<sub>2</sub>, -C(=O)NH(알킬), -C(=O)N(알킬)<sub>2</sub>, -OC(=O)(알킬), -OC(=O)(히드록시알킬), -OC(=O)O(알킬), -OC(=O)O(히드록시알킬), -OC(=O)NH<sub>2</sub>, -OC(=O)NH(알킬), -OC(=O)N(알킬)<sub>2</sub>, 아지도, -NH<sub>2</sub>, -NH(알킬), -N(알킬)<sub>2</sub>, -NH(아릴), -NH(히드록시알킬), -NHC(=O)(알킬), -NHC(=O)H, -NHC(=O)NOH, -NHC(=O)NH(알킬), -NHC(=O)N(알킬)<sub>2</sub>, -NHC(=NH)NH<sub>2</sub>, -OSO<sub>2</sub>(알킬), -SH, -S(알킬), -S(시클로알킬), -S(=O)알킬, -SO<sub>2</sub>(알킬), -SO<sub>2</sub>NH<sub>2</sub>, -SO<sub>2</sub>NH(알킬), -SO<sub>2</sub>N(알킬)<sub>2</sub> 등이 포함되지만, 이들로 한정되는 것은 아니다.

[0054]

치환되는 모이어티가 지방족 모이어티인 경우, 바람직한 치환기는 아릴, 헵테로아릴, 시클로지방족, 헵테로시클로지방족, 할로, 히드록실, 시아노, 니트로, 알콕시, -O(히드록시알킬), -O(할로알킬), -O(시클로알킬), -O(헵테로시클로알킬), -O(아릴), 알킬티오, 아릴티오, =O, =NH, =N(알킬), =NOH, =NO(알킬), -CO<sub>2</sub>H, -C(=O)NOH, -C(=O)O(알킬), -C(=O)O(히드록시알킬), -C(=O)NH<sub>2</sub>, -C(=O)NH(알킬), -C(=O)N(알킬)<sub>2</sub>, -OC(=O)(알킬), -OC(=O)O(알킬), -OC(=O)O(히드록시알킬), -OC(=O)NH<sub>2</sub>, -OC(=O)NH(알킬), -OC(=O)N(알킬)<sub>2</sub>, 아지도, -NH<sub>2</sub>, -NH(알킬), -N(알킬)<sub>2</sub>, -NH(아릴), -NH(히드록시알킬), -NHC(=O)(알킬), -NHC(=O)H, -NHC(=O)NOH, -NHC(=O)NH(알킬), -NHC(=O)N(알킬)<sub>2</sub>, -NHC(=NH)NH<sub>2</sub>, -NHC(=O)NH(알킬), -NHC(=O)N(알킬)<sub>2</sub>, -NHC(=NH)NH<sub>2</sub>, -OSO<sub>2</sub>(알킬), -SH, -S(알킬), -S(아릴), -S(시클로알킬), -SO<sub>2</sub>(알킬), -SO<sub>2</sub>NH<sub>2</sub>, -SO<sub>2</sub>NH(알킬) 및 -SO<sub>2</sub>N(알킬)<sub>2</sub>이다. 보다 바람직한 치환기는 할로, 히드록실, 시아노, 니트로, 알콕시, -O(아릴), =O, =NOH, =NO(알킬), -OC(=O)O(알킬), -OC(=O)NH<sub>2</sub>, -OC(=O)NH(알킬), -OC(=O)N(알킬)<sub>2</sub>, 아지도, -NH<sub>2</sub>, -NH(알킬), -N(알킬)<sub>2</sub>, -NH(아릴), -NHC(=O)(알킬), -NHC(=O)H, -NHC(=O)NOH, -NHC(=O)NH(알킬), -NHC(=O)N(알킬)<sub>2</sub>, -NHC(=NH)NH<sub>2</sub> 및 -NHC(=O)NH<sub>2</sub>이다.

[0055]

치환되는 모이어티가 시클로지방족, 헵테로시클로지방족, 아릴, 또는 헵테로아릴 모이어티인 경우, 바람직한 치환기는 알킬, 알케닐, 알키닐, 할로, 할로알킬, 히드록실, 히드록시알킬, 시아노, 니트로, 알콕시, -O(히드록시알킬), -O(할로알킬), -O(아릴), -O(시클로알킬), -O(헵테로시클로알킬), 알킬티오, 아릴티오, -C(=O)(알킬), -C(=O)H, -CO<sub>2</sub>H, -C(=O)NOH, -C(=O)O(알킬), -C(=O)O(히드록시알킬), -C(=O)NH<sub>2</sub>, -C(=O)NH(알킬), -C(=O)N(알킬)<sub>2</sub>, -OC(=O)(알킬), -OC(=O)O(히드록시알킬), -OC(=O)O(알킬), -OC(=O)O(히드록시알킬), -OC(=O)NH(알킬), -OC(=O)N(알킬)<sub>2</sub>, 아지도, -NH<sub>2</sub>, -NH(알킬), -N(알킬)<sub>2</sub>, -NH(아릴), -NH(히드록시알킬), -NHC(=O)(알킬), -NHC(=O)H, -NHC(=O)NOH, -NHC(=O)NH(알킬), -NHC(=O)N(알킬)<sub>2</sub>, -NHC(=NH)NH<sub>2</sub>, -OSO<sub>2</sub>(알킬), -SH, -S(알킬), -S(아릴), -S(시클로알킬), -S(=O)알킬, -SO<sub>2</sub>(알킬), -SO<sub>2</sub>NH<sub>2</sub>, -SO<sub>2</sub>NH(알킬) 및 -SO<sub>2</sub>N(알킬)<sub>2</sub>이다. 보다 바람직한 치환기는 알킬, 알케닐, 할로, 할로알킬, 히드록실, 히드록시알킬, 시아노, 니트로, 알콕시, -O(히드록시알킬), -C(=O)(알킬), -C(=O)H, -CO<sub>2</sub>H, -C(=O)NOH, -C(=O)O(알킬), -C(=O)O(히드록시알킬), -C(=O)NH<sub>2</sub>, -C(=O)NH(알킬), -C(=O)N(알킬)<sub>2</sub>, -OC(=O)(알킬), -OC(=O)O(히드록시알킬), -OC(=O)O(알킬), -OC(=O)O(히드록시알킬), -OC(=O)NH(알킬), -OC(=O)N(알킬)<sub>2</sub>, -NH<sub>2</sub>, -NH(알킬), -N(알킬)<sub>2</sub>, -NH(아릴), -NHC(=O)(알킬), -NHC(=O)H, -NHC(=O)NOH, -NHC(=O)NH(알킬), -NHC(=O)N(알킬)<sub>2</sub> 및 -NHC(=NH)NH<sub>2</sub>이다.

-NHC(=NH)NH<sub>2</sub>이다.

[0056] "C<sub>1</sub>-C<sub>5</sub> 알킬" 또는 "5 내지 10%"와 같이 범위가 언급되는 경우, 이같은 범위에는 처음 예에서 C<sub>1</sub> 및 C<sub>5</sub> 및 두번 째 예에서 5% 및 10%과 같은 범위의 종점이 포함된다.

[0057] 특정 입체이성질체가 구체적으로 (예를 들어, 구조식에서 관련 입체중심에 짙은선 또는 점선 결합에 의해, 구조식에서 E 또는 Z 배위를 갖는 것으로서 이중 결합 표시에 의해, 또는 입체화학-표시 명명법에 의해) 표기되지 않는 경우, 모든 입체이성질체가 순수한 화합물 뿐만 아니라 그의 혼합물로서 본 발명의 범주에 포함된다. 달리 나타내지 않는 한, 개별 거울상이성질체, 부분입체이성질체, 기하 이성질체 및 이들의 조합물 및 혼합물은 모두 본 발명에 포함된다.

[0058] 당업자는 화합물이 본원에 사용된 구조식에 도시된 것과 동등한 호변이성질체 형태 (예를 들어, 케토 및 에놀 형태), 공명 형태, 및 쓰비터이온성 형태를 가질 수 있으며, 구조식은 이같은 호변이성질체 형태, 공명 형태 또는 쓰비터이온성 형태를 포함함을 인식할 것이다.

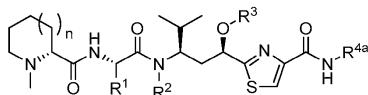
[0059] "제약상 허용되는 에스테르"는 생체내 (예를 들어 인체내)에서 가수분해되어 모 화합물 또는 그의 염을 생성하거나, 또는 그 자체가 모 화합물의 그것과 유사한 활성을 갖는 에스테르를 의미한다. 적합한 에스테르에는 C<sub>1</sub>-C<sub>5</sub> 알킬, C<sub>2</sub>-C<sub>5</sub> 알케닐 또는 C<sub>2</sub>-C<sub>5</sub> 알키닐 에스테르, 특히 메틸, 에틸 또는 n-프로필이 포함된다.

[0060] "제약상 허용되는 염"은 제약 제제에 적합한 화합물의 염을 의미한다. 화합물이 하나 이상의 염기성 기를 갖는 경우, 염은 산 부가 염, 예컨대 술페이트, 히드로브로마이드, 타르트레이트, 메실레이트, 말레이트, 시트레이트, 포스페이트, 아세테이트, 파모에이트 (엠보네이트), 히드로아이오다이드, 니트레이트, 히드로클로라이드, 락테이트, 메틸술페이트, 푸마레이트, 벤조에이트, 숙시네이트, 메실레이트, 락토비오네이트, 수베레이트, 토실레이트 등일 수 있다. 화합물이 하나 이상의 산성 기를 갖는 경우, 염은 칼슘 염, 칼륨 염, 마그네슘 염, 메글루민 염, 암모늄 염, 아연 염, 피페라진 염, 트로메타민 염, 리튬 염, 콜린 염, 디에틸아민 염, 4-페닐시클로헥실아민 염, 벤자린 염, 나트륨 염, 테트라메틸암모늄 염 등과 같은 염일 수 있다. 다형성 결정질 형태 및 용매화물도 또한 본 발명의 범주 내에 포함된다.

[0061] 화합물

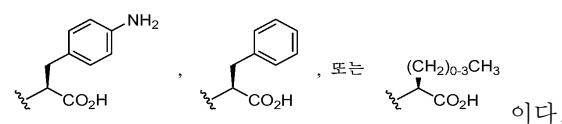
[0062] 바람직한 화학식 II의 화합물의 실시양태는 하기 화학식 II-a로 표시되며,

[0063] <화학식 II-a>



[0064]

[0065] 상기 식에서, n, R<sup>1</sup>, R<sup>2</sup>, 및 R<sup>3</sup>은 화학식 II와 관련하여 상기 정의된 바와 같고, R<sup>4a</sup>는



[0066]

[0067] 화학식 II-a의 화합물에서, 자연 발생 튜부리신 내 Tup/Tut에 상응하는 서브유닛은 카르복실산 기 직후의 2개의 지방족 탄소 원자의 결실을 통해 (즉, 아미노 기는 이제 카르복실산 기에 대해 γ-가 아닌 α-가 됨) 적어도 2개의 탄소 만큼 크기 및 친유성이 감소된다. R<sup>4</sup>가 4-아미노페닐알라닌인 경우, 아민 기는 극성 모이어티를 구성하며, 이는 친유성을 추가로 감소시킨다. SAR 연구는 친유성이 튜부리신 및 그의 유사체 또는 유도체의 생물학적 활성에 있어서 중요한 인자임을 밝혀내었다. 문헌 [Steinmetz et al., 2004] 및 [Neri et al., 2006]은 둘 모두 보다 친유성인 자연 발생 튜부리신 - 즉 Tut 서브유닛 (화학식 I에서 R<sup>A</sup>가 OH) 대신 Tup 서브유닛을 갖는 것 (화학식 I에서 R<sup>A</sup>가 H) - 이 보다 큰 생물학적 활성을 보유함을 개시한다. 또한, 활성에 있어서의 차이는 Tup 서브유닛에서 11-아실옥시 잔기 (화학식 I의 기 R<sup>C</sup>)의 크기 및 친유성과 관계없이 유지되었다 (문헌 [Steinmetz et al., 2004]). 이러한 결과는 친유성 Tup/Tut 서브유닛이 특히 중요한 SAR 성분임을 나타낸다.

[0068]

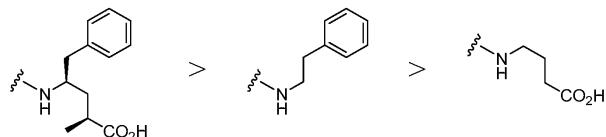
상기의 관찰은 부분적으로 발라수브라마니안(Balasubramanian) 등에 의한 2 가지의 연구에서 입증된다. 먼저

(문헌 [Balasubramanian et al., 2008]), Tup 서브유닛에서 카르복실기에 대해 탄소 알파에서 디메틸화된 유사체를 동일한 위치에서 탈메틸화된 다른 동일한 유사체와 비교하였다. 디메틸화된 유사체는 시험관내 투불린 억제  $IC_{50}$ 이 비슷하긴 했지만, 예상된 바와 같이 그의 상대적 친유성에 기초하여 보다 큰 항증식 활성을 가졌다.

그러나, 이러한 경향은 3종의 유사체 (1종은  $\alpha$ -탄소 탈메틸화된 것, 1종은 모노메틸화된 것, 및 1종은 디메틸화된 것)를 비교한 두번쩨 연구에서는 이어지지 않았다 (문헌 [Balasubramanian et al., 2009]). 여기서 가장 활성인 유사체는 탈메틸화된 것이었고, 모노메틸화된 것 - 즉 천연 Tup 서브유닛을 갖는 것 - 은 훨씬 적은 활성을 가졌다. 그러나, 후자의 유사체는 분자를 본질적으로 불활성하게 하는, 다른 곳에 추가의 변형을 갖는 것 이어서, SAR 추론이 (존재한다면) 구분될 수 있는 것인지 불분명하다.

[0069]

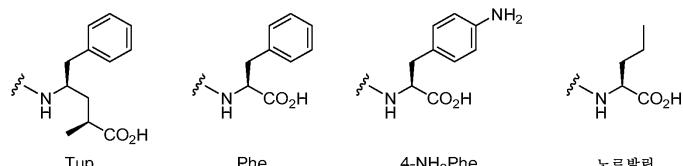
문헌 [Patterson et al., 2007] 및 [Ellman et al., 2009]은 튜부리신 D 및 Tup 서브유닛에 페네틸 또는  $\gamma$ -카르복시기 만을 보유하는 유사체의 세포독성을 비교하였다. 페네틸-보유 유사체는 3종의 암 세포주에 대하여 튜부리신 D에 비해 3.6 내지 13.6배 덜 활성이었지만, 덜 친유성인  $\gamma$ -카르복실기를 보유하는 경우, 훨씬 더 큰 활성의 손실이 존재하여 25.7 내지 62.5배 덜 활성이었다. 즉, 활성의 순서는 다음과 같았다:



튜부리신 D

[0070]

상기 문헌들은 개별적으로 그리고 조합되어, Tup 위치에서의 친유성이 튜부리신의 생물학적 활성에 특히 중요함을 시사한다. 따라서, 종전 기술은 Tup 서브유닛을 화학식 II-a에 따라 페닐알라닌 (Phe), 4-아미노페닐알라닌 (4-NH<sub>2</sub>Phe), 노르발린 또는 다른 R<sup>4</sup> 서브유닛으로 치환하는 것은 이들 각각이 적어도 2개의 지방족 탄소가 손실되게 하고, 결과적으로 Tup/Tut 위치에서 친유성을 감소시킬 것이기 때문에 바람직하지 않음을 시사한다.

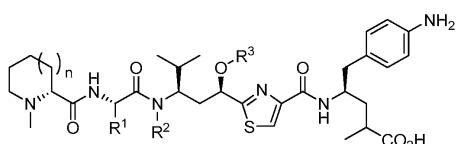


[0072]

화학식 II의 화합물의 또 다른 바람직한 실시양태는 하기 화학식 II-b로 표시되며,

[0073]

<화학식 II-b>

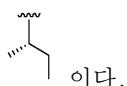


[0075]

상기 식에서, n, R<sup>1</sup>, R<sup>2</sup>, 및 R<sup>3</sup>은 화학식 II와 관련하여 상기 정의된 바와 같다. 화학식이 Tup 방향족 고리의 4-위치에서 -NH<sub>2</sub> 기를 포함하는 문헌에서 발견되지만 (문헌 [Domling 2005a and 2005b]), 이같은 특성을 가진 화합물을 어떻게 제조할 수 있는지를 개시하고 있는 것은 존재하지 않는다.

[0077]

화학식 II, II-a, 및 II-b에서, R<sup>1</sup>은 바람직하게는 H, C<sub>1</sub>-C<sub>5</sub> 알킬, C<sub>2</sub>-C<sub>5</sub> 알케닐, 또는 C<sub>2</sub>-C<sub>5</sub> 알케닐이며, 보다 바람직하게는 이소류실 잔기, 즉



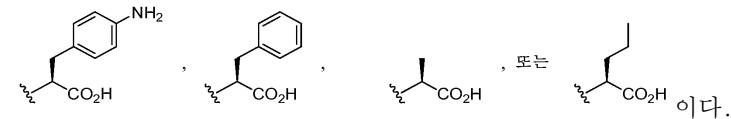
[0078]

화학식 II, II-a 및 II-b에서, R<sup>2</sup>는 바람직하게는 H, C<sub>1</sub>-C<sub>5</sub> 알킬, C<sub>2</sub>-C<sub>5</sub> 알케닐, CH<sub>2</sub>O(C<sub>1</sub>-C<sub>5</sub> 알킬), CH<sub>2</sub>O(C<sub>2</sub>-C<sub>5</sub> 알케닐), CH<sub>2</sub>O(C=O)(C<sub>1</sub>-C<sub>5</sub> 알킬), 또는 CH<sub>2</sub>OC(=O)(C<sub>2</sub>-C<sub>5</sub> 알케닐)이고; 보다 바람직하게는 H, Me, Et, n-Pr, CH<sub>2</sub>OMe, CH<sub>2</sub>OEt, CH<sub>2</sub>O(n-Pr), CH<sub>2</sub>OC(=O)i-Bu, CH<sub>2</sub>OC(=O)n-Pr, CH<sub>2</sub>OC(=O)CH=CH<sub>2</sub>, 또는 CH<sub>2</sub>OC(=O)Me이며, Me, n-Pr,

CH<sub>2</sub>OMe, CH<sub>2</sub>OC(=O)i-Bu, 및 CH<sub>2</sub>O(n-Pr)o] 특히 바람직하다.

[0080] 화학식 II, II-a 및 II-b에서, R<sup>3</sup>은 바람직하게는 H, C<sub>1</sub>-C<sub>5</sub> 알킬, C<sub>2</sub>-C<sub>5</sub> 알케닐, C(=O)C<sub>1</sub>-C<sub>5</sub> 알킬 또는 C(=O)C<sub>2</sub>-C<sub>5</sub> 알케닐이고; 보다 바람직하게는 H, Me, Et 또는 C(=O)Me이다.

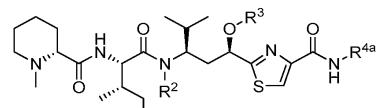
[0081] 바람직하게는, 화학식 II 및 II-a에서 R<sup>4</sup> 및 R<sup>4a</sup>는



[0083] 화학식 II, II-a 및 II-b에서 n은 바람직하게는 1이고, 화학식 II의 경우에 R<sup>5</sup>는 바람직하게는 메틸이며; 즉, Mep 서브유닛 내 고리는 바람직하게는 N-메틸 피페리디닐 고리이다.

[0084] 화학식 II-a에 따른 화합물의 바람직한 실시양태는 하기 화학식 II-a'으로 도시되며,

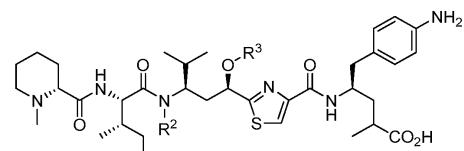
[0085] <화학식 II-a'>



[0086] [0087] 상기 식에서, R<sup>4a</sup>는 화학식 II-a와 관련하여 상기 정의된 바와 같고, R<sup>2</sup>는 H, C<sub>1</sub>-C<sub>5</sub> 알킬, C<sub>2</sub>-C<sub>5</sub> 알케닐, CH<sub>2</sub>O(C<sub>1</sub>-C<sub>5</sub> 알킬), CH<sub>2</sub>O(C<sub>2</sub>-C<sub>5</sub> 알케닐), CH<sub>2</sub>O(C=O)(C<sub>1</sub>-C<sub>5</sub> 알킬) 또는 CH<sub>2</sub>OC(=O)(C<sub>2</sub>-C<sub>5</sub> 알케닐)이고; R<sup>3</sup>은 H, C<sub>1</sub>-C<sub>5</sub> 알킬, C<sub>2</sub>-C<sub>5</sub> 알케닐, C(=O)C<sub>1</sub>-C<sub>5</sub> 알킬 또는 C(=O)C<sub>2</sub>-C<sub>5</sub> 알케닐이다. 바람직하게는, R<sup>2</sup>는 H, Me, Et, n-Pr, CH<sub>2</sub>OMe, CH<sub>2</sub>OEt, CH<sub>2</sub>OC(=O)i-Bu, CH<sub>2</sub>OC(=O)n-Pr, CH<sub>2</sub>OC(=O)CH=CH<sub>2</sub> 또는 CH<sub>2</sub>OC(=O)Me이고; 보다 바람직하게는 Me, n-Pr, CH<sub>2</sub>OMe, CH<sub>2</sub>OC(=O)i-Bu 또는 CH<sub>2</sub>O(n-Pr)이다. 바람직하게는, R<sup>3</sup>은 H, Me, Et 또는 C(=O)Me이다.

[0088] 화학식 II-b에 따른 화합물의 바람직한 실시양태는 하기 화학식 II-b'으로 도시되며,

[0089] <화학식 II-b'>



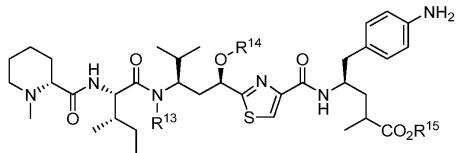
[0090] [0091] 상기 식에서, R<sup>2</sup>는 H, C<sub>1</sub>-C<sub>5</sub> 알킬, C<sub>2</sub>-C<sub>5</sub> 알케닐, CH<sub>2</sub>O(C<sub>1</sub>-C<sub>5</sub> 알킬), CH<sub>2</sub>O(C<sub>2</sub>-C<sub>5</sub> 알케닐), CH<sub>2</sub>O(C=O)(C<sub>1</sub>-C<sub>5</sub> 알킬) 또는 CH<sub>2</sub>OC(=O)(C<sub>2</sub>-C<sub>5</sub> 알케닐)이고; R<sup>3</sup>은 H, C<sub>1</sub>-C<sub>5</sub> 알킬, C<sub>2</sub>-C<sub>5</sub> 알케닐, C(=O)C<sub>1</sub>-C<sub>5</sub> 알킬 또는 C(=O)C<sub>2</sub>-C<sub>5</sub> 알케닐이다. 바람직하게는, R<sup>2</sup>는 H, Me, Et, n-Pr, CH<sub>2</sub>OMe, CH<sub>2</sub>OEt, CH<sub>2</sub>OC(=O)i-Bu, CH<sub>2</sub>OC(=O)n-Pr, CH<sub>2</sub>OC(=O)CH=CH<sub>2</sub> 또는 CH<sub>2</sub>OC(=O)Me이고, R<sup>3</sup>은 H, Me, Et 또는 C(=O)Me이다.

[0092] R<sup>4</sup>의 카르복실 기가 에스테르화된 경우, 바람직하게는 에스테르는 C<sub>1</sub>-C<sub>5</sub> 알킬 에스테르, 예컨대 Me, Et 또는 Pr 에스테르이다. 다르게는, 카르복실 기는 암모니아 또는 알킬 아민에 의해 아미드화될 수 있다.

[0093] 또 다른 실시양태에서, 본 발명은 하기 화학식 II-c로 표시되는 구조를 갖는 화합물을 제공하며,

[0094]

&lt;화학식 II-c&gt;

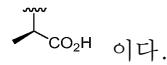


[0095]

[0096] 상기 식에서,  $R^{13}$ 은 Me, n-Pr,  $CH_2OMe$  또는  $CH_2OC(=O)CH_2CH(Me)_2$ 이고;  $R^{14}$ 는 Me 또는  $C(=O)Me$ 이며;  $R^{15}$ 는 H 또는  $C_1-C_5$  알킬 (바람직하게는 H, Me 또는 Et)이다.

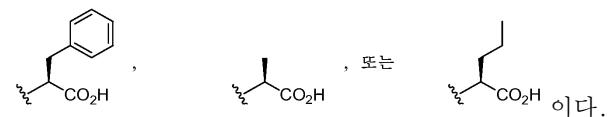
[0097]

화학식 II-b, II-b' 및 II-c에서, 카르복실에 대한 메틸 알파에서의 임체화학은 바람직하게는 자연 발생 튜부리신에 상응하는 것, 즉



[0098]

[0099] 바람직한 실시양태에서, 본 발명의 화합물은  $R^4$  (또는 경우에 따라  $R^{4a}$ )에서  $\alpha$ -아미노산의  $\alpha$ -아민 기를 갖는 카르복실 기의 아미드 형태로 존재한다.  $\alpha$ -아미노산은 단백질 생성 아미노산, 4-아미노페닐알라닌, 노르발린, 노르류신 및 시트룰린으로 이루어진 군으로부터 선택될 수 있다. 바람직하게는,  $\alpha$ -아미노산은 알라닌, 노르발린, 글리신, 리신, 아르기닌, 시트룰린, 노르류신, 4-아미노페닐알라닌 및 페닐알라닌으로 이루어진 군으로부터 선택된다. 또한 바람직하게는,  $\alpha$ -아미노산의 절대 배위는 단백질 생성 배위, 즉 L이다. 이러한 바람직한 실시양태에서,  $R^4$  (또는  $R^{4a}$ )는 바람직하게는

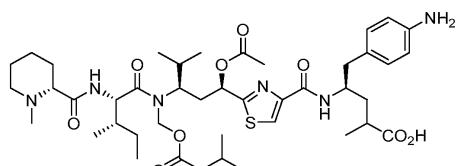


[0100]

[0101] 화학식 II에 따른 본 발명의 화합물의 구체적인 예에는 하기 화합물 III-a 내지 III-y가 포함된다. 일부 화합물은 제약상 허용되는 에스테르 또는  $\alpha$ -아미노산의  $\alpha$ -아민 기 또는 그의 메틸 에스테르를 갖는  $R^4$  카르복실 기의 제약상 허용되는 아미드로 도시된다.

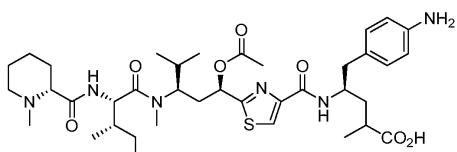
[0102]

&lt;화학식 III-a&gt;



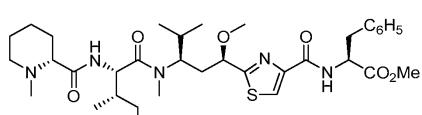
[0103]

&lt;화학식 III-b&gt;



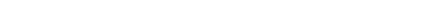
[0104]

&lt;화학식 III-c&gt;



[0105]

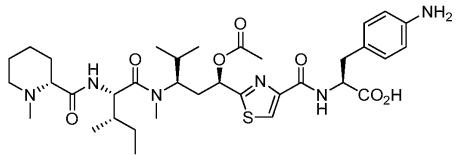
&lt;화학식 III-d&gt;



[0106]

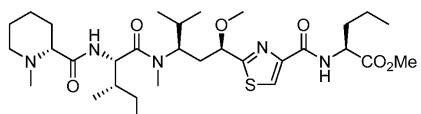
[0108]

&lt;화학식 III-d&gt;



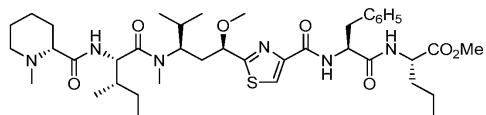
[0109]

&lt;화학식 III-e&gt;



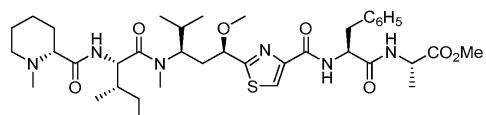
[0111]

&lt;화학식 III-f&gt;



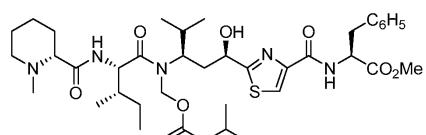
[0113]

&lt;화학식 III-g&gt;



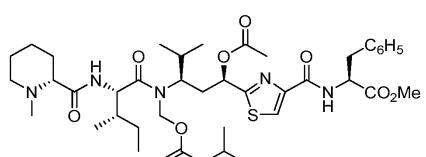
[0115]

&lt;화학식 III-h&gt;



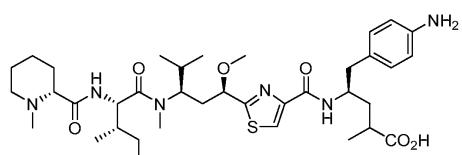
[0117]

&lt;화학식 III-i&gt;



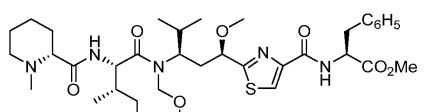
[0119]

&lt;화학식 III-j&gt;



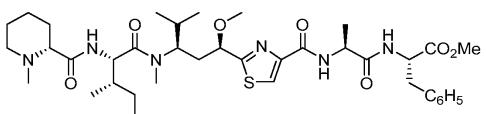
[0121]

&lt;화학식 III-k&gt;



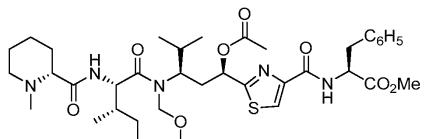
[0123]

[0124] &lt;화학식 III-1&gt;



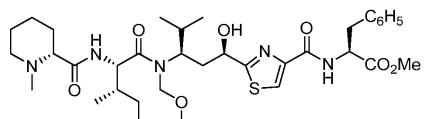
[0125]

[0126] &lt;화학식 III-m&gt;



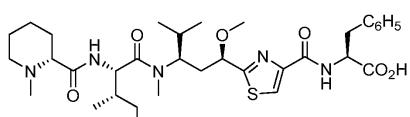
[0127]

[0128] &lt;화학식 III-n&gt;



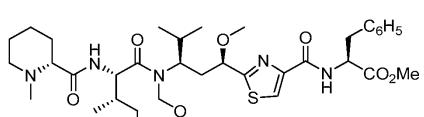
[0129]

[0130] &lt;화학식 III-o&gt;



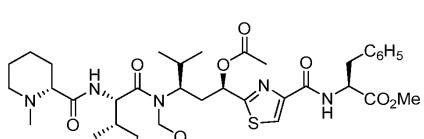
[0131]

[0132] &lt;화학식 III-p&gt;



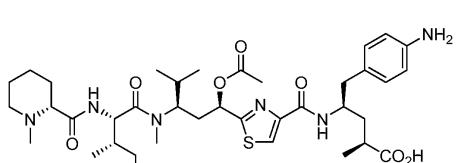
[0133]

[0134] &lt;화학식 III-q&gt;



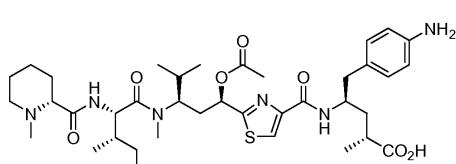
[0135]

[0136] &lt;화학식 III-r&gt;



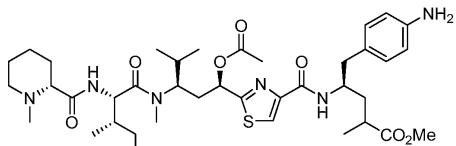
[0137]

[0138] &lt;화학식 III-s&gt;



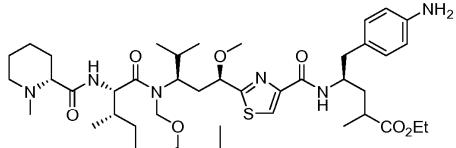
[0139]

[0140] &lt;화학식 III-t&gt;



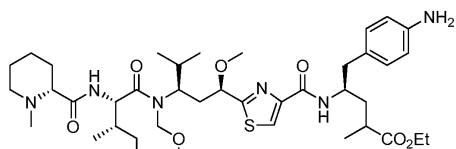
[0141]

[0142] &lt;화학식 III-u&gt;



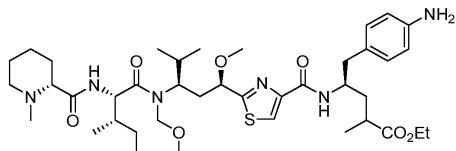
[0143]

[0144] &lt;화학식 III-v&gt;



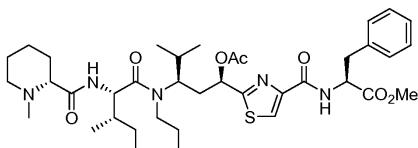
[0145]

[0146] &lt;화학식 III-w&gt;



[0147]

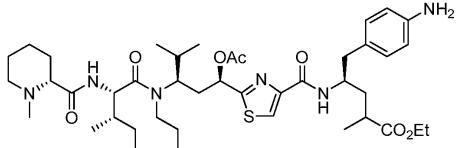
[0148] &lt;화학식 III-x&gt;



[0149]

및

[0150] &lt;화학식 III-y&gt;

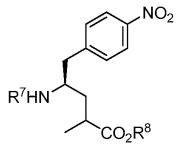


[0151]

[0152] 본 발명은 또한 본 발명의 화합물의 합성에 활용될 수 있는 신규 중간체를 제공한다. 본원의 도면 및 실시예에

교시된 바와 같이, 하기 화학식 VIII-a에 따른 화합물은 화학식 II 또는 II-b에 따른 화합물을 제조하는데 사용될 수 있다.

[0153] &lt;화학식 VIII-a&gt;

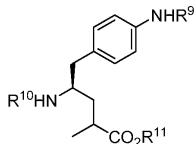


[0154]

[0155] 화학식 VIII-a에서,  $R^7$ 은 H 또는 아민 보호기이고,  $R^8$ 은 H,  $C_1-C_{10}$  알킬,  $C_2-C_{10}$  알케닐,  $C_2-C_{10}$  알키닐, 아릴, 시클로지방족, 알킬시클로지방족, 아릴알킬 또는 알킬아릴이다. 바람직하게는,  $R^7$ 은 H, Boc (t-부톡시카르보닐), Troc (2,2,2-트리클로로에톡시 카르보닐), Bpoc ((1-메틸-1-(4-비페닐)에톡시카르보닐)), Cbz (벤질옥시 카르보닐), Aloc (알릴옥시카르보닐), 메틸 아민 또는 Fmoc (9-플루오레닐메톡시카르보닐)이다. 바람직하게는,  $R^8$ 은 H 또는  $C_1-C_5$  알킬 (특히 Me)이다.

[0156] 본 발명의 화합물의 합성에 유용한 또 다른 신규 중간체는 화학식 VIII-b에 따른 구조를 갖는다. 본 발명의 화합물을 제조하기 위한 하기 화학식 VIII-b의 화합물의 이용은 본원의 도면 및 실시예에 교시되어 있다.

[0157] <화학식 VIII-b>



[0158]

[0159] 화학식 VIII-b에서,  $R^9$  및  $R^{10}$ 은 독립적으로 H 또는 아민 보호기이고,  $R^{11}$ 은 H,  $C_1-C_{10}$  알킬,  $C_2-C_{10}$  알케닐,  $C_2-C_{10}$  알키닐, 아릴, 시클로지방족, 알킬시클로지방족, 아릴알킬 또는 알킬아릴이다. 바람직하게는,  $R^9$  및  $R^{10}$ 은 독립적으로 H, Boc, Troc, Bpoc, Cbz, Aloc, 메틸아민 및 Fmoc으로부터 선택된다. 바람직하게는,  $R^{11}$ 은 H 또는  $C_1-C_5$  알킬 (특히 Me)이다. 바람직하게는,  $R^9$  및  $R^{10}$ 이 각각 아민 보호기인 경우, 이들은 상이한 아민 보호기이다.

[0160] 화학식 VIII-a 및 VIII-b의 화합물을 위한 추가의 적합한 아민 보호기는 문헌 [Greene and Wuts, *Protective Groups in Organic Synthesis*, 3rd edition, pp. 464-653 (John Wiley & Sons, New York, 1999)]에 개시되어 있으며, 상기 문헌의 개시내용은 본원에 참고로 포함된다.

[0161] 접합체

[0162] 또 다른 측면에서, 본 발명에 따른 세포독성 화합물 및 리간드를 포함하는, 하기 화학식 IV로 표시되는 접합체가 제공되며,

[0163] <화학식 IV>

[0164]  $[D(X^D)_a C(X^Z)_b]_m Z$

[0165] 상기 식에서, Z는 리간드이고; D는 본 발명에 따른 세포독성 화합물이고;  $-(X^D)_a C(X^Z)_b-$ 는 이들이 Z 및 D를 연결 하므로, 총칭하여 "링커 모이어티" 또는 "링커"로 지칭된다. 링커 내의 C는 화합물 D의 의도된 생물학적 작용 부위에서 절단되도록 설계된 절단가능한 기이고;  $X^D$  및  $X^Z$ 는 이들이 각각 D와 C 및 C와 Z를 공간적으로 떨어뜨려 놓기 때문에 스페이서 모이어티 (또는 "스페이서")라 지칭되며; 아래첨자 a 및 b는 독립적으로 0 또는 1이고 (즉,  $X^D$  및/또는  $X^Z$ 의 존재는 임의적임); 아래첨자 m은 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 또는 10 (바람직하게는 1, 2, 3 또는 4)이다. D,  $X^D$ , C,  $X^Z$  및 Z는 이하에서 보다 상세하게 정의된다.

[0166] 리간드 Z - 예를 들어 항체 - 는 표적화 기능을 제공한다. 그의 항원 또는 수용체가 위치하는 표적 조직 또는 세포에 결합함으로써, 리간드 Z는 접합체를 그곳으로 이끈다. 바람직하게는, 표적 조직 또는 세포는 암 조직 또는 세포이며, 항원 또는 수용체는 종양-관련 항원, 즉 비암성 세포에 비하여 암성 세포에 의해 독특하게 발현되거나 암 세포에 의해 과다발현되는 항원이다. 표적 조직 또는 세포에서 기 C가 절단되면 화합물 D가 방출되고, 이는 국소적으로 그의 세포독성 효과를 발휘한다. 일부 예에서, 접합체는 세포내 이입에 의해 표적 세포로 내재화되고, 절단은 표적 세포 내에서 일어난다. 이러한 방식으로, 의도하는 작용 부위에서의 화합물 D의 정확한 전달이 달성되어 필요한 투여량이 감소된다. 또한, 화합물 D는 정상적으로는 그것이 접합된 상태에서는 생물학적으로 불활성 (또는 유의하게 활성이 덜함)이기 때문에, 비-표적 조직 또는 세포에 대한 바람직하지 않은 독성은 감소된다. 항암 약물이 일반적으로 종종 세포에 대해 매우 독성이기 때문에, 이는 중요한

고려사항이다.

[0167] 아래첨자 m에 의해 반영되는 바와 같이, 각각의 리간드 Z 분자는 접합에 이용가능한 부위 D의 개수 및 이용되는 실험 조건에 따라 하나를 초과하는 화합물 D와 접합될 수 있다. 당업자는 각각의 개별 리간드 Z 분자가 화합물 D에 정수의 개수로 접합되지만, 접합체의 제조시에는 통계적 평균을 반영하여 리간드 Z에 대한 화합물 D의 비-정수 비율을 분석할 수 있음을 인식할 것이다.

[0168] 리간드 Z 및 그의 접합

[0169] 바람직하게는, 리간드 Z는 항체이다. 편의성 및 간결성을 위해, 그리고 제한없이, 리간드 Z의 접합과 관련하여 본원에서 후속되는 상세한 논의는 그것이 항체라는 맥락에서 기술될 것이지만, 당업자는 필요한 변경을 위하여 다른 유형의 리간드 Z도 접합될 수 있음을 이해할 것이다. 예를 들어, 리간드로서 폴산과의 접합체가 그의 표면에 플레이트 수용체를 갖는 세포를 표적화할 수 있다 (문헌 [Vlahov et al., 2008a, 2008b and 2010]; [Leammon et al., 2009]). 같은 이유로, 이하의 상세한 논의는 주로 항체 Z 대 화합물 D의 1:1 비의 관점에서 기술된다.

[0170] 바람직하게는, 리간드 Z는 이같은 리간드 Z를 포함하는 접합체가 암 세포를 선택적으로 표적화 가능하게 하는 종양 관련 항원에 대한 항체이다. 이같은 항원의 예에는 메소텔린, 전립선 특이적 막 항원 (PSMA), CD19, CD22, CD30, CD70, B7H4 (또한 O8E로 공지됨), 단백질 티로신 키나제 7 (PTK7), RG1, CTLA-4, 및 CD44가 포함된다. 항체는 동물 (예를 들어, 뮤린), 키메라, 인간화, 또는 바람직하게는 인간 항체일 수 있다. 항체는 바람직하게는 모노클로날, 특히 모노클로날 인간 항체이다. 상기 언급한 일부 항원에 대한 인간 모노클로날 항체의 제조는 US 2009/0074660 A1 (Korman et al.) (B7H4); US 2009/0142349 A1 A2 (Rao-Naik et al.) (CD19); WO 2008/070569 A2 (King et al.) (CD22); US 7,387,776 B2 (2008) (Keler et al.) (CD30); US 2009/0028872 A1 (Terrett et al.) (CD70); US 6,984,720 B1 (2006) (Korman et al.) (CTLA-4); US 2009/0217401 A1 (Korman et al.) (PD-1); US 2008/0279868 A1 (Huang et al.) (PSMA); US 2010/0034826 A1 (Lu et al.) (PTK7); US 7,335,748 B2 (2008) (Harkins et al.) (RG1); WO 2009/045957 A1 (Terrett et al.) (메소텔린); 및 US 2010/0092484 A1 (Xu et al.) (CD44)에 개시되어 있으며; 이들은 그 개시내용이 본원에 참고로 포함된다.

[0171] 리간드 Z는 또한 항체 단편 또는 항체 모방체, 예컨대 아피바디, 도메인 항체 (dAb), 나노바디, 유니바디, DARPin, 안티칼린, 베르사바디, 듀오칼린, 리포칼린, 또는 아비머일 수 있다.

[0172] 리신 잔기 내의 ε-아미노 기, 팬던트 탄수화물 모이어티, 카르복실산 기, 디술퍼드 기, 및 티올 기를 비롯하여 리간드 Z 상의 여러 다양한 반응성 기 중 어느 하나가 접합 부위일 수 있다. 각 유형의 반응성 기는 몇몇 이점과 몇몇 단점을 갖는 균형을 나타낸다. 접합에 적합한 항체 반응성 기의 검토를 위해, 예를 들어 문헌 [Garnett, *Adv. Drug Delivery Rev.* 53 (2001), 171-216] 및 [Dubowchik and Walker, *Pharmacology & Therapeutics* 83 (1999), 67-123]을 참조하고, 이들의 개시내용은 본원에 참고로 포함된다.

[0173] 한 실시양태에서, 리간드 Z는 리신 ε-아미노 기를 통해 접합된다. 대부분의 항체는 리신 ε-아미노 기에 여러 회 노출되며, 이종이관능성 작용제에 의한 변형을 비롯한 당업계 공지의 기술을 이용하여 아미드, 우레아, 티오우레아, 또는 카르바메이트 결합을 통해 접합될 수 있다 (이하에서 추가로 기재됨). 그러나, 접합체 제조에 있어서 잠재적인 배치-대-배치 변동성이 야기되도록 어떤 ε-아미노 기를 얼마나 많이 반응시킬지 제어하는 것은 어렵다. 또한, 접합은 항체의 본래 입체형태를 유지하는데 중요한 양성화된 ε-아미노 기를 중화시킬 수 있거나, 또는 항원 결합 부위 근처 또는 그 부위의 리신에서 일어날 수 있고, 이는 어느 것도 바람직한 것이 아니다.

[0174] 또 다른 실시양태에서, 많은 항체가 글리코실화되는 것과 같이 리간드 Z를 탄수화물 측쇄를 통해 접합시킬 수 있다. 탄수화물 측쇄는 퍼아이오데이트에 의해 산화되어 알데히드 기를 생성할 수 있고, 이는 차례로 아민과 반응하여 세미카르바존, 옥심 또는 히드라존에서와 같이 이민 기를 형성할 수 있다. 원하는 경우에, 나트륨 시아노보로히드라이드에 의한 환원에 의해 이민 기를 보다 안정한 아민 기로 전환할 수 있다. 탄수화물 측쇄를 통한 접합에 대한 추가의 개시내용은, 예를 들어 문헌 [Rodwell et al., *Proc. Nat'l Acad. Sci. USA* 83, 2632-2636 (1986)]을 참조하고, 그의 개시내용은 본원에 참고로 포함된다. 리신 ε-아미노 기에서와 같은, 접합 부위(들)의 위치의 재현 및 화학량론에 관한 관심이 존재한다.

[0175] 또 다른 실시양태에서, 리간드 Z는 카르복실산 기를 통해 접합될 수 있다. 한 실시양태에서, 말단 카르복실산 기는 관능화되어 카르보히드라지드로 되며, 이어서 이는 알데히드-보유 접합 보이어티와 반응한다. 문헌

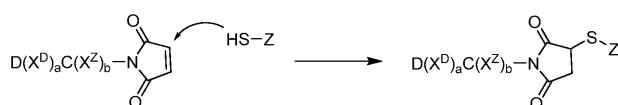
[Fisch et al., *Bioconjugate Chemistry* 1992, 3, 147-153]을 참조한다.

[0176] 또 다른 실시양태에서, 항체 Z는 항체 Z 상의 시스테인 잔기 및 접합체의 다른 부분 상의 황을 가교하는 디술피드 기를 통해 접합될 수 있다. 몇몇 항체는 유리 티올 (술프히드릴) 기가 결여되어 있지만, 예를 들어 헌지 영역에 디술피드 기를 갖는다. 그러한 경우에, 본래의 디술피드 기의 환원에 의해 유리 티올 기가 생성될 수 있다. 그렇게 생성된 티올 기가 후속하여 접합에 사용될 수 있다. 예를 들어, 문헌 [Packard et al., *Biochemistry* 1986, 25, 3548-3552]; [King et al., *Cancer Res.* 54, 6176-6185 (1994)]; 및 [Doronina et al., *Nature Biotechnol.* 21(7), 778-784 (2003)]을 참조하고; 이들의 개시내용은 본원에 참고로 포함된다. 다시, 접합 부위 위치 및 화학량론 및 항체 천연 입체형태의 가능한 파괴에 관한 관심이 존재한다.

[0177] 천연 디술피드 결합을 파괴하지 않으면서 항체에 유리 티올 기를 도입하기 위한 많은 방법들이 공지되어 있고, 그러한 방법을 본 발명의 리간드 Z와 함께 수행할 수 있다. 사용하는 방법에 따라, 소정의 위치에 예측가능한 수의 유리 술프히드릴을 도입하는 것이 가능할 수 있다. 한가지 접근법에서, 시스테인을 다른 아미노산으로 치환시킨 돌연변이된 항체가 제조된다. 예를 들어, US 2007/0092940 A1 (Eigenbrot et al.); 문헌 [Chilkoti et al., *Bioconjugate Chem.* 1994, 5, 504-507]; US 4,698,420 (1987) (Urnovitz et al.); [Stimmel et al., *J. Biol. Chem.*, 275 (39), 30445-30450 (2000)]; US 7,311,902 B2 (2007) (Bam et al.); [Kuan et al., *J. Biol. Chem.*, 269 (10), 7610-7618 (1994)]; [Poon et al., *J. Biol. Chem.*, 270 (15), 8571-8577 (1995)]을 참조한다. 또 다른 접근법에서, 여분의 시스테인을 C 말단에 부가한다. 예를 들어, 문헌 [Cumber et al., *J. Immunol.*, 149, 120-126 (1992)]; [King et al., *Cancer Res.*, 54, 6176-6185 (1994)]; [Li et al., *Bioconjugate Chem.*, 13, 985-995 (2002)]; [Yang et al., *Protein Engineering*, 16, 761-770 (2003)]; 및 [Olafson et al., *Protein Engineering Design & Selection*, 17, 21-27 (2004)]을 참조한다. 유리 시스테인을 도입하기 위한 바람직한 방법이 WO 2009/026274 A1 (Liu et al.)에 교시되어 있으며, 여기서는 시스테인 보유 아미노산 서열을 항체 중쇄의 C 말단에 부가한다. 이러한 방법은 공지된 수의 시스테인 잔기 (중쇄 당 하나)를 항원 결합 부위와 떨어진 공지된 위치에 도입한다. 본 단락에서 언급한 문헌의 개시내용은 모두 본원에 참고로 포함된다.

[0178] 또 다른 실시양태에서, 리신  $\epsilon$ -아미노 기를 2-아미노티올란 또는 N-숙신이미딜-3-(2-피리딜디티오)프로피오네이트 (SPDP)와 같은 이종이관능성 시약으로 변형시켜  $\epsilon$ -아미노 기를 티올 또는 디술피드 기로 전환시킴으로써 - 이를테면 시스테인 대용물을 생성할 수 있다. 그러나, 이러한 방법은 동일한 접합 위치 및 적절한  $\epsilon$ -아미노 기와 관련된 화학량론 제한으로 인해 곤란을 겪게 된다.

[0179] 또 다른 바람직한 실시양태에서, 리간드 Z는 티올 기의 친핵성 부가 생성물을 통해 수용자 모이어티에 접합된다. 바람직한 수용자 모이어티는 말레이미드 기로, 그의 항체 티올 기와의 반응을 이하에서 일반론으로 설명한다. 티올 기는 상술한 바와 같이 천연 티올 기 또는 도입된 것일 수 있다.



링커  $-(X^D)_aC(X^Z)_b-$

[0180] 상기에 기재된 바와 같이, 본 발명의 접합체의 링커 부분은 최대 3개의 요소: 절단가능한 기 C 및 임의의 스페이서  $X^Z$  및  $X^D$ 를 포함한다.

[0182] 절단가능한 기 C는 생리적 조건 하에서 절단가능한 기로, 바람직하게는 접합체가 혈액 혈장 내에서 일반적으로 순환되는 동안에는 비교적 안정하지만, 접합체가 의도하는 작용 부위, 즉 표적 세포 근처, 표적 세포 또는 표적 세포 내에 도달했을 때에는 쉽게 절단되는 것으로 선택된다. 바람직하게는, 접합체는 항체 Z가 표적 세포의 표면 상에 디스플레이된 항원에 결합되었을 때 표적 세포에 의한 세포내 이입에 의해 내재화된다. 후속하여, 표적 세포의 소포체 (초기 엔도솜, 후기 엔도솜 또는 특히 리소솜)에서 기 C의 절단이 일어난다.

[0183] 한 실시양태에서, 기 C는 pH 민감성 기이다. 혈액 혈장 내 pH는 중성을 약간 초과하지만, 리소솜 내의 pH는 산성, 약 5이다. 따라서, 절단이 산 촉매되는 기 C는 혈액 혈장 내에서의 속도에 비해 리소솜 내에서 수 자릿수 더 빠른 속도로 절단될 것이다. 적합한 산-민감성 기의 예에는 US 4,631,190 (1986) (Shen et al.); US 5,144,011 (1992) (Shen et al.); 문헌 [Shen et al., *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 102, 1048-1054 (1981)] 및 [Yang et al., *Proc. Natl Acad. Sci. (USA)*, 85, 1189-1193 (1988)]에 기재되어 있는 시스-아코니

틸 아미드 및 히드라존이 포함되며, 이들의 개시내용은 본원에 참고로 포함된다.

[0184] 또 다른 실시양태에서, 기 C는 디슬피드이다. 디슬피드는 티올-디슬피드 교환 메카니즘에 의해 주위 티올 농도에 의존한 속도로 절단될 수 있다. 글루타티온 및 다른 티올의 세포내 농도가 그의 혈청 농도에 비해 높기 때문에, 디슬피드의 절단 속도는 세포내에서 더 높을 것이다. 또한, 티올-디슬피드 교환 속도는 디슬피드의 입체 및 전자 특성을 조정하는 것에 의해 조절될 수 있으며 (예를 들어, 알킬-아릴 디슬피드 대 알킬-알킬 디슬피드; 아릴 고리 상에서의 치환 등), 혈청 안정성 또는 특정 절단 속도를 향상시키는 디슬피드 연결을 설계하는 것이 가능하다. 접합체 내의 디슬피드 절단가능한 기와 관련된 추가의 개시내용에 대해서는, 예를 들어 문헌 [Thorpe et al., *Cancer Res.* 48, 6396-6403 (1988)]; US 2005/0287155 A1 (Santi et al.); US 6,989,452 B2 (2006) (Ng et al.); WO 2002/096910 A1 (Ng et al.); US 7,691,962 B2 (Boyd et al.); 및 WO 2008/083312 A2 (Sufi et al.)을 참조하고; 이들의 개시내용은 본원에 참고로 포함된다.

[0185] 바람직한 기 C로는, 혈청 내의 프로테아제에 의하는 것과는 대조적으로, 의도하는 작용 부위에서 프로테아제에 의해 우세하게 절단되는 웨პ티드 결합이 포함된다. 전형적으로, 기 C는 1 내지 20개의 아미노산, 바람직하게는 1 내지 6개의 아미노산, 보다 바람직하게는 1 내지 3개의 아미노산을 포함한다. 아미노산(들)은 천연 및/또는 비천연  $\alpha$ -아미노산일 수 있다. 천연 아미노산은 유전자 코드에 의해 코딩된 것, 뿐만 아니라 그로부터 유래된 아미노산, 예를 들어 히드록시프롤린,  $\gamma$ -카르복시글루타메이트, 시트룰린 및 O-포스포세린이다. 용어 아미노산에는 또한 아미노산 유사체 및 모방체가 포함된다. 유사체는 R 기가 천연 아미노산 중에서 발견되는 것이 아닌 것임을 제외하고, 천연 아미노산의 동일한 일반  $\text{H}_2\text{N}(\text{R})\text{CHCO}_2\text{H}$  구조를 갖는 화합물이다. 유사체의 예에는 호모세린, 노르류신, 메티오닌-술포시드 및 메티오닌 메틸 술포늄이 포함된다. 아미노산 모방체는  $\alpha$ -아미노산의 일반 화학 구조와 다른 구조를 갖지만, 그와 유사한 방식으로 기능하는 화합물이다. 용어 "비천연 아미노산"은 "D" 입체화학적 형태를 나타내는 것으로 의도되고, 천연 아미노산은 "L" 형태를 갖는다.

[0186] 바람직하게는, 기 C는 프로테아제를 위한 절단 인식 서열인 아미노산 서열을 함유한다. 많은 절단 인식 서열이 당업계에 공지되어 있다. 예를 들어, 문헌 [Matayoshi et al., *Science* 247: 954 (1990)]; [Dunn et al., *Meth. Enzymol.* 241: 254 (1994)]; [Seidah et al., *Meth. Enzymol.* 244: 175 (1994)]; [Thornberry, *Meth. Enzymol.* 244: 615 (1994)]; [Weber et al., *Meth. Enzymol.* 244: 595 (1994)]; [Smith et al., *Meth. Enzymol.* 244: 412 (1994)]; 및 [Bouvier et al., *Meth. Enzymol.* 248: 614 (1995)]을 참조하고; 이들의 개시 내용은 본원에 참고로 포함된다.

[0187] 세포에 의해 내재화되는 것이 의도되지 않는 접합체의 경우, 기 C가 표적 조직의 부근의 세포외 기질에 존재하는 프로테아제, 예를 들어 근처의 죽어가는 세포에 의해 방출되는 프로테아제 또는 종양 관련 프로테아제에 의해 절단되도록 이를 선택할 수 있다. 예시적인 세포외 종양 관련 프로테아제는 매트릭스 메탈로프로테아제 (MMP), 티메트 올리고웨პ티다제 (TOP) 및 CD10이다.

[0188] 세포에 의해 내재화되도록 설계된 접합체의 경우, 기 C는 바람직하게는 엔도솜 또는 리소솜 프로테아제, 특히 후자에 의해 절단되도록 선택된 아미노산 서열을 포함한다. 그러한 프로테아제의 비제한적인 예에는 카텝신 B, C, D, H, L 및 S, 특히 카텝신 B가 포함된다. 카텝신 B는 서열  $-\text{AA}^2\text{AA}^1-$  (여기서  $\text{AA}^1$ 은 염기성 또는 강력한 수소 결합 아미노산 (예컨대 리신, 아르기닌, 또는 시트룰린)이고,  $\text{AA}^2$ 는 소수성 아미노산 (예컨대 페닐알라닌, 발린, 알라닌, 류신 또는 이소류신)임), 예를 들어 Val-Cit (여기서 Cit은 시트룰린을 나타냄) 또는 Val-Lys에서 웨პ티드를 우세하게 절단한다. (본원에서, 문맥상 달리 분명하게 나타내지 않는 한, 아미노산 서열은  $\text{H}_2\text{N}-\text{AA}^2\text{AA}^1-\text{CO}_2\text{H}$ 에서와 같이 N에서 C 방향으로 기술됨). 카텝신-절단가능한 기에 관한 추가의 정보에 대해서는, 문헌 [Dubowchik et al., *Biorg. Med. Chem. Lett.* 8, 3341-3346 (1998)]; [Dubowchik et al., *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 8 3347-3352 (1998)]; 및 [Dubowchik et al., *Bioconjugate Chem.* 13, 855-869 (2002)]을 참조하고; 이들의 개시내용은 참고로 포함된다. 웨პ티딜 링커를 절단하는데 이용될 수 있는 또 다른 효소는 우세하게 Ala-Ala-Asn에서 절단하는 리소솜 시스테인 프로테아제인 레구메인이다.

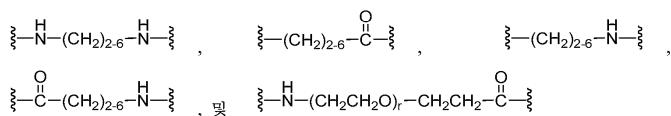
[0189] 한 실시양태에서, 기 C는 2개의 아미노산 서열  $-\text{AA}^2\text{AA}^1-$ 을 포함하는 웨პ티드이며, 여기서  $\text{AA}^1$ 은 리신, 아르기닌, 또는 시트룰린이고,  $\text{AA}^2$ 는 페닐알라닌, 발린, 알라닌, 류신 또는 이소류신이다. 또 다른 실시양태에서, C는 Val-Cit, Ala-Val, Val-Ala-Val, Lys-Lys, Ala-Asn-Val, Val-Leu-Lys, Cit-Cit, Val-Lys, Ala-Ala-Asn, Lys, Cit, Ser, 및 Glu로 이루어진 군으로부터 선택된 1 내지 5개의 아미노산 서열로 이루어진다.

[0190] 단일 아미노산으로 이루어진 절단가능한 기 C의 제조 및 설계는 US 2010/0113476 A1 (Chen et al.)에 개시되어 있으며, 그의 개시내용은 본원에 참고로 포함된다.

[0191] 기 C는 또한 광절단가능한 것, 예를 들어 빛에 노출되었을 때 절단되는 니트로벤질 에테르일 수 있다.

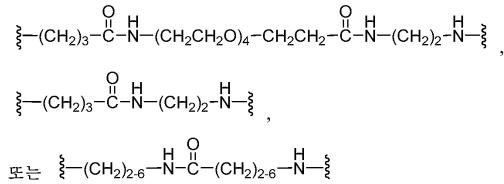
[0192] 기 C는 항체 Z 또는 화합물 D에 직접 결합될 수 있으며; 즉, 경우에 따라 스페이서 X<sup>Z</sup> 및 X<sup>D</sup>가 존재하지 않을 수 있다. 예를 들어, 기 C가 디술피드인 경우, 2개의 황 중 하나는 시스테인 잔기일 수 있거나 또는 항체 Z에 대한 대용물일 수 있다. 또는, 기 C는 항체의 탄수화물 측쇄 상의 알데히드에 결합된 히드라존일 수 있다. 또는, 기 C는 항체 Z의 리신 ε-아미노 기에 의해 형성된 웨티드 결합일 수 있다. 바람직한 실시양태에서, 화합물 D는 화합물 D 내의 카르복실 또는 아민 기에 대한 웨티딜 결합을 통해 기 C에 직접 결합된다.

[0193] 존재할 경우, 스페이서 X<sup>Z</sup>는 기 C와 항체 Z 사이에 전자가 후자에 의한 항원 결합을 입체적으로 방해하거나 또는 후자가 전자의 절단을 입체적으로 방해하지 않도록 공간적인 분리를 제공한다. 또한, 스페이서 X<sup>Z</sup>는 접합체에 증가된 용해도 또는 감소된 응집 특성을 부여하는데 사용될 수 있다. 스페이서 X<sup>Z</sup>는 하나 이상의 모듈화된 절편을 포함할 수 있으며, 이는 임의의 수의 조합으로 조립될 수 있다. 스페이서 X<sup>Z</sup>에 적합한 절편의 예로는



[0194]

[0195] 가 있으며, 여기서 아래첨자 r은 1 내지 24, 바람직하게는 2 내지 4이다. 이들 절편이 조합되어



[0196]

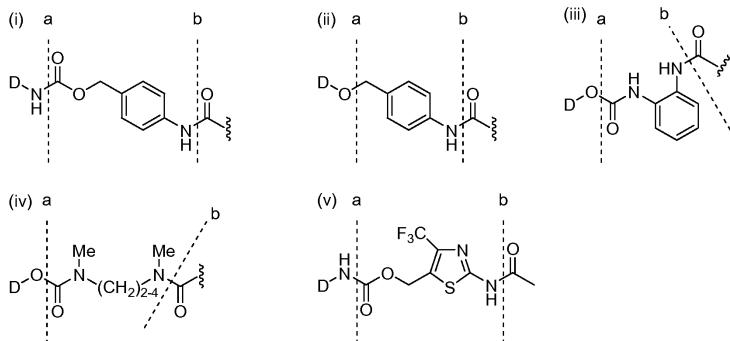
[0197] 와 같은 스페이서 X<sup>Z</sup>를 만들 수 있다.

[0198] 스페이서 X<sup>D</sup>는, 존재할 경우, 기 C와 화합물 D 사이에 후자가 전자의 절단을 입체적으로 또는 전자적으로 방해하지 않도록 공간적인 분리를 제공한다. 스페이서 X<sup>D</sup>는 또한 접합체에 부가적인 분자량 및 화학적 관능성이 도입되도록 작용할 수 있다. 일반적으로, 부가적인 질량 및 관능성은 혈청 반감기 및 그 밖의 접합체 특성에 영향을 미칠 것이다. 따라서, 스페이서 기의 혼명한 선택을 통해 접합체의 혈청 반감기를 조정할 수 있다. 스페이서 X<sup>D</sup>는 또한 스페이서 X<sup>Z</sup>와 관련하여 상기에서 기재한 바와 같이 모듈화된 절편으로부터 조립될 수 있다.

[0199]

스페이서 X<sup>Z</sup> 또는 X<sup>D</sup> 중 어느 하나, 또는 둘 모두는 자기 희생 모이어티를 포함할 수 있다. 자기 희생 모이어티는 (1) 기 C 및 항체 Z 또는 세포독소 D에 결합되고 (2) 기 C로부터의 절단이 경우에 따라 자기 희생 모이어티가 항체 Z 또는 세포독소 D로부터 그 자신을 비결합시키는 반응 순서가 개시되도록 하는 구조를 갖는 모이어티다. 다시 말하면, 항체 Z 또는 세포독소 D로부터 떨어진 부위에서의 반응 (기 C로부터의 절단)이 또한 X<sup>Z</sup>-Z 또는 X<sup>D</sup>-D 결합을 끊어지게 한다. 자기 희생 모이어티의 존재는 스페이서 X<sup>Z</sup>의 경우에 바람직한데, 이는 접합체가 절단된 후 스페이서 X<sup>D</sup> 또는 그의 부분이 계속해서 세포독소 D에 부착된 채로 존재하는 경우, 후자의 생물학적 활성이 손상될 수 있기 때문이다. 자기 희생 모이어티의 이용은 절단가능한 기 C가 폴리웨티드인 경우에 특히 바람직하다.

[0200] 파트너 분자 D 상의 히드록실 또는 아미노 기에 결합된 자기 희생 모이어티 (i)-(v)의 예를 이하에 나타낸다:



[0201]

[0202] 자기 희생 모이어티는 점선 a 및 b 사이의 구조이고, 인접 구조적 특징은 문맥에 제공한다. 자기 희생 모이어티 (i) 및 (v)는 화합물 D-NH<sub>2</sub>에 결합하는 반면 (즉, 화합물 D는 아미노 기를 통해 접합됨), 자기 희생 모이어티 (ii), (iii), 및 (iv)는 화합물 D-OH에 결합한다 (즉, 화합물 D는 히드록실 또는 카르복실 기를 통해 접합됨). 점선 b에서의 아미드 결합의 절단은 아미드 질소를 아민 질소로서 방출시켜, 경우에 따라 점선 a에서의 결합의 절단 및 D-OH 또는 D-NH<sub>2</sub>의 후속 방출을 야기하는 반응 순서를 개시시킨다. 자기 희생 모이어티에 관한 추가의 개시내용은, 문헌 [Carl et al., *J. Med. Chem.*, 24 (3), 479-480 (1981)]; WO 81/01145 (1981) (Carl et al.); [Dubowchik et al., *Pharmacology & Therapeutics*, 83, 67-123 (1999)]; US 6,214,345 B1 (2001) (Firestone et al.); [Toki et al., *J. Org. Chem.* 67, 1866-1872 (2002)]; [Doronina et al., *Nature Biotechnology* 21 (7), 778-784 (2003) (*erratum*, p. 941)]; US 7,691,962 B2 (Boyd et al.); US 2008/0279868 A1 (Boyd et al.); WO 2008/083312 A2 (Sufi et al.); US 7,375,078 B2 (Feng); 및 US 2003/0096743 A1 (Senter et al.)을 참조하고, 이들의 개시내용은 본원에 참고로 포함된다.

[0203]

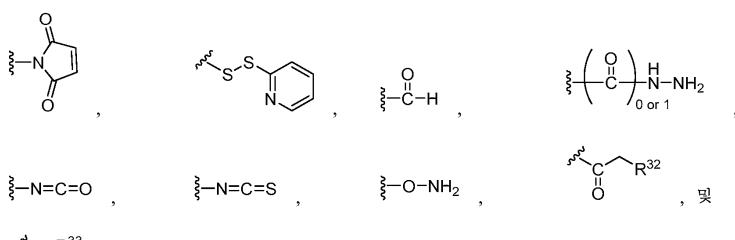
화합물 D - 링커 조성물

[0204] 본 발명의 접합체는 바람직하게는 먼저 화합물 D 및 링커 (X<sup>D</sup>)<sub>a</sub>(X<sup>Z</sup>)<sub>b</sub>를 연결하여 하기 화학식 V-a로 표시되는 약물-링커 조성물을 형성하는 것에 의해 제조되며,

[0205] <화학식 V-a>

[0206] D-(X<sup>D</sup>)<sub>a</sub>C(X<sup>Z</sup>)<sub>b</sub>-R<sup>31</sup>

[0207] 상기 식에서, R<sup>31</sup>은 접합체를 형성하기 위해 항체 Z 상의 관능기와 반응하는데 적합한 관능기이다. 적합한 기 R<sup>31</sup>의 예에는



[0208]

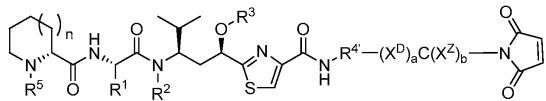
이) 포함되며,

[0209] 상기 식에서, R<sup>32</sup>는 Cl, Br, F, 메실레이트 또는 토실레이트이고, R<sup>33</sup>은 Cl, Br, I, F, OH, -O-N-숙신이미딜, -O-(4-나트로페닐), -O-펜타플루오로페닐, 또는 -O-테트라플루오로페닐이다. 적합한 모이어티 D-(X<sup>D</sup>)<sub>a</sub>C(X<sup>Z</sup>)<sub>b</sub>-R<sup>31</sup>을 제조하는데 일반적으로 이용가능한 화학이 US 7,087,600 B2 (2006) (Ng et al.); US 6,989,452 B2 (2006) (Ng et al.); US 7,129,261 B2 (2006) (Ng et al.); WO 02/096910 A1 (Ng et al.); US 7,691,962 B2 (Boyd et al.); US 2006/0004081 A1 (Chen et al.); US 2006/0247295 A1 (Gangwar et al.); US 2008/0279868 A1 (Boyd et al.); US 2008/0281102 A1 (Gangwar et al.); US 2008/0293800 A1 (Gangwar et al.); WO 2008/083312 A2 (Sufi et al.); 및 US 2010/0113476 A1 (Chen et al.)에 개시되어 있고; 이들의 개시내용은 본원에 참고로 포함된다.

함된다.

[0210] 바람직한 실시양태에서,  $R^{31}$ 은 말레이미드 기이고, 세포독성 화합물-링커 분자는 하기 화학식 V-b로 표시될 수 있으며,

[0211] <화학식 V-b>

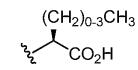
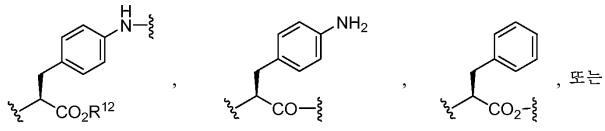
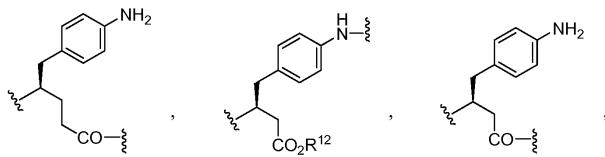
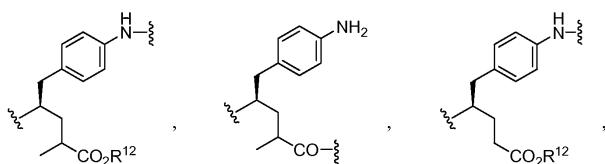


[0212] 상기 식에서,

[0214] n은 0, 1 또는 2이고;

[0215]  $R^1$ ,  $R^2$  및  $R^3$ 은 독립적으로 H, 비치환 또는 치환된  $C_1-C_{10}$  알킬, 비치환 또는 치환된  $C_2-C_{10}$  알케닐, 비치환 또는 치환된  $C_2-C_{10}$  알키닐, 비치환 또는 치환된 아릴, 비치환 또는 치환된 헤테로아릴, 비치환 또는 치환된  $(CH_2)_{1-2}O(C_1-C_{10}$  알킬), 비치환 또는 치환된  $(CH_2)_{1-2}O(C_2-C_{10}$  알케닐), 비치환 또는 치환된  $(CH_2)_{1-2}O(C_2-C_{10}$  알키닐),  $(CH_2)_{1-2}OC(=O)(C_1-C_{10}$  알킬), 비치환 또는 치환된  $(CH_2)_{1-2}OC(=O)(C_2-C_{10}$  알케닐), 비치환 또는 치환된  $(CH_2)_{1-2}OC(=O)(C_2-C_{10}$  알키닐), 비치환 또는 치환된  $C(=O)(C_1-C_{10}$  알킬), 비치환 또는 치환된  $C(=O)(C_2-C_{10}$  알케닐), 비치환 또는 치환된  $C(=O)(C_2-C_{10}$  알키닐), 비치환 또는 치환된 시클로지방족, 비치환 또는 치환된 헤테로시클로지방족, 비치환 또는 치환된 아릴알킬 또는 비치환 또는 치환된 알킬아릴이고;

[0216]  $R^{4'}$ 은



[0217] 이며,

[0218] 여기서  $R^{12}$ 은 H,  $C_1-C_5$  알킬,  $C_2-C_5$  알케닐 또는  $C_2-C_5$  알키닐이고;

[0219]  $R^5$ 은 H,  $C_1-C_5$  알킬,  $C_2-C_5$  알케닐,  $C_2-C_5$  알키닐,  $CO(C_1-C_5$  알킬),  $CO(C_2-C_5$  알케닐) 또는  $CO(C_2-C_5$  알키닐)이고;

[0220]  $X^D$  및  $X^Z$ 는 스페이서 기이고;

[0221] C는 질단가능한 기이고;

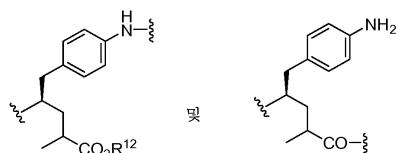
[0222] a 및 b는 독립적으로 0 또는 1이고;

[0223] 여기서 기  $R^{4'}$ 은 그의 카르복실 또는 아민 기를 통해 a가 1인 경우에는 기  $X^D$ 에, 또는 a가 0인 경우에는 기 C에

연결된다.

[0224] 바람직하게는,  $R^{4'}$ 의 카르복실 또는 아민 기와 기  $X^D$  또는 C 사이의 연결은, 경우에 따라 아미드 결합을 통한다.

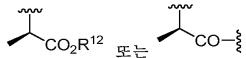
[0225] 구조



[0226]

[0227] 에서,

[0228] 카르복실 기에 대한 메틸 기 알파에서의 입체화학은 바람직하게는 자연 발생 튜부리신의 그것, 즉

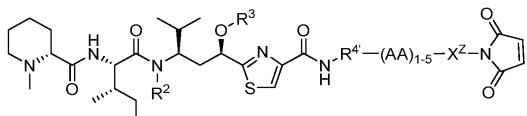


[0229]

[0230] 예상된다.

[0231] 바람직하게는, 화학식 V-b에서 n은 1이고,  $R^1$ 은 이소류실 잔기이고, a는 0이고, b는 1이고, C는 1 내지 5개의 아미노산 (바람직하게는 1 내지 2개)을 포함하고,  $R^{4'}$ 은 효소적으로 절단가능한 펩티딜 결합에 의해 C에 결합되고,  $R^5$ 는 Me이다. 이러한 바람직한 실시양태는 하기 화학식 V-c로 표시되며,

[0232] <화학식 V-c>

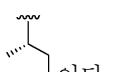


[0233]

[0234] 상기 식에서,  $R^2$ ,  $R^3$ , 및  $R^{4'}$ 은 화학식 V-b과 관련하여 정의된 바와 같고, 각각의 AA는 독립적으로 천연 아미노산이고,  $X^Z$ 는  $CH_2CH_2NHC(=O)(CH_2)_{2-5}$  또는  $C(=O)(CH_2)_{2-5}$ 이다. 바람직한 아미노산 AA는 리신, 시트룰린, 알라닌, 발린, 글리신 및 페닐알라닌이다.

[0235]

화학식 V-b에서,  $R^1$ 은 바람직하게는 H,  $C_1-C_5$  알킬,  $C_2-C_5$  알케닐 또는  $C_2-C_5$  알케닐이고, 보다 바람직하게는 이소류실 잔기, 즉



[0236]

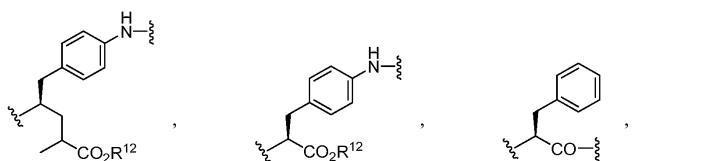
화학식 V-b 및 V-c에서,  $R^2$ 는 바람직하게는 H,  $C_1-C_5$  알킬,  $C_2-C_5$  알케닐,  $CH_2O(C_1-C_5$  알킬),  $CH_2O(C_2-C_5$  알케닐),  $CH_2O(C=O)(C_1-C_5$  알킬) 또는  $CH_2OC(=O)(C_2-C_5$  알케닐)이고; 보다 바람직하게는 H, Me, Et,  $CH_2OMe$ ,  $CH_2OEt$ ,  $CH_2OC(=O)i-Bu$ ,  $CH_2OC(=O)n-Pr$ ,  $CH_2OC(=O)CH=CH_2$  또는  $CH_2OC(=O)Me$ 이다.

[0238]

화학식 V-b 및 V-c에서,  $R^3$ 은 바람직하게는 H,  $C_1-C_5$  알킬,  $C_2-C_5$  알케닐,  $C(=O)C_1-C_5$  알킬 또는  $C(=O)C_2-C_5$  알케닐이고; 보다 바람직하게는 H, Me, Et 또는  $C(=O)Me$ 이다.

[0239]

화학식 V-b 및 V-c에서,  $R^{4'}$ 은 바람직하게는



[0240] , 또는 이고,

[0241]  $R^{12} \circ]$

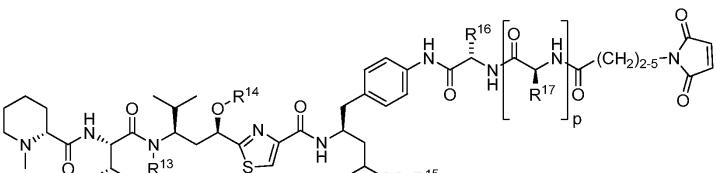
[0242] 와 같고,

[0243]  $R^{12}$  가 H, Me 또는 Et 와 같은 것이 특히 바람직하다.

[0244] 화학식 V-b에서, n은 바람직하게는 1이고,  $R^5$ 는 바람직하게는 메틸이고; 즉, Mep 서브유닛의 고리는 바람직하게는 N-메틸 피페리디닐 고리이다.

[0245] 또 다른 실시양태에서, 본 발명은 하기 화학식 V-d로 표시되는 구조를 갖는 화합물을 제공하며,

[0246] <화학식 V-d>

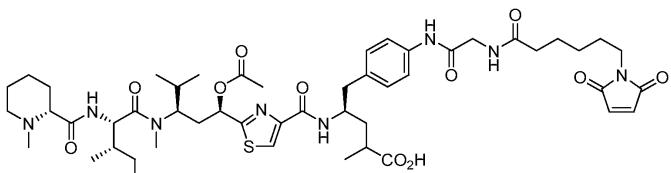


[0247]

[0248] 상기 식에서,  $R^{13}$ 은 Me, n-Pr,  $CH_2OMe$  또는  $CH_2OC(=O)CH_2CH(Me)_2$ 이고;  $R^{14}$ 는 Me 또는  $C(=O)Me$ 이고;  $R^{15}$ 는 H 또는  $C_1-C_5$  알킬 (바람직하게는 H, Me 또는 Et)이고;  $R^{16}$ 은 리신 ( $(CH_2)_4NH_2$ ) 또는 시트룰린 ( $(CH_2)_3NHC(=O)NH_2$ ) 측쇄기이고;  $R^{17}$ 은 빌린 ( $C(Me)_2$ ) 또는 알라닌 (Me) 측쇄기이고; p는 0 또는 1이다.

[0249] 본 발명의 구체적인 세포독성 화합물-링커 구축물의 예가 이하에서 화학식 VI-a 내지 VI-t로 나타내어진다. 화합물-링커 VI-n이 특히 바람직하다. 이는 말레이이미드 기를 가지며, 이하에서 기재한 바와 같은 절차에 의해 그의 술프히드릴 기를 통해 항체에 접합될 준비가 되어 있다.

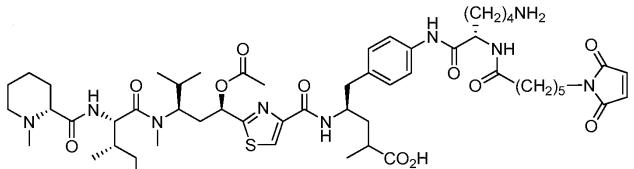
[0250] <화학식 VI-a>



[0251]

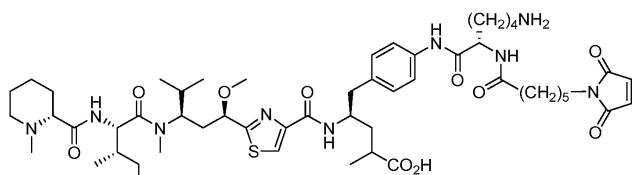
[0252]

&lt;화학식 VI-b&gt;



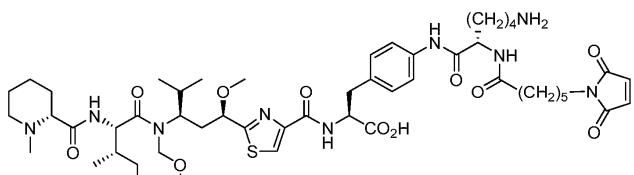
[0253]

&lt;화학식 VI-c&gt;



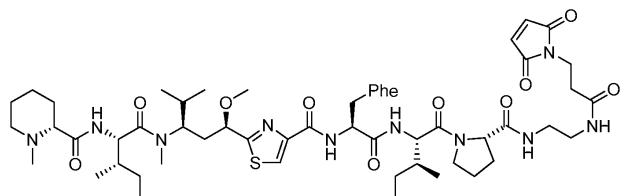
[0255]

&lt;화학식 VI-d&gt;



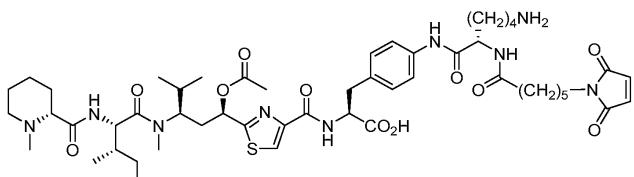
[0257]

&lt;화학식 VI-e&gt;



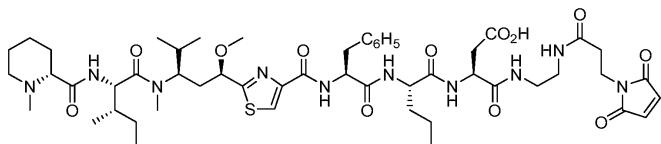
[0259]

&lt;화학식 VI-f&gt;



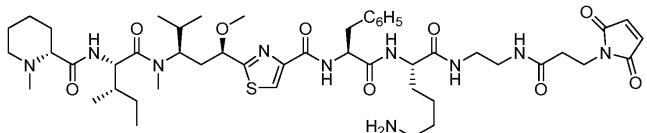
[0261]

&lt;화학식 VI-g&gt;



[0263]

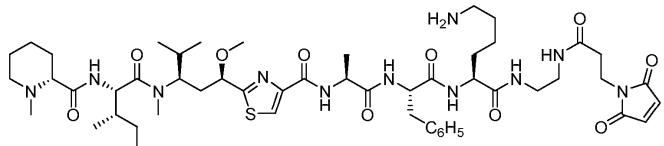
&lt;화학식 VI-h&gt;



[0265]

[0266]

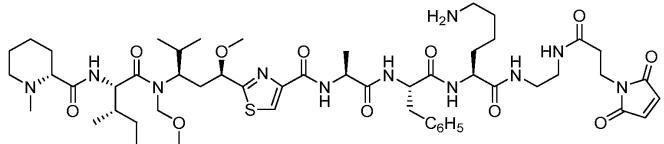
&lt;화학식 VI-i&gt;



[0267]

[0268]

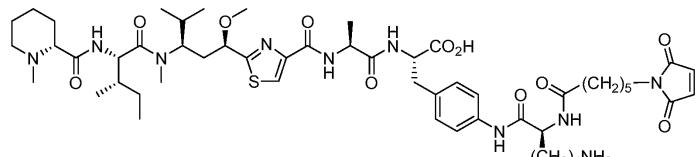
&lt;화학식 VI-j&gt;



[0269]

[0270]

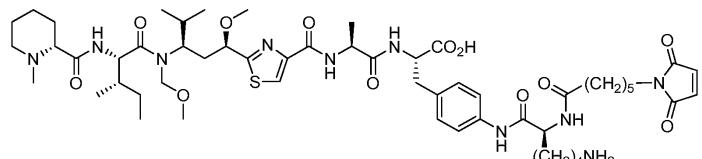
&lt;화학식 VI-k&gt;



[0271]

[0272]

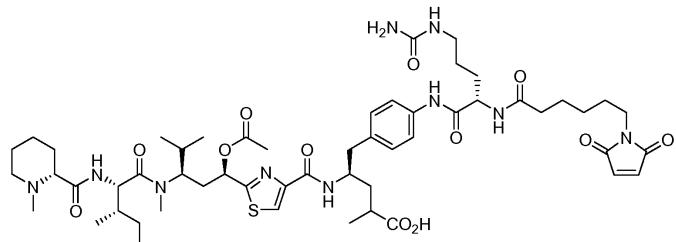
&lt;화학식 VI-l&gt;



[0273]

[0274]

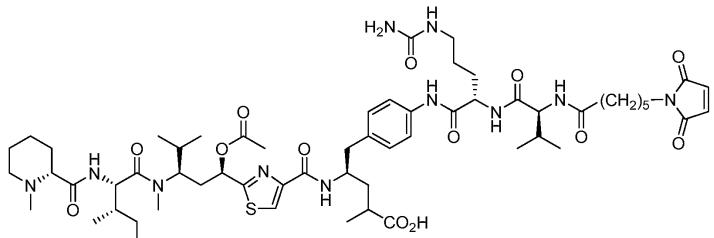
&lt;화학식 VI-m&gt;



[0275]

[0276]

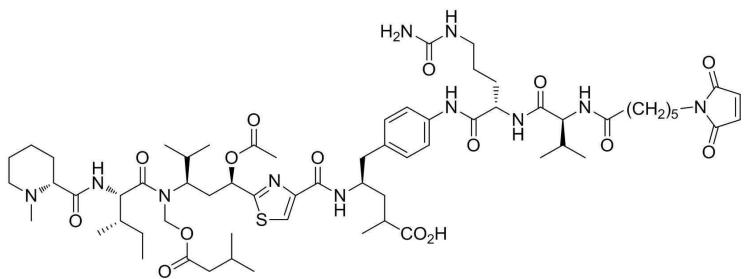
&lt;화학식 VI-n&gt;



[0277]

[0278]

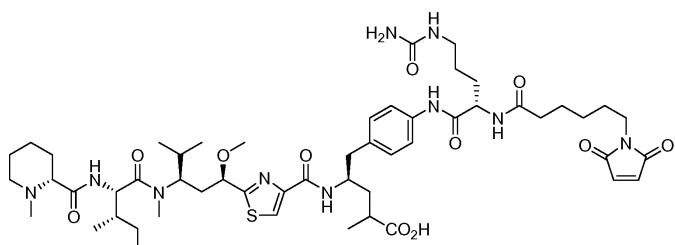
&lt;화학식 VI-o&gt;



[0279]

[0280]

&lt;화학식 VI-p&gt;

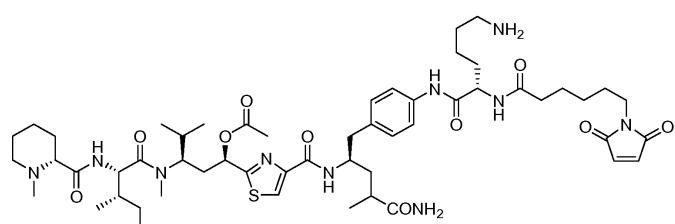


[0281]

및

[0282]

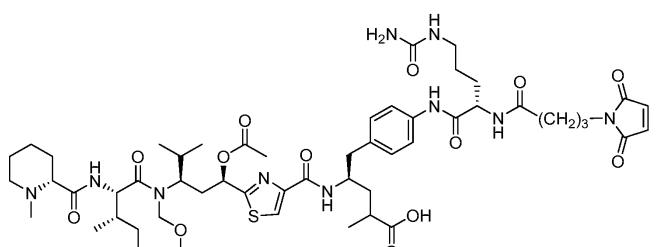
&lt;화학식 VI-q&gt;



[0283]

[0284]

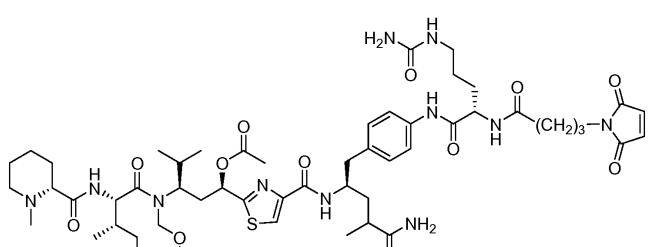
&lt;화학식 VI-r&gt;



[0285]

[0286]

&lt;화학식 VI-s&gt;

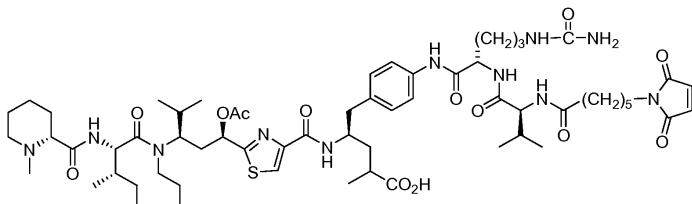


[0287]

및

[0288]

&lt;화학식 VI-t&gt;



[0289]

접합체의 제조

[0290]

다음은 예시적인 절차로, 상기한 바와 같이 리신  $\epsilon$ -아미노 기를 2-이미노티울란과 반응시킨 후 말레이미드-함유 약물-링커 모이어티와 반응시키는 것에 의해 항체에 유리 티울 기를 도입하는 것을 기초로 한다. 먼저 항체를 50 mM NaCl 및 2 mM 디에틸렌 트리아민 펜타아세트산 (DTPA)을 함유하는 0.1 M 포스페이트 완충제 (pH 8.0)로 완충제 교환하고, 5-10 mg/mL로 농축시킨다. 2-이미노티울란을 항체에 첨가하는 것을 통해 티울화가 이루어진다. 첨가하는 2-이미노티울란의 양은 예비 실험에 의해 결정될 수 있고, 항체마다 상이할 수 있다. 예비 실험에서, 증가량의 2-이미노티울란 적정량을 항체에 첨가한 후, 항체와 함께 1시간 동안 RT (실온, 약 25°C)에서 인큐베이션하고, 세파텍스™ G-25 칼럼을 이용하여 항체를 50 mM pH 6.0 HEPES 완충제로 탈염시키고, 디티오디피리딘 (DTDP)과 반응시켜 도입된 티울 기의 수를 신속하게 결정한다. 티울화의 DTDP와의 반응은 티오피리딘을 유리시키고, 이는 324 nm에서 분광분석에 의해 모니터링할 수 있다. 전형적으로 0.5-1.0 mg/mL 단백질 농도의 샘플을 사용한다. 280 nm에서의 흡광도를 이용하여 샘플 내 단백질 농도를 정확하게 결정할 수 있고, 이어서 각 샘플의 분취액 (0.9 mL)을 0.1 mL DTDP (에탄올 중 5 mM 원액)와 함께 10분 동안 RT에서 인큐베이션한다. 블랭크 완충제 샘플 단독 + DTDP를 또한 나란히 인큐베이션한다. 10분 후에, 324 nm에서의 흡광도를 측정하고, 티오피리딘에 대한 흡광 계수  $19,800 \text{ M}^{-1}$ 을 이용하여 티울 기의 수를 정량한다.

[0291]

전형적으로 항체당 약 3개의 티울 기의 티울화 수준이 바람직하다. 예를 들어, 일부 항체의 경우, 이는 2-이미노티울란을 15배 몰 과량으로 첨가한 후 RT에서 1시간 동안 인큐베이션하는 것에 의해 달성될 수 있다. 이어서, 항체를 2-이미노티울란과 함께 목적하는 몰비로 인큐베이션한 다음, 접합 완충제 (5 mM 글리신 및 2 mM DTPA를 함유하는 50 mM pH 6.0 HEPES 완충제)로 탈염시킨다. 티울화된 물질을 빙상에 유지시키면서 도입된 티울의 개수를 상기한 바와 같이 정량한다.

[0292]

도입된 티울의 수를 확인한 후, 약물-링커 모이어티를 티울 당 3배 몰 과량으로 첨가한다. 최종 농도의 5% 디메틸су폴시드 (DMSO), 또는 유사한 대안 용매를 또한 함유하는 접합 완충제 중에서 접합 반응이 진행되도록 한다. 통상, 약물-링커 원액을 100% DMSO에 용해시킨다. 원액을 티울화된 항체에 직접 첨가하여 첨가된 DMSO가 최종 농도를 10%에 이르게 하는데 충분하게 하거나, 또는 최종 농도 10%의 DMSO를 함유하는 접합 완충제 중에 사전-회석시킨 후, 동 부피의 티울화된 항체를 첨가한다.

[0293]

접합 반응 혼합물을 RT에서 2시간 동안 교반하면서 인큐베이션한다. 인큐베이션 후에, 접합 반응 혼합물을 원심분리하고, 0.2  $\mu\text{m}$  필터를 통해 여과한다. 접합체의 정제는 많은 방법을 이용하여 크로마토그래피를 통해 달성할 수 있다. 한 방법에서, 접합체는 5 mM 글리신 및 50 mM NaCl을 함유하는 50 mM pH 7.2 HEPES 완충제로 사전 평형화시킨 세파크릴(SEPHACRYL)™ S200 칼럼 상에서 크기 배제 크로마토그래피에 의해 정제한다. 크로마토그래피는 28 cm/h의 선형 유량으로 행한다. 접합체를 함유하는 분획을 모으고, 풀링하고, 농축시킨다. 별법적 방법에서는, 이온 교환 크로마토그래피를 통해 정제를 달성할 수 있다. 조건은 항체마다 다르며, 각 경우에서 최적화되어야 한다. 예를 들어, 항체-약물 접합체 반응 혼합물을 5 mM 글리신을 함유하는 50 mM pH 5.5 HEPES 중에 사전 평형화시킨 SP-세파로스™ 칼럼에 적용한다. 항체 접합체를 평형 완충제 중의 0-1 M NaCl 구배를 이용하여 pH 5.5에서 용출시킨다. 접합체를 함유하는 적절한 분획을 풀링하고, 제제 완충제 (5 mM 글리신 및 100 mM NaCl을 함유하는 50 mM pH 7.2 HEPES 완충제)에 대해 투석한다.

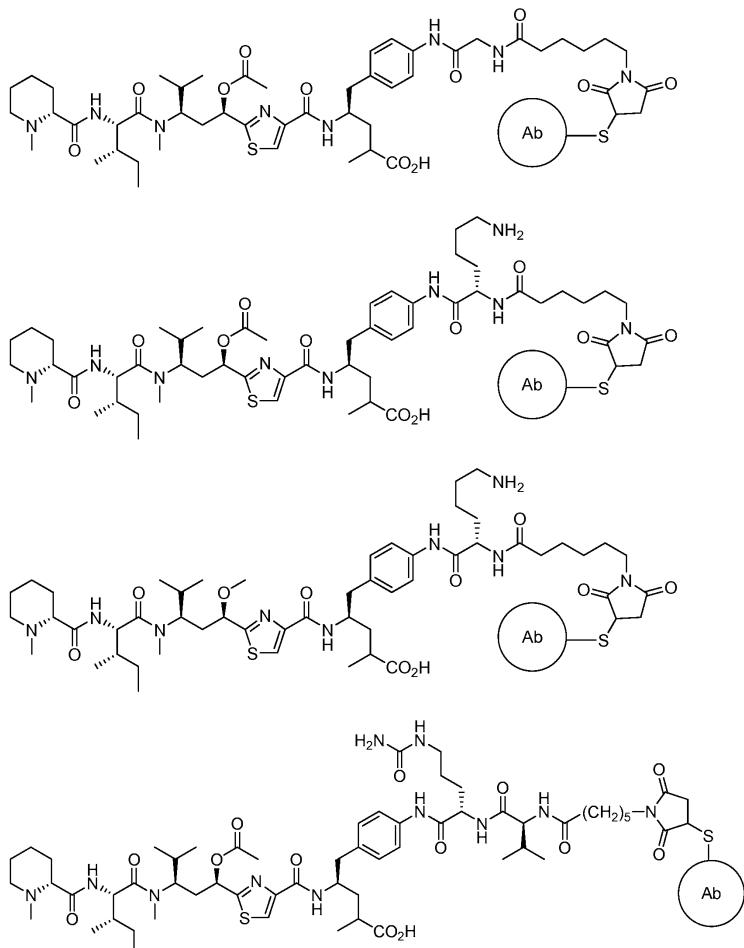
[0294]

당업자는 상술한 조건 및 방법론이 예시적인 것이며 비제한적이고, 접합을 위한 다른 접근법이 당업계에 공지되어 있으며 본 발명에서 이용가능하다는 것을 이해할 것이다.

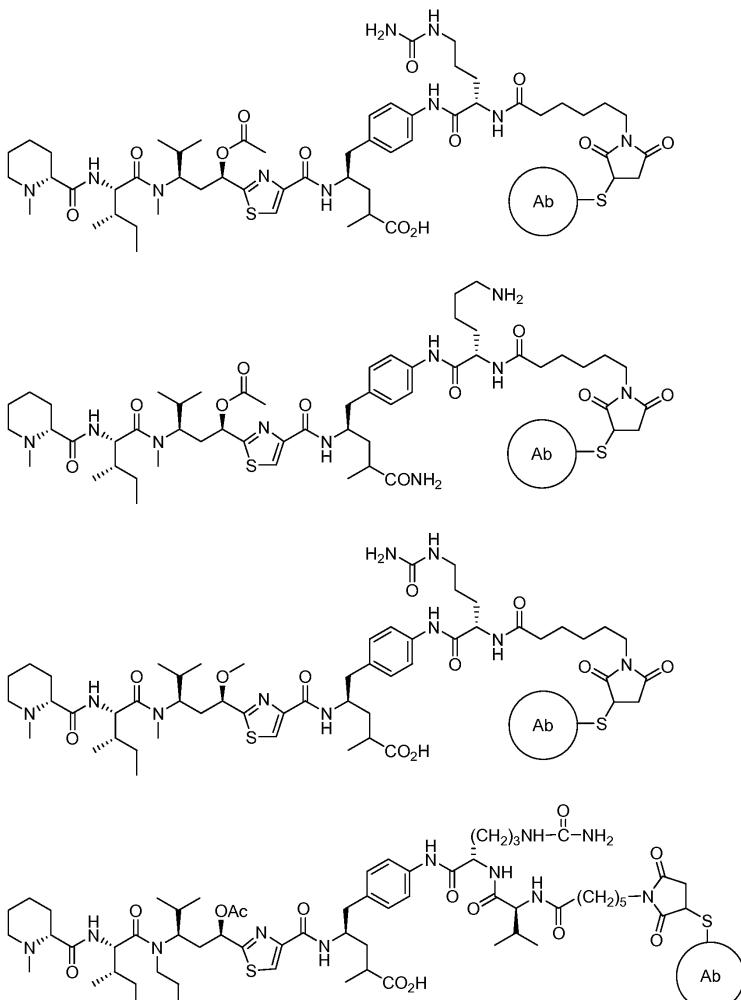
[0295]

상기한 기술을 이용하여, 본 발명의 화합물을 항-PSMA 항체인 항체 2A10 (US 2009/0297438 (Huang et al.)); 항-CD70 항체인 2H5 (US 2009/0028872 (Terrett et al.)); 항-CD70 항체인 1F4 (WO 2008/074004 (Coccia et al.)); 또는 항-메소텔린 항체인 6A4 (WO 2009/045957 (Terrett et al.))를 이용하여 접합시켰다. 생성된 접합체는 하기 화학식으로 도시될 수 있으며, 여기서 Ab는 항체를 나타낸다. 당업자는 이들 화학식에서 세포독소

-항체 화합물 비가 단순히 1:1로 표시되어 있지만, 실제로 비는 통상 2 내지 3 더 크다는 것을 이해할 것이다.



[0297]



[0298]

제약 조성물

[0300]

또 다른 측면에서, 본 개시내용은 제약상 허용되는 부형제와 함께 제제화된 본 개시내용의 화합물을 포함하는 제약 조성물을 제공한다. 이는 임의로는 하나 이상의 추가의 제약상 활성인 성분, 예컨대 항체 또는 또 다른 약물을 함유할 수 있다. 제약 조성물은 또 다른 치료제, 특히 또 다른 항암제와 함께 조합 요법으로 투여될 수 있다.

[0301]

제약 조성물은 하나 이상의 부형제를 포함할 수 있다. 사용될 수 있는 부형제는 담체, 표면 활성제, 증점제 또는 유화제, 고체 결합제, 분산 또는 혼탁 보조제, 가용화제, 착색제, 향미제, 코팅제, 봉해제, 윤활제, 감미제, 보존제, 등장화제, 및 이들의 조합물을 포함한다. 적합한 부형제의 선택 및 사용은 문헌 [Gennaro, ed., *Remington: The Science and Practice of Pharmacy*, 20th Ed. (Lippincott Williams & Wilkins 2003)]에 교시되어 있으며, 이의 개시내용은 본원에 참고로 포함된다.

[0302]

바람직하게는, 제약 조성물은 정맥내, 근육내, 피하, 비경구, 척수 또는 표피 투여를 위해 적합하다 (예를 들어, 주사 또는 주입에 의함). 투여 경로에 따라, 활성 화합물은 산의 작용 및 화합물을 불활성화시킬 수 있는 다른 천연 조건으로부터 상기 화합물을 보호하는 물질 내에 코팅될 수 있다. 어구 "비경구 투여"는 대체로 주사에 의한, 경장 및 국소 투여 이외의 투여 방식을 의미하고, 비제한적으로 정맥내, 근육내, 동맥내, 경막내, 피막내, 안와내, 심장내, 피내, 복강내, 경기관, 피하, 표피하, 관절내, 피막하, 지주막하, 척수내, 경막외 및 흉골내 주사 및 주입을 포함한다. 별법적으로, 제약 조성물은 비-비경구 경로, 예컨대 국소, 표피 또는 점막 투여 경로를 통해, 예를 들어 비강내, 경구, 질내, 직장, 설하 또는 국소적으로 투여될 수 있다.

[0303]

제약 조성물은 멸균 수용액 또는 분산액의 형태로 존재할 수 있다. 이들은 또한 마이크로에멀젼, 리포솜, 또는 높은 약물 농도를 달성하는데 적합한 다른 규칙적인(ordered) 구조로 제제화될 수 있다.

[0304]

단일 투여 형태를 생산하기 위해 담체 물질과 조합될 수 있는 활성 성분의 양은 치료할 대상체 및 특정 투여 방식에 따라 변할 것이고, 일반적으로 치료 효과를 생성하는 조성물의 양일 것이다. 일반적으로 100%를 기준으

로, 그 양은 제약상 허용되는 담체와 조합되어 약 0.01% 내지 약 99% 활성 성분, 바람직하게 약 0.1% 내지 약 70%, 가장 바람직하게 약 1% 내지 약 30% 활성 성분의 범위일 것이다.

[0305] 투여 요법은 치료 반응을 제공하기 위해 조절된다. 예를 들어, 단일 볼루스가 투여될 수 있거나, 여러 분할 용량이 시간 경과에 따라 투여될 수 있거나, 또는 용량이 치료 상황의 긴급성에 따라 정해지는 바에 비례하여 감소 또는 증가될 수 있다. 비경구 조성물을 투여의 용이성 및 투여량의 균일성을 위해 투여 단위 형태로 제제화하는 것이 특히 유리하다. "투여 단위 형태"는 치료할 대상체에 대한 단일 투여량으로서 적합한 물리적으로 분리된 단위를 지칭하고, 각 단위는 요구되는 제약 담체와 함께 목적하는 치료 반응을 제공하도록 계산된 소정량의 활성 화합물을 함유한다.

[0306] 투여량은 숙주 체중 kg 당 약 0.0001 내지 100 mg, 보다 통상적으로는 0.01 내지 5 mg의 범위이다. 예를 들어, 투여량은 0.3 mg/kg 체중, 1 mg/kg 체중, 3 mg/kg 체중, 5 mg/kg 체중 또는 10 mg/kg 체중일 수도 있고, 또는 1 내지 10 mg/kg의 범위 이내일 수도 있다. 예시적인 치료 요법은 1주당 1회, 매 2주마다 1회, 매 3주마다 1회, 매 4주마다 1회, 1개월에 1회, 매 3개월마다 1회, 또는 매 3개월 내지 매 6개월마다 1회 투여이다. 바람직한 투여 요법은 하기의 투여 스케줄 중 하나를 이용하는, 정맥내 투여를 통한 체중 kg 당 1 mg 또는 체중 kg 당 3 mg을 포함한다: (i) 6회의 투약은 매 4주마다, 그후에는 매 3개월마다; (ii) 매 3주마다; (iii) 1회는 체중 kg 당 3 mg, 이어서 매 3주마다 체중 kg 당 1 mg. 일부 방법에서, 투여량은 약 1-1000  $\mu$ g/ml, 일부 방법에서는 약 25-300  $\mu$ g/ml의 혈장 항체 농도를 달성하도록 조절된다.

[0307] 본 발명의 화합물의 "치료 유효량"은 바람직하게는 질환 증상의 중증도를 감소시키거나, 질환 증상이 없는 기간의 빈도 및 지속 기간을 증가시키거나, 또는 손상 또는 질환 고통으로 인한 무능력을 방지한다. 예를 들어, 종양 보유 대상체의 치료를 위해, "치료 유효량"은 바람직하게는 비처리 대상체에 비해 종양 성장을 적어도 약 20%, 보다 바람직하게는 적어도 약 40%, 훨씬 더 바람직하게는 적어도 약 60%, 보다 더 바람직하게는 적어도 약 80% 만큼 억제한다. 치료 유효량의 치료 화합물은 전형적으로 인간이거나 다른 포유동물일 수 있는 대상체에서 종양 크기를 감소시키거나, 달리 증상을 개선할 수 있다.

[0308] 제약 조성물은 제어 또는 지속 방출 제제, 예를 들어 임플란트, 경피 패치, 및 마이크로캡슐화 전달 시스템일 수 있다. 생분해성의 생체적합성 중합체, 예컨대 에틸렌 비닐 아세테이트, 폴리무수물, 폴리글리콜산, 콜라겐, 폴리오르토에스테르 및 폴리락트산이 사용될 수 있다. 예를 들어, 문헌 [Sustained and Controlled Release Drug Delivery Systems, J.R. Robinson, ed., Marcel Dekker, Inc, New York, 1978]을 참조한다.

[0309] 치료 조성물은 (1) 무바늘 피하 주사 장치 (예를 들어, US 5,399,163; 5,383,851; 5,312,335; 5,064,413; 4,941,880; 4,790,824; 및 4,596,556); (2) 마이크로-주입 펌프 (US 4,487,603); (3) 경피 장치 (US 4,486,194); (4) 주입 장치 (US 4,447,233 및 4,447,224); 및 (5) 삼투 장치 (US 4,439,196 및 4,475,196)와 같은 의료 기기를 통해 투여될 수 있으며; 상기 문헌의 개시내용은 본원에 참고로 포함된다.

[0310] 특정 실시양태에서, 제약 조성물은 생체 내에서 적절한 분포가 보장되도록 제제화될 수 있다. 예를 들어, 본 발명의 치료 화합물이 혈액-뇌 장벽을 가로지르도록 보장하기 위해, 이들을 리포솜 내에 제제화할 수 있고, 리포솜은 특정 세포 또는 장기로의 선택적 수송을 향상시키는 표적화 잔기를 추가로 포함할 수 있다. 예를 들어, US 4,522,811; 5,374,548; 5,416,016; 및 5,399,331; 문헌 [V.V. Ranade (1989) *J. Clin. Pharmacol.* 29:685]; [Umezawa *et al.*, (1988) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 153:1038]; [Bloeman *et al.*, (1995) *FEBS Lett.* 357:140]; [M. Owais *et al.*, (1995) *Antimicrob. Agents Chemother.* 39:180]; [Briscoe *et al.*, (1995) *Am. J. Physiol.* 1233:134]; [Schreier *et al.*, (1994) *J. Biol. Chem.* 269:9090]; [Keinanen and Laukkonen (1994) *FEBS Lett.* 346:123]; 및 [Killion and Fidler (1994) *Immunomethods* 4:273]를 참조한다.

### 용도

[0312] 본 발명의 화합물 또는 그의 접합체는 질환, 예컨대 이들로 한정되는 것은 아니지만, 과다증식성 질환, 예를 들어: 머리, 목, 비강, 부비동, 비인두, 구강, 구인두, 후두, 하인두, 타액선 및 부신경절종의 종양을 비롯한 두경부암; 간 및 담도계의 암, 특히 간세포 암종; 장암, 특히 결장직장암; 난소암; 소세포 및 비소세포 폐암 (SCLC 및 NSCLC); 유방암 육종, 예컨대 섬유육종, 악성 섬유성 조직구종, 배아성 횡문근육종, 평활근육종, 신경 섬유육종, 골육종, 활막 육종, 지방육종 및 폐포 연부 육종; 백혈병, 예컨대 급성 전골수구성 백혈병 (APL), 급성 골수성 백혈병 (AML), 급성 림프모구성 백혈병 (ALL) 및 만성 골수성 백혈병 (CML); 중추신경계의 신생물, 특히 뇌암; 다발성 골수종 (MM), 림프종, 예컨대 호지킨 림프종, 림프형질세포양 림프종, 여포성 림프종, 점막-관련 림프양 조직 림프종, 외투 세포 림프종, B-계통 대세포 림프종, 버켓 림프종, 및 T-세포 역형성 대세포 림

프종을 표적화하는데 사용될 수 있다. 임상적으로, 본원에 기재된 방법의 실시 및 조성물의 사용은 암성 성장의 크기 또는 개수를 감소시키고/거나 관련 증상 (적용가능한 경우)을 감소시킬 것이다. 병리학적으로, 본원에 기재된 방법의 실시 및 조성물의 사용은 병리학적 관련 반응을 야기할 것으로, 예컨대 암 세포 증식을 억제하고, 암 또는 종양의 크기를 감소시키고, 추가의 전이를 방지하고, 종양 혈관신생을 억제할 것이다. 이같은 질환의 치료 방법은 치료 유효량의 본 발명의 조합물을 대상체에게 투여하는 것을 포함한다. 이러한 방법은 필요에 따라 반복될 수 있다. 특히, 암은 결장직장암, 간암, 전립선암, 유방암, 흑색종, 교모세포종, 폐암, 췌장암, 난소암, 다발성 골수종, 신암, 백혈병 (특히 ALL, APL 또는 AML) 또는 림프종일 수 있다.

[0313] 본 발명의 화합물 또는 그의 접합체는 다른 항암제 또는 세포독성제, 예를 들어 항체, 알킬화제, 혈관신생 억제제, 항대사물, DNA 절단제, DNA 가교제, DNA 삽입제, DNA 작은 홈 결합제, 에네디인, 열 충격 단백질 90 억제제, 히스톤 데아세틸라제 억제제, 면역조절제, 미세소관 안정화제, 뉴클레오시드 (퓨린 또는 피리미딘) 유사체, 핵 유출 억제제, 프로테아솔 억제제, 토포이소머라제 (I 또는 II) 억제제, 티로신 키나제 억제제, 및 세린/트레오닌 키나제 억제제와 함께 투여될 수 있다. 구체적인 항암제 또는 세포독성제로는  $\beta$ -라파콘, 안사미토신 P3, 아우리스타틴, 비칼루타미드, 블레오마이신, 보르테조닙, 부술판, 칼리스타틴 A, 캄프토데신, 카페시타빈, CC-1065, 시스플라틴, 크립토피신, 다우노루비신, 디소라졸, 도세탁센, 독소루비신, 두오카르마이신, 다이네마이신 A, 에포틸론, 에토포시드, 플록수리딘, 플록수리딘, 플루다라빈, 플루오르우라실, 게피티닙, 젤다나마이신, 17-알릴아미노-17-데메톡시젤다나마이신 (17-AAG), 17-(2-디메틸아미노에틸)아미노17-데메톡시젤다나마이신 (17-DMAG), 켐시타빈, 히드록시우레아, 이마티닙, 인터페론, 인터류킨, 이리노테칸, 메이탄신, 메토트렉세이트, 미토마이신 C, 옥살리플라틴, 파클리탁센, 수베로일아닐리드 히드록삼산 (SAHA), 티오텐파, 토포테칸, 트리코스타틴 A, 빈블라스틴, 빙크리스틴, 빈데신, 레날리도미드 (레블리미드(REVLIMID)®), 베바시주맙 (아바스틴(AVASTIN)®), 트라스투주맙 (헤르셉틴(HERCEPTIN)®) 및 세톡시맙 (에르비톡스(ERBITUX)®)이 포함된다.

#### [0314] 실시예

[0315] 본 발명의 실시는 이하의 실시예를 참고하여 추가로 이해될 수 있으며, 이하의 실시예는 실례로서 제공되며 제한을 위해 제공되는 것은 아니다.

#### [0316] 실시예 1 - 반응식 1

[0317] 반응식 1 (도 1a 및 1b)은 본 발명의 화합물의 제조 방법을 도시한다.

[0318] 티오아미드 2. 2,2-디에톡시아세토니트릴 1 (25 g, 193 mmol)을 실온 (RT)에서 메탄올 (MeOH) 300 mL 중의  $(\text{NH}_4)_2\text{S}$  (40 mL, 265 mmol, 45% 수용액)와 혼합하였다. 반응 혼합물을 밤새 유지시킨 후, 진공 하에 농축시키고, 잔류물을 에틸 아세테이트 (EtOAc)에 녹였다. EtOAc 용액을 포화  $\text{NaHCO}_3$  용액에 이어 염수로 세척하고, 무수  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  상에서 건조시켰다. EtOAc를 증발시켜 티오아미드 2 (26 g, 159 mmol, 82%)를 백색 고체로서 수득하였다.

[0319]  $^1\text{H}\text{NMR}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  5.01 (s, 1H), 3.67 (m, 4H), 1.22 (t,  $J = 7.2$  Hz, 6H).

[0320] 메틸 2-(디에톡시메틸)티아졸-4-카르복실레이트 3. 분자체 (3A) 100 g을 MeOH 300 mL 중의 티오아미드 2 (25 g, 153 mmol) 및 메틸 브로모파루베이트 (20 mL, 163 mmol)의 반응 혼합물에 첨가하였다. 혼합물을 1.5시간 동안 환류시킨 후, 이를 냉각시키고, 셀라이트(CELITE)™를 통해 여과하였다. 여과물을 농축시키고, 칼럼을 통과시켜 (디클로로메탄 (DCM):EtOAc, 8:1) 티아졸 카르복실레이트 3 (34.5 g, 140 mmol, 91%)을 고체로서 수득하였고, 이를 추가의 정제 없이 다음 단계에서 사용하였다.

[0321] 메틸 2-포르밀티아졸-4-카르복실레이트 4. 티아졸-4-카르복실레이트 3 (30 g, 122 mmol)을 아세톤 300 mL에 용해시키고, 여기에 수성 HCl (21 mL, 2 M)을 첨가하였다. 반응 혼합물을 밤새 RT로 유지시킨 후, 반응 혼합물을 가열하고, 2시간 동안 60°C로 유지시켰다. 이어서 반응 혼합물을 냉각시키고, 진공하에 증발시켜 잔류물을 수득하였고, 이를 DCM 200 mL에 녹였다. 이어서 DCM 용액을 포화  $\text{NaHCO}_3$  용액에 이어 염수로 세척하고, 무수  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  상에서 건조시켰다. DCM 용액을 여과하고, 진공 하에 농축시켜 농축된 용액을 수득하였고, 이를 에테르로 연화처리하여 메틸 2-포르밀티아졸-4-카르복실레이트 4 (14 g, 82 mmol, 2단계 동안 54%)를 백색 고체로서 수득하였다.

$^1\text{H}\text{NMR}$  (400 MHz,

[0322]  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  133-8-p110.16 (d,  $J = 1.3$  Hz, 1H), 8.53 (d,  $J = 1.3$  Hz, 1H), 4.01 (s, 3H).

[0323] 술펜이민 7. (S)-2-메틸프로판-2-술핀아미드 5 (7.3 mL, 68 mmol)를 테트라히드로푸란 (THF) 100 mL에 용해시키고, 여기에  $Ti(OEt)_4$  (27 mL, 130 mmol) 및 3-메틸-2-부탄논 6 (8 g, 41 mmol)을 RT에서 첨가하였다. 반응 혼합물을 밤새 환류시킨 다음 냉각시키고, 염수 용액에 첨가하였다. 생성된 혼합물을 여과하고, 케이크를  $EtOAc$ 로 세척하였다. 유기 상을 농축시켜 잔류물을 수득하였고, 이를 실리카 겔 칼럼 크로마토그래피 (DCM: $EtOAc$ , 4:1)하여 술펜이민 7 (9.5 g, 37 mmol, 75%)을 오일로서 수득하였다.

$^1HNMR$  (400 MHz,  $CDCl_3$ )  $\delta$  2.53

(m, 1H), 2.29 (s, 3H), 1.22 (s, 9H), 1.12 (d,  $J$  = 4.2 Hz, 3H), 1.10 (d,  $J$  = 4.2 Hz, 3H) MS  
(ES+) m/z, 계산치 : m+1, 190.12, 실측치, 190.

[0324] [0325] 화합물 8. 리튬 디이소프로필 아미드 ("LDA", 60 mL, 108 mmol, 1.8 M)를  $-78^{\circ}C$ 에서 에테르 200 mL에 첨가한 후, 에테르 200 mL 중의 술펜이민 7 (18.9 g, 100 mmol)을 첨가하고, 생성된 반응 혼합물을 40분 동안 교반하였다.  $C_1Ti(OiPr)_3$  (203 mmol, 48.4 mL)을 반응 혼합물에 첨가하고, 용액을 60분 동안 교반하였다. THF 180 mL 중의 메틸 2-포르밀티아졸-4-카르복실레이트 4 (12.5 g, 72.6 mmol)의 용액을 반응 혼합물에 천천히 첨가하였다. 또 다른 2시간 후에  $-78^{\circ}C$ 에서, 아세트산 및 THF의 혼합물 (1/5 v/v, 4.9 mL)을 첨가하였다. 혼합물을 1시간에 걸쳐  $5^{\circ}C$ 로 가온한 다음, 염수 용액에 부었다. 이어서, 에테르 및  $EtOAc$  용액을 이용하여 염수 용액으로부터 목적 생성물을 추출하였다. 이어서 유기 상을 무수  $MgSO_4$  상에서 건조시키고, 여과하고, 증발시켰다. 잔류물을 2개의 칼럼을 통해 통과시켜 (DCM: $EtOAc$  및 헥산: $EtOAc$ ), 화합물 8 (19.6 g, 54 mmol, 75%)을 오일로서 수득하였다.

[0326] MS (ES+) m/z, 계산치 : m+1, 361.12, 실측치, 361.

[0327] 화합물 9. THF 200 mL 중의 화합물 8 (19 g, 52.7 mmol)의 용액을  $-78^{\circ}C$ 로 냉각시키고, 그 후  $Ti(OEt)_4$  (21.7 mL, 105 mmol)를 천천히 첨가하였다. 60분 후, 용액이 맑아지기 시작할 때,  $NaBH_4$  (31 mmol, 1.17 g)를 첨가하고, 2시간 후에 (더 긴 반응 시간은 에스테르의 환원을 야기함)  $MeOH$  10 mL를 첨가하였다. 이어서 혼합물을  $0^{\circ}C$ 로 가온하고, 많은 열음 중의  $HOAc$  1 mL에 부었다. 혼합물을 여과하고, 케이크를  $EtOAc$ 로 세척하였다. 분리한 후에, 유기 상을  $Na_2SO_4$ 로 건조시키고, 증발시켰다. 최종 잔류물을 칼럼을 통해 통과시켜 (DCM: $EtOAc$ , 1:4), 화합물 9 (19 g, 52 mmol, 99%)를 오일로서 수득하였다.

$^1HNMR$  (400

MHz,  $CDCl_3$ )  $\delta$  8.1 (s, 1H), 5.54 (d,  $J$  = 6.7 Hz, 1H), 5.16 (m, 1H), 3.92 (s, 3H), 3.42 ((m, 1H), 3.32 (d,  $J$  = 8.4 Hz, 1H), 2.25 (m, 1H), 1.88 (m, 1H), 1.68 (m, 1H), 1.26 (s, 9H), 0.91 (d,  $J$  = 6.8 Hz, 3H), 0.87 (d,  $J$  = 6.7 Hz, 3H).  $^{13}CNMR$  (100 MHz,  $CDCl_3$ )  $\delta$  177.9, 162.1, 146.6, 127.7, 67.9, 58.6, 56.4, 52.5, 40.8, 33.9, 23.1, 19.8, 17.4. MS (ES+) m/z,

계산치: m+1, 363.13, 실측치, 363.

[0328] [0329] 디메틸화 화합물 10. 수소화나트륨 (9.69 mmol, 60%, 387 mg)을 6 mL N,N-디메틸포름아미드 (DMF) 중의 화합물 9의 용액에  $5^{\circ}C$ 에서 첨가하고, 60분 후에 메틸 아이오다이드 (607  $\mu\ell$ , 9.7 mmol)를 첨가하였다. 3시간 동안 반응 혼합물을 교반한 후, 혼합물을 빙냉 포화  $NH_4Cl$  용액에 부었다. 에틸 에테르를 첨가하고, 유기 층을 염수로 세척하고, 무수  $MgSO_4$  상에서 건조시키고, 농축시켜 잔류물을 수득하였다. 잔류물을 칼럼을 통해 통과시켜 (헥산: $EtOAc$  1:4), 디메틸화 화합물 10 (314 mg, 0.805 mmol, 33%)을 액체로서 수득하였다.

$^1HNMR$  (400 MHz,  $CDCl_3$ )  $\delta$  8.17 (s, 1H), 4.87 (dd,  $J$  = 11.0 Hz,  $J$  = 2.5 Hz, 1H), 3.94 (s, 3H), 3.50 (s, 3H), 3.40 (m, 1H), 2.58 (s, 3H), 1.99 (m, 1H), 1.83 (m, 2H), 1.25 (s, 9H), 0.98 (d,  $J$  = 6.8 Hz, 3H), 0.95 (d,  $J$  = 6.7 Hz, 3H) MS (ES+) m/z,

계산치: m+1, 391.16, 실측치, 391.

[0330] [0331] 모노메틸 아민 11. 수성 HCl (4 N, 디옥산 중, 0.5 mL)을 5 mL  $MeOH$  중의 디메틸화 화합물 10 (370 mg, 0.95 mmol)의 용액에 첨가하였다. 60분 동안 반응 혼합물을 교반한 후, 진공 하에 증발시켜 모노메틸 아민 11 (362 mg)을 그의 HCl 염으로서 수득하였고, 이를 추가의 정제 없이 다음 단계에서 사용하였다.

[0332] MS (ES+) m/z, 계산치: m+1, 287.14, 실측치, 287.

[0333] 아미드 12. 모노메틸 아민 11 (362 mg, 1.12 mmol), Fmoc 화합물 22 (문현 [Wipf et al., 2007]에 따라 제조된 것; 1.2 g, 3.38 mmol) 및 N,N-디이소프로필에틸아민 (DIEA, 976  $\mu$ L, 5.6 mmol)을 5 mL DMF 중에서 RT에서 혼합하였다. 24시간 동안 교반한 후, 혼합물을 농축시키고, 잔류물을 EtOAc에 용해시켰다. 유기 상을  $\text{NaHCO}_3$ , 염수로 세척하고, 무수  $\text{MgSO}_4$  상에서 건조시키고, 농축시켜 잔류물을 수득하였다. 잔류물을 칼럼을 통해 통과시켜 (헥산:EtOAc:MeOH 7:3:0.6), 아미드 12 (466 mg, 0.75 mmol, 67%)를 오일로서 수득하였다. (ES+) m/z, 계산치: m+1, 622.2, 질측치, 622.

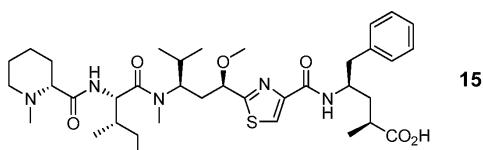
[0334] 화합물 13. 아미드 12 (466 mg, 0.75 mmol)를 5% 피페리딘을 함유하는 8 mL DCM에 RT에서 용해시켰다. 1시간 후에, 혼합물을 진공하에 증발시키고, 잔류물을 칼럼을 통해 시켜 오일 (150 mg)을 수득한 다음, 이것을 2 mL DCM 중의 (D)-N-메틸 피페롤리닉 산 23 (문현 [Peltier et al., 2006]에 따라 제조된 "D-Mep"; 50 mg, 0.35 mmol), N,N,N',N'-테트라메틸-0-(7-아자벤조트리아졸-1-일)우로늄 혼합물을 (HATU, 126 mg, 0.33 mmol), DIEA (152  $\mu$ L, 0.84 mmol)와 혼합하였다. 2.5시간 동안 교반한 후, 용매를 증발시켜 잔류물을 수득하였고, 이를 EtOAc에 용해시켰다. 이어서 유기 상을 포화  $\text{NaHCO}_3$ , 염수로 세척하고, 무수  $\text{MgSO}_4$  상에서 건조시키고, 농축시켜 잔류물을 수득하였다. 잔류물을 칼럼을 통해 통과시켜 (DCM:MeOH 0-10%), 화합물 13 (99 mg, 0.188 mmol, 25%)을 오일로서 수득하였다.

[0335] MS (ES+) m/z, 계산치: m+1, 525.3, 질측치, 525.

[0336] 산 14. 화합물 13 (99 mg, 0.18 mmol)을 MeOH 및 물의 3 mL 혼합물 (3:1 v:v)에 용해시키고, 여기에  $\text{NaOH}$  (370  $\mu$ L, 0.37 mmol, 1 M)를 첨가하였다. 2시간 동안 교반한 후, 반응 혼합물을 중화시키고 농축시켜 잔류물을 수득하였다. 잔류물을 C-18 칼럼을 통해 통과시켜 (물 (1% 트리플루오로아세트산 ("TFA")):아세토니트릴 (ACN) (1%TFA), 0-100%), 산 14 (78 mg, 0.125 mmol, 69%)를 TFA 염으로서 수득하였다. MS (ES+) m/z, 계산치: m+1, 511.29, 질측치, 511.

[0337] 화합물 15. DIEA (24  $\mu$ L, 137  $\mu$ mol)를 DMF (0.5 mL) 중의 산 14 (9 mg, 14.4  $\mu$ mol, TFA 염) 및 HATU (6 mg, 15  $\mu$ mol)의 용액에 RT에서 첨가하였다. 모든 산 14가 활성화된 후 (HPLC로 모니터링함), 튜부페닐알라닌 (문현 [Peltier et al., 2006]에 따라 제조된 것; 6.5 mg, 27  $\mu$ mol, HCl 염)을 첨가하였다. 20분 동안 교반한 후, 반응 혼합물을 C-18 칼럼을 통해 통과시켜 (물 (1% TFA):ACN (1%TFA), 0-100%), 화합물 15 (2.5 mg, 3  $\mu$ mol, 21%)를 백색 TFA 염으로서 수득하였다.

[0338] MS (ES+) m/z, 계산치: m+1, 700.4, 질측치, 700.



[0339]

[0340] 화합물 16. DIEA (20  $\mu$ L, 0.11 mmol)를 0.5 mL DMF 중의 산 14 (12 mg, 0.019 mmol, TFA 염), 페닐알라닌 메틸 에스테르 (5.3 mg, 0.024 mmol, HCl 염으로서) 및 HATU (11.4 mg, 0.03 mmol)의 용액에 첨가하였다. 30분 후에, 반응 혼합물을 C-18 칼럼을 통해 통과시켜 (물 (1% TFA):ACN (1%TFA) 0-100%), 화합물 16 (4.2 mg, 0.005 mmol, 26%)을 백색 TFA 염으로서 수득하였다.

[0341]

MS (ES+) m/z, 계산치: m+1, 672.89, 질측치, 672.5.

[0342]

화합물 16은 또한 상기에서 화학식 III-c로 지칭된다.

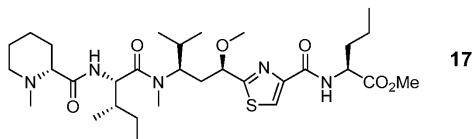
[0343]

화합물 17. DIEA (7  $\mu$ L, 0.04 mmol)를 DMF 중의 산 14 (5 mg, 0.008 mmol), 노르발린 메틸 에스테르 ("NVaM", 2 mg, 0.012 mmol) 및 HATU (4.5 mg, 0.012 mmol)의 용액에 첨가하였다. 30분 동안 반응 혼합물을 교반한 후, 조 혼합물을 C-18 칼럼을 통해 통과시켜 (물 (1% TFA):ACN (1%TFA) 0-100%), 화합물 17 (1.3 mg, 0.0017 mmol, 21%)을 백색 TFA 염으로서 수득하였다.

[0344]

MS (ES+) m/z, 계산치: m+1, 624.85, 질측치, 624.5.

[0345] 화합물 17은 또한 상기에서 화학식 III-e로 지칭된다.



[0346]

[0347] 산 18. 수성 NaOH ( $75 \mu\ell$ , 0.75 mmol, 10 M)를 MeOH 및 THF 혼합물 중의 화합물 16 (168 mg, 0.25 mmol)의 용액에 첨가하였다. 밤새 교반한 후, 혼합물을 중화시키고, 건고상태로 동결건조시켰다. 고체를 추가의 정제 없이 다음 단계에서 사용하였다. MS (ES+) m/z, 계산치: m+1, 658.36, 실측치, 658.4.

[0348] 산 18은 또한 상기에서 화학식 III-o로 지칭된다.

[0349] 노발릴 아미드 19. DIEA ( $5 \mu\ell$ , 0.03 mmol)를 DMF 중의 산 18 (5 mg, 0.006 mmol), HATU (3.5 mg, 0.009 mmol) 및 NVaM (1.5 mg, 0.009 mmol)의 용액에 첨가하였다. 30분 동안 교반한 후, 반응 혼합물을 C-18 칼럼을 통해 통과시켜 (물 (1% TFA):ACN (1%TFA) 0-100%), 노발릴 아미드 19 (2.2, 0.0025 mmol, 40%)를 백색 TFA 염으로서 수득하였다. MS (ES+) m/z, 계산치: m+1, 772.02, 실측치, 771.5.

[0350] 노발릴 아미드 19는 또한 상기에서 화학식 III-f로 지칭된다.

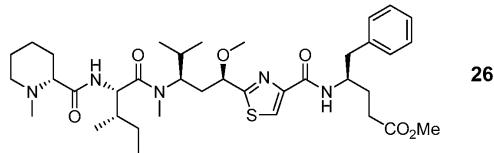
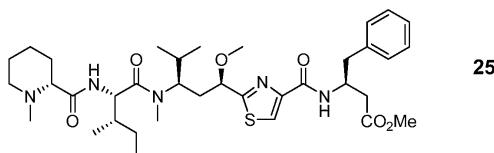
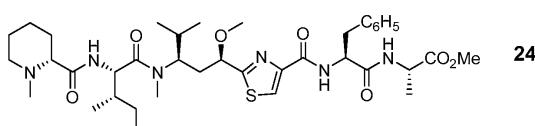
[0351] 화합물 24, 25 및 26. 이들 3종의 화합물은 상기 기재한 바와 유사한 절차를 이용하여 산 14 또는 18로부터 합성하였다. 생성물은 모두 C-18 칼럼에 의해 정제하였다 (물 (1% TFA):ACN (1%TFA) 0-100%). 수율은 25-50%로 다양하였다.

화합물 24: MS (ES+) m/z, 계산치: m+1, 743.4, 실측치 743.

화합물 25: MS (ES+) m/z, 계산치: m+1, 686.39, 실측치 686.5 화합물 26: MS

[0352]

(ES+) m/z, 계산치: m+1, 700.40, 실측치 700.5.



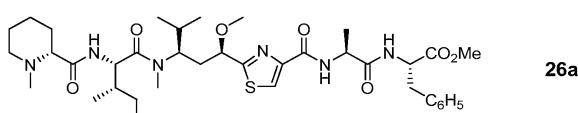
[0353]

[0354] 화합물 24는 또한 상기에서 화합물 III-g로 지칭된다.

[0355] 화합물 26a. 화합물 14를 화합물 16에서 기재한 것과 동일한 절차에 따라 Ala-Phe OMe와 커플링시켰다. 생성물을 C-18 칼럼에 의해 정제하였다 (물 (1% TFA):ACN (1%TFA), 0-100%). MS (ES+) m/z, 계산치: m+1, 743, 실측치 743.4.

[0356]

화합물 26a는 또한 상기에서 화학식 III-1로 지칭된다.



[0357]

실시예 2 - 반응식 2

[0359] 본 실시예는 반응식 2에 나타난 화합물의 합성을 기술한다 (도 2).

[0360] 화합물 28. 폐닐알라닌 메틸 에스테르 (10 mg, 46.5  $\mu$ mol) 및 HATU (14.7 mg, 38.6  $\mu$ mol)를 0.5 mL DMF 중의 화합물 27 (문헌 [Peltier et al., 2006]에 따라 제조된 것; 10 mg, 15.5  $\mu$ mol, 포르메이트 염)의 용액에 첨가한 후, RT에서 DIEA를 첨가하였다. 30분 동안 교반한 후, DMSO (2 mL)를 첨가하고, 반응 혼합물을 바로 C-18 칼럼을 통해 통과시켜 (물 (5 mM 포름산암모늄, pH 7.2):ACN 0-100%), 화합물 28 (3.2 mg, 25%)을 백색 고체 (포르메이트 염)로서 수득하였다.

[0361] MS (ES+) m/z, 계산치: m+1, 758.41, 실탐치 758.4.

[0362] 화합물 28은 또한 상기에서 화학식 III-h로 지칭된다.

[0363] 화합물 29. 아세트산 무수물 (30  $\mu$ L, 290  $\mu$ mol)을 0.5 mL 피리딘 중의 화합물 28 (3.2 mg, 3  $\mu$ mol, 포르메이트 염)의 용액에 0°C에서 첨가하였다. 24시간 동안 교반한 후, 반응 혼합물로부터 용매를 증발시키고, 잔류물을 정규 실리카 칼럼을 통해 통과시켜 (DCM:MeOH 0-10%), 화합물 29 (2.0 mg, 83%)를 오일로서 수득하였다. MS (ES+) m/z, 계산치: m+1, 800.42, 실탐치 800.4.

[0364] 화합물 29는 또한 상기에서 화학식 III-i로 지칭된다.

[0365] O-아세틸, N,O-아세탈 29a. 화합물 29 (2 mg, 2.4  $\mu$ mol)를 0.5 mL MeOH에 용해시키고, 여기에 디옥산 중의 4 N HCl을 한 방울 첨가하였다. 반응 혼합물을 밤새 RT에서 교반한 후, 혼합물을 농축시키고, 잔류물을 DMSO에 용해시킨 다음, C-18 칼럼을 통해 통과시켜 (물 (20 mM 포름산암모늄, pH 6.1): ACN (0-100%)), O-아세틸, N,O-아세탈 29a (1.38 mg, 75%)를 동결건조시킨 후 백색 고체 (포르메이트 염)로서 수득하였다. MS (ES+) m/z, 계산치: m+1, 730, 실탐치 730.4.

[0366] O-아세틸, N,O-아세탈 29a는 또한 상기에서 화학식 III-m으로 지칭된다.

[0367] N,O-아세탈 29b. 화합물 28 (5 mg, 6  $\mu$ mol)을 MeOH에 용해시키고, 여기에 디옥산 중의 4 N HCl을 1방울 첨가하였다. 24시간 동안 반응 혼합물을 교반한 후, 용액을 농축시키고, 추가의 정제 없이 다음 단계 반응에서 사용하였다.

[0368] MS (ES+) m/z, 계산치: m+1, 687, 실탐치 688.4.

[0369] N,O-아세탈 29b는 또한 상기에서 화학식 III-n으로 지칭된다.

[0370] O-메틸, N,O-아세탈 29c. N,O-아세탈 29b (약 5 mg, 7.2  $\mu$ mol)를 DMF에 용해시키고, 여기에 디메틸су페이트 (3  $\mu$ L, 37  $\mu$ mol) 및 NaH (2 mg, 50  $\mu$ mol, 미네랄 오일 중 60%)를 0°C에서 첨가하였다. 1시간 후, 혼합물을 DMSO에 녹이고, C-18 칼럼을 통해 통과시켜 (물 (20 mM 포름산암모늄, pH 6.1): ACN (0-100%)), O-메틸, N,O-아세탈 29c를 반고체로서 수득하였다 (0.31 mg, 5%; 동일한 MW의 미확인 화합물을 함유하는 혼합물). MS (ES+) m/z, 계산치: m+1, 702, 실탐치 702.4.

[0371] O-메틸, N,O-아세탈 29c는 또한 상기에서 화학식 III-k로 지칭된다.

[0372] 실시예 3 - 반응식 3

[0373] 반응식 3 (도 3)은 화학식 II-b에 따른 화합물의 제조 절차를 나타낸다.

[0374] 알콜 30. TFA (171 mL)를 DCM (272 mL) 중의 (S)-tert-부틸-1-히드록시-3-(4-니트로페닐)프로판-2-일카르바메이트 20 (US 7,214,487 B2 (Erlanson et al.); 13.9 g, 46.9 mmol)의 용액에 0°C에서 첨가하였다. 반응 혼합물을 RT로 가온하고, 25분 동안 반응이 진행되도록 하였다. 용액을 농축시켜 조질의 (S)-2-아미노-3-(4-니트로페닐)프로판-1-올 9.2 g을 백색 고체로서 수득하였다. THF (87 mL) 및 물 (87 mL) 중의 상기 조 생성물 및 탄산나트륨 (12.4 g, 117.3 mmol)의 용액에 N-카르브에톡시프탈이미드 ("CEPT", 12.3 g, 56.3 mmol)를 첨가하였다. 반응 혼합물을 RT에서 4시간 동안 교반한 후, EtOAc (150 mL)를 첨가하였다. 수성 상을 EtOAc로 추출하였다. 합한 유기 층을 염수로 세척하고, 무수  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  상에서 건조시키고, 여과하고, 진공 하에 농축시켜 조 잔류물을 수득하였고, 이를 헥산 중의 0-100% EtOAc의 구배로 실리카 겔로부터 용출시키는 플래쉬 크로마토그래피에 의해 정제하여, 알콜 30을 12.3 g 수득하였다. MS: (+) m/z 327.0 (M+1).

[0375] 트리플레이트 31. 무수 DCM (18 mL) 중의 알콜 30 (1 g, 3.06 mmol)의 용액에 피리딘 (0.274 mL, 3.36 mmol)

을  $-78^{\circ}\text{C}$ 에서 첨가하였다. 반응 혼합물을  $-78^{\circ}\text{C}$ 에서 5분 동안 교반한 후, 트리플루오로메탄술폰산 무수물 (0.568 mL, 3.36 mmol)을 첨가하였다. 반응 혼합물을  $-78^{\circ}\text{C}$ 에서 45분 동안 교반한 다음, RT에서 45분 동안 교반하였다. 침전물을 여과한 후, 여과물을 실리카 젤로부터 DCM으로 용출시키는 플래쉬 크로마토그래피에 의해 정제하여, 트리플레이트 31을 0.84 g 수득하였다.

<sup>1</sup>H NMR

(400 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  8.10 (2H, d,  $J$  = 8.8 Hz), 7.81 (2H, m), p7.74 (2H, m), 7.36 (2H,  $J$  = 8.8 Hz), 5.13 (1H, t,  $J$  = 10.0 Hz), 4.99 (1H, m), 4.80 (1H, dd,  $J$  = 4.8, 5.6 Hz), 3.52 (1H, dd,  $J$  = 3.2, 11.2 Hz), 및 3.27 (1H, dd,  $J$  = 5.6, 8.8 Hz).

[0376]

디에스테르 32. 디에틸 메틸말로네이트 (0.71 mL, 4.12 mmol)를 무수 THF (4.7 mL) 중의 수소화나트륨 (0.161 g, 미네랄 오일 중 60% 분산액, 4.03 mmol)의 혼탁액에  $0^{\circ}\text{C}$ 에서 적가하였다. 반응 혼합물을  $0^{\circ}\text{C}$ 에서 10분 동안 교반한 다음, RT에서 10분 동안 교반하였다. 생성된 용액을 무수 THF (9.4 mL) 중의 트리플레이트 31 (0.84 g, 1.83 mmol)의 용액에  $0^{\circ}\text{C}$ 에서 천천히 첨가하였다. 반응 혼합물을  $0^{\circ}\text{C}$ 에서 밤새 교반한 후, 포화 NH<sub>4</sub>Cl 수용액 (20 mL)을 첨가하였다. 수용액을 EtOAc으로 추출하고, 합한 유기 층을 염수로 세척하고, MgSO<sub>4</sub> 상에서 건조시키고, 여과하고, 진공 하에 농축시켜 잔류물을 수득하였다. 조 생성물을 헥산 중의 0-50% EtOAc의 구배로 실리카 젤로부터 용출하는 플래쉬 크로마토그래피에 의해 정제하여 디에스테르 32를 0.57 g 수득하였다. MS: (+) m/z 483.3 (M+1).

[0378]

모노에스테르 33. 6 N HCl (10 mL) 및 아세트산 (10 mL) 중의 디에스테르 32의 용액을 2일 동안  $145^{\circ}\text{C}$ 에서 가열하였다. 유기 용액을 농축시켜, 조질의 (R)-4-아미노-2-메틸-5-(4-나트로페닐)펜탄산의 히드로클로라이드 염 0.41 g을 백색 고체로서 수득하였다.

[0379]

2,2-디메톡시프로판 ("DMP", 4 mL, 32.6 mmol)을 무수 MeOH (20 mL) 중의 조 생성물의 히드로클로라이드 염 및 진한 HCl의 용액 (1 mL)에 첨가하였다. 반응 혼합물을 밤새  $60^{\circ}\text{C}$ 에서 가열하였다. 유기 용액을 농축시켜, 조질의 (R)-메틸 4-아미노-2-메틸-5-(4-나트로페닐)펜타노에이트의 히드로클로라이드 염 0.43 g을 백색 고체로서 수득하였다.

[0380]

트리에틸아민 (0.44 mL, 3.1 mmol)을 ACN (10 mL) 중의 조질의 (R)-메틸 4-아미노-2-메틸-5-(4-나트로페닐)펜타노에이트의 히드로클로라이드 염 및 디-tert-부틸 디카르보네이트 (0.369 g, 1.69 mmol)의 용액에 RT에서 첨가하였다. 반응 혼합물을 4시간 동안 RT에서 교반한 후, 용매를 증발시켰다. 물 (20 mL)을 첨가하고, 수용액을 EtOAc로 추출하였다. 합한 유기 층을 염수로 세척하고, Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 상에서 건조시키고, 여과하고, 농축시켰다. 조 생성물을 헥산 중의 0-30% EtOAc의 구배로 실리카 젤로부터 용출하는 플래쉬 크로마토그래피에 의해 정제하여, 모노에스테르 33 0.31 g을 무색 오일로서 수득하였다. MS: (+) m/z 267.3 (M-99).

[0381]

카르복실산 34. 6 N HCl 중의 모노에스테르 33 (0.31 g, 0.846 mmol)의 용액을 1.5시간 동안  $130^{\circ}\text{C}$ 에서 가열하였다. 유기 용액을 농축시켜, 카르복실산 34 0.244 g을 백색 고체로서 수득하였다. MS: (+) m/z 253.1 (M+1).

[0382]

나트로 산 35. 화합물 34a (80.4 mg, 0.149 mmol, 문헌 [Patterson et al., 2008]에 따라 제조된 것)를 DCM (0.76 mL) 중의 펜타플루오로페놀 (41.1 mg, 0.224 mmol) 및 N,N'-디아이소프로필카르보디이미드 ("DIC", 0.0255 mL, 0.164 mmol)의 0.2 M 용액에  $0^{\circ}\text{C}$ 에서 첨가하였다. 반응 혼합물을 RT로 가온하고, 밤새 RT에서 교반하였다. 용매를 증발시켰다. EtOAc (18 mL)를 첨가하고, 반응 용기를 EtOAc로 세정하면서 조 생성물을 여과하였다. 여과물을 감압 하에 농축시키고, 조 물질을 추가의 정제 없이 사용하였다. DMF (0.6 mL)를 조 생성물에 첨가한 후, 카르복실산 34 (0.129 g, 0.448 mmol) 및 DIEA (0.13 mL, 0.745 mmol)를 첨가하였다. 반응 혼합물을 밤새 RT에서 교반하고, 용매를 증발시켰다. 조 생성물을 1% NH<sub>4</sub>OH를 함유하는 DCM 중의 10-20% MeOH의 구배로 실리카 젤로부터 용출하는 플래쉬 크로마토그래피에 의해 정제하여, 나트로 산 35 0.11 g을 백색 고체로서 수득하였다.

[0383]

MS: (+) m/z 773.4 (M+1).

아미노산 36. MeOH (5 mL) 중의 니트로 산 35 (0.11 g, 0.142 mmol) 및 탄소상 팔라듐 (10%, 15 mg)의 용액을 4시간 동안 수소 분위기 하에서 교반하였다. 촉매를 여과하고, 여과물을 농축시켜, 아미노산 36 91 mg을 백색 고체로서 수득하였다. MS: (+) m/z 743.5 (M+1). 아미노산 36은 또한 상기에서 화합물 III-b로 지칭된다.

[0385] 메틸 에스테르 36a. HCl (1방울, 37%)을 MeOH (0.5 mL) 중의 아미노산 36 (1.9 mg, 2.5 mmol) 및 2,2-디메톡시프로판 ("DMP", 0.05 mL, 0.41 mol)의 용액에 첨가하였다. 반응 혼합물을 2시간 동안 RT에서 교반한 다음 농축시켰다. 조 생성물을 정제용 HPLC에 의해 정제하여, 메틸 에스테르 36a 1.7 mg을 백색 고체로서 수득하였다. MS: (+) m/z 757.5 (M+1). 에스테르 36a는 또한 본 명세서에서 화학식 III-t로 도시된다.

[0386] 실시예 4 - 반응식 4

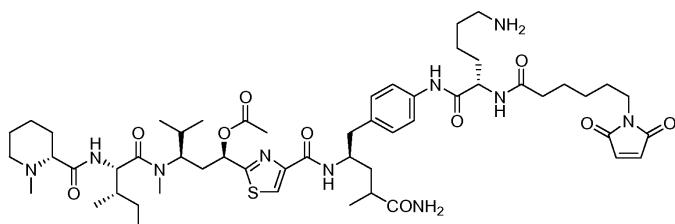
[0387] 반응식 4 (도 4)는 접합을 대비하여 본 발명의 화합물에 펩티딜 링커 및 반응성 관능기를 부착시키는 방법을 보여준다.

[0388] 화합물 37. DMF (0.3 mL) 중의 DIEA, Fmoc-Lys(Boc)-OH (17.3 mg, 0.037 mmol) 및 HATU (12.8 mg, 0.0336 mmol)의 용액을 5분 동안 RT에서 교반하였다. 용액의 pH는 8 내지 9 사이로 유지시켰다. 이어서, pH를 8 내지 9 사이로 유지시키면서 DMF (2 mL) 및 DIEA 중의 아미노산 36 (25 mg, 0.0336 mmol)의 용액을 반응 혼합물에 첨가하였다. 15분 동안 RT에서 교반한 후, 포화 NH<sub>4</sub>Cl 용액 (5 mL)을 첨가하여 반응물을 켄칭시켰다. 수용액을 EtOAc로 추출하고, 합한 유기 층을 건조시키고, 여과하고, 농축시켰다. 조 생성물을 DCM 중의 0-20% MeOH 의 구배로 실리카 젤로부터 용출하는 플래쉬 크로마토그래피에 의해 정제하여, 화합물 37을 36.1 mg 수득하였다. MS: (+) m/z 1193.6 (M+1).

[0389] 화합물 38. pH를 9 내지 10 사이로 유지하면서, 피페리딘을 DMF (2 mL) 중의 화합물 37 (36.1 mg, 0.0302 mmol)의 용액에 첨가하였다. 20분 동안 RT에서 교반한 후, 유기 용액을 농축시켜, 조질의 유리 a-아미노 화합물을 29.3 mg 수득하였다.

[0390] pH를 8 내지 9 사이로 유지하면서, DIEA를 DMF (0.3 mL) 중의 6-말레이미도헥산산 (7.0 mg, 0.0332 mmol) 및 HATU (11.5 mg, 0.0302 mmol)의 용액에 첨가하였다. 반응 혼합물을 5분 동안 RT에서 교반하였다. 이어서, pH 를 8 내지 9 사이로 유지하면서 DMF (2 mL) 중의 DIEA 및 조질의 유리 아미노 화합물을 첨가하였다. 반응 혼합물을 15분 동안 RT에서 교반한 후, 조 생성물을 정제용 HPLC에 의해 정제하여 화합물 38 9.1 mg을 백색 고체로서 수득하였다. MS: (+) m/z 1164.6 (M+1).

[0391] 화합물 39. TFA (1.5 mL)를 DCM (1.5 mL) 중의 화합물 38 (9.1 mg, 0.0078 mmol)의 용액에 첨가하였다. 반응 혼합물을 15분 동안 RT에서 교반한 후, 조 생성물을 정제용 HPLC에 의해 정제하여, 목적 화합물 39의 TFA 염 5.0 mg을 백색 고체로서 수득하였다. MS: (+) m/z 1064.8 (M+1). 화합물 39의 유리 염기 구조는 또한 상기에서 화합물 VI-b로 도시되었다. 몇몇 화합물 39의 아미드는 또한 그의 제조 중 부산물로서 단리되었다. MS: (+) m/z 1063.6 (M+1). 아미드는 또한 본 명세서에서 화학식 VI-q로 도시된다.



화합물 39의 아미드

[0392]

[0393] 실시예 5 - 반응식 5

[0394] 반응식 5 (도 5)는 화학식 II-b에 따른 화합물을 제조하기 위한 대안적 절차를 나타낸다.

[0395] 아미노 에스테르 42. 1,4-디옥산 중의 4.0 N HCl (6.7 mL)을 에탄올 (17 mL) 중의 화합물 41 (문헌 [Patterson et al., 2008]에 따라 제조된 것; 1 g, 2.66 mmol)의 용액에 첨가하였다. 반응 혼합물을 2시간 동안 RT에서 교반한 다음 농축시켜, 아미노 에스테르 42 0.82 g을 백색 고체로서 수득하였다. MS: (+) m/z 273.3 (M+1).

[0396] 아지도 에스테르 43. 옥살릴 클로라이드 (1.71 mL, 19.95 mmol) 및 DMF (0.33 mL, 4.26 mmol)를 헥산 (176 mL) 중의 아지도 이소류신 (문헌 [Lundquist et al., Org. Lett. 2001, 3, 781]; 0.669 g, 4.26 mmol)의 용액에 첨가하였다. 반응 혼합물을 1시간 동안 RT에서 교반하고, 여과하고, 농축시켜, 산 클로라이드를

수득하였다. 산 클로라이드 및 DIEA (2.32 mL, 13.3 mmol)를 DCM (26.7 mL) 중의 아미노 에스테르 42 (0.82 g, 2.66 mmol)의 용액에 0°C에서 첨가하였다. 반응 혼합물을 RT로 가온하고, 밤새 RT에서 교반하였다. 염수를 첨가하여 반응물을 켄칭시키고, 수용액을 EtOAc로 추출하였다. 합한 유기 층을  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  상에서 건조시키고, 여과하고, 진공 하에 농축시켰다. 조 생성물을 혼산 중의 0-50% EtOAc의 구배로 실리카 젤로부터 용출하는 플래쉬 크로마토그래피에 의해 정제하여 아지도 에스테르 43 0.86 g을 백색 고체로서 수득하였다. MS: (+) m/z 412.3 (M+1).

[0397]

트리에틸실릴 화합물 44. 2,6-루티딘 (1.22 mL, 10.45 mmol) 및 트리에틸실릴 트리플루오로메탄술포네이트 (1.14 mL, 5.02 mmol)를 DCM (11 mL) 중의 아지도 에스테르 43 (0.86 g, 2.09 mmol)의 용액에 0°C에서 첨가하였다. 반응 혼합물을 1시간에 걸쳐 RT으로 가온시킨 다음, 추가로 1시간 동안 RT에서 교반하였다. 염수를 첨가하여 반응물을 켄칭시키고, 수용액을 EtOAc로 추출하였다. 합한 유기 층을 건조시키고, 여과하고, 농축시켰다. 조 생성물을 혼산 중의 0-30% EtOAc의 구배로 용출하는 실리카 젤 플래쉬 크로마토그래피에 의해 정제하여 트리에틸실릴 화합물 44를 1.1 g 수득하였다. MS: (+) m/z 526.4 (M+1).

[0398]

N-메틸 화합물 45. THF (6.5 mL) 중의 트리에틸실릴 화합물 44 (1.04 g, 1.98 mmol)의 용액을 -45°C로 냉각시키고, 칼륨 헥사메틸디실라지드 (톨루엔 중 0.5 M, 4.75 mL, 2.37 mmol)를 첨가하였다. 생성된 혼합물을 20분 동안 -45°C에서 교반하였다. 메틸 아이오다이드 (0.37 mL, 5.94 mmol)를 첨가하고, 반응 혼합물을 4시간에 걸쳐 RT로 가온하고, 이 시점에 반응물을 에탄올 (10 mL)로 켄칭시켰다. 조 생성물을 EtOAc로 회석하고, 염수로 세척하고, 수성 층을 EtOAc로 추출하였다. 합한 유기 층을 무수  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  상에서 건조시키고, 여과하고, 진공 하에 농축시켰다. 조 생성물을 혼산 중의 0-30% EtOAc의 구배로 실리카 젤로부터 용출하는 플래쉬 크로마토그래피에 의해 정제하여 N-메틸 화합물 45를 0.91 g 수득하였다.

[0399]

MS: (+) m/z 540.4 (M+1).

[0400]

화합물 46. 산소제거된  $\text{AcOH}/\text{H}_2\text{O}/\text{THF}$  (65 mL, 3:1:1, v/v/v) 중의 N-메틸 화합물 45 (1.0 g, 1.85 mmol)의 용액을 36시간 동안 RT에서 교반하였다. 톨루엔 (250 mL)을 첨가하고, 용액을 농축시켰다. 조 생성물을 혼산 중의 0-100% EtOAc의 구배로 실리카 젤로부터 용출하는 플래쉬 크로마토그래피에 의해 정제하여 화합물 46 0.46 g을 오일로서 수득하였다. MS: (+) m/z 426.3 (M+1).

[0401]

메틸 에테르 47. 칼륨 헥사메틸디실라지드 ("KHMDS", 톨루엔 중 0.5 M, 2.54 mL, 1.27 mmol)를 THF (5 mL) 중의 화합물 46 (0.45 g, 1.06 mmol)의 용액에 -78°C에서 첨가하였다. 반응 혼합물을 20분 동안 -78°C에서 교반하였다. 메틸 아이오다이드 (0.2 mL, 3.18 mmol)를 첨가하고, 반응 혼합물을 2시간에 걸쳐 -20°C로 가온하고, 이 시점에 포화  $\text{NH}_4\text{Cl}$  용액으로 반응물을 켄칭시켰다. 수용액을 EtOAc로 추출하였다. 합한 유기 층을 무수  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  상에서 건조시키고, 여과하고, 진공 하에 농축시켰다. 조 생성물을 혼산 중의 0-50% EtOAc의 구배로 실리카 젤로부터 용출하는 플래쉬 크로마토그래피에 의해 정제하여 화합물 47 0.41 g을 무색 오일로서 수득하였다. MS: (+) m/z 440.3 (M+1).

[0402]

화합물 48. EtOAc (10 mL) 중의 D-Mep (0.45 g, 3.14 mmol)의 용액에 펜타플루오로페놀 (0.64 g, 3.47 mmol) 및 N,N'-디시클로헥실카르보디이미드 ("DCC", 0.72 g, 3.47 mmol)를 첨가하였다. 반응 혼합물을 밤새 RT에서 교반한 후, 침전물을 여과하고, EtOAc로 세척하였다. 생성된 여과물에 화합물 47 (0.46 g, 1.05 mmol) 및 탄소상 팔라듐 (10 중량%, 0.36 g)을 첨가하였다. 반응 혼합물을 밤새 수소 분위기 하에서 교반하였다. 촉매를 여과한 다음, 여과물을 진공 하에 농축시켰다. 조 생성물을 EtOAc 중의 0-5% MeOH의 구배로 실리카 젤로부터 용출하는 플래쉬 크로마토그래피에 의해 정제하여 화합물 48 0.43 g을 무색 오일로서 수득하였다. MS: (+) m/z 539.4 (M+1).

[0403]

카르복실산 49. 산소제거된 1,4-디옥산 (8 mL) 중의 화합물 48 (0.43 g, 0.80 mmol)의 용액에 산소제거된 수산화리튬 수용액 (0.6 M, 4 mL)을 RT에서 첨가하였다. 반응 혼합물을 2시간 동안 RT에서 교반한 다음, 진공 하에 농축시켰다. 조 생성물을 1%  $\text{NH}_4\text{OH}$ 를 함유하는 DCM 중의 10-30% MeOH의 구배로 실리카 젤로부터 용출하는 플래쉬 크로마토그래피에 의해 정제하여 카르복실산 49 0.3 g을 백색 고체로서 수득하였다. MS: (+) m/z 511.4 (M+1).

[0404] 니트로 산 50. 카르복실산 49 (80 mg, 0.157 mmol)를 DCM (0.8 mL) 중의 펜타플루오로페놀 (43.3 mg, 0.235 mmol) 및 DIC (0.0269 mL, 0.173 mmol)의 0.2 M 용액에 0°C에서 첨가하였다. 반응 혼합물을 RT로 가온하고, 이 온도에서 밤새 교반하였다. 용매를 증발시켰다. 에틸 아세테이트 (18 mL)를 첨가하고, 반응 용기를 EtOAc 세정하면서 조 생성물을 여과하였다. 여과물을 감압 하에 농축시키고, 조 물질을 추가의 정제 없이 사용하였다. DMF (0.6 mL)를 조 생성물에 첨가한 후, 카르복실산 34 (0.136 g, 0.47 mmol) 및 DIEA (0.137 mL, 0.785 mmol)를 첨가하였다. 반응 혼합물을 밤새 RT에서 교반한 다음, 용매를 진공 하에 증발시켰다. 조 생성물을 플래쉬 크로마토그래피에 의해 1% NH<sub>4</sub>OH를 함유하는 DCM 중의 10-20% MeOH의 구배로 실리카 젤로부터 용출하면서 정제하여, 니트로 산 50 0.1 g을 백색 고체로서 수득하였다. MS: (+) m/z 745.4 (M<sup>+</sup>).

[0405] 아미노산 51. MeOH (5 mL) 중의 니트로 산 50 (0.1 g, 0.134 mmol) 및 탄소상 팔라듐 (10%, 14 mg)의 혼합물을 4시간 동안 수소 분위기 하에서 교반하였다. 촉매를 여과하고, 여과물을 진공 하에 농축시켜, 아미노산 51 87.3 mg을 백색 고체로서 수득하였다. MS: (+) m/z 715.5 (M<sup>+</sup>). 아미노산 51은 또한 상기에서 화합물 III-j로 지칭된다.

[0406] 실시예 6 - 반응식 6

[0407] 반응식 6 (도 6)는 화학식 II-b에 따른 화합물을 제조하기 위한 또 다른 절차를 나타낸다.

[0408] 히드록시 니트로 화합물 52. 화합물 27 (반응식 2) (16.4 mg, 0.0275 mmol)을 DCM (0.2 mL) 중의 펜타플루오로페놀 (7.6 mg, 0.0413 mmol) 및 DIC (0.0094 mL, 0.0606 mmol)의 0.2 M 용액에 0°C에서 첨가하였다. 반응 혼합물을 RT로 가온하고, 밤새 RT에서 교반하였다. 용매를 증발시켰다. EtOAc (3 mL)를 첨가하고, 반응 용기를 EtOAc로 세정하면서 조 생성물을 여과하였다. 여과물을 감압 하에 농축시키고, 조 물질을 추가의 정제 없이 사용하였다. DMF (0.1 mL)를 조 생성물에 첨가한 후, 카르복실산 34 (반응식 3) (20.8 mg, 0.083 mmol) 및 N,N-디이소프로필에틸아민 (0.024 mL, 0.138 mmol)을 첨가하였다. 반응 혼합물을 밤새 RT에서 교반한 다음 용매를 증발시켰다. 조 생성물을 DCM 중의 0-10% MeOH의 구배로 실리카 젤로부터 용출하는 플래쉬 크로마토그래피에 의해 정제하여 히드록시 니트로 화합물 52 14.9 mg을 백색 고체로서 수득하였다. MS: (+) m/z 831.5 (M<sup>+</sup>).

[0409] 아세틸 니트로 화합물 53. 피리딘 (0.23 mL) 중의 히드록시 니트로 화합물 52 (14.9 mg, 0.018 mmol)의 0.1 M 용액을 0°C에서 냉각시키고, 아세트산 무수물 (0.054 mL, 0.57 mmol)을 첨가하였다. 반응 혼합물을 2시간에 걸쳐 RT로 가온하고, 24시간 동안 RT에서 교반하였다. 반응 혼합물을 0°C로 냉각시키고, 1,4-디옥산 및 물의 1:1 혼합물을 첨가하였다. 반응 혼합물을 RT로 가온한 후, 이 온도에서 12시간 동안 교반하였다. 용매를 증발시키고, 잔류물을 정제용 HPLC에 의해 정제하여 아세틸 니트로 화합물 53 2.2 mg을 백색 고체로서 수득하였다.

[0410] MS: (+) m/z 873.2 (M<sup>+</sup>).

[0411] 아세틸 아미노 화합물 54. 메탄올 (0.2 mL) 중의 아세틸 니트로 화합물 53 (2.2 mg, 0.0025 mmol) 및 탄소상 팔라듐 (10%, 1 mg)의 혼합물을 4시간 동안 수소 분위기 하에서 교반하였다. 촉매를 여과하고, 여과물을 농축시켰다. 조 생성물을 정제용 HPLC에 의해 정제하여 아세틸 니트로 화합물 54 0.1 mg을 백색 고체로서 수득하였다. MS: (+) m/z 843.2 (M<sup>+</sup>). 아세틸 아미노 화합물 54는 또한 상기에서 화합물 III-a로서 지칭된다.

[0412] 실시예 7 - 반응식 7

[0413] 반응식 7 (도 7)은 본 발명의 화합물을 제조하기 위한 또 다른 절차를 나타낸다.

[0414] 화합물 55. 화합물 34a (반응식 3) (70 mg, 0.13 mmol)를 DCM (0.66 mL) 중의 펜타플루오로페놀 (35.9 mg, 0.195 mmol) 및 DIC (0.0223 mL, 0.143 mmol)의 0.2 M 용액에 0°C에서 첨가하였다. 반응 혼합물을 RT로 가온하고, 밤새 RT에서 교반하였다. 용매를 증발시켰다. EtOAc (16 mL)를 첨가하고, 반응 용기를 EtOAc로 세정하면서 조 생성물을 여과하였다. 여과물을 감압 하에 농축시키고, 조 물질을 추가의 정제 없이 사용하였다. DMF (0.5 mL)를 조 생성물에 첨가한 후, p-니트로페닐알라닌 (82.0 mg, 0.39 mmol) 및 DIEA (0.114 mL, 0.65 mmol)를 첨가하였다. 반응 혼합물을 밤새 RT에서 교반한 다음, 용매를 증발시켰다. 조 생성물을 1% NH<sub>4</sub>OH를 함유하는 DCM 중의 10-20% MeOH의 구배로 실리카 젤로부터 용출하는 플래쉬 크로마토그래피에 의해 정제하여 화합물 55 65.2 mg을 백색 고체로서 수득하였다. MS: (+) m/z 731.0 (M<sup>+</sup>).

[0415] 화합물 56. MeOH (3 mL) 중의 화합물 55 (65.2 mg, 0.089 mmol) 및 탄소상 팔라듐 (10%, 9.4 mg)의 혼합물을

4시간 동안 수소 분위기 하에서 교반하였다. 촉매를 여과하고, 여과물을 농축시켜, 화합물 56 33.8 mg을 백색 고체로서 수득하였다. MS: (+) m/z 701.2 (M<sup>+</sup>1). 화합물 56은 또한 상기에서 화합물 III-d로서 지칭된다.

[0416] 실시예 8 - 반응식 8

[0417] 반응식 8 (도 8a)은 본 발명의 화합물을 제조하기 위한 중간체로서 유용한 화학식 VIII-b에 따른 화합물을 제조하기 위한 방법을 보여준다.

[0418] Boc 에스테르 58. DMF (아크로스(Acros), 무수, 50 mL) 중의 아미노 에스테르 57 (켐-임팩스(Chem-Impex), 5 g, 19.18 mmol) 및 디-tert-부틸 디카르보네이트 ("Boc")<sub>2</sub>O, 알드리치(Aldrich), 4.6 g, 21.10 mmol)의 용액에 트리에틸아민 ("TEA", 알드리치, 8.36 mL, 60 mmol)을 첨가하였다. 반응 혼합물을 0.5시간 동안 교반하였다. HPLC 분석은 반응이 완료되었음을 나타내었다. 반응 혼합물을 EtOAc (500 mL)로 회석하고, 유기 층을 물 (200 mL)에 이어 염수 (200 mL)로 세척하고, 무수 MgSO<sub>4</sub> 상에서 건조시키고, 농축시켰다. 조 생성물을 120 g 콤비플래쉬(CombiFlash) 칼럼 상에서 DCM 중의 0-5% MeOH로 정제하여 백색 고체 Boc 에스테르 58 (5.6 g, 81%)을 수득하였다.

<sup>1</sup>HNMR (DMSO) δ 8.18

(d, 2 H), 7.47 (d, 2 H), 7.38 (d, 1H), 4.23 (m, 1 H), 3.60 (s, 3 H), 3.15 (m, 1 H), 2.95 (m, 1 H), 1.23 (s, 9 H).

[0419] [0420] 알켄 59. 건조 빙-아세톤 중에서 -78°C로 냉각시킨 DCM (아크로스, 무수, 2 mL) 중의 Boc 에스테르 58 (230 mg, 0.68 mmol)의 용액에 DIBAL (알드리치, DCM 중 1 M, 1 mL)을 천천히 첨가하였다. 반응 혼합물을 교반하고, 3시간에 걸쳐 -20°C로 가온하였다. (1-에톡시카르보닐에틸리덴)-트리페닐포스포란 (알드리치, 492 mg, 1.36 mmol)을 첨가하였다. 반응 혼합물을 -20°C에서 1시간 동안 교반하였다. 반응 혼합물을 EtOAc (100 mL)로 회석하고, 생성된 유기물을 물 (50 mL)에 이어 염수 (50 mL)로 세척하고, 무수 MgSO<sub>4</sub> 상에서 건조시키고, 농축시켰다. 조 생성물을 10 g 콤비플래쉬™ 칼럼 상에서 헥산 중의 0-50% EtOAc로 정제하여, 백색 고체 알켄 59 (151 mg, 59%)를 수득하였다.

<sup>1</sup>HNMR (DMSO) δ 8.18

(d, 2 H), 7.47 (d, 2 H), 7.38 (d, 1H), 4.23 (m, 1 H), 3.60 (s, 3 H), 3.15 (m, 1 H), 2.95 (m, 1 H), 1.23 (s, 9 H).

[0421] [0422] 아릴 아민 60. EtOH (아크로스, 무수, 3 mL) 및 목탄상 Pd (알드리치, 10%, 50 mg) 중의 알켄 59 (148 mg, 0.39 mmol)의 용액을 밤새 H<sub>2</sub> 하에서 교반하였다. 반응 혼합물을 DCM (10 mL)으로 회석하고, 셀라이트™를 통해 여과하였다. 여과물을 농축시키고, 조 생성물을 4 g 콤비플래쉬™ 칼럼 상에서 DCM 중의 0-20% MeOH로 정제하여 아릴 아민 60을 백색 고체로서 수득하였다 (102 mg, 75%).

<sup>1</sup>HNMR (DMSO) δ 7.18 (d, 2 H), 7.11 (s, 2 H), 6.71 (d, 1 H), 3.98

(q, 2 H), 3.51 (m, 1 H), 2.57 (m, 2 H), 2.41 (m, 1 H), 1.63 (m, 1 H), 1.37 (m, 1 H), 1.29 (s, 9 H), 1.09 (t, 3 H), 0.99 (d, 3 H), MS (ES+) m/z, 계산치: m+1, 351.2, 실측치 351.2.

[0423] 실시예 9 - 반응식 9

[0424] 반응식 9 (도 8b)는 본 발명의 화합물을 제조하기 위한 중간체로서 유용한, 화학식 VIII-b에 따른 화합물을 제조하기 위한 또 다른 방법을 보여준다.

[0425] [0426] 아미노산 61. MeOH (0.5 mL) 중의 카르복실산 24 (반응식 3, 도 3) (4.4 mg, 0.0025 mmol) 및 탄소상 팔라듐 (10%, 1 mg)의 혼합물을 밤새 수소 분위기 하에서 교반하였다. 촉매를 여과하고, 여과물을 농축시켜, 아미노산 61 3.5 mg을 백색 고체로서 수득하였다. MS: (+) m/z 223.3 (M<sup>+</sup>1).

[0427] 실시예 10 - 반응식 10, 11 및 12

[0428] 반응식 10 (도 8c)은 본 발명의 화합물을 제조하기 위한 중간체로서 유용한, 화학식 VIII-b에 따른 화합물을 제조하기 위한 또 다른 방법을 보여준다.

[0429] 화합물 62. 메탄올 (20 mL) 중의 모노에스테르 33 (반응식 3, 도 3) (0.34 g, 0.93 mmol) 및 탄소상 팔라듐 (10%, 50 mg)의 혼합물을 밤새 수소 분위기 하에서 교반하였다. 촉매를 여과하고, 여과물을 농축시켜, 화합물

62 0.29 g을 백색 고체로서 수득하였다. MS: (+) m/z 237.3 (Boc 제외).

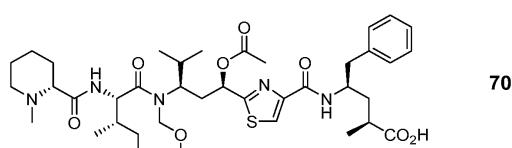
[0430] 반응식 11 (도 9)은 본 발명의 화합물을 제조하기 위해 화학식 VIII-b에 따른 화합물을 어떻게 이용하는지를 설명한다. 먼저 방향족 아민 기를 Fmoc 기로 보호하고, TFA를 처리하여 지방족 아민 기로부터 Boc 기를 제거하고, 탄산  $\alpha$ ,  $\alpha$ -디메틸-p-페닐벤질 페닐 에스테르 (8C1)를 처리하여 Bpoc 기를 구비하고, 피페리딘으로 Fmoc 기를 제거하여 Boc 에스테르 62를 Bpoc 에스테르 62a로 전환시켰다. HATU를 이용하여 Bpoc 에스테르 62a를 카르복실산 63과 커플링시켜 중간체 에스테르를 수득한 다음, LiOH로 가수분해하여 화합물 64를 생성하였다. 화합물 64로부터 Cbz 보호기를 제거하기 위한 수소화에 이어, 6-말레이미도헥산산과 HATU-매개 커플링시키고, 아세트산으로 Bpoc 기를 제거하여 아미노산 65를 수득하였다. 화합물 34a와의 또 다른 HATU-매개 커플링 (반응식 3, 도 3)으로 화합물 66을 수득하였다. 접합을 대비하여 TFA로 Boc 보호기를 제거하여 화합물 67을 수득하였다.

[0431] 화학식 VIII-b의 화합물을 이용하는 또 다른 방식이 반응식 12 (도 10)에 도시되어 있다. 화합물 34a로부터 출발하여, 화합물 68과의 HATU-매개 커플링에 의해 Boc 에스테르 69를 수득하였다. TFA를 이용한 Boc 기의 제거 및 LiOH에 의한 에스테르의 가수분해로 아미노산 36을 수득하였고, 이는 접합에 적합한 조성물을 제조하기 위해 반응식 4 (도 4)에서 보여지는 바와 같이 상술될 수 있다.

[0432] 실시예 11 - 화합물 70

[0433] 화합물 70. 튜부리신 D (문헌 [Peltier et al., 2006]에 따라 제조된 것; 2 mg, 2.4  $\mu$ mol)를 0°C에서 MeOH에 용해시켰다. 이 용액에 한 방울의 HCl (0.1 M)을 첨가하였다. 반응 혼합물을 밤새 RT에서 교반한 후, 용액을 진공 하에 증발시켜 잔류물을 수득하였고, 이를 단칼럼을 통해 통과시켜 (DCM:MeOH 0-10%), 화합물 70 (1.3 mg, 1.6  $\mu$ mol, 67%)을 오일로서 수득하였다.

[0434] MS (ES+) m/z, 계산치: m+1, 772.42, 실측치, 772.



[0435]

[0436] 당업자는 상기에서 구체적으로 기재된 것 이외에, 본 발명의 화합물을 제조하기 위해 일반적인 방법론의 반응식을 적용할 수 있음을 인식할 것이다. 예를 들어, 화합물 14 (화합물 49와 같음)를 이용하여, 이를 Tup 서브유닛 대신 다른 대체물과 커플링시켜 본 발명의 수많은 다른 화합물을 제조할 수 있다. 또 다른 예로서, 화합물 9 (반응식 1), 화합물 44 및 46 (반응식 5)과 함께 사용된 시약을 변경하여, 구체적으로 예시된 것을 넘어 화학식 II의 기 R<sup>2</sup> 및 R<sup>3</sup>에 대한 변이체를 합성할 수 있다.

[0437] 실시예 12 - 접합체의 제조

[0438] 본 실시예는 세포독소-링커 구축물 (VI-b) 및 항-CD70 모노클로날 항체 2H5 (US 2009/0028872 A1 (Terrett et al.); WO 2008/074004 A2 (Coccia et al.))의 접합체의 제조법을 기재한다. 이는 다른 접합체의 제조에 사용되는 절차를 대표한다.

[0439] 20 mM 인산나트륨, 50 mM NaCl, 100  $\mu$ M DTPA, pH 7.5 중의 약 5 mg/mL의 항-CD70 항체 2H5를 13-배 몰 과량의 2-이미노티울란으로 티올화하였다. 티올화 반응은 계속해서 혼합하면서 RT에서 1시간 동안 진행시켰다.

[0440] 티올화 이후, 항체를 PD10 칼럼 (세파텍스 G-25)을 통해 접합 완충제 (50 mM HEPES, 5 mM 글리신, 2 mM DTPA, pH 6.0)로 완충제 교환하였다. 티올화된 항체의 농도는 280 nm에서 결정하였다. 티올 농도는 디티오디피리딘 검정을 이용하여 측정하였다.

[0441] DMSO 중의 구축물 VI-b의 5 mM 원액을 항체의 티올당 3배 몰 과량으로 첨가하고, 90분 동안 RT에서 혼합하였다. 접합 후에, DMSO 중의 100 mM N-에틸말레이미드를 항체당 10배 몰 과량의 티올로 첨가하여, 임의의 미반응된 티올 기를 켄칭시켰다. 이러한 켄칭 반응을 지속적으로 혼합하면서 1시간 동안 RT에서 행하였다.

[0442] 항-CD70 항체 약물 접합체를 0.2  $\mu$ M 여과한 후 양이온-교환 크로마토그래피 정제하였다. SP 세파로스™ 고성능 양이온 교환 칼럼 (CEX)을 5 칼럼 용적 (CV)의 50 mM HEPES, 5 mM 글리신, 1 M NaCl, pH 6.0를 이용하여 재생시켰다. 재생 후에, 칼럼을 3 CV의 평형 완충제 (50 mM HEPES, 5 mM 글리신, pH 6.0)로 평형화시켰다. 접합

체를 로딩하고, 칼럼을 상기 평형 완충제로 1회 세척하였다. 접합체를 50 mM HEPES, 5 mM 글리신, 200 mM NaCl, pH 6.0으로 용출하였다. 용출액을 분획으로 모았다. 이어서, 칼럼을 50 mM HEPES, 5 mM 글리신, 1 M NaCl, pH 6.0을 이용하여 재생시켜, 단백질 응집체 및 임의의 미반응 물질 (VI-b)을 제거하였다.

[0443] 단량체 항체 접합체를 함유하는 분획을 풀링하였다. 항체 접합체 농도 및 치환비를 280 및 252 nm에서 흡광도를 측정하여 결정하였다.

[0444] 정제된 용출액 풀을 투석에 의해, 30 mg/ml 수크로스, 10 mg/ml 글리신, pH 6.0으로 완충제 교환하였다. 투석 후 텍스트란 40을 10 mg/ml로 샘플에 첨가하였다. 농도 및 치환비 (SR)를 280 및 252 nm에서 흡광도를 측정하여 결정하였다. SR은 항체 몰 당 세포독소 2.2 mol이었다.

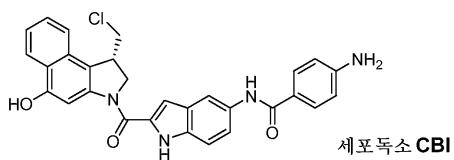
[0445] 실시예 13 - 중식 검정

[0446] 본 실시예는 본 발명의 화합물 또는 그의 접합체의 항증식 활성을 검정하는데 사용되는 절차를 일반적으로 기재한다. 인간 종양 세포주를 아메리칸 타입 컬쳐 콜렉션 (ATCC, 미국 20108 버지니아주 머내서스 P.O. Box 154 9)으로부터 수득하여 ATCC로부터의 지침서에 따라 배양하였다. ATP 검정 또는  $^3\text{H}$  티미딘 검정을 위해, 세포를 96 웰 플레이트에 3시간 동안  $1.0 \times 10^3$  또는  $1.0 \times 10^4$  세포/웰로 각각 시딩하였다. 유리 (미접합) 화합물 또는 그의 접합체의 1:3 연속 희석물을 웰에 첨가하였다. 플레이트를 24 내지 72시간 동안 인큐베이션하였다.  $^3\text{H}$  티미딘 플레이트를 웰당 1.0  $\mu\text{Ci}$ 의  $^3\text{H}$ -티미딘으로 총 인큐베이션 기간의 마지막 24시간 동안 펼성하고, 수거하고, 탑 카운트 섬광 계수기(Top Count Scintillation Counter, 팩커드 인스트루먼츠(Packard Instruments), 코넥티커트주 메리лен 소재) 상에서 판독하였다. ATP 플레이트에서의 ATP 수준은 셀타이터-글로(CELLTITER-GLO)<sup>®</sup> 발광 세포 생육 키트를 이용하여 제조업체의 매뉴얼에 따라 측정하였고, 글로맥스(GLOMAX)<sup>®</sup> 20/20 발광측정기 (둘 다 프로메가(Promega) 사제, 미국 위스콘신주 매디슨 소재) 상에서 판독하였다. 프리즘(PRISM)<sup>TM</sup> 소프트웨어, 버전 4.0 (그래프패드 소프트웨어(GraphPad Software), 미국 캘리포니아주 라 졸라 소재)을 이용하여 EC<sub>50</sub> 값 - 작용제가 세포 증식을 50% 만큼 억제하거나 감소시키는 농도 - 을 결정하였다.

[0447] 실시예 14 - 세포독소 시험관내 활성

[0448]  $^3\text{H}$  티미딘 또는 ATP 발광 검정, 또는 둘 모두를 이용하여, 이하의 암 세포주에 대한 본 발명의 화합물의 활성을 검정하였다: HCT-15 (결장직장암, 다중-약물 내성 (MDR)); Hep3B (간암); LNCaP (전립선암, 안드로겐 수용체 양성 (AR<sup>+</sup>)); MDA-MB-231 (유방암, 에스트로겐 수용체, 프로게스테론 수용체, 및 Her2 음성 (3중 음성)); A2058 (흑색종); U-87 MG (교모세포종); NCI-H460 (NSCLC); A549 (NSCLC); HPAC (췌장암, 원발성); PC3 (전립선암, AR<sup>-</sup>); BT474 (유방암, Her2 매우 양성 (Her2hi)); SKOV3 (난소암, Her2hi); 786-0 (신암); UO-31 (신암, MDR); NCI-H740 (SCLC); DMS53 (SCLC); SK-BR3 (유방암, Her2hi); ZR-75 (유방암, 에스트로겐 수용체 양성); OVCAR3 (난소암); HL-60 (APL); OVCAR8/Adr (난소암, MDR); CEM-C1 (ALL); Nomo-1 (AML); RPMI-8226 (MM)); Raji (림프종); SW-480 (결장직장암, 전이성); SW-620 (결장직장암); 및 H226 (폐암). (모든 화합물을 모든 세포주에 대해 검정한 것은 아님).

[0449] 이하의 화합물은 참조 또는 비교 세포독소로서 사용하였다: 독소루비신 (Dox), 세포독소 CBI (시클로프로파[c] 벤즈[e]인돌-4-온 클래스의 DNA 작은 흠 알킬화제), 튜부리신 D (Tub D, 표 1), 및 MMAF의 메틸 에스테르 ("MMAF", 아우리스타틴-관련 화합물; 문헌 [Sutherland et al., J. Biol. Chem. 2006, 281 (15), 10540-10547] 참조).



[0450]

[0451] 도 11a 및 11b는 각각 HL-60 및 786-0 세포에 대한 본 발명의 화합물의  $^3\text{H}$  티미딘 증식 검정에 대한 예시적 플롯을 보여준다 (비교 화합물로서 세포독소 CBI 및 튜부리신 D를 이용하였고, 인큐베이션 기간은 48시간임).

[0452]

도 12a 및 12b는 각각 HL-60 및 786-0 세포에 대한 본 발명의 제2 화합물 세트의 ATP 발광 증식 검정에 대한 예

시직 플롯을 보여준다 (인큐베이션 기간은 72시간임). 도 12c 및 12d는 각각 HL-60 및 786-0 세포에 대한 동일한 화합물 세트의  $^3\text{H}$  티미딘 증식 검정에 대한 플롯을 보여준다 (인큐베이션 기간은 72시간임). 각 경우에, 독소루비신을 비교 화합물로서 사용하였다.

[0453] 표 2는  $^3\text{H}$  티미딘 방법을 이용한 증식 검정에 대한 데이터를 제공한다 (인큐베이션 기간은 72시간임).

## 표 2

(파트 1) - $^3\text{H}$ 티미딘 증식 검정							
화합물	세포주 및 EC <sub>50</sub> (nM)						
	HCT-15	Hep3B	LNCaP	MDA-MB-231	A2058	U-87 MG	NCI-H460
Dox	149	44	130	133	—	106	101
CBI	0.040	0.020	0.051	0.019	—	0.14	0.042
Tub D	0.062	0.022	0.36	0.091	—	0.014	0.032
MMAF	1.3	0.11	1.7	0.29	—	0.12	0.37
15	67	1.6	27	1.3	1.6	0.42	2.0
16	284	>100	>100	>100	>100	>100	>100
17	392	>100	>100	84	>100	12	>100
19	1067	52	>100	—	0.13	>100	>100
24	704	32	76	33	0.12	18	>100
25	280	305	930	236	409	271	306
26	31	18	>3000	15	25	5.2	18
26a	>100	36	80	>100	>100	71	>100
28	223	24	64	>100	0.96	>100	>100
29	0.18	0.041	0.54	0.13	0.40	0.064	0.21
29c	2.4	3.0	5.2	4.8	5.6	0.51	15
36	64	39	342	>100	60	15	52
51	101	4.2	41	8.7	0.40	0.75	7.2
54	0.44	0.30	16	1.6	0.64	0.11	0.31
56	2477	>100	>100	>100	>100	>100	>100

[0454]

(파트 2) - $^3\text{H}$ 티미딘 증식 검정							
화합물	세포주 및 EC <sub>50</sub> (nM)						
	A549	HPAC	PC3	BT474	SKOV3	786-O	UO-31
Dox	128	126	276	424	163	168	267
CBI	0.072	0.063	0.049	1.2	0.047	0.035	0.035
Tub D	0.014	0.015	0.038	0.51	0.039	0.15	0.10
MMAF	0.21	0.29	0.38	1.7	0.24	1.4	7.3
(III-q)	—	—	—	—	—	7.61	—
15	2.1	3.0	1.7	7.1	2.6	—	15
16	>100	>100	>100	>100	44	19	>100
17	>100	>100	82	>100	91	32	>100
19	>100	>100	>100	>100	>100	>100	>100
24	38	>100	63	>100	68	>100	>100
25	270	206	319	804	180	1862	435
26	18	11	16	11	4.6	26	50
26a	>100	>100	>100	7	47	>100	>100
28	>100	34	>100	>100	9.9	61	>100
29	0.44	0.069	0.21	0.57	0.029	1.2	0.13
29c	6.5	32	11	12	1.9	3.9	1.0
36	44	83	66	>100	32	>100	>100
51	7.8	6.4	5.6	30	4.4	10	35
54	0.24	0.83	0.82	8.8	0.34	6.9	1.3
56	>100	>100	>100	>100	>100	29	>100

[0455]

(파트 3) - $^3\text{H}$ 티미딘 증식 검정							
화합물	세포주 및 EC <sub>50</sub> (nM)						
	H740	DMS53	SK-BR3	ZR-75	OVCAR3	HL-60	OVCAR8
Dox	255	979	—	794	258	56	2044
CBI	0.098	1.5	—	1.5	0.071	0.027	0.16
Tub D	2.2	0.21	—	1.7	0.051	0.032	0.17
MMAF	13	10	—	42	0.16	0.25	25
(III-q)	—	—	—	—	—	15.05	—
15	2.3	37	17	—	>100	0.60	423
16	>100	>100	>100	>100	>100	8.9	1869
17	32	>100	>100	>100	>100	17	2970
19	3.8	>100	>100	34	53	37	69
24	51	>100	>100	3.6	90	6.9	>100
25	347	515	1714	>3000	379	308	946
26	3.0	99	32	>300	3.2	0.45	201
26a	3.2	>100	158	56	21	10	100
28	5.8	>100	>100	4.3	3.1	7.7	27
29	0.41	0.28	1.1	3.8	0.02	0.0099	0.70
29c	5.3	76	72	44	3.6	1.8	1.4
36	>100	>100	>100	>100	>100	107	>100
51	37	24	>100	1.3	2.5	4.2	20
54	10	2.0	1.1	2.2	3.9	0.53	2.1
56	>100	>100	>100	>100	>100	>100	>3000

[0456]

화합물	(파트 4) - $^3\text{H}$ 티미딘 증식 검정					
	세포주 및 EC <sub>50</sub> (nM)					
	CEM-C1	Nomo-1	RPMI-8226	Raji		
Dox	144	105	68	61		
CBI	0.11	0.016	0.12	0.013		
Tub D	0.018	0.042	0.037	0.013		
MMAF	0.17	0.27	0.24	0.12		
15	0.93	2.3	3.3	0.47		
16	11	1.8	22	28		
17	43	6.8	47	53		
19	22	1.3	23	32		
24	13	1.1	17	11		
25	225	116	396	231		
26	22	0.36	7.7	7.0		
26a	10	2.0	22	20		
28	10	0.20	8.7	13		
29	0.019	0.0075	0.034	0.024		
29c	45	0.43	16	8.5		
36	44	124	48	15		
51	2.0	3.5	2.2	1.5		
54	0.38	0.77	0.36	0.20		
56	>100	>100	>100	>100		

[0457]

[0458] 표 3은 ATP 발광 증식 검정에 대한 데이터를 제공한다 (인큐베이션 기간은, 나타낸 바와 같이 48, 72, 또는 96 시간임).

## 표 3

(파트 1) - ATP 발광 증식 검정 (인큐베이션 기간은 기재된 바와 같음)							
화합물	세포주 및 EC <sub>50</sub> (nM)						
	HCT-15 (48 h)	Hep3B (48 h)	MDA- MB-231 (48 h)	A2058 (48 h)	NCI- H460 (48 h)	A549 (48 h)	PC3 (48 h)
Dox	—	443	—	—	—	149	1082
CBI	—	2.6	—	—	—	3.0	12
Tub D	—	0.0012	—	—	—	0.020	0.039
MMAF	—	0.053	—	—	—	0.33	0.43
15	40	6.3	5.6	3.5	6.7	—	>100
16	157	26	28	30	69	—	>100
17	443	>100	65	30	69	—	>100
19	—	18	—	—	—	—	~33
24	—	10	—	—	—	—	13
25	—	246	—	—	—	111	155
26	113	100	120	93	—	—	>3000
26a	—	—	—	—	—	—	—
28	—	17	—	—	—	—	5.8
29	—	1.6	—	—	—	3.9	3.4
29c	200	75	52	32	—	—	66
36	—	86	—	—	—	1.9	78
51	—	3.8	—	—	—	—	16
54	—	1.5	—	—	—	3.0	3.1
56	>3000	>100	>100	>100	>100	—	>100

[0459]

(파트 2) – ATP 발광 증식 검정 (인큐베이션 기간은 기재된 바와 같음)							
화합물	세포주 및 EC <sub>50</sub> (nM)						
	BT474 (48 h)	SKOV3 (48 h)	786-O (48 h)	UO-31 (48 h)	DMS53 (48 h)	SK-BR3 (48 h)	ZR-75 (48 h)
Dox	—	674	360	908	—	—	—
CBI	—	3.0	1.6	4.2	—	—	—
Tub D	—	0.029	0.022	0.099	—	—	—
MMAF	—	0.19	0.71	2.6	—	—	—
15	3.5	4.2	—	—	32	3.9	13
16	19	18	—	—	50	6.6	11
17	23	58	—	>100	~80	24	24
19	8.8	—	—	>100	—	3.9	20
24	4.6	—	—	13	—	8.9	8.4
25	166	—	—	759	366	>3000	1003
26	19	—	—	240	—	253	208
26a	—	—	—	—	—	—	—
28	12	—	—	5.8	—	7.8	16
29	1.5	—	—	2.7	5.3	3.6	15
29c	492	—	—	26	—	278	136
36	~120	—	—	8.8	~300	>300	>300
51	11	—	—	>100	—	13	19
54	4.8	—	—	—	7.9	6.2	9.6
56	>100	>100	—	—	>100	>100	>100
84a	—	—	6.12	—	—	—	—
84b	—	—	4.10	—	—	—	—
109	—	—	1.03	—	—	—	—

[0460]

화합물	(파트 3) – ATP 발광 중식 검정 (인큐베이션 기간은 기재된 바와 같음)						
	세포주 및 EC <sub>50</sub> (nM)						
	OVCAR3 (48 h)	HL-60 (48 h)	CEM- C1 (48 h)	Nomo-1 (48 h)	RPMI- 8226 (48 h)	HCT-15 (72 h)	LNCaP (72 h)
Dox	632	—	—	—	—	600	592
CBI	4.1	—	—	—	—	3.4	3.3
Tub D	0.085	—	—	—	—	0.014	0.093
MMAF	0.17	—	—	—	—	0.075	0.98
15	>100	—	—	—	—	—	—
16	>100	—	—	—	—	—	—
17	>100	—	—	—	—	—	—
19	25	—	—	—	—	245	—
24	29	—	—	—	—	188	—
25	>3000	224	—	83	—	366	—
26	—	—	61	3.9	45	—	412
26a	—	—	—	—	—	—	—
28	14	—	—	—	—	132	—
29	>100	0.59	—	0.24	—	4.5	—
29c	—	—	20	2.9	70	—	255
36	>300	114	—	34	—	96	>300
36a	0.048	—	—	—	—	—	—
51	5.5	—	—	—	—	93	—
54	>100	2.5	—	3.1	—	2.6	11
56	>100	—	—	—	—	—	—
84a	8.19	10-28	—	—	—	138	—
84b	4.91	16-27	—	—	—	22.8	—
109	0.019	—	—	—	—	—	—
112	0.05-.09	—	—	—	—	—	—

[0461]

화합물	세포주 및 EC <sub>50</sub> (nM)						
	MDA-MB-231 (72 h)	A2058 (72 h)	U-87 MG (72 h)	NCL-H460 (72 h)	A549 (72 h)	HPAC (72 h)	BT474 (72 h)
Dox	518	101	324	92	—	215	388
CBI	3.1	0.20	3.3	0.64	—	6.0	5.5
Tub D	0.047	0.0064	0.0054	0.0076	—	—	0.021
MMAF	0.33	0.039	0.052	0.13	—	0.067	0.024
15	—	—	8.6	—	—	—	—
16	—	—	>100	—	—	—	—
17	—	—	22	—	—	—	—
19	32	26	>100	43	—	0.33	—
24	13	14	18	23	—	1.1	—
25	202	212	357	177	—	97	—
26	—	—	94	90	—	279	—
26a	—	—	—	—	—	—	—
28	16	20	18	35	—	5.9	—
29	5.1	2.9	4.9	3.0	—	4.9	—
29c	—	—	136	6.0	—	4.6	—
36	9.6	43	37	16	—	2.9	—
51	—	5.5	7.6	14	—	4.5	—
54	5.6	1.4	1.6	1.6	—	0.96	—
56	—	—	>100	—	—	—	—

[0462]

(파트 5) – ATP 발광 증식 검정 (인큐베이션 기간은 기재된 바와 같음)							
화합물	세포주 (EC <sub>50</sub> , nM)						
	SKOV3 (72 h)	786-O (72 h)	H740 (72 h)	DMS53 (72 h)	SK-BR3 (72 h)	ZR-75 (72 h)	OVCAR3 (72 h)
Dox	—	—	—	755	441	236	—
CBI	—	—	2.2	3.8	3.1	2.2	—
Tub D	—	—	0.022	0.069	0.025	0.034	—
MMAF	—	—	—	4.5	0.16	0.25	—
(III-q)	—	103.6	—	—	—	—	—
15	—	9.4	—	—	—	—	—
16	—	36	—	—	—	—	—
17	—	73	—	—	—	—	—
19	15	40	—	87	—	—	—
24	13	36	—	>100	—	—	—
25	109	306	—	—	—	—	—
26	38	126	—	193	—	—	49
26a	—	—	—	—	—	—	—
28	11	29	—	58	—	—	—
29	1.3	2.8	—	—	—	—	—
29c	17	34	—	17	—	—	99
36	45	183	—	—	—	—	—
36a	—	0.434	—	—	—	—	—
51	10	19	—	46	—	—	—
54	1.3	2.6	—	—	—	—	—
56	—	>100	—	—	—	—	—
109	—	—	—	—	—	—	0.202
112	—	0.67	—	—	—	—	0.049
133	—	4.17	—	—	—	—	—
134	—	9.89	—	—	—	—	—
135	—	12.94	—	—	—	—	—

[0463]

(파트 6) – ATP 발광 증식 검정 (인큐베이션 기간은 기재된 바와 같음)							
화합물	세포주 및 EC <sub>50</sub> (nM)						
	HL-60 (72 h)	CEM-C1 (72 h)	Nomo-1 (72 h)	RPMI- 8226 (72 h)	Raji (72 h)	SW480 (96 h)	SW-620 (96 h)
Dox	147	161	338	345	301	215	145
CBI	0.76	0.55	0.37	4.1	2.1	0.92	0.33
Tub D	0.0096	0.0030	0.013	0.0051	0.0048	0.020	0.0058
MMAF	0.12	0.11	0.14	0.068	0.084	0.17	0.057
(III-q)	14.27	—	—	—	—	—	—
15	2.7	2.6	2.7	2.6	2.5	5.6	3.7
16	2.8	2.5	3.1	15	3.0	48	29
17	7.4	26	3.9	15	27	92	65
19	7.7	11	5.2	9.6	9.2	52	14
24	6.4	8.7	4.0	8.4	7.9	42	10
25	—	176	—	235	209	261	193
26	27	—	—	—	46	67	48
26a	—	—	—	—	—	—	—
28	2.9	11	0.82	10	15	36	21
29	—	0.85	—	1.0	2.1	2.7	1.5
29c	8.6	—	—	—	36	41	8.4
36	—	40	—	62	24	81	45
51	—	4.8	7.4	5.2	5.0	13	6.4
54	—	1.2	—	1.6	1.2	1.6	1.1
56	>100	>100	>100	5.7	24	>100	28

[0464]

[0465] 추가로, ATP 검정 및 72시간의 인큐베이션 기간을 이용하여 H226 세포주에 대해 이하의 화합물의 EC<sub>50</sub> 값을 측정하였다: 화합물 36a (0.307 nM); 화합물 109 (1.609 nM); 및 화합물 112 (0.67–1.16 nM). ATP 검정 및 48시간의 인큐베이션 기간을 이용하여 OVACAR8/Adr 세포주에 대해 이하의 화합물의 EC<sub>50</sub> 값을 측정하였다: 화합물 36a (17.05 nM); 화합물 84a (300 nM 초과); 화합물 84b (47.2 nM); 화합물 109 (24.9 nM); 및 화합물 112 (12 nM).

[0466]

#### 실시예 15 – 접합체 시험관내 활성

[0467]

도 13은 CD70 양성인 786-0 신암 세포에 대해 측정한 <sup>3</sup>H 티미딘 증식 검정에서의 본 발명의 접합체의 활성을 보여준다. 인큐베이션 기간은 72시간이었다. 도 13의 곡선으로부터 추출한 EC<sub>50</sub> 값을 다른 실험으로부터의 데이터와 함께 표 4에 제공한다. 세포주 LNCap은 전립선 특이적 막 항원 (PSMA)을 발현하는 전립선암 세포주이고; H226은 메소텔린을 발현하는 폐암 세포주이다. 접합에 사용된 항체는 항-PSMA 항체인 2A10 (US 2009/0297438 (Huang et al.)); 항-CD70 항체인 2H5 (US 2009/0028872 (Terrett et al.)); 항-CD70 항체인 1F4 (WO 2008/074004 (Coccia et al.)); 및 항-메소텔린 항체인 6A4 (WO 2009/045957 (Terrett et al.))였다. 대조군으로서, WO 2008/083312 (Sufi et al.)의 화합물 J ("Cpd. J", DNA 작은 흠 결합/알킬화제)를 접합 파트너로서 사용하였고, 디프테리아 독소 ("DTX")를 비접합된 비-특이적 대조군으로서 사용하였다.

표 4

접합체의 시험관내 활성			
접합체 또는 시험 화합물		세포주	EC <sub>50</sub> (nM)
명칭	설명		
2A10- 화합물 J	2A10 및 화합물 J의 접합체	786-O	116.7
DTX	비접합된 비-특이적 대조군	786-O	104.4
2H5- 화합물 J	2H5 및 화합물 J의 접합체	786-O	0.08592
1F4- 화합물 J	1F4 및 화합물 J의 접합체	786-O	0.09951
2H5-(VI-a)	2H5 및 화합물 VI-a의 접합체	786-O	0.1151 내지 0.0749
2A10-(VI-a)	2A10 및 화합물 VI-a의 접합체	786-O	>> 100
2H5-(VI-b)	2H5 및 화합물 VI-b의 접합체	786-O	0.06554
2A10-(VI-b)	2A10 및 화합물 VI-b의 접합체	786-O	>> 100
2H5-(VI-n)	2H5 및 화합물 VI-n의 접합체	786-O	0.4384
2H5-(VI-m)	2H5 및 화합물 VI-m의 접합체	786-O	0.5899
2H5-(VI-q)	2H5 및 화합물 VI-q의 접합체	786-O	불활성
2H5-(VI-p)	2H5 및 화합물 VI-p의 접합체	786-O	불활성
2H5-(VI-t)	2H5 및 화합물 VI-t의 접합체	786-O	0.310
6A4-(VI-t)	6A4 및 화합물 VI-t의 접합체	H226	0.360
2A10-(VI-t)	2A10 및 화합물 VI-t의 접합체	LNCap	0.570

[0468]

[0469] 데이터는 CD70-양성 786-O 세포에 세포독소를 효과적으로 전달할 수 있는 접합체를 위해서는 CD70-특이적 항체가 필요하며: 다른 항원 (PSMA)에 대해 특이적인 항체 2A10의 접합체는 활성이 낮거나 없음을 보여준다. 대조적으로, 항-CD70 항체의 모든 접합체는 활성이 있었다. 화합물 VI-a 및 VI-b의 접합체는 널리 공지되어 있는 접합 파트너인 화합물 J 접합체와 활성이 비슷하였고, 이들 접합체 중 하나는 임상 시험중에 있다. 화합물 VI-a 및 VI-b의 접합체가 매우 적은 비 특이적인 독성을 나타내며: 2A10-(VI-a) 및 2A10-(VI-b)의 활성이 2A10-CBI의 그것에 필적한다는 것은 주목할 만하다.

[0470]

실시예 16 - 접합체 생체내 활성

[0471]

CD70-양성 인간 신암 786-O 세포 (최초로 ATCC에서 획득한 Cat. CRL-1932)를 ATCC 지침에 따라 시험관내에서 배양하였다. 세포를 수거하고, DPBS/매트리겔(MATRIGEL)<sup>TM</sup> (1:1) 200  $\mu$ l 당  $2.5 \times 10^6$  개의 세포를 CB17.SCID 마우스의 옆구리 영역에 피하 이식하였다. 포울러 전자식 디지털 캘리퍼(Fowler Electronic Digital Caliper, 모델 62379-531; 프레드 브이. 포울러 코포레이션(Fred V. Fowler Co.), 미국 메사추세츠주 뉴톤 소재)를 이용하여 종양을 3차원적으로 매주 측정하고, 스터디로그 인크.(Studylog Inc., 미국 캘리포니아주 사우스 샌프란시스코 소재)로부터의 스터디디렉터(StudyDirector) 소프트웨어를 이용하여 데이터를 전자적으로 기록하였다. 매일 동물의 자세, 털 손질, 및 호흡 변화, 뿐만 아니라 무기력을 체크하였다. 또한 매주 동물의 체중을 재고, 체중 감소가 20% 이상이면 안락사시켰다. 종양의 평균 크기가 194  $\text{mm}^3$ 에 이르면, 각각 6 마리의 마우스 그룹을 단일 복강내 (IP) 용량의 시험 접합체 (예를 들어, 2H5-(VI-b)) 및 이소형 대조군 (2A10-(VI-b))으로 0.3  $\mu\text{mol}/\text{체중 kg}$ 으로 처리하였다. 종양 부피 (LWH/2) 및 마우스의 체중을 각 연구 과정에 걸쳐 기록하였고, 연구는 최초 투약 후 대략 2달 동안 진행하였다. 엑셀 스프레드시트 매크로를 이용하여 종양 크기의 평균, SD, 및 중앙값을 계산하였다. 데이터는 프리즘(Prism) 소프트웨어 버전 4.0을 이용하여 그래프로 나타내었다.

[0472]

이종이식 연구 결과를 도 14에 나타내었고, 여기서 범례 표지는 이전의 실시예 및 도 13에서와 같은 의미를 갖는다. 데이터는 CD70<sup>+</sup> 786-O 세포에 대하여 본 발명의 화합물 접합체의 생체내 활성을 입증한다. 비히를 대조군 또는 항-PSMA 항체 2A10과의 접합체를 투여한 경우 종양 평균 부피가 2배를 초과한데 반하여, 항-CD70 항체 2H5와의 화합물 VI-a 및 VI-b 접합체는 둘 모두 연구 과정에 걸쳐 평균 종양 크기를 1/2 미만으로 감소시켰다.

[0473]

실시예 17 - 반응식 13

[0474]

반응식 13 (도 15)은 본 발명의 화합물을 제조하는데 유용한, 거울상이성질체적으로 순수한 4-니트로튜부페닐알

라닌 (4-NO<sub>2</sub>Tup) 82a 및 82b를 제조하는 방법을 나타낸다.

[0475] 화합물 80. 디-tert-부틸 디카르보네이트 (90.5 mg, 0.42 mmol)를 0.7 M aq. NaOH (1 mL) 중의 반응식 3의 화합물 34 (0.1 g, 0.35 mmol)의 혼합물에 첨가하였다. 반응 혼합물을 3시간 동안 RT에서 교반한 다음, 0.5 N HCl을 이용하여 pH 3으로 산성화시켰다. 수용액을 EtOAc로 3회 추출한 후, 합한 유기 층을 건조시키고, 여과하고, 농축시켰다. 조 생성물을 DCM 중의 0-20% 메탄올의 구배로 실리카 겔로부터 용출하는 플래쉬 크로마토그래피에 의해 정제하여 화합물 80 0.117 g을 백색 고체로서 수득하였다. MS: (+) m/z 253.1 (M+1, Boc 제외).

[0476] (-)-멘톨 에스테르 81a 및 81b. DCC (87.8 mg, 0.43 mmol)를 DCM (1.5 mL) 중의 화합물 80, (-)-멘톨 (66.6 mg, 0.43 mmol) 및 4-(디메틸아미노)-피리딘 ("DMAP", 10.4 mg, 0.085 mmol)의 용액에 RT에서 첨가하였다. 반응 혼합물을 3시간 동안 RT에서 교반한 후, 침전물을 여과하였다. 이어서 여과물을 농축시켰다. 조 생성물을 헥산 중의 0-20% EtOAc의 구배로 실리카 겔로부터 용출하는 플래쉬 크로마토그래피에 의해 정제하여 에스테르 81a 55.7 mg을 백색 고체로서, 그리고 에스테르 81b 55.7 mg을 백색 고체로서 수득하였다.

에스테르 81a의 경우 MS : (+) m/z 391.2 (M+1,

Boc 제외); 에스테르 81b의 경우 MS : (+) m/z 391.2 (M+1, Boc 제외).

[0477] 4-NO<sub>2</sub>Tup 82a 및 82b. 6 N HCl (40 mg, 0.082 mmol) 중의 에스테르 81a의 용액을 1.5시간 동안 130°C에서 가열하였다. 반응 혼합물을 농축시켜 4-NO<sub>2</sub>Tup 82a 23.5 mg을 백색 고체로서 수득하였다.

<sup>1</sup>H NMR (D<sub>2</sub>O, 400 MHz):  $\delta$  8.04 (d, 2H, *J*=

8.4 Hz), 7.33 (d, 2H, *J*= 8.4 Hz), 3.50 (m, 1H), 3.03 (dd, 1H, *J*= 6.8, 14.4 Hz), 2.89 (dd, 1H, *J*= 7.6 Hz, 14.4 Hz), 2.45-2.39 (m, 1H), 1.92-1.84 (m, 1H), 1.62-1.55 (m, 1H), 및

0.98 (d, 3H, *J*= 7.2 Hz); MS: (+) m/z 253.1 (M+1).

[0478] 4-NO<sub>2</sub>Tup 82b는 동일한 규모로 동일한 절차에 의해 백색 고체로서 수득하였다 (23.5 mg).

<sup>1</sup>H NMR (D<sub>2</sub>O, 400 MHz):

$\delta$  8.03 (d, 2H, *J*= 8.4 Hz), 7.33 (d, 2H, *J*= 8.4 Hz), 3.50 (m, 1H), 2.93 (dd, 2H, *J*= 2.0, 7.6 Hz), 2.54-2.48 (m, 1H), 1.86-1.78 (m, 1H), 1.60-1.53 (m, 1H), 및 0.98 (d, 3H, *J*=

6.8 Hz); MS: (+) m/z 253.1 (M+1).

[0481] 실시예 18 - 반응식 14

[0482] 반응식 14 (도 16)는 4-NO<sub>2</sub>Tup 82a 및 82b의 본 발명의 화합물로의 전환을 도시한다.

[0483] 니트로 산 83a. 반응식 3의 화합물 34a (10 mg, 0.019 mmol)를 DCM (0.2 mL) 중의 펜타플루오로페놀 (5.1 mg, 0.028 mmol) 및 N,N'-디이소프로필카르보디이미드 ("DIC", 0.0032 mL, 0.021 mmol)의 0.2 M 용액에 0°C에서 첨가하였다. 반응 혼합물을 RT로 가온하고, 이 온도에서 밤새 교반하였다. 용매를 증발시켰다. EtOAc (1.8 mL)를 첨가하고, 반응 용기를 EtOAc로 세정하면서 조 생성물을 여과하였다. 여과물을 감압 하에 농축시키고, 조질의 펜타플루오로페닐을 추가의 정제 없이 사용하였다. DMF (0.2 mL)를 조질의 에스테르에 첨가한 후, 4-NO<sub>2</sub>Tup 82a (10.7 mg, 0.037 mmol) 및 DIEA (0.013 mL, 0.074 mmol)를 첨가하였다. 반응 혼합물을 밤새 RT에서 교반한 다음, 용매를 증발시켰다. 조 생성물을 DCM 중의 1% NH<sub>4</sub>OH를 함유하는 0-20% MeOH의 구배로 실리카 겔로부터 용출하는 플래쉬 크로마토그래피에 의해 정제하여 니트로 산 83a 12.9 mg을 백색 고체로서 수득하였다.

[0484] MS: (+) m/z 773.4 (M+1).

[0485] 별법적 경로 니트로 산 83a: pH를 8-9로 유지하면서 DIEA를 DMF (0.3 mL) 중의 화합물 34a (10 mg, 0.019 mmol) 및 HATU (7.8 mg, 0.020 mmol)의 용액에 첨가하였다. 반응 혼합물을 5분 동안 RT에서 교반하였다. 이어서 pH를 8-9로 유지하면서 DMF (1 mL) 중의 DIEA 및 니트로 아민 82a (5.4 mg, 0.019 mmol)을 첨가하였다. 반응 혼합물을 15분 동안 RT에서 교반한 후, 조 생성물을 정제용 HPLC에 의해 정제하여 니트로 산 83a 13.4 mg을 백색 고체로서 수득하였다.

[0487] 니트로 산 83b를 동일한 규모로 동일한 대안적 경로에 의해 제조하여 백색 고체로서 수득하였다 (13.4 mg). MS: (+) m/z 773.4 (M+1).

[0488] 아민 84a. MeOH (0.37 mL) 중의 니트로 산 83a (7.5 mg, 0.0097 mmol) 및 탄소상 팔라듐 (10%, 1.1 mg)의 혼합물을 4시간 동안 수소 분위기 하에서 교반하였다. 촉매를 여과하고, 여과물을 농축시켰다. 조 생성물을 정제용 HPLC에 의해 정제하여 아민 84a 6.2 mg을 백색 고체로서 수득하였다.

<sup>1</sup>H

NMR (CD<sub>3</sub>OD, 400 MHz):  $\delta$  8.06 (s, 1H), 7.36 (d, 2H, *J* = 8.4 Hz), 7.17 (d, 2H, *J* = 8.4 Hz), 5.70 (dd, 1H, *J* = 2.8, 11.2 Hz), 4.71 (d, 1H, *J* = 7.2 Hz), 4.44-4.35 (m, 2H), 3.74 (d, 1H, *J* = 9.6 Hz), 3.49-3.45 (m, 1H), 3.36-3.35 (m, 1H), 3.30-3.25 (m, 1H), 3.13 (s, 3H), 3.14-3.04 (m, 1H), 2.93 (d, 2H, *J* = 8.4 Hz), 2.74 (s, 3H), 2.48-2.28 (m, 3H), 2.15 (s, 3H), 2.19-2.03 (m, 2H), 1.95-1.86 (m, 4H), 1.80-1.71 (m, 2H), 1.71-1.57 (m, 3H), 1.24-1.13 (m, 1H), 1.16 (d, 3H, *J* = 7.2 Hz), 1.04 (d, 3H, *J* = 6.4 Hz), 1.02 (d, 3H, *J* = 6.8 Hz), 0.94 (t, 3H, *J* = 7.2 Hz), 및 0.84 (d, 3H, *J* = 6.8 Hz); MS: (+) m/z 743.4 (M+1).

[0489]

[0490] 니트로 산 83b를 8 mg의 규모로 동일한 절차를 이용하여 아민 84b로 수소화하였다. 아민 84b는 백색 고체로서 수득되었다 (6.7 mg).

<sup>1</sup>H NMR (CD<sub>3</sub>OD,

400 MHz):  $\delta$  8.06 (s, 1H), 7.35 (d, 2H, *J* = 8.4 Hz), 7.16 (d, 2H, *J* = 8.4 Hz), 5.70 (dd, 1H, *J* = 2.8, 11.2 Hz), 4.72 (d, 1H, *J* = 7.2 Hz), 4.49-4.32 (m, 2H), 3.75 (d, 1H, *J* = 10.0 Hz), 3.49-3.45 (m, 1H), 3.36-3.35 (m, 1H), 3.33-3.31 (m, 1H), 3.12 (s, 3H), 3.12-3.04 (m, 1H), 2.91 (d, 2H, *J* = 7.6 Hz), 2.74 (s, 3H), 2.57-2.52 (m, 1H), 2.45-2.37 (m, 1H), 2.33-2.28 (m, 1H), 2.15 (s, 3H), 2.19-2.13 (m, 1H), 2.03-1.88 (m, 5H), 1.81-1.57 (m, 5H), 1.24-1.13 (m, 1H), 1.17 (d, 3H, *J* = 6.8 Hz), 1.04 (d, 3H, *J* = 6.4 Hz), 1.02 (d, 3H, *J* = 7.2 Hz), 0.94 (t, 3H, *J* = 7.2 Hz), 및 0.84 (d, 3H, *J* = 6.4 Hz); MS: (+) m/z 743.4 (M+1).

[0491]

[0492] 화합물 84a 및 84b는 또한 본 명세서에서 각각 화학식 III-r 및 III-s로 도시된다.

[0493] 실시예 19 - 반응식 15

[0494] 반응식 15 (도 17)는 단일 아미노산 (시트룰린) 링커를 갖는 본 발명의 접합-대비 화합물의 합성을 도시한다.

[0495] 화합물 85. DMF (4 mL) 중의 반응식 10의 화합물 62 (0.22 g, 0.654 mmol), Fmoc-보호된 시트룰린 (0.39 g, 0.981 mmol) 및 N-(3-디메틸아미노프로필)-N'-에틸카르보디이미드 히드로클로라이드 ("EDCI", 0.188 g, 0.981 mmol)의 혼합물을 밤새 RT에서 교반하였다. 포화 NH<sub>4</sub>Cl을 첨가하여 반응물을 켄칭시키고, 수용액을 EtOAc로 추출하였다. 합한 유기 층을 건조시키고, 여과하고, 농축시켰다. 조 생성물을 플래쉬 크로마토그래피에 의해 DCM 중의 0-100% MeOH의 구배로 실리카 젤로부터 용출하면서 정제하여 화합물 85 0.42 g을 백색 고체로서 수득하였다.

[0496] MS: (+) m/z 716.4 (M+1).

[0497] 화합물 86. pH를 9-10으로 유지하면서, 피페리딘을 DMF 중의 화합물 85 (0.248 g, 0.346 mmol)의 용액에 첨가하였다. 반응 혼합물을 20분 동안 RT에서 교반한 다음 농축하여, 화합물 86을 0.17 g 수득하였다. MS: (+) m/z 494.4 (M+1).

[0498] 화합물 87. 물 (3 mL) 중의 LiOH (26.6 mg, 1.11 mmol)를 THF (2 mL) 중의 화합물 86 (0.17 g, 0.346 mmol)의 용액에 첨가하였다. 반응 혼합물을 2시간 동안 RT에서 교반한 후, 용매를 부분적으로 제거하였다. 수용액을 HCl로 pH 2-3으로 산성화하고, 농축시켰다. 잔류물을 DMF (2 mL)에 재용해시키고, N-숙신이미딜 6-말레이이미도헥사노에이트 (0.16 g, 0.519 mmol) 및 DIEA (0.091 mL, 0.519 mmol)를 첨가하였다. 반응 혼합물을 10분 동안 RT에서 교반한 후, 조 생성물을 정제용 HPLC에 의해 정제하여 화합물 87 0.198 g을 백색 고체로서 수득하였다.

[0499] MS: (+) m/z 673.4 (M+1).

[0500] 화합물 88. TFA (0.5 mL)를 DCM (0.5 mL) 중의 화합물 87 (12.5 mg, 0.019 mmol)의 용액에 실온에서 첨가하였다. 반응 혼합물을 5분 동안 RT에서 교반한 다음 농축시켜, 화합물 88 12.8 mg을 백색 고체로서 수득하였다.

MS: (+) m/z 573.4 (M+1).

[0501] 화합물 89. pH를 8-9로 유지하면서, DIEA를 DMF (0.3 mL) 중의 반응식 3의 화합물 34a (5 mg, 0.0093 mmol) 및 HATU (3.9 mg, 0.010 mmol)의 용액에 첨가하였다. 반응 혼합물을 5분 동안 RT에서 교반하였다. 이어서 pH를 8-9로 유지하면서, DMF (1 mL) 중의 DIEA 및 화합물 88 (12.8 mg, 0.019 mmol)을 첨가하였다. 반응 혼합물을 15분 동안 RT에서 교반한 후, 조 생성물을 정제용 HPLC에 의해 정제하여 화합물 89 8.6 mg을 백색 고체로서 수득하였다. MS: (+) m/z 1093.8 (M+1). 화합물 89는 또한 본 명세서에서 화학식 VI-m으로 도시된다.

[0502] 화합물 90. pH를 8-9로 유지하면서, DIEA를 DMF (0.3 mL) 중의 반응식 5의 화합물 49 (5 mg, 0.0098 mmol) 및 HATU (4.1 mg, 0.011 mmol)의 용액에 첨가하였다. 반응 혼합물을 5분 동안 RT에서 교반하였다. 이어서 pH를 8-9로 유지하면서, DMF (1 mL) 중의 DIEA 및 화합물 88 (13.5 mg, 0.0196 mmol)을 첨가하였다. 반응 혼합물을 15분 동안 RT에서 교반한 후, 조 생성물을 정제용 HPLC에 의해 정제하여 화합물 90 8.9 mg을 백색 고체로서 수득하였다. MS: (+) m/z 1065.6 (M+1). 화합물 90은 또한 본 명세서에서 화학식 VI-p로 도시된다.

[0503] 실시예 20 - 반응식 16

[0504] 반응식 16 (도 18)은 디펩티드 (시트룰린-발린) 링커를 갖는 본 발명의 접합-대비 화합물의 제조를 도시한다.

[0505] 화합물 91. pH를 8-9로 유지하면서, DIEA를 DMF (0.5 mL) 중의 Fmoc-보호된 발린 (62.3 mg, 0.184 mmol) 및 HATU (63.6 mg, 0.167 mmol)의 용액에 첨가하였다. 반응 혼합물을 5분 동안 RT에서 교반하였다. 이어서 pH를 8-9로 유지하면서, DMF (1 mL) 중의 DIEA 및 반응식 15의 화합물 86 (82.5 mg, 0.167 mmol)을 첨가하였다. 반응 혼합물을 15분 동안 RT에서 교반한 후, 0.05% aq. TFA를 첨가하여 반응물을 켄칭시켰다. 수용액을 EtOAcet로 추출하고, 합한 유기 층을 건조시키고, 여과하고, 농축시켰다. 조 생성물을 DCM 중의 0-20% MeOH의 구배로 실리카 젤로부터 용출하는 플래쉬 크로마토그래피에 의해 정제하여 화합물 91 0.13 g을 백색 고체로서 수득하였다. MS: (+) m/z 815.5 (M+1).

[0506] 화합물 92. pH를 9-10으로 유지하면서, 피페리딘을 DMF 중의 화합물 91 (0.144 g, 0.177 mmol)의 용액에 첨가하였다. 반응 혼합물을 20분 동안 RT에서 교반한 다음, 농축시켰다. 잔류물을 THF (2.5 mL)에 용해시키고, 물 (1.3 mL) 중의 LiOH (16.3 mg, 0.681 mmol)를 첨가하였다. 반응 혼합물을 2시간 동안 RT에서 교반한 후, 용매를 부분적으로 제거하였다. 수용액을 HCl로 pH 2-3으로 산성화한 다음, 농축시켰다. 잔류물을 DMF (2.5 mL)에 재용해시킨 다음, N-숙신이미딜 6-말레이이미도헥사노에이트 (0.105 g, 0.341 mmol) 및 DIEA (0.060 mL, 0.341 mmol)를 첨가하였다. 반응 혼합물을 10분 동안 RT에서 교반한 후, 조 생성물을 정제용 HPLC에 의해 정제하여 화합물 92 0.116 g을 백색 고체로서 수득하였다.

[0507] MS: (+) m/z 772.5 (M+1).

[0508] 화합물 93. TFA (0.6 mL)를 DCM (1 mL) 중의 화합물 92 (14.4 mg, 0.019 mmol)의 용액에 RT에서 첨가하였다. 반응 혼합물을 5분 동안 RT에서 교반한 다음 농축시켜, 화합물 93 14.7 mg을 백색 고체로서 수득하였다.

#### <sup>1</sup>H NMR

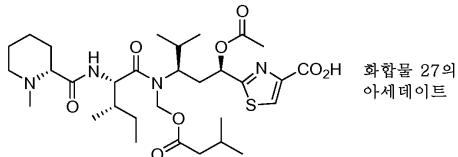
(CD<sub>3</sub>OD, 400 MHz):  $\delta$  7.58 (dd, 2H, *J* = 1.6, 8.4 Hz), 7.21 (dd, 2H, *J* = 2.8, 8.8 Hz), 6.79 (s, 2H), 4.48 (m, 1H), 4.13 (d, 1H, *J* = 7.6 Hz), 3.57-3.46 (m, 3H), 3.33-3.32 (m, 1H), 3.22-3.09 (m, 2H), 2.91-2.80 (m, 1H), 2.27 (t, 2H, *J* = 7.2 Hz), 2.09-1.85 (m, 3H), 1.81-1.54 (m, 8H), 1.35-1.29 (m, 3H), 1.19 (d, 1.5 H, *J* = 6.8 Hz), 1.18 (d, 1.5 H, *J* = 7.2 Hz), 0.98 (d, 3H, *J* = 2.4 Hz), 0.96 (d, 3H, *J* = 2.8 Hz); MS: (+) m/z 672.4 (M+1).

[0509]

[0510] 화합물 94. pH를 8-9로 유지하면서, DIEA를 DMF (0.3 mL) 중의 반응식 3의 화합물 34a (11 mg, 0.0204 mmol) 및 HATU (7.8 mg, 0.0204 mmol)의 용액에 첨가하였다. 반응 혼합물을 5분 동안 RT에서 교반하였다. 이어서 pH를 8-9로 유지하면서, DMF (1 mL) 중의 DIEA 및 화합물 93 (14.7 mg, 0.019 mmol)을 첨가하였다. 반응 혼합물을 15분 동안 RT에서 교반한 후, 조 생성물을 정제용 HPLC에 의해 정제하여 화합물 94 18.9 mg을 백색 고체로서 수득하였다. MS: (+) m/z 1192.6 (M+1). 화합물 94는 또한 본 명세서에서 화학식 VI-n으로 도시된다.

[0511] 화합물 27의 아세테이트. 아세트산 무수물 (0.248 mL)을 피리딘 (2.6 mL) 중의 반응식 2의 화합물 27 (문헌 [Peltier et al., 2006]; 0.13 g, 0.218 mmol)의 용액에 0°C에서 첨가하였다. 이어서, 반응 혼합물을 밤새 RT에서 교반하였다. 반응 혼합물을 0°C에서 냉각시킨 후, 물 및 1,4-디옥산 (12 mL, v/v 1:1)의 용액을 첨가하였

다. 반응 혼합물을 밤새 RT에서 교반한 다음, 농축시켰다. 조 생성물을 DCM 중의 10-20% MeOH의 구배로 실리카겔로부터 용출하는 플래쉬 크로마토그래피에 의해 정제하여 화합물 27의 아세테이트 0.114 g을 백색 고체로서 수득하였다. MS: (+) m/z 639.4 (M+1).



[0512]

[0513] 화합물 95. pH를 8-9로 유지하면서, DIEA를 DMF (0.3 mL) 중의 화합물 27의 아세테이트 (3.8 mg, 0.0059 mmol) 및 HATU (2.5 mg, 0.0065 mmol)의 용액에 첨가하였다. 반응 혼합물을 5분 동안 RT에서 교반하였다. 이어서 pH를 8-9로 유지하면서, DMF (1 mL) 중의 DIEA 및 화합물 93 (5.6 mg, 0.0071 mmol)을 첨가하였다. 반응 혼합물을 15분 동안 RT에서 교반한 후, 조 생성물을 정제용 HPLC에 의해 정제하여 화합물 95 6.5 mg을 백색 고체로서 수득하였다. MS: (+) m/z 1292.7 (M+1). 화합물 95는 또한 본 명세서에서 화학식 VI-o으로 도시된다.

[0514]

실시예 21 - 반응식 17

[0515]

본 실시예는 반응식 17 (도 19)을 참조하여 본 발명의 화합물을 제조하는데 유용한 중간체인 산 108의 합성을 기술한다.

[0516]

메틸 에스테르 100. 디옥산 중의 HCl (8.3 mL, 4 M, 33.2 mmol)을 MeOH (10 mL) 중의 반응식 1의 화합물 9 (8 g, 22.1 mmol)의 용액에 첨가하였다. 반응 혼합물을 RT에서 교반하였다. 20분 후에, 용액을 진공 하에 증발시켜 메틸 에스테르 100을 오일 (6.5 g)로서 수득하였고, 이를 추가의 정제 없이 다음 반응 단계에서 사용하였다.

[0517]

프로필 아민 101. 프로판알 (700  $\mu$ L, 7.36 mmol) 및 NaBH(OAc)<sub>3</sub> (2.8 g, 13.2 mmol)을 DCM (10 mL) 중의 메틸 에스테르 100 (1.96 g, 6.6 mmol)의 용액에 첨가하였다. 반응 혼합물을 5°C에서 교반하였다. 1시간 후에 혼합물을 EtOAc에 녹이고, 7% K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 용액으로 2회에 이어 염수로 세척하였다. EtOAc 층을 무수 Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 상에서 건조시킨 다음 진공하여 증발시켜 잔류물을 수득하였고, 이를 칼럼을 통해 통과시켜 (MeOH:DCM, 0-10%) 프로필 아민 101 (1.12 g, 60%)을 오일로서 수득하였다.

<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  8.17 (s, 1H), 5.43 (t, *J* = 4.6 Hz, 1H), 3.93 (s, 3H), 3.07-2.87 (m, 2H), 2.82-2.70 (m, 1H), 2.54 (s, 1H), 2.45-2.26 (m, 2H), 2.16-2.02 (m, 1H), 1.73 (m, 2H), 1.05-0.94 (m, 9H). MS m/z C<sub>14</sub>H<sub>25</sub>N<sub>2</sub>O<sub>3</sub>S (M+1)<sup>+</sup> 계산치 301.2, 실측치 301.

[0518]

[0519] 화합물 102. (벤조트리아졸-1-일옥시)트리피롤리디노포스포늄 혼합물 (PyBop, 1.28 g, 2.47 mmol), HOt (0.33 g, 2.47 mmol), Boc-보호 이소류신 (430  $\mu$ L, 2.47 mmol)을 DCM (5 mL) 중의 프로필 아민 101 (570 mg, 1.9 mmol)의 용액에 첨가하였다. 반응 혼합물을 RT에서 교반하였다. 20분 후에 EtOAc (200 mL)를 첨가하고, 유기 층을 10% 시트르산 (2회), 포화 NaHCO<sub>3</sub> 및 염수로 세척하였다. EtOAc 층을 무수 Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 상에서 건조시킨 다음 진공하여 증발시켜 잔류물을 수득하였고, 이것을 칼럼을 통해 통과시켜 화합물 102 (0.55 g)를 오일로서 수득하였다. MS m/z C<sub>25</sub>H<sub>44</sub>N<sub>3</sub>O<sub>6</sub>S (M+1)<sup>+</sup> 계산치 514.3, 실측치 514.3.

[0520]

아지도 에스테르 104. DCM (3 mL) 중의 산 클로라이드 103 (2 mmol, 문헌 [Lundquist et al., 2001]; 또한 상기 반응식 5의 아지도 에스테르 43의 제법도 참조)을 DCM (10 mL) 및 DIEA (871  $\mu$ L, 5 mmol) 중의 화합물 102 (0.55 g, 1.1 mmol)의 용액에 첨가하였다. 반응 혼합물을 5°C에서 교반하였다. 10분 동안 교반한 후, 혼합물을 진공 하에 증발시켜 잔류물을 수득하였고, 이를 칼럼을 통해 통과시켜 아지도 에스테르 104 (300 mg)를 오일로서 수득하였다.

[0521]

MS m/z C<sub>31</sub>H<sub>53</sub>N<sub>6</sub>O<sub>7</sub>S (M+1)<sup>+</sup> 계산치 653.4, 실측치 653.

[0522]

화합물 106. EtOAc 1 mL 중의 펜타플루오로페닐 에스테르 105 (2.1 mmol, 문헌 [Peltier et al., 2006])의 용액을 EtOAc (5 mL) 중의 아지도 에스테르 104 (300 mg, 0.46 mmol) 및 Pd/C (10%, 50 mg)의 용액에 첨가하였다. 반응 플라스크를 별룬을 이용하여 H<sub>2</sub>로 채우고, RT에서 밤새 교반하였다. 밤새 교반한 후, 반응 혼합물을 여과하고, 진공하에 농축시킨 다음, 칼럼을 통해 통과시켜 (MeOH:DCM, 0-10%), 화합물 106 (170 mg)을 오일로 수득하였다.

서 수득하였다.

[0523] MS  $m/z$  C<sub>38</sub>H<sub>66</sub>N<sub>5</sub>O<sub>8</sub>S (M+1)<sup>+</sup> 계산치 752.5, 실측치 752.5.

[0524] 화합물 107. NaOH (120  $\mu$ L, 1.2 mmol, 10 M)를 MeOH (10 mL) 중의 화합물 106 (170 mg, 0.22 mmol)의 용액에 RT에서 첨가하였다. 2시간 동안 교반한 후, 반응 혼합물을 진한 HCl로 pH 2로 산성화시켰다. 이어서 반응 혼합물을 진공하에 증발시키고, 역상 칼럼을 통해 통과시켰다 (ACN:H<sub>2</sub>O, 0-100% (0.1% TFA 함유)). 동결건조시킨 후, 화합물 107 (63 mg)이 백색 분말로서 수득되었다. HPLC 프로파일은 그것이 화전이성질체의 혼합물임을 나타내었다.

[0525] MS  $m/z$  C<sub>26</sub>H<sub>45</sub>N<sub>4</sub>O<sub>5</sub>S (M+1)<sup>+</sup> 계산치 525.3, 실측치 525.

[0526] 산 108. 아세트산 무수물 (60  $\mu$ L, 0.64 mmol)을 페리딘 (1 mL) 중의 화합물 107 (63 mg, 0.12 mmol)의 용액에 5°C에서 첨가하였다. 온도를 점차적으로 RT로 상승시켰다. 반응이 밤새 진행되게 한 후, 물 (100  $\mu$ L)을 첨가하였다. 또 다른 5시간 후에, 휘발성 유기물을 진공하에 제거하여 잔류물을 수득하였고, 이를 역상 칼럼을 통해 통과시켜 (ACN:H<sub>2</sub>O, 0-100% (0.1% TFA 함유)), 산 108 (42 mg)을 오일로서 수득하였다.

<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CD<sub>3</sub>OD)  $\delta$  8.35 (s, 1H),

5.71 (dd,  $J$  = 11.4, 1.4 Hz, 1H), 4.63 (d,  $J$  = 9.1 Hz, 1H), 3.97 (t,  $J$  = 16.4 Hz, 1H),  
3.65-3.42 (m, 2H), 3.21-3.05 (m, 2H), 2.87 (s, 3H), 2.34-2.14 (m, 4H), 2.13 (s, 3H),  
2.03-1.46 (m, 10H), 1.29-1.06 (m, 1H), 1.04-0.85 (m, 15H). MS  $m/z$  C<sub>28</sub>H<sub>47</sub>N<sub>4</sub>O<sub>5</sub>S

[0527] (M+1)<sup>+</sup> 계산치 567.3, 실측치 567.

[0528] 실시예 22 - 반응식 18 및 19

[0529] 반응식 18 (도 20a 및 20b)는 이전 실시예에서 제조한 산 108을 이용한 본 발명의 화합물의 합성을 보여준다.

[0530] HATU-매개 커플링을 위한 일반적 절차. HATU (1.2x 과량) 및 DIEA (4x 과량)를 DMF 중의 산 108의 용액에 5°C에서 첨가하였다. 10분 동안 반응 혼합물을 교반한 후, 상응하는 아민을 첨가하였다. 반응 혼합물을 또 다른 10분 동안 교반한 후, 이를 DMSO 및 0.1% TFA 용액으로 희석시켰다. 생성된 혼합물을 역상 칼럼을 통해 통과시켰다 (ACN:H<sub>2</sub>O, 0-100% (0.1% TFA 함유)). 수집된 분획을 분석하고, 목적하는 분획을 동결건조시켜 상응하는 생성물을 수득하였다.

[0531] 화합물 109. 산 108과 페닐알라닌 메틸 에스테르의 커플링으로부터 수득하였다.

MS  $m/z$  C<sub>38</sub>H<sub>58</sub>N<sub>5</sub>O<sub>7</sub>S (M+1)<sup>+</sup> 계산치 728.4, 실측치 728.4. 화합물 109는 또한 상기에서 구조 III-x로 도시된다.

[0532] 화합물 111. 산 108과 화합물 110 (하기 제법)의 커플링으로부터 수득하였다.

MS  $m/z$  C<sub>42</sub>H<sub>63</sub>N<sub>6</sub>O<sub>9</sub>S (M+1)<sup>+</sup> 계산치 827.4, 실측치 827.5.

[0533] 화합물 112. MeOH 2 mL 중의 화합물 111 (5 mg, 6  $\mu$ mol)의 용액에 Pd/C (10%, 10 mg)를 첨가하였다. 반응 플라스크를 별분을 이용하여 H<sub>2</sub>로 채우고, RT에서 2시간 동안 교반하였다. 이어서, 반응 혼합물을 여과하고, 진공하에 농축시키고, 역상 칼럼을 통해 통과시켜 (ACN:H<sub>2</sub>O, 0-100% (0.1% TFA 함유)), 화합물 112 (2.1 mg)를 백색 분말로서 수득하였다. MS  $m/z$  C<sub>42</sub>H<sub>67</sub>N<sub>6</sub>O<sub>7</sub>S (M+1)<sup>+</sup> 계산치 799.5, 실측치 799.5. 화합물 112는 또한 상기에서 구조 III-y로 도시된다.

[0534] 화합물 114. 산 108과 화합물 113 (하기 제법)의 커플링으로부터 수득하였다.

MS  $m/z$  C<sub>41</sub>H<sub>64</sub>N<sub>5</sub>O<sub>7</sub>S (M+1)<sup>+</sup> 계산치 770.4, 실측치 770.

[0535] 화합물 116. 산 108과 화합물 115 (하기 제법)의 커플링으로부터 수득하였다.

MS  $m/z$  C<sub>61</sub>H<sub>95</sub>N<sub>11</sub>O<sub>13</sub>S (M+2)<sup>+</sup> 계산치 610.9, 실측치 611. 화합물 116은 또한 상기에서 구조 VI-t로 도시된다.

[0536] 화합물 117. 산 108과 알파-N-아세틸 리신 메틸 에스테르의 커플링으로부터 수득하였다.

MS  $m/z$  C<sub>37</sub>H<sub>63</sub>N<sub>6</sub>O<sub>8</sub>S (M+1)<sup>+</sup> 계산치 751.4, 실측치 751.5.

[0537] 화합물 110. 반응식 8의 알켄 59 (메틸 에스테르 대신 에틸 에스테르로서, 1 g, 2.6 mmol)을 5% TFA를 함유하

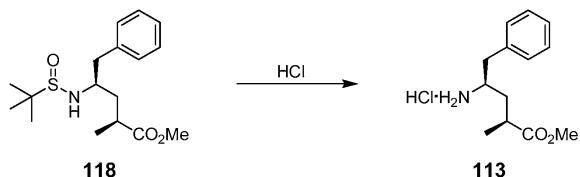
는 DCM (10 mL)에 용해시키고, 반응 혼합물을 5°C에서 교반하였다. 40분 후에 혼합물을 진공하에 건조시켜 화합물 110 (0.3 g, 100%)을 반고체로서 수득하였다.

<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CD<sub>3</sub>OD) δ 8.22-8.17

(m, 2H), 7.50 (dd, *J* = 9.0, 2.2 Hz, 2H), 6.58 (d, *J* = 10.0 Hz, 1H), 4.45 (td, *J* = 9.8, 5.3 Hz, 1H), 4.19 (q, *J* = 7.1 Hz, 2H), 3.35-3.28 (m, 1H), 3.06 (dd, *J* = 13.2, 9.6 Hz, 1H), 1.55 (d, *J* = 0.9 Hz, 3H), 1.27 (t, *J* = 7.1 Hz, 3H).

[0538]

[0539] 화합물 113. HCl (2.5 mL, 10 mmol, 4 M)을 MeOH (10 mL) 중의 화합물 118 (2 g, 5.5 mmol, 문헌 [Peltier et al., 2006])의 용액에 첨가하고, 반응 혼합물을 RT에서 교반하였다. 20분 후에 반응 혼합물을 진공하에 건조시켜 화합물 113 (2 g, 100%)을 반고체로서 수득하였다. 조 생성물을 추가의 정제 없이 다음 단계 반응에서 사용하였다. MS *m/z* C<sub>13</sub>H<sub>19</sub>NO<sub>2</sub> (M+1)<sup>+</sup> 계산치 222.1, 실측치 222.



[0540]

[0541] 반응식 19 (도 21)는 상기의 화합물 116의 합성에 사용된 화합물 115의 합성을 보여준다.

[0542]

화합물 120. DIEA (697  $\mu$ l, 12 mmol) 및 발린 t-부틸 에스테르 543 (627 mg, 3 mmol)를 6-말레이미도헥산산 ("6-MHA", 622 mg, 3 mmol) 및 HATU (1.14 g, 3 mmol)의 10 mL DCM 용액에 첨가하였다. 20분 후에 EtOAc (200 mL)를 첨가하였다. 유기 상을 10% 시트르산, 포화 NaHCO<sub>3</sub> 용액 및 염수로 세척하였다. 이어서, 이를 무수 Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>로 건조시키고, 용매를 증발에 의해 제거하였다. 생성된 잔류물을 칼럼을 통해 통과시켜 (헥산:EtOAc, 0-80%), 화합물 120 (900 mg)을 오일로서 수득하였다.

<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 6.66 (s, 2H),  
5.94 (d, *J* = 8.5 Hz, 1H), 4.44 (dd, *J* = 8.7, 4.5 Hz, 1H), 3.49 (t, *J* = 7.2 Hz, 2H), 2.31-2.06 (m, 3H), 1.73-1.54 (m, 4H), 1.45 (s, 9H), 1.37-1.25 (m, 2H). MS *m/z* C<sub>19</sub>H<sub>31</sub>N<sub>2</sub>O<sub>5</sub> (M+1)<sup>+</sup>

[0543]

계산치 367.2, 실측치 367.

[0544]

화합물 121. 화합물 120 (1 g, 2.73 mmol)을 3 mL TFA를 함유하는 20 mL DCM에 RT에서 용해시켰다. 1시간 후에 혼합물을 증발에 의해 건조시켜, 화합물 121 (1 g)을 오일로서 수득하였고, 이를 추가의 정제 없이 사용하였다.

[0545]

MS *m/z* C<sub>15</sub>H<sub>23</sub>N<sub>2</sub>O<sub>5</sub> (M+1)<sup>+</sup> 계산치 311.2, 실측치 311.

[0546]

화합물 123. DIEA (920  $\mu$ l, 5.28 mmol) 및 화합물 122 (500 mg, 1.32 mmol; 하기 반응식 22 및 실시 예 25 참조)를 Fmoc-보호된 시트룰린 (524 mg, 1.32 mmol) 및 HATU (601 mg, 1.58 mmol)의 10 mL DMF 용액에 첨가하였다. 20분 후에, 200 mL EtOAc를 첨가하였다. 유기 상을 10% 시트르산, 포화 NaHCO<sub>3</sub> 용액 및 염수로 세척하였다. 이어서, 이를 무수 Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>로 건조시키고, EtOAc를 증발시켰다. 생성된 잔류물을 칼럼을 통해 통과시켜 (MeOH:DCM; 0-10%) 고체를 수득하였다. 이 고체를 5% 피페리딘을 함유하는 DMF (5 mL)에 용해시켰다. 1시간 후에 용액을 증발시키고, 잔류물을 역상 칼럼을 통해 통과시켜 (ACN:H<sub>2</sub>O; 0-100% (0.1% TFA 함유)), 화합물 123 (212 mg)을 수득하였다. MS *m/z* C<sub>27</sub>H<sub>46</sub>N<sub>5</sub>O<sub>6</sub> (M+1)<sup>+</sup> 계산치 536.3, 실측치 536.4.

[0547]

화합물 124. DIEA (404  $\mu$ l, 2.4 mmol) 및 화합물 560 (321 mg, 0.6 mmol)을 화합물 550 (180 mg, 0.58 mmol) 및 HATU (220 mg, 0.58 mmol)의 5 mL DMF 용액에 첨가하였다. 20분 후에, 200 mL EtOAc를 첨가하였다. 유기 상을 10% 시트르산, 포화 NaHCO<sub>3</sub> 용액 및 염수로 세척하였다. 이어서, 이를 무수 Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>로 건조시키고, EtOAc를 증발시켰다. 생성된 잔류물을 칼럼을 통해 통과시켜 (MeOH:DCM; 0-20%), 화합물 124 (240 mg)를 오일로서 수득하였다.

[0548]

MS *m/z* C<sub>42</sub>H<sub>66</sub>N<sub>7</sub>O<sub>10</sub> (M+1)<sup>+</sup> 계산치 828.5, 실측치 828.5.

[0549] 화합물 115. 화합물 124 (240 mg, 0.29 mmol)를 TFA 및 DCM (1:1)의 5 mL 용액에 용해시켰다. 3시간 후에 혼합물을 증발에 의해 건조시키고, 생성된 화합물 115를 추가의 정제 없이 사용하였다. NMR로부터, 2종의 이성질체의 혼합물 (5:1)이 수득되었다. 주요 이성질체를 보고한다:

<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CD<sub>3</sub>OD) δ 8.27 (d, *J* = 7.5 Hz, 1H), 7.58 (dd, *J* = 8.5, 1.9 Hz, 2H), 7.21 (d, *J* = 8.5 Hz, 2H), 6.79 (s, 2H), 4.48 (dd, *J* = 13.3, 8.1 Hz, 1H), 4.14 (dd, *J* = 7.5, 4.9 Hz, 1H), 3.62-3.38 (m, 3H), 3.25-2.97 (m, 3H), 2.96-2.78 (m, 2H), 2.70-2.40 (m, 1H), 2.32-2.21 (m, 2H), 2.11-1.92 (m, 2H), 1.94-1.83 (m, 1H), 1.82-1.70 (m, 1H), 1.70-1.49 (m, 7H), 1.19 (d, *J* = 7.0 Hz, 3H), 0.97 (dd, *J* = 6.8, 2.8 Hz, 6H). MS *m/z* C<sub>33</sub>H<sub>50</sub>N<sub>7</sub>O<sub>8</sub> (M+1)<sup>+</sup>

계산치 672.4, 실측치 672.

[0550]

[0551] 실시예 23 - 반응식 20

[0552]

반응식 20 (도 22)은 본 발명의 화합물을 제조하는데 사용되는 중간체인 화합물 131의 합성을 보여준다.

[0553]

화합물 125. 반응식 1의 화합물 9 (3 g, 8.29 mmol)를 THF (20 mL) 및 디메틸су페이트 (1.2 mL, 12.4 mmol)에 용해시켰다. 이 용액에 NaH (552 mg, 13.8 mmol)를 5°C에서 1.5시간에 걸쳐 일부씩 나누어 첨가하였다. 이어서, 반응 혼합물을 포화 NH<sub>4</sub>Cl 용액에 부었다. EtOAc를 반응 혼합물에 첨가하고, 유기 상을 염수로 세척하고, 건조시키고, 진공 하에 증발시켜 잔류물을 수득하였다. 생성된 잔류물을 칼럼을 통해 통과시켜 (헥산:EtOAc, 0-100%), 화합물 125 (1.2 g)을 오일로서 수득하였다.

<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 8.12 (s, 1H), 4.95 (dd, *J* = 10.0, 3.3 Hz, 1H), 3.89 (s, 3H), 3.50 (s, 3H), 3.45-3.40 (m, 2H), 1.93-1.79 (m, 2H), 1.74-1.65 (m, 1H), 1.20 (s, 9H), 0.84 (d, *J* = 6.8 Hz, 3H), 0.80 (d, *J* = 6.8 Hz, 3H). MS *m/z* C<sub>16</sub>H<sub>29</sub>N<sub>2</sub>O<sub>4</sub>S<sub>2</sub> (M+1)<sup>+</sup> 계산치 377.1, 실측치 377.2.

[0554]

[0555] 화합물 126. 디옥산 중의 HCl (1 mL, 4 mmol)을 MeOH (10 mL) 중의 화합물 125 (0.7 g, 1.86 mmol)의 용액에 첨가하였다. 반응 혼합물을 RT에서 교반하였다. 20분 후에, 휘발성 물질을 진공하에 증발시켜 화합물 126 (0.8 g)을 오일로서 수득하였고, 이를 추가의 정제 없이 다음 반응 단계에서 사용하였다.

[0556]

MS *m/z* C<sub>12</sub>H<sub>21</sub>N<sub>2</sub>O<sub>3</sub>S (M+1)<sup>+</sup> 계산치 273.1, 실측치 273.

[0557]

화합물 127. DCM (10 mL) 및 DIEA (1.8 mL, 10 mmol) 중의 화합물 126 (616 mg, 2 mmol)의 용액에 5°C에서 DCM 5 mL 중의 화합물 103 (반응식 17, 6 mmol)을 첨가하였다. 반응 혼합물을 RT에서 3시간 동안 교반하였다. 3시간 후에 반응 혼합물을 포화 NaHCO<sub>3</sub> 용액 및 EtOAc에 부었다. 유기 상을 염수로 세척하고, 건조시키고, 증발시켰다. 생성된 잔류물을 칼럼을 통해 통과시켜 (헥산:EtOAc, 0-50%), 화합물 127 (594 mg, 72%)을 반오일로서 수득하였다.

<sup>1</sup>H

NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 8.18 (s, 1H), 6.47 (d, *J* = 9.9 Hz, 1H), 4.60-4.52 (m, 1H), 4.23-4.13 (m, 1H), 3.96-3.95 (m, 1H), 3.94 (s, 3H), 3.44 (s, 3H), 2.21-2.08 (m, 1H), 1.94-1.84 (m, 2H), 1.84-1.71 (m, 1H), 1.52-1.38 (m, 1H), 1.35-1.20 (m, 1H), 1.07 (d, *J* = 6.9 Hz, 3H), 0.95-0.85 (m, 9H). <sup>13</sup>C NMR (101 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 176.00, 168.63, 161.92, 146.90, 128.24, 78.81, 70.34, 58.97, 52.72, 50.76, 40.48, 38.62, 32.24, 24.32, 19.13, 18.13, 16.25, 11.82. MS *m/z* C<sub>18</sub>H<sub>30</sub>N<sub>5</sub>O<sub>4</sub>S (M+1)<sup>+</sup> 계산치 412.2, 실측치 412.3.

[0558]

[0559] 화합물 129. 칼륨 헥사메틸디실라지드 ("KHMDS", 0.19 mmol, 톨루엔 용액의 0.375 mL)를 화합물 127 (50 mg, 0.12 mmol)의 THF (0.5 mL) 용액에 -43°C에서 첨가하였다. 20분 후에, 화합물 128 (0.36 mmol, 137  $\mu$ L, 문현 [Abe et al., 1997])을 첨가하였다. 2시간 후, 100  $\mu$ L MeOH를 첨가하고, 반응 혼합물을 포화 NH<sub>4</sub>Cl 용액에 부었다. 이어서 EtOAc를 첨가하였다. 층을 분리시킨 후, 유기 상을 염수로 세척하고, 무수 Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>로 건조시키고, 용매를 증발에 의해 제거하였다. 생성된 잔류물을 칼럼을 통해 통과시켜 (헥산:EtOAc, 0-50%), 화합물 129 (51 mg)를 반고체로서 수득하였다.

<sup>1</sup>H NMR (400

MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 8.16 (s, 1H), 5.70 (s, 1H), 5.43 (d, *J* = 12.4 Hz, 1H), 5.32 (d, *J* = 12.3 Hz, 1H), 4.39 (d, *J* = 10.6 Hz, 1H), 3.92 (d, *J* = 11.7 Hz, 3H), 3.53-3.44 (m, 1H), 3.37 (d, *J* = 10.5 Hz, 3H), 2.41 (d, *J* = 7.2 Hz, 2H), 2.37-2.11 (m, 4H), 1.92 – 1.68 (m, 2H), 1.37-1.21 (m, 1H), 1.12 – 0.85 (m, 18H). <sup>13</sup>C NMR (101 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 175.24, 172.79, 171.21, 161.90, 147.09, 128.25, 78.44, 68.69, 63.35, 58.71, 52.48, 43.23, 38.63, 34.91, 31.01, 25.73, 25.25, 22.58, 22.56, 22.48, 20.45, 19.62, 16.14, 10.65. MS *m/z* C<sub>24</sub>H<sub>40</sub>N<sub>5</sub>O<sub>6</sub>S

[0560] (M+1)<sup>+</sup> 계산치 526.3, 질측치 424.3 (N,O 아세탈의 파괴)

[0561] 화합물 130. 화합물 129 (200 mg, 0.38 mmol) 및 105 (문현 [Peltier et al., 2006]; 4 mmol)를 5 mL EtOAc 중에서 Pd/C (150 mg, 10%)와 함께 rt에서 혼합하였다. 반응 플라스크를 배기하고, 별분을 이용하여 다시 H<sub>2</sub>로 채웠다. RT에서 밤새 교반한 후, 혼합물을 여과하고, 용매를 증발시켰다. 칼럼 크로마토그래피 (SiO<sub>2</sub>, MeOH:DCM, 0-10%) 후에, 화합물 130 (97 mg)을 고체로서 수득하였다.

[0562] MS *m/z* C<sub>31</sub>H<sub>53</sub>N<sub>4</sub>O<sub>7</sub>S (M+1)<sup>+</sup> 계산치 625.4, 질측치 625.5.

[0563] 화합물 131. 트리부틸주석 히드록시드 (181 mg, 0.59 mmol)를 10 mL 1,2-디클로로에탄 중의 화합물 130 (97 mg, 0.16 mmol)의 용액에 첨가하였다. 67°C에서 22시간 후에, 혼합물을 증발시키고, 역상 칼럼을 통해 통과시켜 (ACN:(20 mM NH<sub>4</sub>(HCO<sub>3</sub>) 완충제, pH 7), 5-100%), 화합물 131 (34 mg)을 고체로서 수득하였다.

[0564] MS *m/z* C<sub>30</sub>H<sub>51</sub>N<sub>4</sub>O<sub>7</sub>S (M+1)<sup>+</sup> 계산치 611.3, 질측치 510 (N,O 아세탈에서 파괴됨)

[0565] 실시예 24 – 반응식 21

[0566] 반응식 21 (도 23)은 전구체로서 화합물 131을 이용한 본 발명의 화합물의 합성을 보여준다.

[0567] 화합물 132. 화합물 60 (반응식 8, 200 mg, 0.57 mmol)을 20% TFA를 함유하는 2 mL DCM에 rt에서 용해시켰다. 1시간 후에 휘발성 물질을 증발시켜 화합물 132 (200 mg)을 황색 고체로서 수득하였고, 이를 추가의 정제 없이 사용하였다.

[0568] 화합물 133. DIEA (43  $\mu$ L, 0.2 mmol)를 화합물 131 (30 mg, 0.049 mmol) 및 HATU (22.3 mg, 0.059 mmol)의 DMF (1 mL) 용액에 -43°C에서 첨가하였다. 10분 후, 화합물 132 (15 mg, 0.06 mmol)를 첨가하였다. 이어서 혼합물을 RT로 상승시켰다. 최종 혼합물을 역상 칼럼을 통해 통과시켜 (ACN:(20 mM NH<sub>4</sub>(HCO<sub>3</sub>) 완충제, pH 7), 5-100%), 화합물 133 (20 mg)을 백색 분말로서 수득하였다.

[0569] MS *m/z* C<sub>44</sub>H<sub>73</sub>N<sub>6</sub>O<sub>8</sub>S (M+1)<sup>+</sup> 계산치 843.5, 질측치 843.5. 화합물 133은 또한 상기에서 구조 III-u로 도시된다.

[0570] 화합물 134. 화합물 133 (2 mg, 2.4  $\mu$ mol)을 0.5 mL 메탄올에 용해시키고, 1 M HCl을 이용하여 용액의 pH를 1로 조절하였다. 밤새 교반한 후, 휘발성 물질을 증발시키고, 잔류물을 역상 칼럼을 통해 통과시켜 (ACN:(20 mM NH<sub>4</sub>(HCO<sub>3</sub>) 완충제, pH 7), 5-100%), 화합물 134 (0.7 mg)을 백색 분말로서 수득하였다.

[0571] MS *m/z* C<sub>40</sub>H<sub>65</sub>N<sub>6</sub>O<sub>7</sub>S (M+1)<sup>+</sup> 계산치 773.5, 질측치 773.5. 화합물 134는 또한 상기에서 구조 III-v로 도시된다.

[0572] 화합물 135. 화합물 133 (2 mg, 2.4  $\mu$ mol)을 0.5 mL n-프로판올에 용해시키고, 1 M HCl을 이용하여 용액의 pH를 1로 조절하였다. 밤새 교반한 후, 혼합물을 증발시키고, 잔류물을 역상 칼럼을 통해 통과시켜 (ACN:(20 mM NH<sub>4</sub>(HCO<sub>3</sub>) 완충제, pH 7), 5-100%), 화합물 135 (0.4 mg)를 백색 분말로서 수득하였다.

[0573] MS *m/z* C<sub>42</sub>H<sub>69</sub>N<sub>6</sub>O<sub>7</sub>S (M+1)<sup>+</sup> 계산치 802.5, 질측치 801.5. 화합물 135는 또한 상기에서 구조 III-w로 도시된다.

[0574] 실시예 25 – 반응식 22

[0575] 반응식 22 (도 24)는 본 발명의 화합물을 제조하기 위한 중간체로서 유용한 화합물 142의 제조 방법을 보여준다.

[0576] 화합물 136. NaOH (800  $\mu$ L, 10 M, 8 mmol)를 반응식 8의 화합물 59 (1.65 g, 4.37 mmol)를 함유하는 THF 및 MeOH의 20 mL 용액 (1:1)에 첨가하였다. 밤새 교반한 후, 3 N HCl를 이용하여 5°C에서 용액의 pH를 1로 조절하였다. 용매를 증발시킨 후, 200 mL EtOAc를 첨가하였다. 분리시킨 후, 유기 상을 염수로 세척하고, 무수

$\text{Na}_2\text{SO}_4$ 로 건조시키고,  $\text{EtOAc}$ 를 증발시켰다. 잔류물을 칼럼을 통해 통과시켜 ( $\text{MeOH:DCM}$ ; 0-10%), 화합물 136 (1.2 g)을 오일로서 수득하였다.

[0577]  $^1\text{H}$  NMR (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  8.21-8.12 (m, 2H), 7.41-7.32 (m, 2H), 6.62 (d,  $J$  = 8.8 Hz, 1H), 4.82-4.57 (m, 2H), 3.15-3.02 (m, 1H), 2.90 (dd,  $J$  = 13.3, 7.2 Hz, 1H), 1.71 (d,  $J$  = 1.2 Hz, 3H), 1.41 (s, 9H).

[0578] 화합물 137.  $\text{DMF-}t\text{-부틸아세틸}$  (1 mL, 4 mmol)을 화합물 136 (128 mg, 0.36 mmol)의 6 mL 틀루엔 용액에 133°C에서 첨가하였다. 10분 후에 반응 혼합물을 냉각시키고, 용매를 증발시켰다. 잔류물을 칼럼을 통해 통과시켜 (헥산: $\text{EtOAc}$ ; 0-30%), 화합물 137 (133 mg)을 오일로서 수득하였다.

$^1\text{H}$  NMR

(400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  8.19-8.10 (m, 2H), 7.39-7.30 (m, 2H), 6.39 (dd,  $J$  = 9.1, 1.5 Hz, 1H), 4.63 (d,  $J$  = 39.1 Hz, 2H), 3.03 (dd,  $J$  = 13.2, 6.2 Hz, 1H), 2.90 (dd,  $J$  = 13.3, 7.0 Hz, 1H), 1.67 (d,  $J$  = 1.5 Hz, 3H), 1.47 (s, 9H), 1.39 (s, 9H).

[0579] [0580] 화합물 122. 화합물 137 (540 mg, 1.22 mmol),  $\text{Pd/C}$  (136 mg, 10%) 및 3 N  $\text{HCl}$  (0.3 mL)을  $\text{DCM}$  및  $\text{MeOH}$ 의 혼합물 (30 mL:5 mL)에 첨가하였다. 플라스크를 벌룬을 이용하여  $\text{H}_2$ 로 채웠다. RT에서 밤새 교반한 후, 혼합물을 여과하고 농축시켜 화합물 122 (550 mg)를 반고체로서 수득하였다.

[0581] MS  $m/z$   $\text{C}_{21}\text{H}_{35}\text{N}_2\text{O}_4$  ( $\text{M}+1$ )<sup>+</sup> 계산치 379.3, 질측치 223 (Boc 결실).

[0582] 화합물 138. 화합물 136 (100 mg, 0.28 mmol) 및  $\text{Pd/C}$  (20 mg, 10%)를 RT에서 수소 벌룬하에  $\text{MeOH}$  및  $\text{DCM}$  (1:1 v:v)의 5 mL 혼합물에 혼합하였다. 밤새 교반한 후, 혼합물을 여과하고, 용매를 진공하에 증발시켜 화합물 138 (95 mg)을 오일로서 수득하였고, 이를 추가의 정제 없이 다음 반응 단계에서 사용하였다.

[0583] MS  $m/z$   $\text{C}_{17}\text{H}_{27}\text{N}_2\text{O}_4$  ( $\text{M}+1$ )<sup>+</sup> 계산치 323.2, 질측치 223.

[0584] 화합물 139. 화합물 138 (10 mg, 0.03 mmol), *tert*-부틸디메틸실릴 클로라이드 ("TBDMSCl", 4.5 mg, 0.03 mmol) 및 이미다졸 (4 mg, 0.06 mmol)을 1 mL  $\text{DMF}$  중에서 RT에서 혼합하였다. Fmoc-보호된 시트룰린 (24 mg, 0.06 mmol), N,N'-디숙신이미딜 옥살레이트 ("DSO", 8 mg, 0.06 mmol) 및 DIEA (20  $\mu\text{l}$ , 0.12 mmol)를 또 다른 1 mL의  $\text{DMF}$  중에서 RT에서 혼합하였다. 1시간 후에 두 용액을 혼합하고, 혼합물을 RT로 유지시켰다. 밤새 교반한 후,  $\text{EtOAc}$ 를 첨가하고, 용액을 10% aq. 시트르산 및 염수로 세척하였다. 이어서 유기 상을 무수  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ 로 건조시키고, 진공 하에 증발시켰다. 생성된 잔류물을 칼럼을 통해 통과시켜 ( $\text{MeOH:DCM}$ , 0-10%), 화합물 139 (7 mg)를 오일로서 수득하였다. MS  $m/z$   $\text{C}_{38}\text{H}_{48}\text{N}_5\text{O}_8$  ( $\text{M}+1$ )<sup>+</sup> 계산치 702, 질측치 702.

[0585] 화합물 141. 화합물 139 (10 mg, 0.014 mmol)를 5% 피페리딘을 함유하는 1 mL  $\text{DMF}$ 에 용해시켰다. 20분 후에, 용매를 진공하에 증발시키고, 잔류물을 1 mL  $\text{DMF}$  중의 N-숙신이미딜-4-말레이미도부티레이트 140 (5.6 mg, 0.028 mmol) 및 DIEA (5  $\mu\text{l}$ , 0.028 mmol)와 혼합하였다. 10분 후에 용매를 진공하에서 반응 혼합물로부터 제거하고, 칼럼을 통해 통과시켜 ( $\text{MeOH:DCM}$ , 0-20%), 화합물 141 (6 mg)을 고체로서 수득하였다. MS  $m/z$   $\text{C}_{31}\text{H}_{45}\text{N}_6\text{O}_9$  ( $\text{M}+1$ )<sup>+</sup> 계산치 645, 질측치 645.

[0586] 화합물 142. 화합물 141 (6 mg, 0.01 mmol)을 10% TFA를 함유하는 1 mL  $\text{DCM}$ 에 용해시켰다. 10분 후에 용매를 진공 하에 증발시켜 화합물 142 (6 mg)를 수득하였고, 이를 추가의 정제 없이 다음 반응 단계에서 사용하였다.

[0587] 실시예 26 - 반응식 23

[0588] 반응식 23 (도 25)은 반응식 22에 따라 제조한 화합물 142를 본 발명의 화합물로 만드는 것을 보여준다.

[0589] 화합물 145. 150  $\mu\text{l}$   $\text{MeOH}$  중의  $\text{HCl}$  (30  $\mu\text{mmol}$ )을 0.7 mL  $\text{MeOH}$  중의 반응식 2의 화합물 27 (5 mg, 8.3  $\mu\text{mmol}$ )의 용액에 5°C에서 첨가하였다. 온도를 점차적으로 RT로 상승시켰다. 밤새 교반한 후, 혼합물을 증발시키고, 0.7 피리딘에 용해시켰다. 이 용액에  $\text{Ac}_2\text{O}$  (28  $\mu\text{l}$ , 296  $\mu\text{mmol}$ )를 5°C에서 첨가하였다. 온도를 점차적으로 RT로 상승시키고, 밤새 교반한 후 50  $\mu\text{l}$   $\text{H}_2\text{O}$ 를 첨가하였다. 3시간 후에 휘발성 물질을 증발시키고, 생성된 잔류물을 증발시켜 화합물 145 (4.7 mg)를 반고체로서 수득하였다.

MS  $m/z$  C<sub>27</sub>H<sub>45</sub>N<sub>4</sub>O<sub>7</sub>S (M+1)<sup>+</sup> 계산치 569.3, 실측치 569.

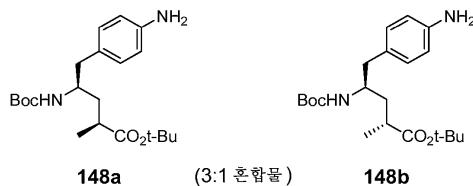
[0590] 화합물 146. DIEA (6  $\mu\ell$ , 34  $\mu\text{mol}$ ) 및 화합물 142 (5.5 mg, 8.3  $\mu\text{mol}$ )를 화합물 530 (4.7 mg, 8.3  $\mu\text{mmol}$ ) 및 HATU (3.2 mg, 8.4  $\mu\text{mol}$ )의 0.5 mL DMF 용액에 5°C에서 첨가하였다. 20분 후에, 생성된 혼합물을 역상 칼럼을 통해 통과시켜 (ACN:(20 mM NH<sub>4</sub>(HCO<sub>3</sub>) 완충제, pH 7), 5-100%), 화합물 146 (4.5 mg)을 백색 고체로서 수득하였다. MS  $m/z$  C<sub>53</sub>H<sub>79</sub>N<sub>10</sub>O<sub>13</sub>S (M+1)<sup>+</sup> 계산치 1095.5, 실측치 1095.5. 화합물 146은 또한 상기에서 구조 VI-r로 도시된다.

[0591] 화합물 147. DIEA (1.4  $\mu\ell$ , 8  $\mu\text{mol}$ ) 및 한 방울의 포화 NH<sub>4</sub>Cl 용액을 화합물 146 (2 mg, 1.8  $\mu\text{mol}$ ) 및 HATU (1.6 mg, 4.6  $\mu\text{mol}$ )의 0.5 mL DMF 용액에 첨가하였다. 10분 후에 혼합물을 역상 칼럼을 통해 통과시켜 (ACN:(20 mM NH<sub>4</sub>(HCO<sub>3</sub>) 완충제, pH 7), 5-100%), 화합물 147 (0.5 mg)을 반고체로서 수득하였다.

[0592] MS  $m/z$  C<sub>53</sub>H<sub>80</sub>N<sub>11</sub>O<sub>12</sub>S (M+1)<sup>+</sup> 계산치 1094.6, 실측치 1094. 화합물 147은 또한 상기에서 구조 VI-s로 도시된다.

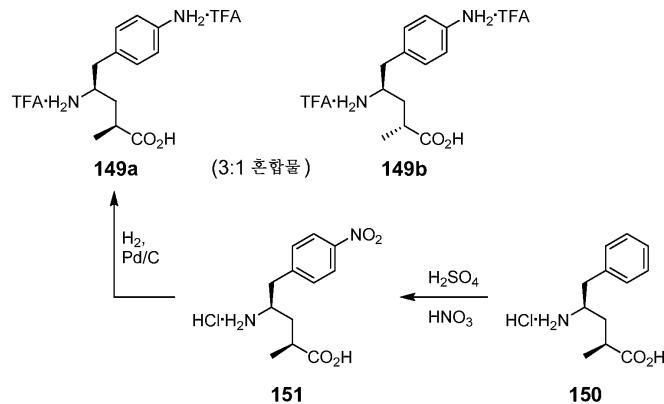
[0593] 실시예 27 - 4-아미노류부페닐알라닌 부분입체이성질체

[0594] 화합물 122 (상기 실시예 25)는 다음과 같이 부분입체이성질체 148a 및 148b의 3:1 혼합물인 것으로 결정되었다.



[0595]

[0596] 화합물 122 (10 mg, 0.026 mmol)를 TFA 및 DCM의 2 mL 혼합물 (1:1)에 RT에서 용해시켰다. 3시간 후에 용매를 증발시키고, 잔류물을 역상 칼럼을 통해 통과시켜 (ACN:H<sub>2</sub>O; 0-100% (0.1% TFA 함유)), 화합물 149a 및 149b의 3:1 혼합물을 수득하였다. 혼합물의 NMR 스펙트럼을 화합물 150으로부터 제조된 정확한 화합물 149a의 샘플의 NMR과 비교하여, 상기 혼합물의 주요 이성질체를 구조 149a로 지정하였다.



[0597]

[0598] 진한 HNO<sub>3</sub> (10  $\mu\ell$ )을 튜부페닐알라닌 150 (문헌 [Peltier et al., 2006]; 6 mg, 0.025 mmol)의 200  $\mu\ell$ 의 진한 H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 용액에 5°C에서 첨가하였다. 20분 후에 용액을 2 mL의 냉각된 7% K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 용액에 부었다. 이어서 10 mL EtOAc를 첨가하였다. 분리시킨 후, 유기 상을 증발에 의해 건조시키고, 잔류물을 역상 칼럼을 통해 통과시켜 (ACN:H<sub>2</sub>O; 0-100% (0.1% TFA 함유)), 니트로 화합물 151 (5 mg)을 수득하였다.

<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CD<sub>3</sub>OD)  $\delta$  8.27-8.21 (m, 2H),

7.56-7.49 (m, 2H), 3.69-3.58 (m, 1H), 3.07 (d,  $J$  = 7.2 Hz, 2H), 2.73-2.61 (m, 1H),  
2.04-1.91 (m, 1H), 1.64 (ddd,  $J$  = 14.7, 8.2, 4.9 Hz, 1H), 1.20 (d,  $J$  = 7.1 Hz, 3H). MS  $m/z$

[0599]

[0600] 이어서 니트로 화합물 151을 다음과 같이 화합물 149a로 전환시켰다: 니트로 화합물 151 (5 mg, 0.01 mmol)을 5 mL MeOH 중의 Pd/C (10 mg, 10%)와 RT에서 혼합하였다. 별룬을 이용하여 플라스크를 H<sub>2</sub>로 채웠다. 1시간 후

에 혼합물을 여과하고 증발시켜 화합물 149a (4.5 mg)를 수득하였다.

<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CD<sub>3</sub>OD) δ 7.08-7.03 (m, 2H), 6.83-6.79 (m, 2H), 3.51-3.41 (m, 1H), 2.84-2.78 (m, 2H), 2.68-2.58 (m, 1H), 2.04-1.92 (m, 1H), 1.60 (d, *J* = 7.8 Hz, 1H), 1.18 (d, *J* = 7.0, Hz, 3H). MS m/z C<sub>12</sub>H<sub>19</sub>N<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (M+1)<sup>+</sup> 계산치 223.1, 실측치 223.

[0601]

[0602] 상기 NMR 스펙트럼은 148a/148b 및 149a/149b 혼합물의 주요 성분의 구조를 정하는데 기초가 되었다.

[0603]

화합물 122의 샘플을 역상 칼럼을 통해 통과시키고 (ACN:H<sub>2</sub>O; 0-100% (0.1% TFA 함유)), 부수 이성질체를 함유하는 분획을 수집하고, 동결건조시켰다. 이어서 수득된 생성물을 TFA 및 DCM으로 처리하여 Boc 기를 제거하였다. 1시간 후에 용매를 증발시켜 생성물을 수득하였고, 이의 NMR 스펙트럼을 화합물 149a의 그것과 비교한 후, 이것이 화합물 149b인 것으로 지정하였다. 화합물 149b:

<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CD<sub>3</sub>OD) 7.36-7.23 (m, 2H), 7.22-7.09 (m, 2H), 3.59-3.40 (m, 1H), 3.04-2.84 (m, 2H), 2.61-2.45 (m, 1H) 2.07-1.87 (m, 1H), 1.73-1.58 (m, 1H), 1.21-1.09 (d, *J* = 7.2 Hz, 3H).

[0604]

[0605] 화합물 148a, 148b, 149a 및 149b는 4-아미노튜부페닐알라닌 서브유닛을 갖는 본 발명의 화합물을 제조하는데 사용될 수 있으며, 여기서 알파-메틸 기의 입체화학은 상기에서 예시한 합성 접근법에 필요한 변경을 위하여 규정하였다. 화합물 82a 및 82b (실시예 17)도 또한 비슷한 용도로 쓰일 수 있다.

[0606]

전술된 본 발명의 상세한 설명에는 본 발명의 특별한 부분 또는 측면에 관한 간단하거나 베타적인 구절이 포함된다. 이는 편의상 명료하게 하기 위해서이고, 특별한 특징이 이것이 기재된 구절 이상으로 관련될 수 있으며, 본원 설명에는 상이한 구절에서 발견된 적당한 모든 정보의 조합이 포함된다는 것을 인지해야 한다. 유사하게, 본원의 각종 도면 및 설명이 본 발명의 구체적 실시양태와 관계가 있긴 하지만, 구체적인 특징이 특별한 도면이나 실시양태 맥락에서 기재되는 경우에, 이러한 특징을 적당한 정도로 또 다른 도면이나 실시양태 맥락에서, 또 다른 특징과 조합해서, 또는 일반적으로 본 발명에서 사용할 수도 있다는 것을 인지해야 한다.

[0607]

추가로, 본 발명이 특정의 바람직한 실시양태에서 특별하게 기재되긴 하였지만, 본 발명은 이러한 바람직한 실시양태로만 제한되지 않는다. 오히려, 본 발명의 범위는 하기하는 특허청구범위에 의해 규정된다.

[0608]

참고문헌

[0609]

첫번째 저자 (또는 본 발명자들)에 의해 단축 방식으로 인용된 하기 참고문헌에 대한 완전한 인용문 및 본 명세서에서 앞서는 날짜를 이하에 제공한다. 이들 참고문헌들 각각은 모든 목적상 본원에 참고로 포함된다.

- Abe et al., WO 97/21712 (1997).
- Boyd et al., US 2008/0279868 A1 (2008).
- Boyd et al., US 7,691,962 B2 (2010).
- Balasubramanian et al., *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2008**, 18, 2996-2999.
- Balasubramanian et al., *J. Med. Chem.* **2009**, 52 (2), 238-240.
- Davis et al., US 2008/0176958 A1 (2008).
- Domling, DE 10 2004 030 227 A1 (2006).
- Domling et al., US 2005/0239713 A1 (2005) [2005a].
- Domling et al., US 2005/0249740 A1 (2005) [2005b].
- Domling et al., *Mol. Diversity* **2005**, 9, 141-147 [2005c].
- Domling et al., *Ang. Chem. Int. Ed.* **2006**, 45, 7235-7239.
- Ellman et al., WO 2009/012958 A2 (2009).
- Hamel et al., *Curr. Med. Chem. – Anti-Cancer Agents* **2002**, 2, 19-53.
- Hoefle et al., DE 100 08 089 A1 (2001).
- Hoefle et al., *Pure Appl. Chem.* **2003**, 75 (2-3), 167-178.
- Hoefle et al., US 2006/0128754 A1 (2006) [2006a].

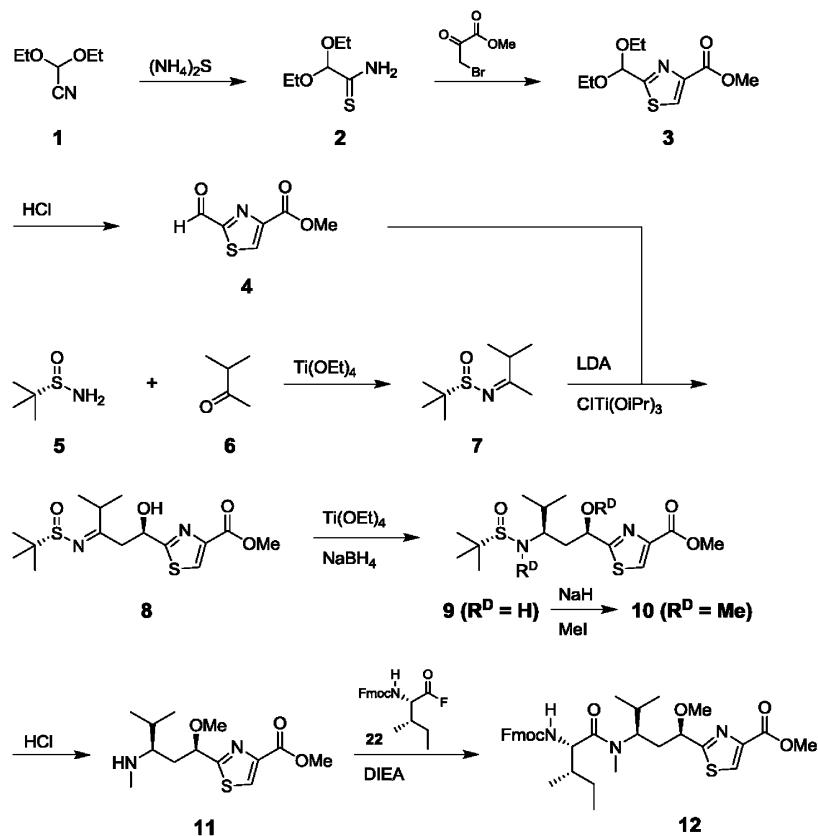
[0610]

Hoefle et al., US 2006/0217360 A1 (2006) [2006b].  
 Kaur et al., *Biochem. J.* **2006**, 396, 235-242.  
 Khalil et al., *ChemBioChem* **2006**, 7, 678-683.  
 Leamon et al., *Cancer Res.* **2008**, 68 (23), 9839-9844.  
 Leamon et al., WO 2009/002993 A1 (2009).  
 Leung et al., US 2002/0169125 A1 (2002).  
 Low et al., WO 2009/026177 A1 (2009).  
 Lundquist et al., *Org. Lett.* **2001**, 3, 781-783.  
 Neri et al., *ChemMedChem* **2006**, 1, 175-180.  
 Patterson et al., *Chem. Eur. J.* **2007**, 13, 9534-9541.  
 Patterson et al., *J. Org. Chem.* **2008**, 73, 4362-4369.  
 Peltier et al., *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, 128, 16018-16019.  
 Reddy et al., *Mol. Pharmaceutics* **2009**, 6 (5), 1518-1525.  
 Reichenbach et al. WO 98/13375 A1 (1998).  
 Richter, WO 2008/138561 A1 (2008).  
 Sani et al., *Angew. Chem. Int. Ed.* **2007**, 46, 3526-3529.  
 Sasse et al., *J. Antibiotics* **2000**, 53 (9), 879-885.  
 Sasse et al., *Nature Chem. Biol.* **2007**, 3 (2), 87-89.  
 Schluep et al., *Clin. Cancer Res.* **2009**, 15 (1), 181-189.  
 Shankar et al., *SYNLETT* **2009**, 8, 1341-1345.  
 Shibue et al., *Tetrahedron Lett.* **2009** 50, 3845-3848.  
 Steinmetz et al., *Angew. Chem. Int. Ed.* **2004**, 43, 4888-4892.  
 Ullrich et al., *Angew. Chemie Int. Ed.* **2009**, 48, 4422-4425.  
 Vlahov et al., *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2008**, 18 (16), 4558-4561 [2008a].  
 Vlahov et al., US 2008/0248052 A1 (2008) [2008b].  
 Vlahov et al., WO 2009/055562 A1 (2009).  
 Vlahov et al., US 2010/0048490 A1 (2010).  
 Wang et al., *Chem. Biol. Drug. Des.* **2007**, 70, 75-86.  
 Wipf et al., *Org. Lett.* **2004**, 6 (22), 4057-4060.  
 Wipf et al., *Org. Lett.* **2007**, 9 (8), 1605-1607.  
 Wipf et al., US 2010/0047841 A1 (2010).

## 도면

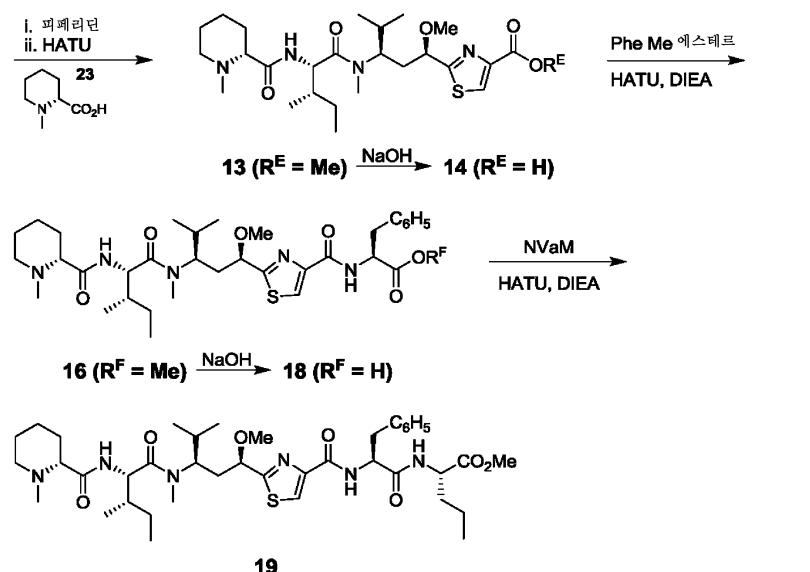
## 도면 1a

## 반응식 1 (파트 1/2)



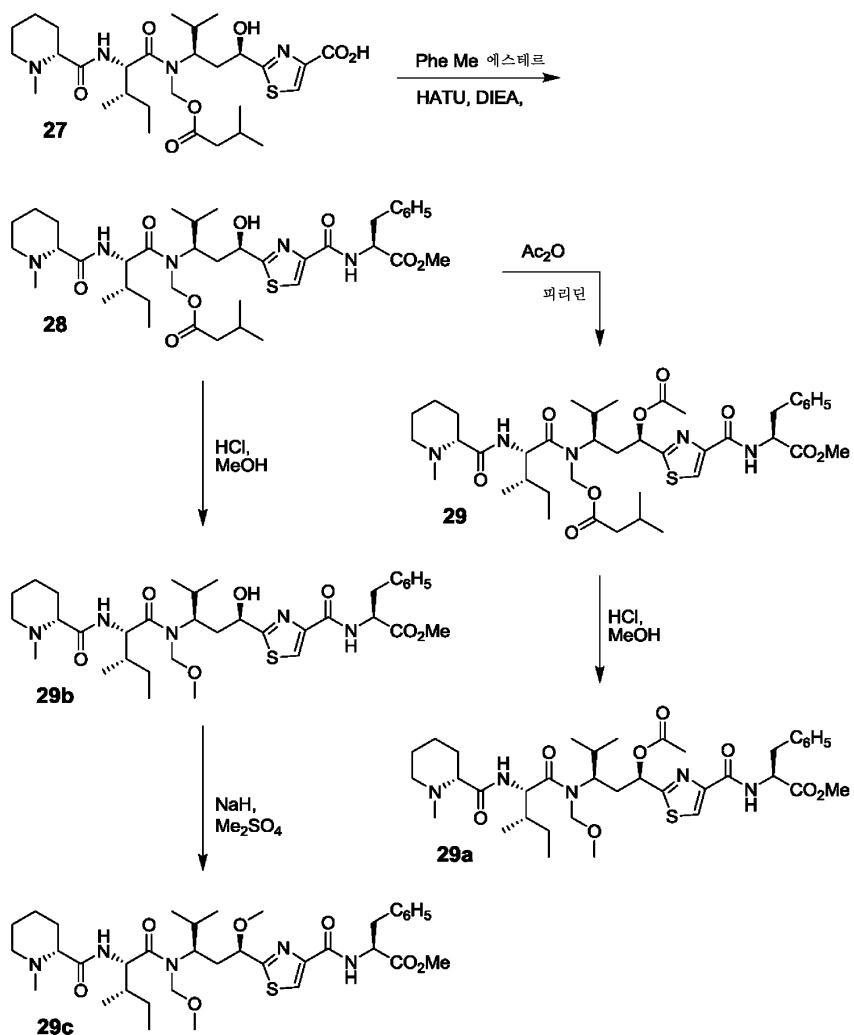
## 도면 1b

## 반응식 1 (파트 2/2)



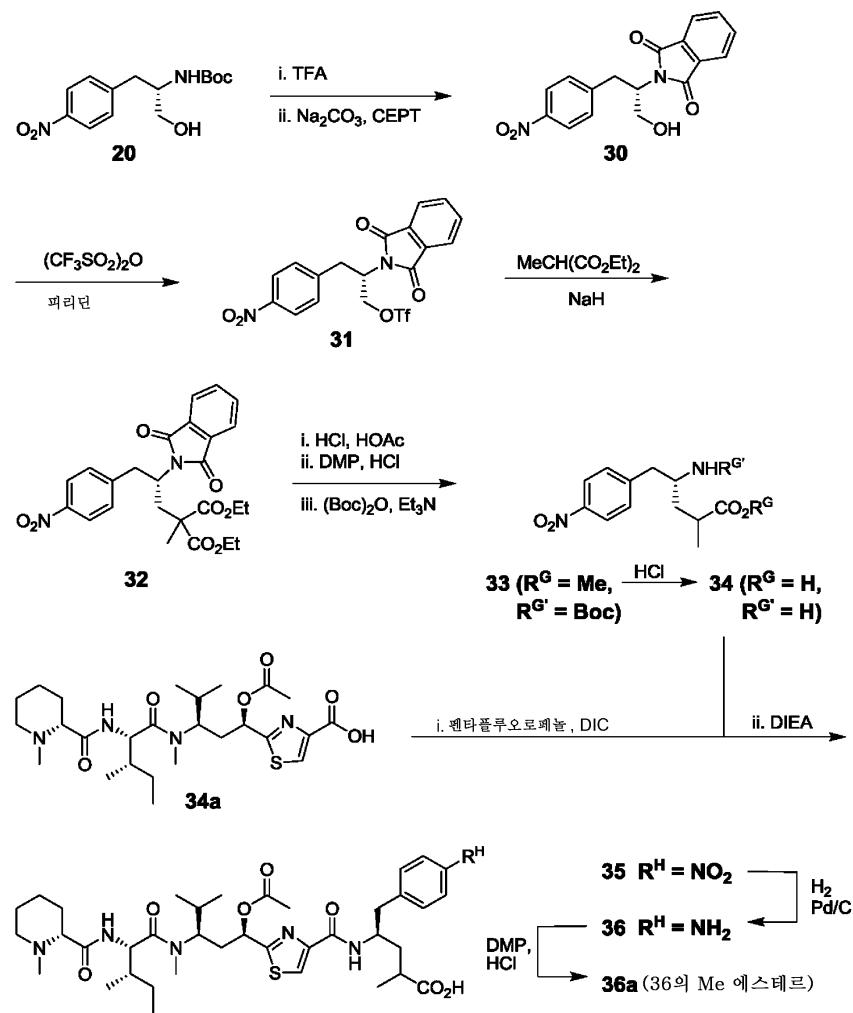
## 도면2

반응식 2



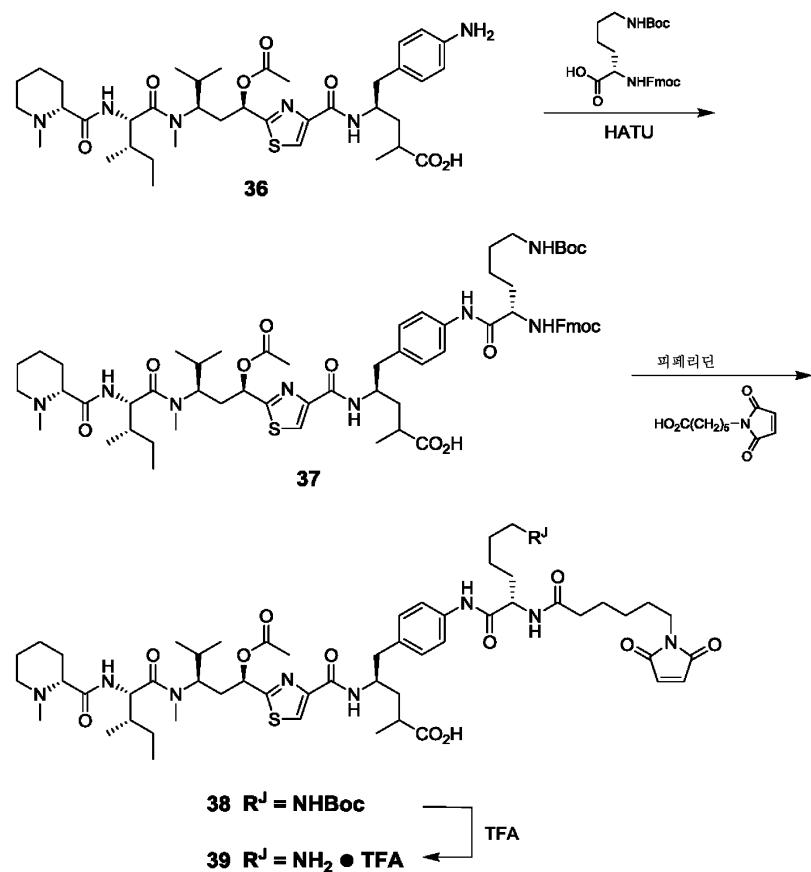
## 도면3

반응식 3



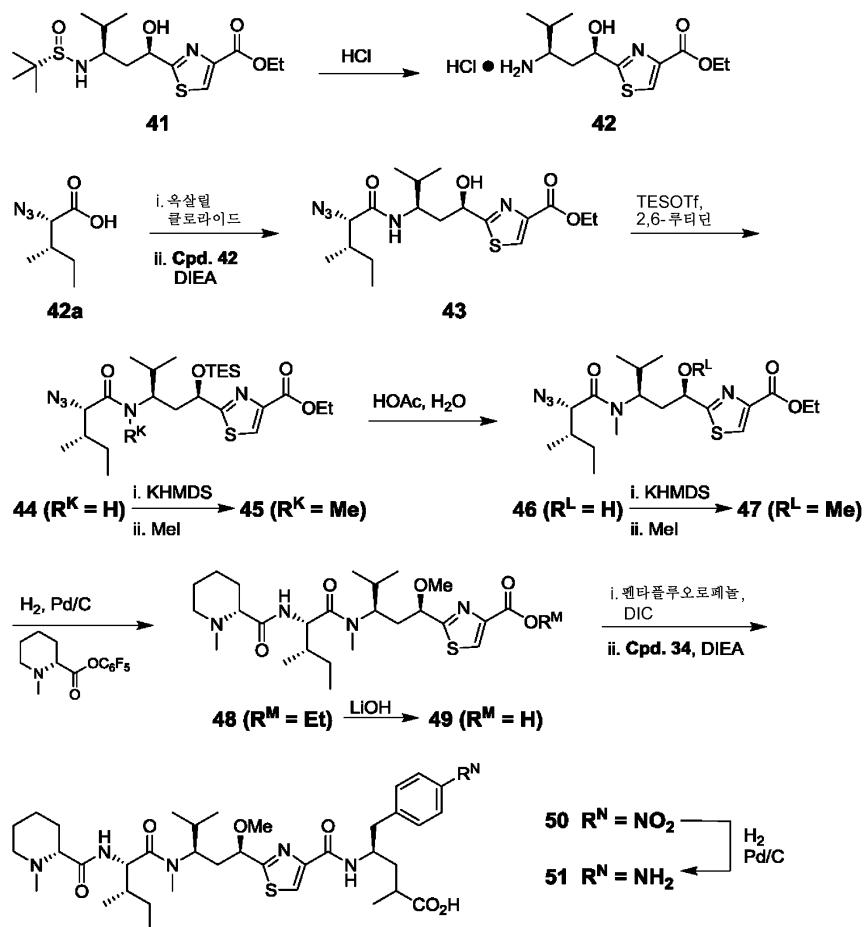
## 도면4

반응식 4



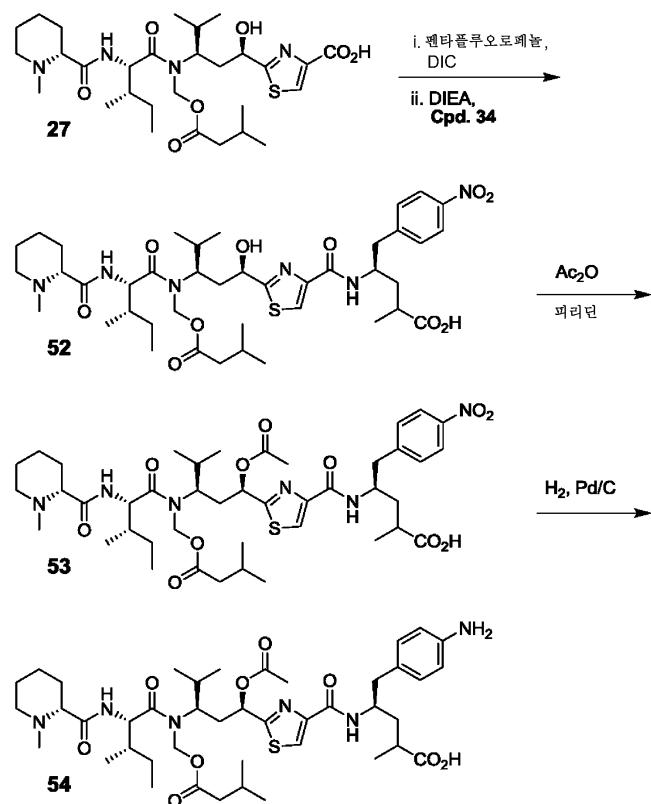
## 도면5

## 반응식 5



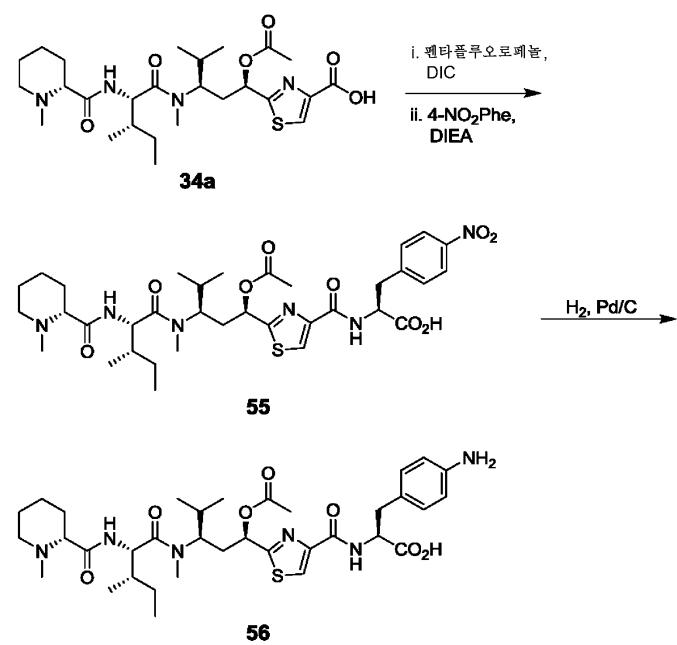
## 도면6

반응식 6



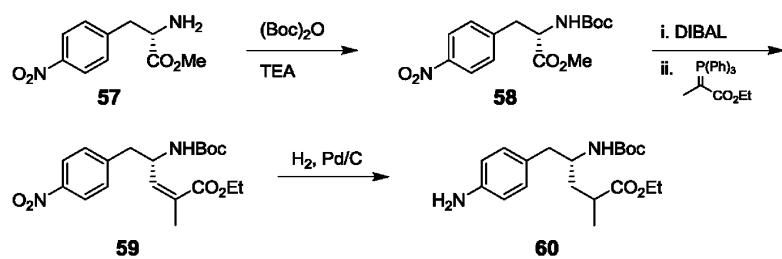
## 도면7

반응식 7



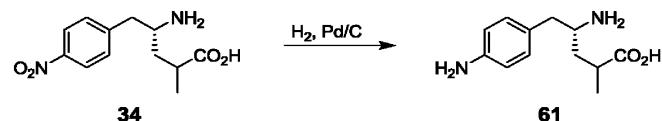
## 도면8a

## 반응식 8



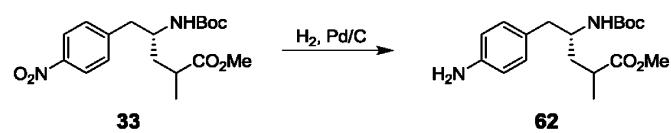
## 도면8b

## 반응식 9



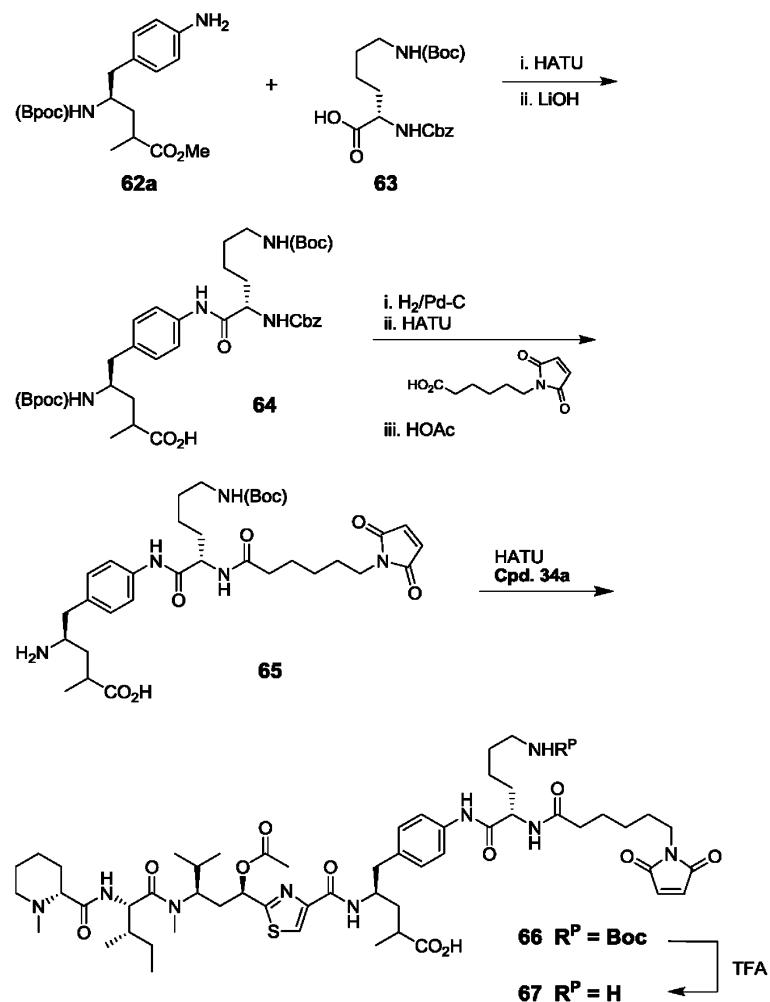
## 도면8c

## 반응식 10



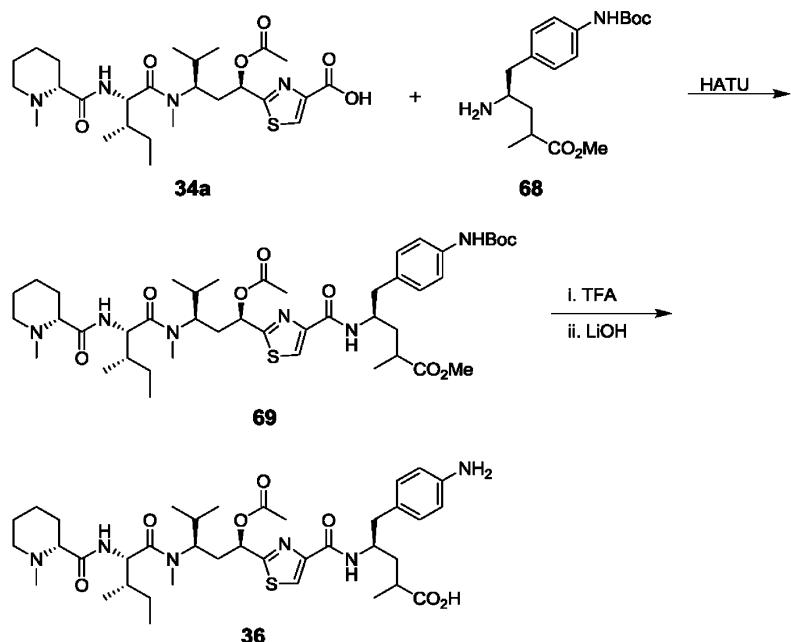
## 도면9

반응식 11

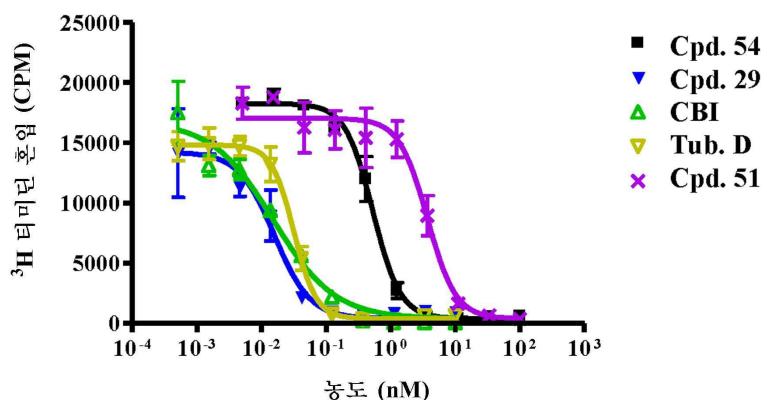


## 도면10

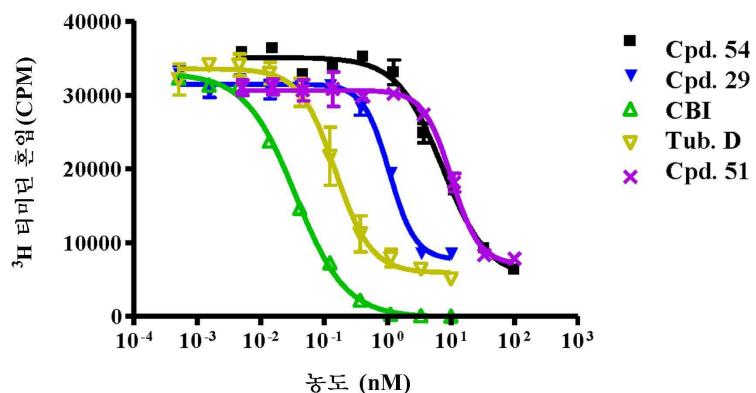
반응식 12



## 도면11a

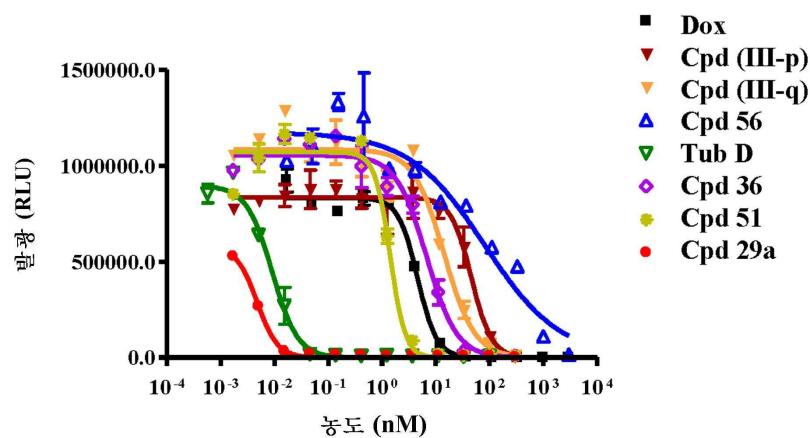
HL-60  $^3\text{H}$  티미딘 충식 검정

## 도면11b

786-0  $^3\text{H}$  티미딘 증식 검정

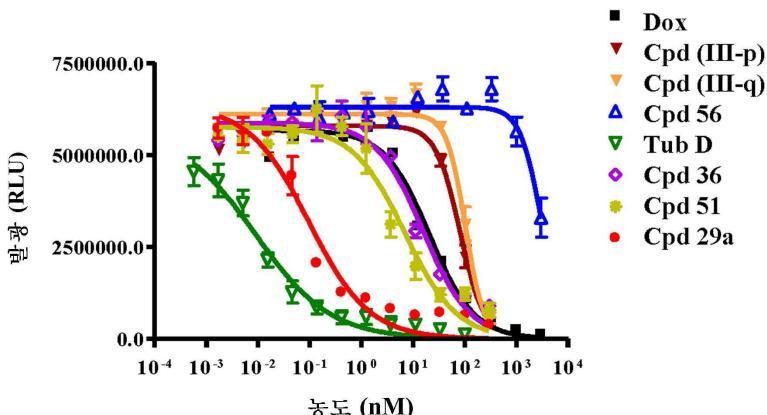
## 도면12a

HL-60 ATP 발광 검정

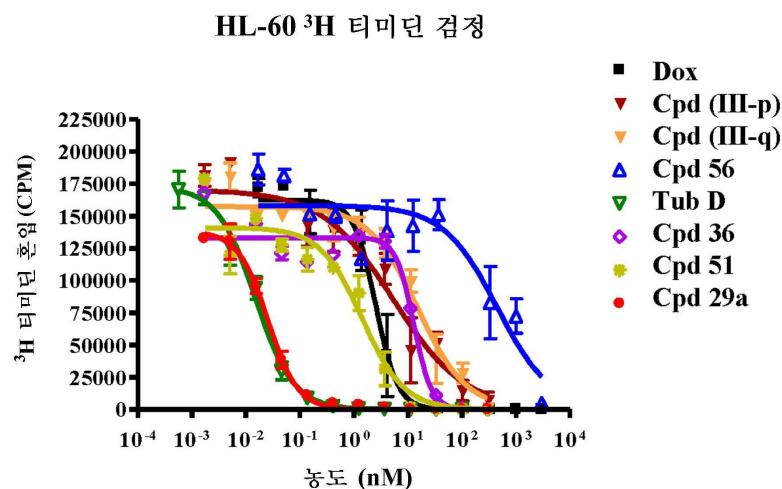


## 도면12b

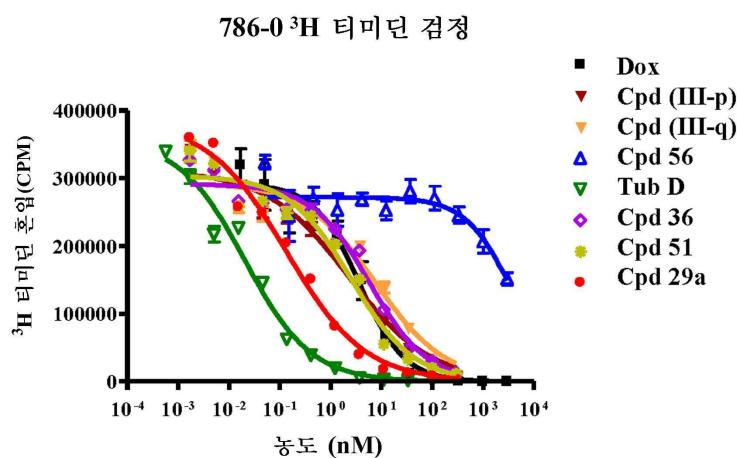
786-0 ATP 발광 검정



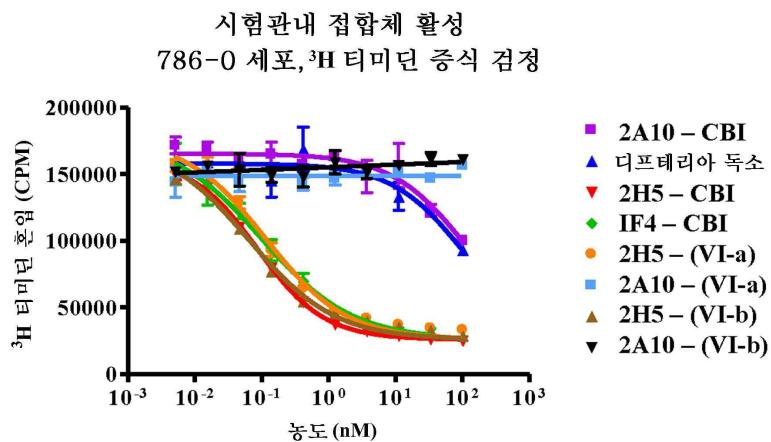
## 도면12c



## 도면12d

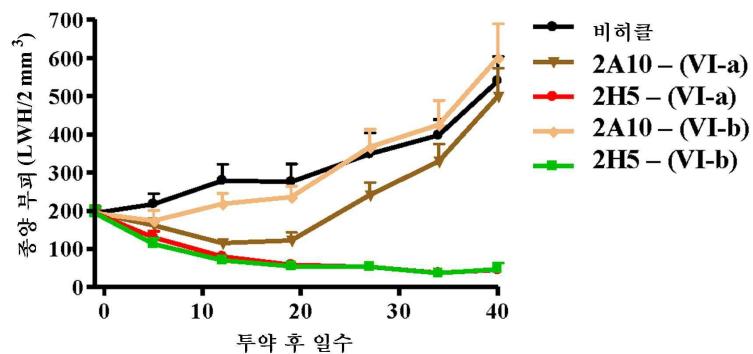


## 도면13



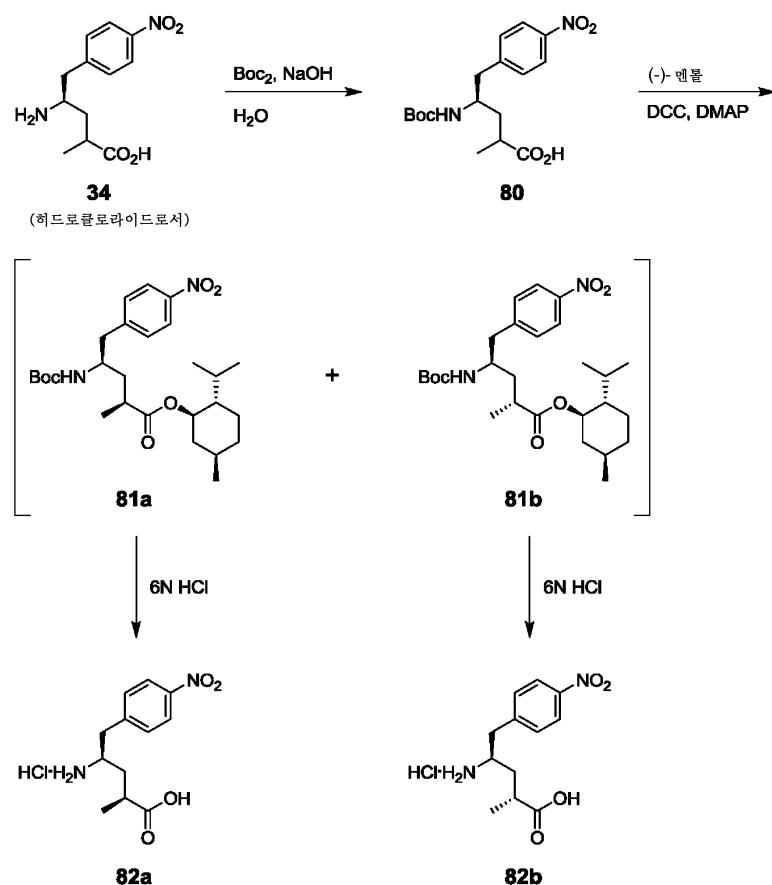
## 도면14

생체내 접합체 활성  
786-0 평균 종양 부피



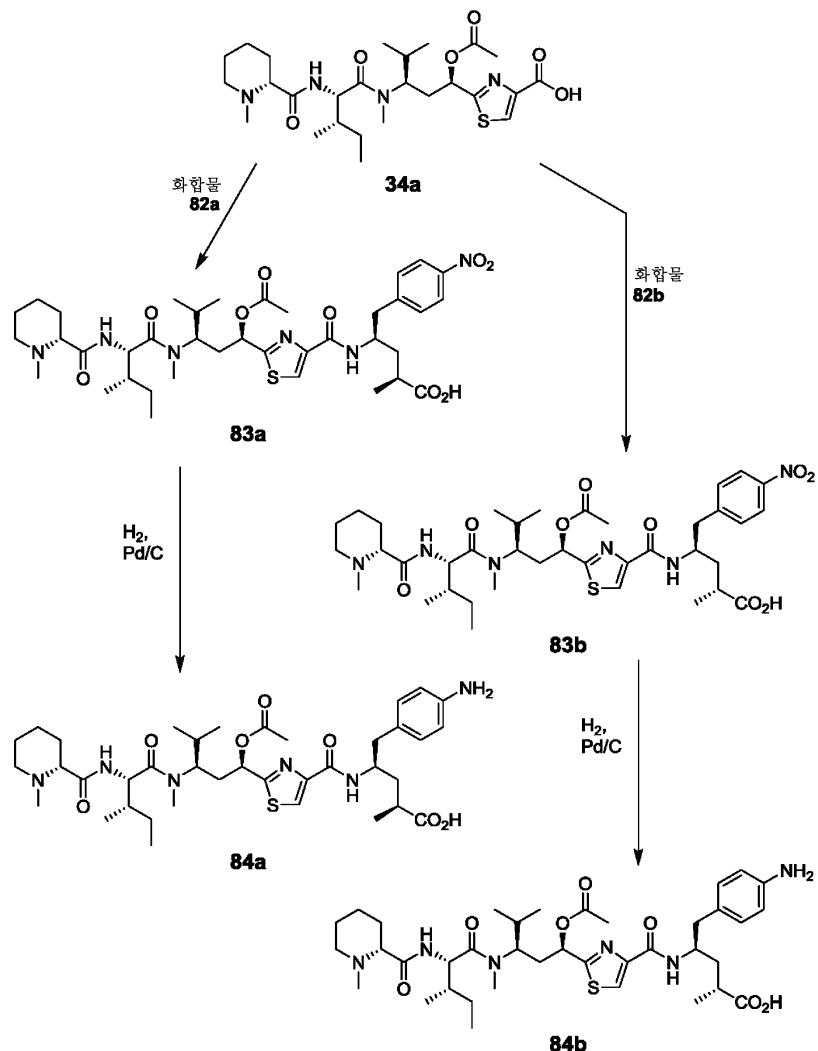
## 도면15

## 반응식 13



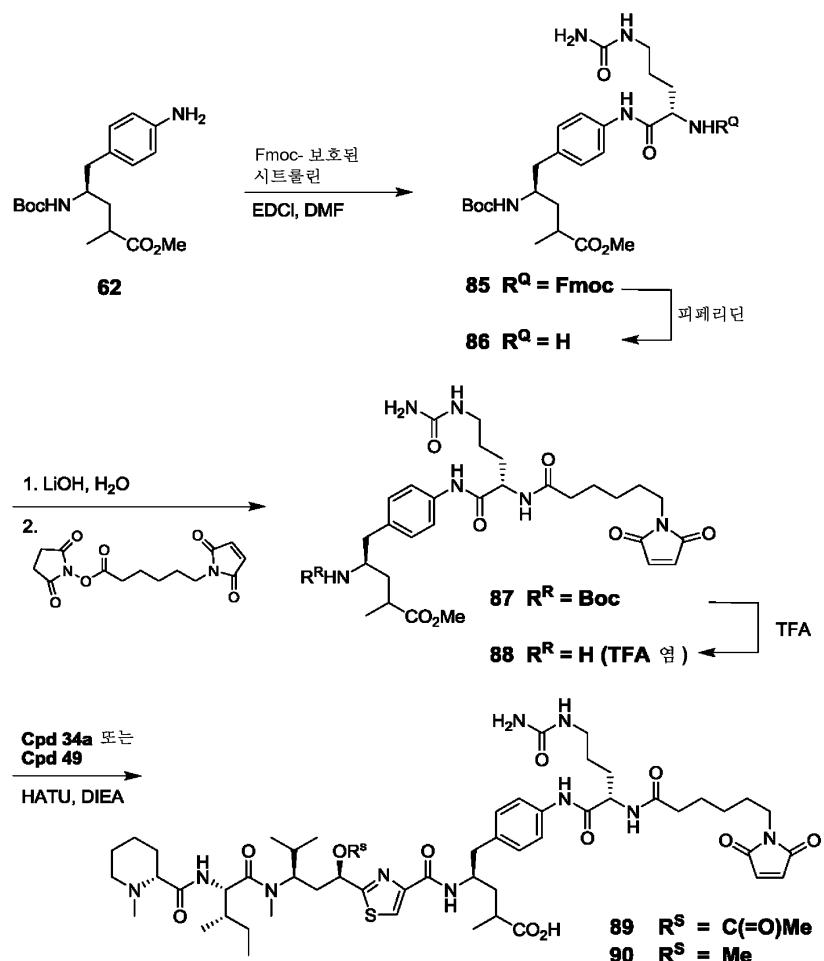
## 도면16

### 반응식 14



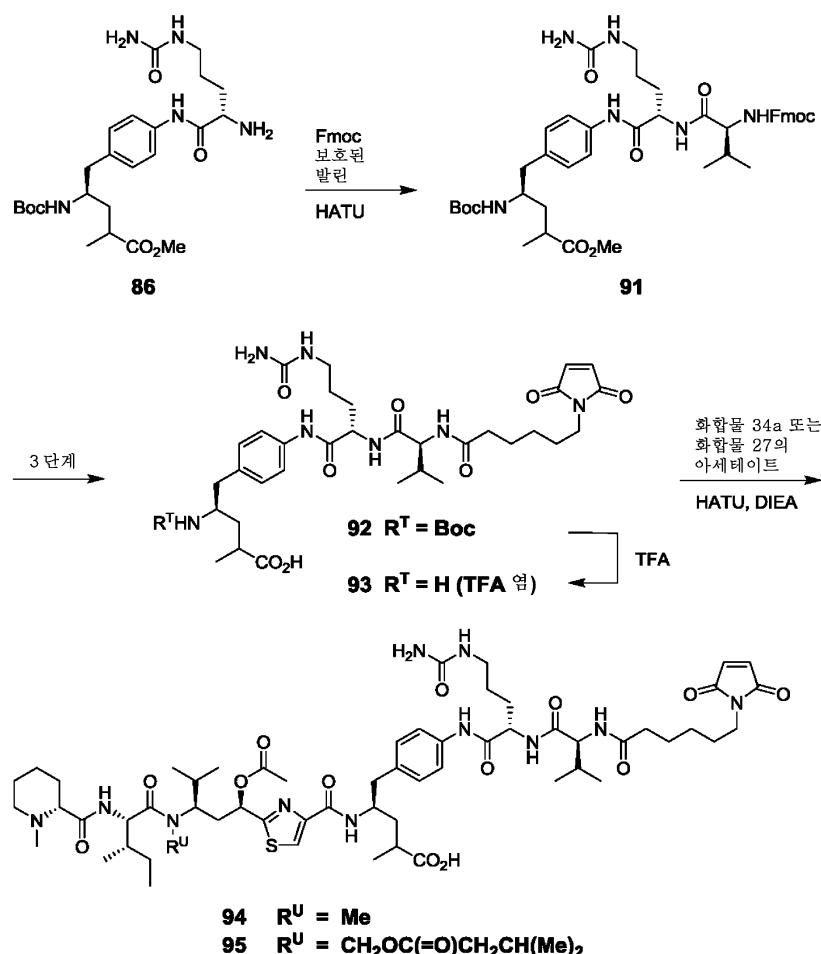
## 도면17

반응식 15



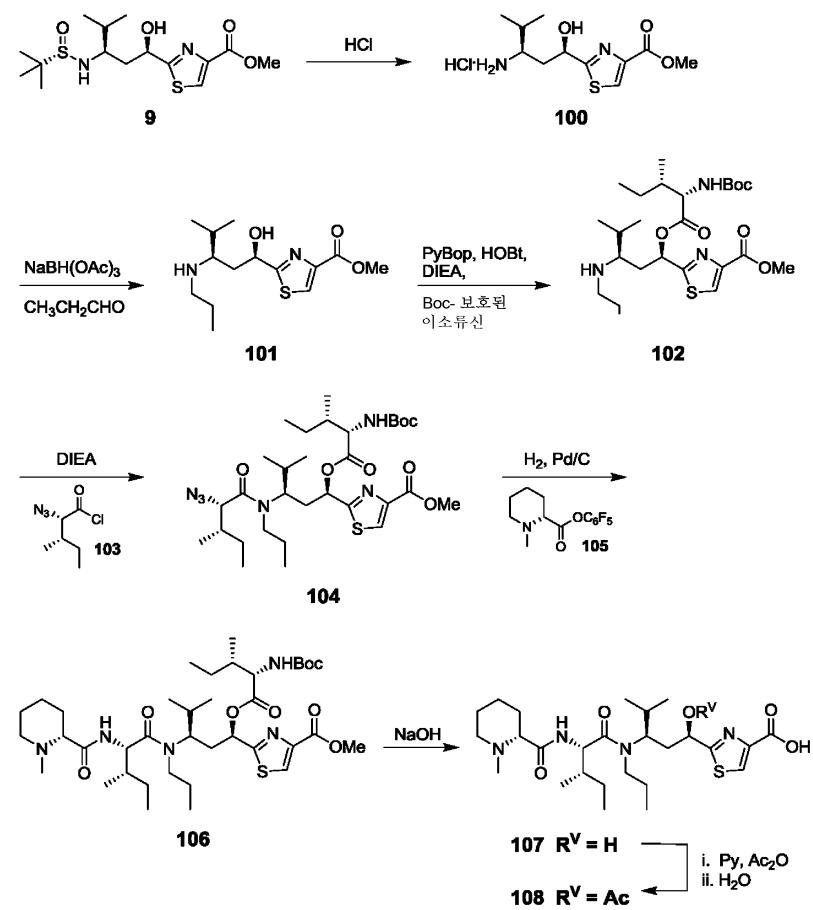
## 도면18

반응식 16



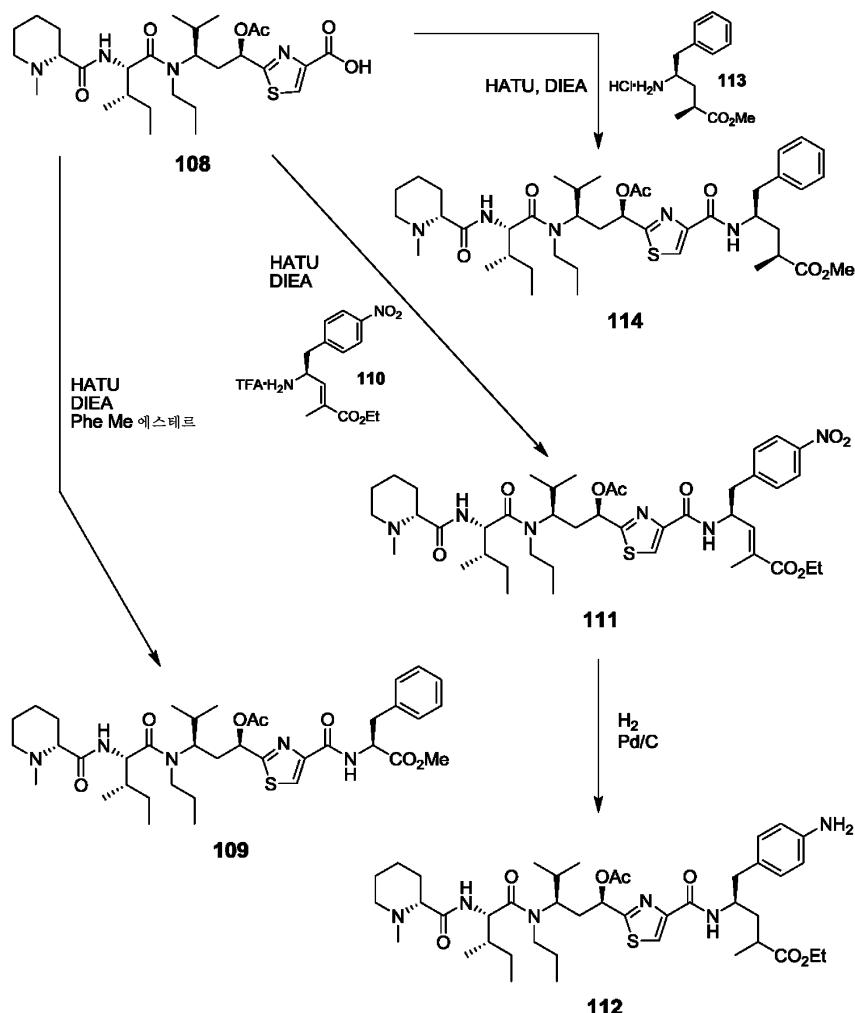
## 도면19

반응식 17



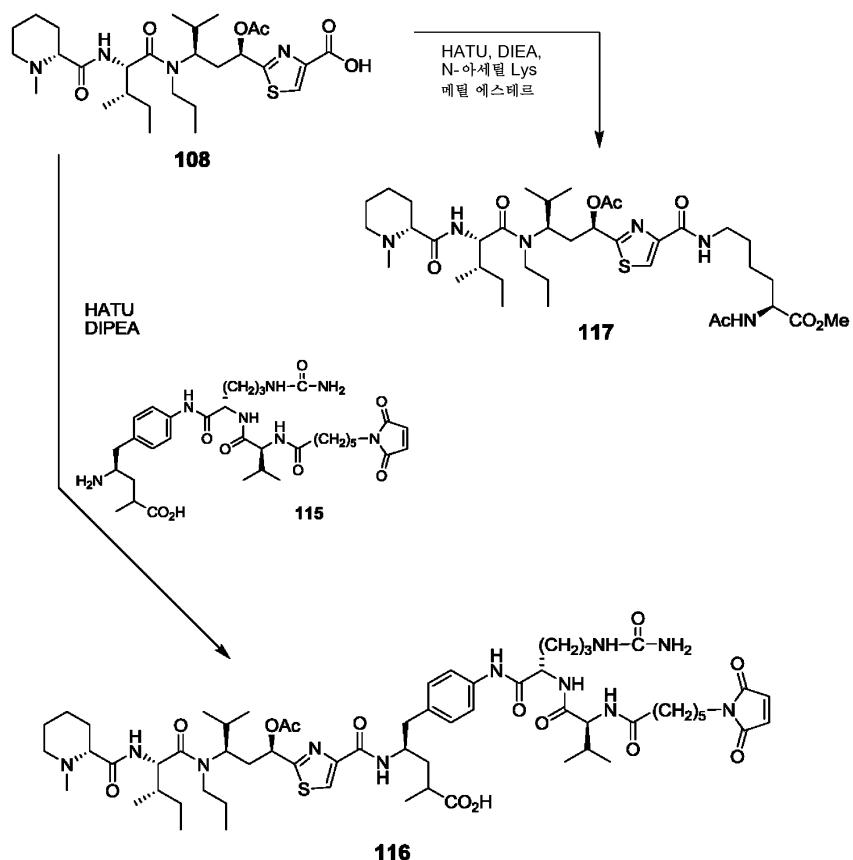
## 도면20a

반응식 18(파트 1/2)



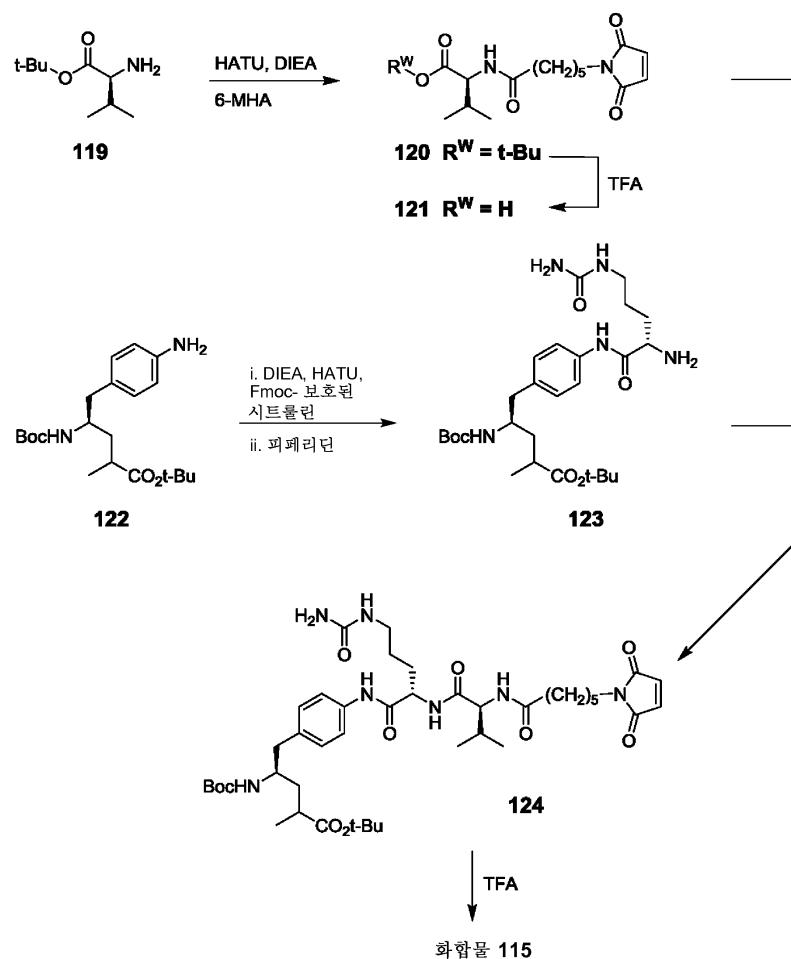
### 도면20b

### 반응식 18 (파트 2/2)



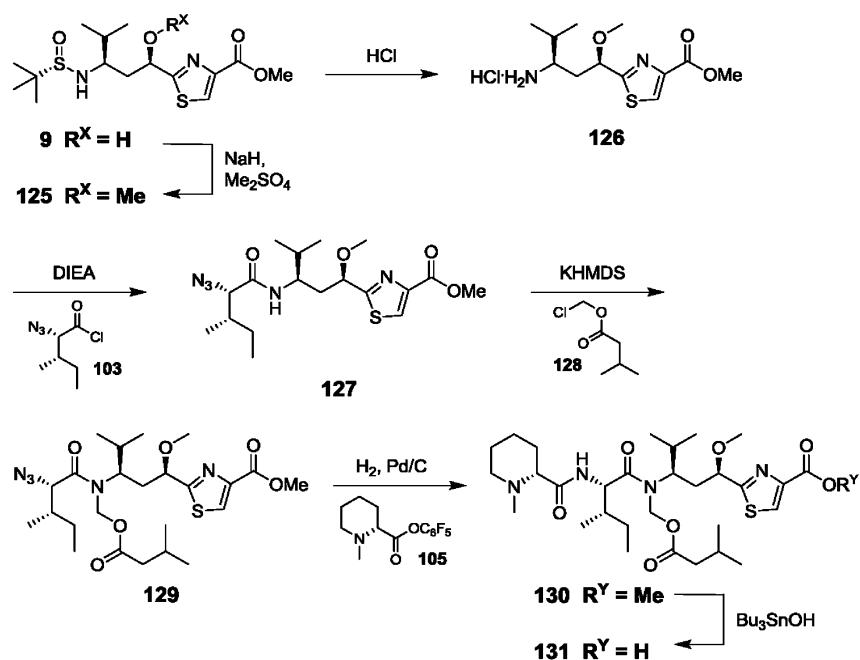
## 도면21

반응식 19



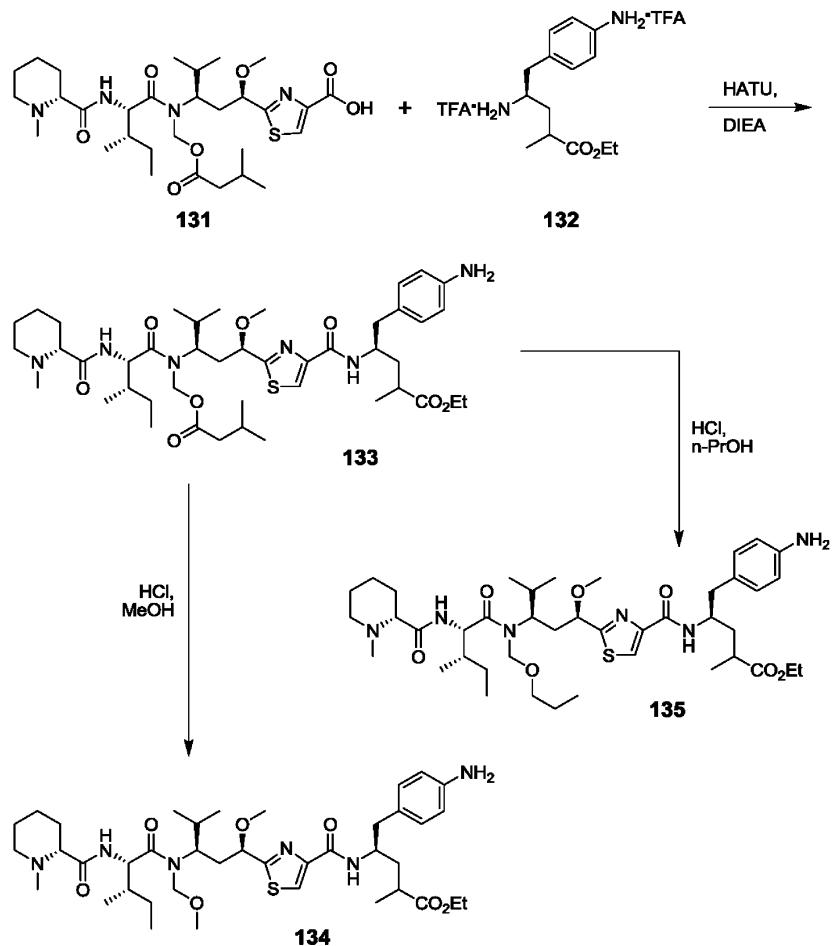
## 도면22

반응식 20



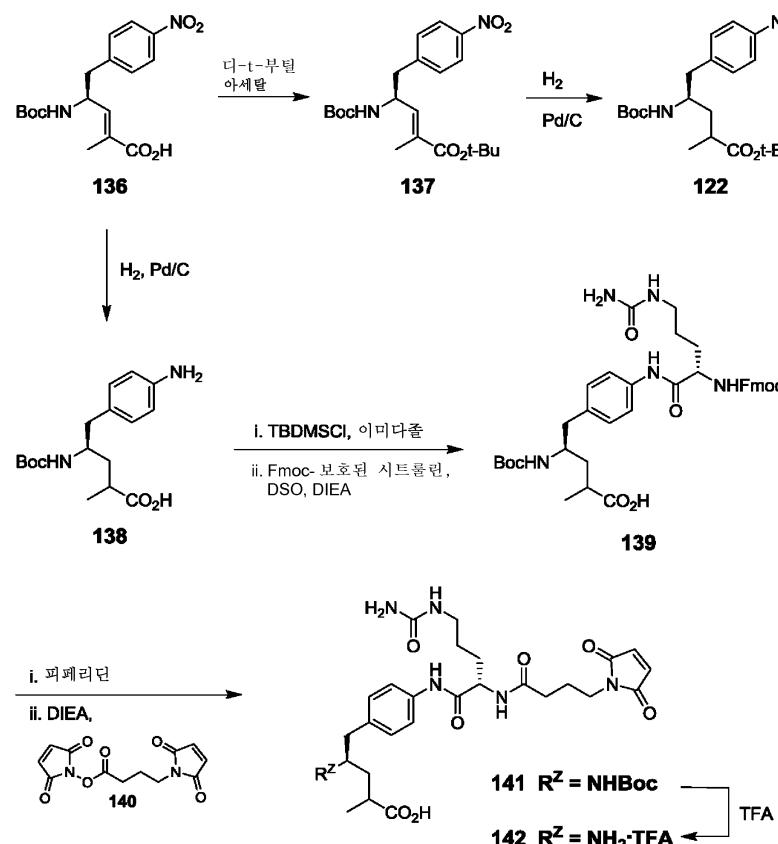
## 도면23

### 반응식 21



## 도면24

반응식 22



## 도면25

반응식 23

