



공개특허 10-2020-0095493



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2020-0095493
(43) 공개일자 2020년08월10일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

A61K 47/68 (2017.01) *A61P 1/00* (2006.01)
A61P 19/02 (2006.01) *A61P 29/00* (2006.01)
C07K 16/28 (2006.01)

(52) CPC특허분류

A61K 47/6849 (2017.08)
A61K 47/6803 (2017.08)

(21) 출원번호 10-2020-7017805

(22) 출원일자(국제) 2018년11월29일

심사청구일자 없음

(85) 번역문제출일자 2020년06월19일

(86) 국제출원번호 PCT/IB2018/059480

(87) 국제공개번호 WO 2019/106608

국제공개일자 2019년06월06일

(30) 우선권주장

62/593,807 2017년12월01일 미국(US)

62/595,045 2017년12월05일 미국(US)

(71) 출원인

애브비 인코포레이티드

미국 일리노이주 60064 놀스 시카고 놀스 워키건
로드 1

(72) 발명자

홉슨 아드리안 디.

미국 매사추세츠주 01545 슈루스버리 홀맨 스트리트 25

오 제이슨 제트.

미국 매사추세츠주 01545 슈루스버리 베벌리 헬드라이브 61

(뒷면에 계속)

(74) 대리인

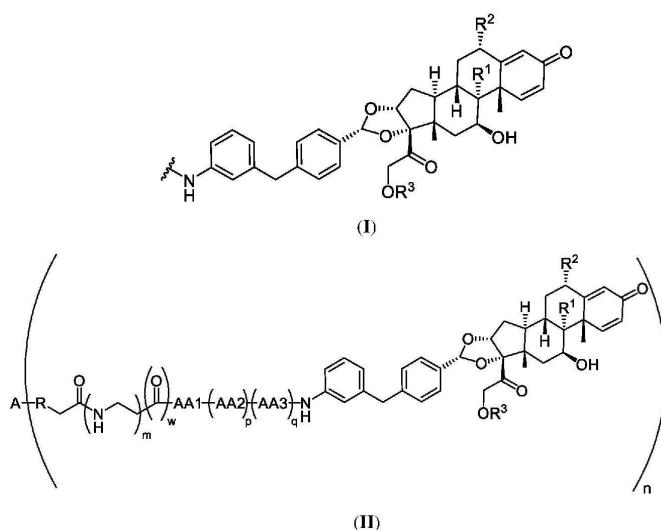
장훈

전체 청구항 수 : 총 37 항

(54) 발명의 명칭 항-CD40 항체 약물 공액체

(57) 요약

화학식 (I)의 라디칼을 포함하는 항-CD40 항체 약물 공액체가 제공되며, 상기 화학식 (I)에서, R¹, R² 및 R³은 본원에서 정의된 바와 같다. 나아가, 화학식 (II)의 항-CD40 항체 약물 공액체가 제공되며, 상기 화학식 (II)에서, Z, R, AA1, AA2, AA3, m, p, q, n, w, R¹, R² 및 R³은 본원에서 정의된 바와 같다. 나아가, 약제학적 조성물 및 이의 키트, 및 이를 사용하는 방법이 제공된다.

대 표 도

(52) CPC특허분류

A61P 1/00 (2018.01)
A61P 19/02 (2018.01)
A61P 29/00 (2018.01)
A61P 35/00 (2018.01)
C07K 16/2878 (2013.01)
C07K 2317/76 (2013.01)

(72) 발명자

맥퍼슨 마이클 제이.

미국 매사추세츠주 01431 애쉬비 필스버리 로드
287

웨겔 웬디

미국 매사추세츠주 01506 브룩필드 라이스 코너 로드
7

브라이언트 손 에이치.

미국 매사추세츠주 01603 우스터 마블 스트리트 30

허난데즈 악셀 주니어

미국 매사추세츠주 01507 찰턴 로리 레인 14

아일 클레어 엘.

미국 콜로라도주 80218 덴버 에이피티. 4 엔 에머
슨 스트리트 1050

마빈 크리스토퍼 시.

미국 일리노이주 60030 그레이슬레이크 브락스톤
웨이 242

평 올리비아 에이.

미국 캘리포니아주 94568 더블린 스트링엄 웨이
2836

산토라 링 시.

미국 매사추세츠주 01545 슈루스버리 토후 서클 7
왕 루

미국 매사추세츠주 01532 노쓰보로 스트라틴 웨이
14

왕 루

미국 매사추세츠주 01581 웨스트보로 님먹 드라이
브 12

명세서

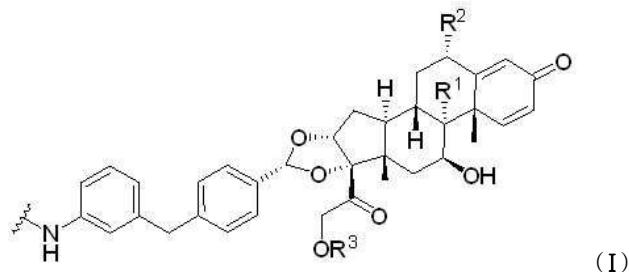
청구범위

청구항 1

항체 약물 공액체로서, 상기 항체 약물 공액체는:

(a) SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 11 및 SEQ ID NO: 12로 제시된 바와 같은 상보성 결정 영역(CDR)을 포함하는 항-CD40 항체; 및

(b) 화학식 (I)의 글루코코티코이드 수용체 효능제의 라디칼을 포함하고:



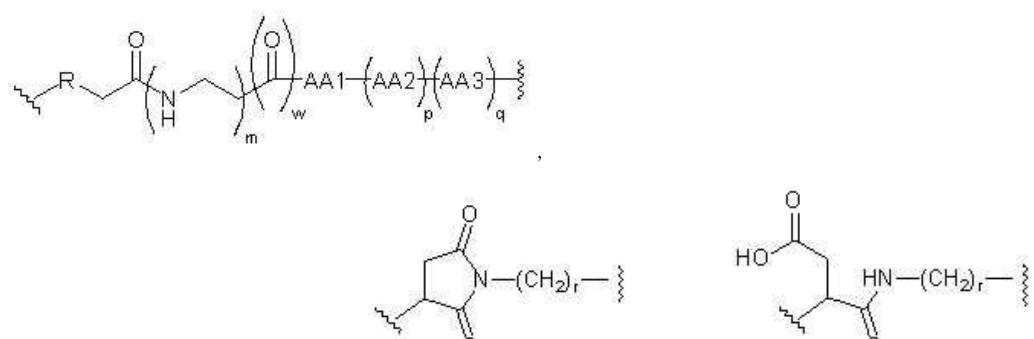
상기 화학식 (I)에서:

R¹은 수소 또는 플루오로이며;

R²는 수소 또는 플루오로이고;

R³는 수소 또는 -P(=O)(OH)₂이며;

나아가, 상기 항체는 하기 화학식으로 표시되는 링커를 통해 글루코코티코이드 수용체 효능제에 공액되고:



상기 화학식에서, R은 결합, 1이며; , 또는 0이고, r은 0 또는 1이며;

AA1, AA2 및 AA3은 독립적으로, 알라닌(Ala), 글리신(Gly), 이소류신(Ile), 류신(Leu), 프롤린(Pro), 발린(Val), 페닐알라닌(Phe), 트립토판(Trp), 티로신(Tyr), 아스파르트산(Asp), 글루탐산(Glu), 아르기닌(Arg), 히스티딘(His), 라이신(Lys), 세린(Ser), 트레오닌(Thr), 시스테인(Cys), 메티오닌(Met), 아스파라긴(Asn) 및 글루타민(Gln)으로 이루어진 군으로부터 선택되며;

m은 0 또는 1이며;

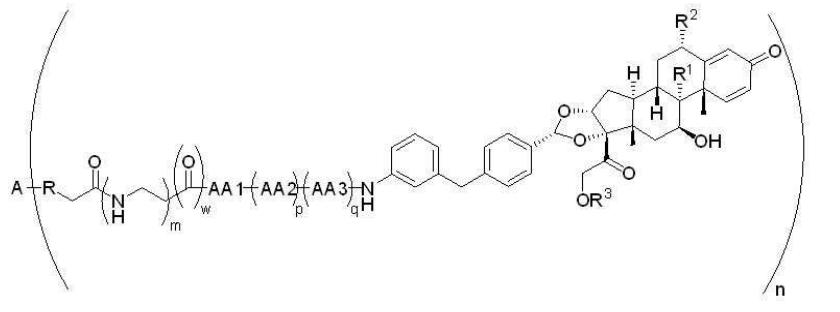
w는 0 또는 1이며;

p는 0 또는 1이고;

q는 0 또는 1인, 항체 약물 공액체.

청구항 2

제1항에 있어서, 화학식에 따른 것이며:



상기 화학식에서, A는 항-CD40 항체이고, n은 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 또는 10인, 항체 약물 공액체.

청구항 3

제1항 또는 제2항에 있어서, R¹은 수소이고 R²는 수소인, 항체 약물 공액체.

청구항 4

제1항 또는 제2항에 있어서, R¹은 플루오로이고 R²는 수소인, 항체 약물 공액체.

청구항 5

제1항 또는 제2항에 있어서, R¹은 플루오로이고 R²는 플루오로인, 항체 약물 공액체.

청구항 6

제1항 내지 제5항 중 어느 한 항에 있어서, R³은 -P(=O)(OH)₂인, 항체 약물 공액체.

청구항 7

제1항 내지 제5항 중 어느 한 항에 있어서, R³은 수소인, 항체 약물 공액체.

청구항 8

제1항 내지 제7항 중 어느 한 항에 있어서, -AA1-(AA2)_p-(AA3)_q-는 -Gly-Glu-; -Ala-Ala-; -Glu-Ala-Ala-; -Gly-Lys-; -Glu-; -Glu-Ser-Lys-; 및 -Gly-Ser-Lys-로 이루어진 군으로부터 선택되는, 항체 약물 공액체.

청구항 9

제8항에 있어서, -AA1-(AA2)_p-(AA3)_q-는 -Gly-Glu-; -Gly-Lys-; -Glu-Ser-Lys-; 및 -Gly-Ser-Lys-로 이루어진 군으로부터 선택되는, 항체 약물 공액체.

청구항 10

제9항에 있어서, -AA1-(AA2)_p-(AA3)_q-는 -Gly-Glu- 또는 -Gly-Lys-인, 항체 약물 공액체.

청구항 11

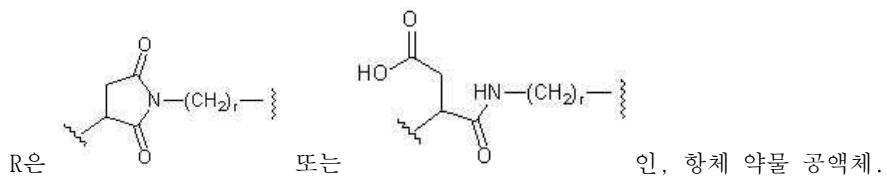
제9항에 있어서, -AA1-(AA2)_p-(AA3)_q-는 -Glu-Ser-Lys- 또는 -Gly-Ser-Lys인, 항체 약물 공액체.

청구항 12

제1항 내지 제11항 중 어느 한 항에 있어서,

m은 0이며;

q는 0이고;

**청구항 13**

제1항 내지 제11항 중 어느 한 항에 있어서,

m은 0 또는 1이며;

p는 1이고;

R은 결합인, 항체 약물 공액체.

청구항 14

제1항 내지 제8항 또는 제10항 중 어느 한 항에 있어서, R은 결합이며, p는 1이며, m은 0이며, w는 0이고, q는 0인, 항체 약물 공액체.

청구항 15

제1항 내지 제8항 또는 제11항 중 어느 한 항에 있어서, R은 결합이며, p는 1이며, m은 0이며, w는 0이고, q는 1인, 항체 약물 공액체.

청구항 16

제1항 내지 제11항 중 어느 한 항에 있어서, m은 1이며; w는 1이고; q는 0인, 항체 약물 공액체.

청구항 17

제1항 내지 제11항 중 어느 한 항에 있어서, m은 0인, 항체 약물 공액체.

청구항 18

제1항에 있어서, 표 5에 열거된 화합물로 이루어진 군으로부터 선택되고, 여기서, n은 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 또는 10인, 항체 약물 공액체.

청구항 19

제18항에 있어서, 실시예 4-공액, 실시예 28-공액 및 실시예 47-공액으로 이루어진 군으로부터 선택되는, 항체 약물 공액체.

청구항 20

제1항에 있어서, 표 6a에 열거된 화합물로 이루어진 군으로부터 선택되고, 여기서, n은 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 또는 10인, 항체 약물 공액체.

청구항 21

제20항에 있어서, 실시예 6-공액, 실시예 7-공액, 실시예 12-공액 및 실시예 13-공액으로 이루어진 군으로부터 선택되는, 항체 약물 공액체.

청구항 22

제1항에 있어서, 표 6b에 열거된 화합물로 이루어진 군으로부터 선택되고, 여기서, n은 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 또는 10인, 항체 약물 공액체.

청구항 23

제22항에 있어서, 실시예 6-가수분해, 실시예 7-가수분해, 실시예 12-가수분해 및 실시예 13-가수분해로 이루어

진 군으로부터 선택되는, 항체 약물 공액체.

청구항 24

제23항에 있어서, 실시예 12-가수분해 및 실시예 13-가수분해로 이루어진 군으로부터 선택되는, 항체 약물 공액체.

청구항 25

제1항 내지 제24항 중 어느 한 항에 있어서, n은 2, 4, 6 또는 8인, 항체 약물 공액체.

청구항 26

제25항에 있어서, n은 2인, 항체 약물 공액체.

청구항 27

제25항에 있어서, n은 4인, 항체 약물 공액체.

청구항 28

제1항에 있어서, n이 2인 실시예 47-공액인, 항체 약물 공액체.

청구항 29

제1항에 있어서, n이 4인 실시예 47-공액인, 항체 약물 공액체.

청구항 30

제1항에 있어서, n이 2인 실시예 28-공액인, 항체 약물 공액체.

청구항 31

제1항에 있어서, n이 4인 실시예 28-공액인, 항체 약물 공액체.

청구항 32

제1항 내지 제31항 중 어느 한 항에 있어서, 항체는 SEQ ID NO: 5로 제시된 바와 같은 중쇄 가변 영역 및 SEQ ID NO: 6으로 제시된 바와 같은 경쇄 가변 영역을 포함하는, 항체 약물 공액체.

청구항 33

제1항 내지 제31항 중 어느 한 항에 있어서, 항체는 SEQ ID NO: 3으로 제시된 바와 같은 중쇄 가변 영역을 포함하는, 항체 약물 공액체.

청구항 34

제1항 내지 제31항 중 어느 한 항에 있어서, 항체는 SEQ ID NO: 4로 제시된 경쇄를 포함하는, 항체 약물 공액체.

청구항 35

제1항 내지 제31항 중 어느 한 항에 있어서, 항체는 SEQ ID NO: 3으로 제시된 중쇄 및 SEQ ID NO: 4로 제시된 경쇄를 포함하는, 항체 약물 공액체.

청구항 36

제1항 내지 제35항 중 어느 한 항의 항체 약물 공액체 및 약제학적으로 허용 가능한 담체를 포함하는 약제학적 조성물.

청구항 37

염증성 장 질환(IBD), 전신 홍반성 루푸스(SLE), 다발성 경화증, 류마티스 관절염, 쇼그伦 증후군 및 화농성 한

선염(HS; Hidradenitis suppurativa)으로 이루어진 군으로부터 선택되는 질병을 이러한 치료를 필요로 하는 대상체에서 치료하는 방법으로서, 상기 방법은 유효량의 제1항 내지 제35항 중 어느 한 항의 항체 약물 공액체 또는 제36항의 약제학적 조성물을 상기 대상체에게 투여하는 단계를 포함하는 방법.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 관련 출원

본 출원은 2017년 12월 1일에 출원된 미국 가출원 62/593,807호, 및 2017년 12월 5일에 출원된 미국 가출원 62/595,045호에 대해 우선권을 주장하며, 이들의 전체 내용은 참조에 의해 본 명세서에 포함된다.

[0003] 서열 목록

본 출원은 ASCII 포맷으로 전자적으로 제출되었으며 그 전문이 참조에 의해 본 명세서에 포함되는 서열 목록을 포함한다. 2018년 11월 29일에 생성된 상기 ASCII 카피는 A103017_1480WO_SL.txt로 명명되고, 13,520 바이트 크기이다.

배경 기술

[0005] CD40은 광범위한 조혈모 세포(림프구, 단핵구, 수지상 세포) 및 비-조혈모 세포(상피, 내피, 섬유아세포) 유형 상에서 발현되는 48 kDa 유형 I 막관통 단백질(문헌[van Kooten, J Leukoc Biol. 2000 Jan; 67(1):2-17])이다. CD40은 B 세포 발달, 림프구 활성화, 및 항원 제시 세포(APC) 기능에서 중요한 역할을 하는 종양因子 인자(TNF) 수용체 계통(family) 구성원이다.

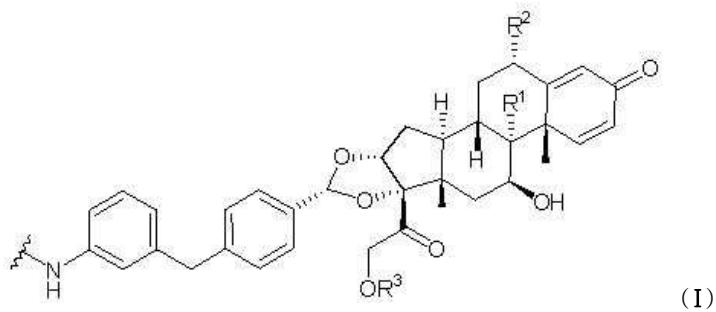
[0006] CD40/CD40L 신호전달 경로는 전신 홍반성 루푸스(SLE), 염증성 장 질환(IBD), 다발성 경화증, 류마티스 관절염 및 쇼그伦 증후군을 포함한 많은 자가면역 질환의 발병기전(pathogenesis)에 관여해 왔다(문헌[Law and Grewal, Adv Exp Med Biol. 2009;647:8-36]). CD40 발현은 신장, 장(intestine) 및 관절을 포함하는 만성 자가면역력에 의해 손상된 조직에서 대식세포, 내피, 상피 및 B 세포 상에서 상승된다(문헌[Borcherding, Am J Pathol. 2010 Apr;176(4):1816-27; Sawada-Hase, Am J Gastroenterol. 2000 Jun;95(6):1516-23]). 가용성 CD40L은 SLE, IBD, 및 쇼그伦 증후군을 앓고 있는 대상체에서 이들 대상체에서의 염증 부담(inflammatory burden)과 일관되어 상승된다.

[0007] 만성 장 염증에서 CD40/CD40L 경로에 대한 가장 초기의 증거 중 일부는, 항-CD40L mAb가 실험 결장염(experimental colitis)으로부터 설치류를 보호했다는 전임상 모델로부터 나왔다(문헌[de Jong, Gastroenterology. 2000 Sep;119(3):715-23; Liu, J Immunol. 2000 Jun 1;164(11):6005-14; Stuber, J Exp Med 1996 Feb 1, 183(2):693-8]). 질환 활성 점수의 감소는 소화관(gut)에서 감소된 전-염증성(pro-inflammatory) 사이토카인 생성 및 만성 체중 손실로부터의 보호와 연관이 있었다. 유사한 결과는 CD40 또는 CD40L에 대해 유전적으로 결핍된 동물에서 관찰되었다(문헌[de Jong, Gastroenterology. 2000 Sep;119(3):715-23]). 질환 발병 후 항-CD40L mAb를 이용한 마우스의 치료는 질환 활성을 감소시키는 데 있어서 여전히 효과적이며, 이는 이 경로가 만성 염증성 질환의 유지에 결정적임을 시사한다. 또한, CD40 효능제 항체는 림프구가 결여된 마우스에서 장 염증을 유도(drive)하는 데 충분하다(문헌[Uhlig, Immunity. 2006 Aug;25(2):309-18]). CD40 siRNA를 사용한 보다 최근의 데이터는 또한, 결장염에서 CD40 신호전달에 대한 중요한 역할을 암시한다(문헌[Arranz, J Control Release. 2013 Feb 10;165(3):163-72]). 크론 질환에서, 고유판(lamina propria) 단핵구 및 상피는 높은 수준의 CD40을 발현하고, CD40+ 단핵구는 말초 혈액에서 농화된다. 더욱이, CD40 좌(locus)에서의 다형성(polymorphism)은 IBD에 대한 증가된 취약성과 연관이 있어 왔다. 항-TNF 항체로 치료되는 크론(Crohn's) 대상체에서 전사 프로파일링은, 적절한 약물 치료 반응을 갖는 대상체에서는 CD40 mRNA 수준이 저하됨을 나타낸다. 그러나, TNF 저해제에 대해 불량한 반응을 갖는 대상체에서는 CD40 mRNA 수준이 변하지 않으며, 이는 CD40-의존적, TNF-독립적 경로가 이들 대상체에서 염증을 촉진할 수 있음을 시사한다. 연구는, CD40 매개 신호전달의 저해가 IBD뿐만 아니라 다른 자가면역 질환의 발병에 중요함을 시사한다.

[0008] 그러나, 다양한 염증성 및 자가면역 질병의 치료에 유용한 새로운 CD40 길항제에 대한 필요성이 계속해서 남아 있다.

발명의 내용

[0009] 일 양태에서, 본 개시내용은 항체 약물 공액체를 제공하며, 상기 항체 약물 공액체는: (a) SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 11 및 SEQ ID NO: 12로 제시된 바와 같은 상보성 결정 영역(CDR)을 포함하는 항-CD40 항체; 및 (b) 화학식 (I)의 글루코코티코이드 수용체 효능제의 라디칼을 포함하고:



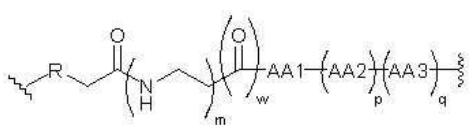
[0010] 상기 화학식 (I)에서:

[0012] R¹은 수소 또는 플루오로이며;

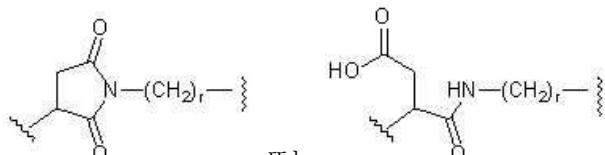
[0013] R²는 수소 또는 플루오로이고;

[0014] R³는 수소 또는 -P(=O)(OH)₂이며;

[0015] 나아가, 상기 항체는 하기 화학식으로 표시되는 링커를 통해 글루코코티코이드 수용체 효능제에 공액되고:



[0016] 상기 화학식에서, R은 결합,



또는

이고, r은 0 또는 1이며;

[0018] AA1, AA2 및 AA3은 독립적으로, 알라닌(Ala), 글리신(Gly), 이소류신(Ile), 류신(Leu), 프롤린(Pro), 발린(Val), 페닐알라닌(Phe), 트립토판(Trp), 티로신(Tyr), 아스파르트산(Asp), 글루탐산(Glu), 아르기닌(Arg), 히스티딘(His), 라이신(Lys), 세린(Ser), 트레오닌(Thr), 시스테인(Cys), 메티오닌(Met), 아스파라진(Asn) 및 글루타민(Gln)으로 이루어진 군으로부터 선택되며;

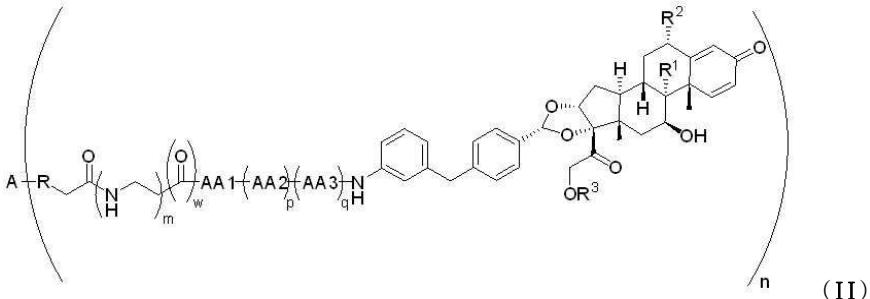
[0019] m은 0 또는 1이며;

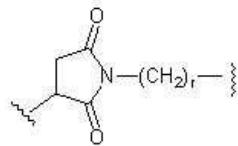
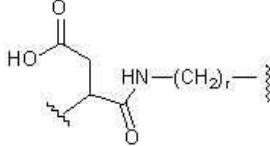
[0020] w는 0 또는 1이며;

[0021] p는 0 또는 1이고;

[0022] q는 0 또는 1이다.

[0023] 또 다른 구현예에서, 본 개시내용은 화학식 (II)에 따른 항체 약물 공액체를 제공하고:



- [0025] 상기 화학식 (II)에서, A는 항-CD40 항체이고, n은 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 또는 10이다.
- [0026] 소정의 구현예에서, n은 2, 4, 6 또는 8이다. 소정의 구현예에서, n은 2이다. 소정의 구현예에서, n은 4이다.
- [0027] 일 구현예에서, 본 개시내용은 임의의 선행 구현예에 따른 항체 약물 공액체를 제공하며, 여기서, R¹은 수소이고 R²는 수소이다. 일 구현예에서, 본 개시내용은 임의의 선행 구현예에 따른 항체 약물 공액체를 제공하며, 여기서, R¹은 플루오로이고 R²는 수소이다. 일 구현예에서, 본 개시내용은 임의의 선행 구현예에 따른 항체 약물 공액체를 제공하며, 여기서, R¹은 플루오로이고 R²는 플루오로이다. 일 구현예에서, 본 개시내용은 항체 약물 공액체를 제공하며, 여기서, R³은 -P(=O)(OH)₂이다. 또 다른 구현예에서, 본 개시내용은 항체 약물 공액체를 제공하며, 여기서, R³는 수소이다.
- [0028] 일 구현예에서, 본 개시내용은 임의의 선행 구현예에 따른 항체 약물 공액체를 제공하며, 여기서, -AA1-(AA2)_p-(AA3)_q는 -Gly-Glu-; -Ala-Ala-; -Glu-Ala-Ala-; -Gly-Lys-; -Glu-; -Glu-Ser-Lys-; 및 -Gly-Ser-Lys-로 이루어진 군으로부터 선택된다. 소정의 구현예에서, AA1-(AA2)_p-(AA3)_q는 -Gly-Glu-; -Gly-Lys-; -Glu-Ser-Lys-; 및 -Gly-Ser-Lys-로 이루어진 군으로부터 선택된다. 소정의 구현예에서, AA1-(AA2)_p-(AA3)_q는 -Gly-Glu- 또는 -Gly-Lys-이다. 소정의 구현예에서, AA1-(AA2)_p-(AA3)_q는 -Glu-Ser-Lys- 또는 -Gly-Ser-Lys-이다.
- [0029] 일 구현예에서, 본 개시내용은 임의의 선행 구현예에 따른 항체 약물 공액체를 제공하며, 여기서, m은 0이며; q는 0이고;
- R은  또는 
- [0030] 일 구현예에서, 본 개시내용은 임의의 선행 구현예에 따른 항체 약물 공액체를 제공하며, 여기서, m은 0 또는 1이며; p는 1이고; R은 결합이다.
- [0031] 일 구현예에서, 본 개시내용은 임의의 선행 구현예에 따른 항체 약물 공액체를 제공하며, 여기서, m은 0 또는 1이며; w는 1이고; R은 결합이다.
- [0032] 일 구현예에서, 본 개시내용은 임의의 선행 구현예에 따른 항체 약물 공액체를 제공하며, 여기서, m은 1이며; w는 1이고; q는 0이다.
- [0033] 일 구현예에서, 본 개시내용은 임의의 선행 구현예에 따른 항체 약물 공액체를 제공하며, 여기서, m은 0이다.
- [0034] 소정의 구현예에서, 본 개시내용은 임의의 선행 구현예에 따른 항체 약물 공액체를 제공하며, 여기서, R은 결합이며, p는 1이며, m은 0이며, w는 0이고, q는 0이다. 소정의 구현예에서, 본 개시내용은 임의의 선행 구현예에 따른 항체 약물 공액체를 제공하며, 여기서, R은 결합이며, p는 1이며, m은 0이며, w는 0이고, q는 1이다.
- [0035] 일 구현예에서, 본 개시내용은 표 5에 열거된 화합물로 이루어진 군으로부터 선택되는 임의의 선행 구현예에 따른 항체 약물 공액체를 제공하며, 여기서, n은 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 또는 10이다. 소정의 구현예에서, n은 2, 4, 6 또는 8이다. 소정의 구현예에서, n은 2이다. 소정의 구현예에서, n은 4이다.
- [0036] 일 구현예에서, 본 개시내용은 실시예 4-공액, 실시예 28-공액, 및 실시예 47-공액으로 이루어진 군으로부터 선택되는 임의의 선행 구현예에 따른 항체 약물 공액체를 제공한다. 소정의 구현예에서, 본 개시내용은 임의의 선행 구현예에 따른 항체 약물 공액체를 제공하며, 여기서, 항체 약물 공액체는 실시예 47-공액된 것이고, n은 2이다. 소정의 구현예에서, 본 개시내용은 임의의 선행 구현예에 따른 항체 약물 공액체를 제공하며, 여기서, 항체 약물 공액체는 실시예 47-공액된 것이고, n은 4이다. 소정의 구현예에서, 본 개시내용은 임의의 선행 구현예에 따른 항체 약물 공액체를 제공하며, 여기서, 항체 약물 공액체는 실시예 28-공액된 것이고, n은 2이다. 소정의 구현예에서, 본 개시내용은 임의의 선행 구현예에 따른 항체 약물 공액체를 제공하며, 여기서, 항체 약물 공액체는 실시예 28-공액된 것이고, n은 4이다.
- [0037] 일 구현예에서, 본 개시내용은 표 6a 또는 6b에 열거된 화합물로 이루어진 군으로부터 선택되는 임의의 선행 구현예에 따른 항체 약물 공액체를 제공하며, 여기서, n은 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 또는 10이다. 소정의 구현예에서, n은 2, 4, 6 또는 8이다. 소정의 구현예에서, n은 2이다. 소정의 구현예에서, n은 4이다.

- [0038] 일 구현예에서, 본 개시내용은 실시예 6-공액, 실시예 6-가수분해, 실시예 7-공액, 실시예 7-가수분해, 실시예 12-공액, 실시예 12-가수분해, 실시예 13-공액, 및 실시예 13-가수분해로 이루어진 군으로부터 선택되는 임의의 선행 구현예에 따른 항체 약물 공액체를 제공한다.
- [0039] 일 구현예에서, 본 개시내용은 실시예 12-가수분해, 실시예 13-가수분해로 이루어진 군으로부터 선택되는 임의의 선행 구현예에 따른 항체 약물 공액체를 제공한다.
- [0040] 소정의 구현예에서, 항체 약물 공액체의 항체는 SEQ ID NO: 5로 제시된 중쇄 가변 영역 및 SEQ ID NO: 6으로 제시된 경쇄 가변 영역을 포함한다.
- [0041] 소정의 구현예에서, 항체 약물 공액체의 항체는 SEQ ID NO: 3으로 제시된 중쇄를 포함한다. 소정의 구현예에서, 항체 약물 공액체의 항체는 SEQ ID NO: 4로 제시된 경쇄를 포함한다. 소정의 구현예에서, 항체 약물 공액체의 항체는 SEQ ID NO: 3으로 제시된 중쇄 및 SEQ ID NO: 4로 제시된 경쇄를 포함한다.
- [0042] 일 구현예에서, 본 개시내용은 임의의 선행 구현예에 따른 항체 약물 공액체 및 약제학적으로 허용 가능한 담체를 포함하는 약제학적 조성물을 제공한다.
- [0043] 일 구현예에서, 본 개시내용은 염증성 장 질환(IBD), 전신 홍반성 루푸스(SLE), 다발성 경화증, 류마티스 관절염, 쇼그렌 증후군 및 화농성 한선염(HS; Hidradenitis suppurativa)으로 이루어진 군으로부터 선택되는 질병을 이러한 치료를 필요로 하는 대상체에서 치료하는 방법을 제공하며, 상기 방법은 유효량의 임의의 선행 구현예에 따른 항체 약물 공액체 또는 임의의 선행 구현예에 따른 약제학적 조성물을 상기 대상체에게 투여하는 단계를 포함한다.
- [0044] 일 구현예에서, 본 개시내용은 키트를 제공하며, 상기 키트는 (a) 임의의 선행 구현예에 따른 항체 약물 공액체 또는 임의의 선행 구현예에 따른 약제학적 조성물을 포함하는 용기; 및 (b) 하나 이상의 용기 상의 또는 이와 연관된 표지 또는 패키지 인서트를 포함하고, 상기 표지 또는 패키지 인서트는, 항체 약물 공액체 또는 약제학적 조성물이 염증성 장 질환(IBD), 전신 홍반성 루푸스(SLE), 다발성 경화증, 류마티스 관절염, 쇼그렌 증후군 및 화농성 한선염(HS)으로 이루어진 군으로부터 선택되는 질병을 치료하는 데 사용됨을 나타낸다.
- [0045] 임의의 상기 구현예에서, IBD는 궤양성 결장염(UC) 또는 크론 질환이다.
- [0046] 일 구현예에서, 본 개시내용은 글루코코티코이드 수용체 효능제를 CD40-발현 세포에 전달하는 방법을 제공하며, 상기 방법은 상기 세포를 임의의 선행 구현예에 따른 항체 약물 공액체와 접촉시키는 단계를 포함한다.
- [0047] 일 구현예에서, 본 개시내용은 항체 약물 공액체의 항-염증성 활성을 결정하는 방법을 제공하며, 상기 방법은: (a) CD40-발현 세포를 임의의 선행 구현예에 따른 항체 약물 공액체와 접촉시키는 단계; 및 (b) 대조군 세포와 비교하여 세포로부터의 전-염증성 사이토카인의 감소된 방출을 결정하는 단계를 포함한다.

도면의 간단한 설명

- [0048] 도 1a는 실시예 4-공액(인간)(n = 4)의 ADC 실시예 2에 제공된 바와 같은 디콘볼루션된(deconvoluted) 질량 분광법 데이터를 도시한다. 25140.73 피크는 하나의 약물 링커 문자가 공액된 경쇄(SEQ ID NO: 4)에 상응한다. 50917.59 피크는 하나의 약물 링커 문자가 공액된 중쇄(SEQ ID NO: 3)에 상응한다.
- 도 1b는 실시예 28-공액(인간)(n = 2)의 ADC 실시예 2에 제공된 바와 같은 음이온 교환 크로마토그래피(AEC) 데이터를 도시하며, 이때 채류 시간은 약 7.5분이다.
- 도 1c는 실시예 4-공액(인간)(n = 2)의 ADC 실시예 2에 제공된 바와 같은 디콘볼루션된 질량 분광법 데이터를 도시한다. 25176.72 피크는 하나의 약물 링커 문자가 공액된 경쇄(SEQ ID NO: 2)에 상응한다. 50954.63 피크는 하나의 약물 링커 문자가 공액된 중쇄(SEQ ID NO: 1)에 상응한다.
- 도 1d는 실시예 28-공액(인간)(n = 4)의 ADC 실시예 2에 제공된 바와 같은 음이온 교환 크로마토그래피(AEC) 데이터를 도시하며, 이때 채류 시간은 약 13분이다.
- 도 1e는 실시예 4-공액(인간)(n = 4)의 ADC 실시예 2에 제공된 바와 같은 디콘볼루션된 질량 분광법 데이터를 도시한다. 25176.88 피크는 하나의 약물 링커 문자가 공액된 경쇄(SEQ ID NO: 2)에 상응한다. 50954.80 피크는 하나의 약물 링커 문자가 공액된 중쇄(SEQ ID NO: 1)에 상응한다.
- 도 2는 실시예 C에 기술된 바와 같은 LPS 및 CD40L-자극된 인간 MoDC 검정법에서 항-인간 CD40 ADC의 시험관내 활성을 도시한다. 도 2에서 데이터는, 시험된 2 가지의 ADC 화합물 중 어느 것에 의한 면역 세포 활성화를 저해

하는 최대 능력이 부모 길항체 항체에 의해 제공되는 저해를 초과함을 실증한다.

도 3은 실시예 D에 기술된 바와 같은 LPS 및 CD40L-자극된 뮤린 BMDC 검정법에서 항-인간 CD40 ADC의 시험관내 활성을 도시한다. 도 3에 도시된 결과는, 실시예 6-가수분해(마우스)에 의한 면역 세포 활성화를 저해하는 최대 능력이 부모 길항체 항체에 의해 제공되는 저해를 초과함을 실증한다.

도 4는 실시예 E에 기술된 바와 같이 LPS-유도 급성 염증에서 실시예 6-가수분해(마우스)(n = 4)의 생체내 활성을 도시한다. 도 4에 도시된 결과는, CD40 ADC가 부모 길항체 항체 또는 아이소타입 ADC보다 생체내에서 DC 활성화를 억제시키는 데 있어서 더 큰 효력을 나타냄을 실증한다.

도 5a는 DTH 반응에서 항-마우스 CD40 ADC(실시예 12-가수분해(마우스))의 생체내 활성을 도시하고, **도 5b**는 실시예 F에 기술된 바와 같이 DTH 반응에서 항-마우스 CD40 ADC(실시예 28-공액(마우스))의 생체내 활성을 도시한다. 도 5a 및 도 5b의 데이터는, 부모 길항체 항체 또는 비-표적화된 ADC 단독보다 생체내에서 T-세포 매개 염증을 더 강력하게 저해하는 CD40 ADC의 증강된 효력을 실증한다.

도 6은 실시예 H에 기술된 바와 같이, 마우스 콜라겐 유도 관절염(CIA)에서 항-마우스 CD40 ADC의 생체내 활성을 도시한다. 도 6의 데이터는, 단일 용량의 항-마우스 CD40 스테로이드 ADC가 대조군 1 및 2와 비교하여 약 6 주 동안 발 부기(paw swelling)의 개선을 통해 연장된 작용 기간을 나타낼 수 있음을 실증한다.

정의

본원에 사용된 바와 같이, 용어 "인간 CD40" 및 "인간 CD40 야생형"(본원에서 hCD40, hCD40wt로서 축약됨)은 유형 I 막관통 단백질을 지칭한다. 일 구현예에서, 용어 인간 CD40은 표준 재조합 발현 방법에 의해 제조될 수 있는 재조합 인간 CD40(rhCD40)을 포함하고자 한다. 표 1은 아미노산 인간 CD40의 서열(즉, SEQ ID NO: 1), 및 이의 세포외 도메인(즉, SEQ ID NO: 2)을 제공한다.

표 1. 인간 CD40 의 서열	
단백질	서열
인간 CD40	MVRPLQCVLWGCLLTAVHPEPPTACREKQYLI NSQCCSLCOPGQKLVS DCTEFTECLPCGESEFLDTWNRETHCHQHKYCDPNLGLRVQQKG TSETDTIC TCEEGWHCTSEACESCVLHRSCSPFGVKQIATGVSDTICEPCPVGF FNSS AFEKCHPWTSCETKDLVVQQAGTNKT D VV CGPQDRLRALVVIPIIFGILFAIL LVLVF IKKVAKKPTNKA PHPKQEPQEINF PDDLPGSNTAAPVQETLHGCQPV TQEDGKESRISVQERQ (SEQ ID NO:1)
인간 CD40 세포외 도메인	EPPTACREKQYLI NSQCCSLCOPGQKLVS DCTEFTECLPCGESEFLDTWNR ETHCHQHKYCDPNLGLRVQQKG TSETDTIC TCEEGWHCTSEACESCV (SEQ ID NO:2)

본원에 사용된 바와 같이, 용어 "항체"는 4개의 폴리펩타이드 사슬, 이황화 결합에 의해 상호-연결된 2개의 중쇄(H) 및 2개의 경쇄(L)로 이루어진 면역글로불린 분자를 지칭하고자 한다. 각각의 중쇄는 중쇄 가변 영역(본원에서 HCVR 또는 VH로 축약됨) 및 중쇄 불변 영역으로 이루어진다. 중쇄 불변 영역은 3개의 도메인, CH1, CH2 및 CH3로 이루어진다. 각각의 경쇄는 경쇄 가변 영역(본원에서 LCVR 또는 VL로 축약됨) 및 경쇄 불변 영역으로 이루어진다. 경쇄 불변 영역은 하나의 도메인, CL로 이루어진다. VH 및 VL 영역은, 프레임워크 영역(FR)이라고 하는 더 보존된 영역이 개재되는(interspersed) 상보성 결정 영역(CDR)이라고 하는 초가변성 영역으로 추가로 세분될 수 있다. 각각의 VH 및 VL은 아미노-말단으로부터 카르복시-말단까지 하기의 순서로 배열되는 3개의 CDR 및 4개의 FR로 이루어진다: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, FR4.

본원에 사용된 바와 같이, 용어 항체의 "항원-결합 부분"(또는 단순히 "항체 부분")은 항원(예를 들어, TNF α)에 특이적으로 결합하는 능력을 보유하는 항체의 하나 이상의 단편을 지칭한다. 항체의 항원-결합 기능은 전장 항체의 단편에 의해 수행될 수 있는 것으로 나타났다. 항체의 용어 "항원-결합 부위" 내에 포함되는 결합 단편의 예는 (i) Fab 단편으로서, VL, VH, CL 및 CH1 도메인으로 구성된 1가 단편; (ii) F(ab')₂ 단편으로서, 힌지(hinge) 영역에서 이황화 가교에 의해 연결된 2개의 Fab 단편을 포함하는 2가 단편; (iii) VH 및 CH1 도메인으로 구성된 Fd 단편; (iv) 항체의 단일 아암(arm)의 VL 및 VH 도메인으로 구성된 Fv 단편, (v) VH 도메인으로 구성된 dAb 단편(문헌[Ward et al., (1989) Nature 341:544-546]]; 및 (vi) 단리된 상보성 결정 영역(CDR)을 포함한다. 더욱이, Fv 단편의 2개의 도메인, VL 및 VH가 별개의 유전자에 의해 코딩되더라도, 이들 도메인은 이들을, VL 및 VH 영역이 짹을 이루어 1가 분자를 형성하는 단일 단백질 사슬(단일 사슬 Fv(scFv)로서 알려져 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)로서 제조할 수 있는 합성 링커에 의해 재조합 방법을 사용하여 접합될 수 있다. 이러한 단일 사슬 항체는 또한, 항체의 용어 "항원-결합 부위" 내에 포괄되고자 한다. 다른 형태의 단일 사슬 항체, 예컨대 디아바이(diabody) 또한, 포괄된다. 디아바디는, VH 및 VL 도메인이 단일 폴리펩타이드 사슬 상에서 발현되지만, 동일한 사슬 상의 2개의 도메인 사이에서 짹형성을 가능하게 하기에는 너무 짧은 링커를 사용함으로써, 도메인이 다른 사슬의 상보적 도메인과 짹을 형성하게 강제하고 2개의 항원 결합 부위를 생성하는 2가, 이 중특이적 항체이다(예를 들어, 문헌[Holliger, P., et al. (1993) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:6444-6448; Poljak, R. J., et al. (1994) Structure 2:1121-1123] 참조).

항체의 "가변 영역"은 항체 경쇄의 가변 영역 또는 항체 중쇄의 가변 영역을 단독으로 또는 조합하여 지칭한다. 중쇄 및 경쇄의 가변 영역은 각각, 4개의 프레임워크 영역(FR), 및 초가변 영역으로 알려지기도 한 3개의 상보성 결정 영역(CDR)을 가진다. CDR은 항체의 항원-결합 부위의 형성에 기여한다. CDR을 결정하기 위한 적어도 2 가지 기법이 존재한다: (1) 종간(cross-species) 서열 가변성에 기초한 접근법(예를 들어, 문헌[Kabat et al. Sequences of Proteins of Immunological Interest, (5th ed., 1991, National Institutes of Health, Bethesda Md.)]); 및 (2) 항원-항체 복합체의 결정학적 연구에 기초한 접근법(문헌[Al-lazikani et al (1997) *J. Molec. Biol.* 273:927-948]). 또한, 이들 2 가지 접근법의 조합은 이따금, CDR을 결정하기 위해 당업계에서 사용된다.

2개 이상의 핵산 또는 폴리펩타이드의 맥락에서 용어 "동일한" 또는 "동일성" 퍼센트는, 임의의 보존적 아미노산 치환을 서열 동일성의 일부로서 간주하지 않으면서 최대 상응도에 대해 비교되고 정렬된 경우(필요하다면 갭을 도입함), 동일하거나 또는 명시된 퍼센트의 동일한 뉴클레오타이드 또는 아미노산 잔기를 갖는 2개의 서열 또는 하위서열을 지칭한다. 동일성 퍼센트는 서열 비교 소프트웨어 또는 알고리즘을 사용하여 또는 시각적 조사에 의해 측정될 수 있다. 아미노산 또는 뉴클레오타이드 서열의 정렬을 수득하기 위해 사용될 수 있는 다양한 알고리즘 및 소프트웨어는 당업계에 알려져 있다. 서열 정렬 알고리즘의 하나의 이러한 비제한적인 예는 문헌[Karlin et al, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 87:2264-2268 (1990)]에 기술되어 있으며, 문헌[Karlin et al., *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 90:5873-5877 (1993)]에서 변형된 바와 같고, NBLAST 및 XBLAST 프로그램(문헌[Altschul et al., *Nucleic Acids Res.*, 25:3389-3402 (1991)])으로 혼입된 알고리즘이다. 소정의 구현예에서, 제2 서열 아미노산에 대한 제1 아미노산 서열의 동일성 퍼센트 "X"는 $100 \times (Y/Z)$ 로서 계산되고, 여기서, Y는 제1 및 제2 서열의 정렬(시각적 조사 또는 특정 서열 정렬 프로그램에 의해 정렬된 바와 같음)에서 동일한 매치(match)로서 채점된 아미노산 잔기의 수이고, Z는 제2 서열 내의 잔기의 총 수이다. 제1 서열의 길이가 제2 서열보다 길다면, 제2 서열에 대한 제1 서열의 동일성 퍼센트는 제1 서열에 대한 제2 서열의 동일성 퍼센트보다 길 것이다.

비제한적인 예로서, 임의의 특정 폴리뉴클레오타이드가 기준 서열에 대해 소정의 서열 동일성 퍼센트(예를 들어, 적어도 80% 동일한, 적어도 85% 동일한, 적어도 90% 동일하고, 일부 구현예에서, 적어도 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99% 동일함)를 갖고 있는지의 여부는, 소정의 구현예에서, Bestfit 프로그램(Wisconsin Sequence Analysis Package, Version 8 for Unix, Genetics Computer Group, University Research Park, 575 Science Drive, Madison, WI 53711)을 사용하여 결정될 수 있다. Bestfit는 2개 서열 사이에서 상동성의 최대 분절(segment)을 찾기 위해 Smith 및 Waterman(문헌[Advances in Applied Mathematics 2: 482 489 (1981)])의 국소상동성 알고리즘을 사용한다. 특정 서열이 예를 들어, 본 개시내용에 따른 기준 서열과 95% 동일한지 결정하기 위해 Bestfit 또는 임의의 다른 서열 정렬 프로그램을 사용하는 경우, 매개변수는, 동일성 퍼센트가 기준 뉴클레오타이드 서열의 전장에 걸쳐 계산되고 상동성에서의 갭이 기준 서열 내 뉴클레오타이드의 총 수의 5% 이하로 허용되도록 설정된다.

일부 구현예에서, 2개의 핵산 또는 폴리펩타이드는 실질적으로 동일하며, 이는 서열 비교 알고리즘을 사용하거나 시각적 조사에 의해 측정되는 바와 같이, 최대 상응도를 위해 비교되고 정렬된 경우, 이들이 적어도 70%, 적어도 75%, 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 그리고 일부 구현예에서, 적어도 95%, 96%, 97%, 98%, 99%의 뉴클레오타이드 또는 아미노산 잔기 동일성을 가짐을 의미한다. 동일성은 적어도 약 10, 약 20, 약 40 내지 60개 잔기 길이 또는 이들 사이의 임의의 중간값인 서열 영역에 걸쳐 존재할 수 있고, 60 내지 80개 잔기, 예를 들어, 적어도 약 90 내지 100개 잔기보다 긴 영역에 걸쳐 존재할 수 있고, 일부 구현예에서, 서열은 비교되는 서열의 전장, 예컨대 뉴클레오타이드 서열의 코딩 영역에 걸쳐 실질적으로 동일하다.

"보존적 아미노산 치환"은, 하나의 아미노산 잔기가 유사한 측쇄를 갖는 다른 아미노산 잔기로 대체되는 치환이다. 염기성 측쇄(예를 들어, 라이신, 아르기닌, 히스티딘), 산성 측쇄(예를 들어, 아스파르트산, 글루탐산), 비하전된 극성 측쇄(예를 들어, 글리신, 아스파라긴, 글루타민, 세린, 트레오닌, 티로신, 시스테인), 비극성 측쇄

(예를 들어, 알라닌, 발린, 류신, 이소류신, 프롤린, 페닐알라닌, 메티오닌, 트립토판), 베타-분지형 측쇄(예를 들어, 트레오닌, 발린, 이소류신) 및 방향족 측쇄(예를 들어, 티로신, 페닐알라닌, 트립토판, 히스티딘)를 포함하여 유사한 측쇄를 갖는 아미노산 잔기의 계통은 당업계에 정의되어 있다. 예를 들어, 티로신에 대한 페닐알라닌의 치환은 보존적 치환이다. 일부 구현예에서, 본 개시내용의 폴리펩타이드 및 항체의 서열에서 보존적 치환은, 항원(들), 예를 들어, 항체가 결합하는 CD40에의, 아미노산 서열을 함유하는 항체의 결합을 무력화시키지 않는다. 항원 결합을 제거하지 않는 뉴클레오타이드 및 아미노산 보존적 치환을 식별하는 방법은 당업계에 잘 알려져 있다(예를 들어, 문헌[Brummell et al., *Biochem.* 32: 1180-1 187 (1993); Kobayashi et al., *Protein Eng.* 12(10):879-884 (1999); 및 Burks et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94: 412-417 (1997)] 참조).

"결합 친화도"는 일반적으로, 분자(예를 들어, 항체 또는 이의 항원-결합 부위)의 단일 결합 부위와 이의 결합 파트너(예를 들어, 항원) 사이의 비공유 상호작용의 총 합계의 강도를 지칭한다. 다르게 지시되지 않는 한, 본원에 사용된 바와 같이, "결합 친화도"는 결합 짹의 구성원(예를 들어, 항체와 항원) 사이의 1:1 상호작용을 반영하는 내인성(intrinsic) 결합 친화도를 지칭한다. 분자 X의 파트너 Y에 대한 상기 분자 X의 친화도는 일반적으로, 해리 상수(Kd)로 표시될 수 있다. 친화도는 당업계에 알려진 보편적인 방법에 의해 측정될 수 있다. 저-친화도 항체는 일반적으로, 항원에 서서히 결합하고 쉽게 해리되는 경향이 있는 반면, 고-친화도 항체는 일반적으로, 항원에 더 빠르게 결합하고 더 오래 결합된 채로 존재하는 경향이 있다. 결합 친화도를 측정하는 여러 가지 방법이 당업계에 알려져 있다.

본원에 사용된 바와 같이, 용어 "길항체"는 인간 CD40(hCD40)의 생물학적 또는 면역학적 활성을 차단하거나 감소시키는 항체 또는 이의 항원-결합 부위를 지칭한다. hCD40의 길항체 항체 또는 이의 항원-결합 부위는 예를 들어, CD40L과 함께(또는 이에 노출되어) 배양(예컨대 B 세포를 CD40L-발현 인간 T 세포와 함께 배양함)되는 1차 인간 B 세포의 CD86 상향조절을 저해할 수 있다. 일부 구현예에서, 효능제 활성이 실질적으로 없는 길항체 항-CD40 항체 또는 이의 항원-결합 부위는, 효능제 검정법, 예컨대 PCT 공보 WO 2016/196314의 실시예 7에 기술된 효능제 단핵구 검정법에서 음성 대조군으로부터의 하나의 표준 편차와 동등하거나 그 내에서 활성 수준을 갖는 것으로 정의된다. 효능제 및 길항체 활성은 또한, 당업계에 알려진 방법을 사용하여, 예를 들어, NFkB 매개 알칼리 포스파타제(AP)에 연결된 인간 CD40을 발현하는 CD40 발현 리포터 세포주를 사용하거나 B 세포 검정법을 사용하여 평가될 수 있다.

"글루코코티코스테로이드의 라디칼"은 부모 글루코코티코스테로이드의 아미노기로부터 수소 원자의 제거로부터 유래된다. 수소 원자의 제거는 링커에의 부모 글루코코티코스테로이드의 부착을 용이하게 한다.

용어 "약물 부하/loading)" 및 "약물 항체 비"(DAR)는 본원에서 상호교환적으로 사용되고, 링커를 통해 항체에 연결된 글루코코티코스테로이드 라디칼의 수를 지칭한다. 화학식 (I)의 라디칼을 포함하는 항체 약물 공액체, 또는 화학식 (II)의, 그리고 예를 들어, 개별적인 ADC를 나타내는 항체 약물 공액체의 "약물 부하" 또는 "약물 항체 비"(DAR)는 개별적인 항체에 연결된 글루코코티코스테로이드 분자의 수(예를 들어, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 또는 10, 또는 변수 n의 약물 부하는 각각 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 또는 10임)(*"화합물 DAR"*)를 지칭한다. 나아가, 항체 약물 공액체(예를 들어, 수합되는 조성물 또는 분획에 제공됨)의 집단(population)의 약물 항체 비(DAR)는 주어진 집단에서 항체에 연결된 글루코코티코스테로이드 분자의 평균 수, 예를 들어, 1 내지 10 ± 0.5, ± 0.4, ± 0.3, ± 0.2 또는 ± 0.1(*"집단 DAR"*)의 정수 또는 분수(fraction)로서 약물 부하 또는 n을 지칭한다.

용어 "대상체"는 특정 치료의 수혜자인 비제한적으로 인간, 비-인간 영장류, 설치류 등을 포함하는 임의의 동물(예를 들어, 포유류)을 지칭한다.

본원에 개시된 바와 같은 항체 약물 공액체의 "유효량"은 구체적으로 언급된 목적을 수행하기에 충분한 양이다. "유효량"은 언급된 목적에 관하여 결정될 수 있다.

용어 "치료적 유효량"은 대상체 또는 포유류에서 질환 또는 장애를 "치료하기에" 효과적인 항체 약물 공액체의 양을 지칭한다. "예방적 유효량"은 요망되는 예방적 결과를 달성하기에 효과적인 양을 지칭한다.

"치료하는" 또는 "치료" 또는 "치료하기 위해" 또는 "경감하는" 또는 "경감하기 위해"와 같은 용어는 진단된 병리학적 질병 또는 장애의 하나 이상의 증상을 치유하거나, 늦추거나, 감소시키고/거나 이의 진행을 늦추거나 중단시키는 치료적 조치("치료적 치료")를 지칭한다. 따라서, 치료적 치료가 필요한 대상체는 장애로 이미 진단받았거나 장애를 갖는 것으로 의심되는 대상체를 포함한다. 예방적(prophylactic) 또는 방지적(preventative) 조치는 표적화된 병리학적 질병 또는 장애의 발달을 방지하는 조치("예방적 치료")를 지칭한다. 따라서, 예방적

치료가 필요한 대상체는 장애를 갖기 쉬운 대상체 및 장애가 방지되고자 하는 대상체를 포함한다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0049] 본 개시내용은 항-CD40 항체에 연결된 글루코코티코이드 수용체 효능제를 포함하는 항체 약물 공액체(ADC)를 제공한다.
- [0050] 염증성 장 질환, 예컨대 크론 질환 및 궤양성 결장염에서, 소화관 장벽 온전성(integrity)의 소실은 공생(commensal) 박테리아가 장 점막을 침범할 수 있게 한다. 상응하는 숙주 면역 반응은 염증 악화를 초래한다. 면역 세포의 미생물 활성화는 독립적으로 CD40 신호전달을 발생시킬 수 있어서, 항-CD40 길항제, 예컨대 Ab-102를 이용한 치료에 의해 영향을 받지 않아, 이의 효력을 제한할 것이다. 그러나, 항-CD40 항체에 연결된 글루코코티코이드 수용체 효능제는 CD40-매개 활성화를 차단할 뿐만 아니라, 이의 글루코코티코이드 수용체 효능제 페이로드(payload)의 내재화(internalization) 및 방출 시 Toll-유사 수용체(TLR)를 통한 미생물-유래 분자의 염증성 신호전달을 저해할 것이다. 이러한 이중 기전은 활성화된 염증성 세포에 대한 최대 저해 반응을 나타내어, 항-CD40 길항제 단독과 비교하여 증강된 효력을 발휘할 것이다.
- [0051] 실시예 C의 데이터는, 그리고 도 2 및 표 18에 제공된 바와 같이 이러한 가설을 확증시킨다. 반-부착성(semi-adherent) 단핵구-유래 수지상 세포(1차 인간 말초 혈액 단핵 세포로부터 유래됨)는 리포다당류(LPS)로 사전(pre)-자극되어, 세포-표면 CD40 발현의 상향조절을 유도하였다. 세척 및 항-CD40 항체 단독(대조군 1)으로의 사전-처리 대 항-인간 CD40 ADC의 선별 후, 세포는 LPS 및/또는 CD40L로 활성화되었고, 전-염증성 사이토카인 IL-6의 분비는 정량화되었다. 데이터는, 항-CD40 항체 단독(대조군 1)이 염증성 신호전달을 부분적으로 억제시키는 한편, 시험된 항-인간 CD40 ADC는 부가적인 염증성, CD40-독립적, 신호전달 (즉, LPS 사전-자극(점선) 전의 수준)을 완전히 억제시킴을 실증한다.
- [0052] **I. 항-CD40 항체**
- [0053] 용어 "항-CD40 항체" 및 "항-CD40 항원-결합 부위"는 인간 CD40의 길항제인 전장 항체 및 항원-결합 부위를 각각 지칭한다. 인간 CD40에 대한 전장 아미노산 서열은 표 1, SEQ ID NO: 1에서 제공된다. 인간 CD40의 세포외 도메인은 표 1, SEQ ID NO: 2서 제공된다.
- [0054] 일 구현예에서, 항체 또는 이의 항원 결합 부위는 상기 항체 또는 이의 항원 결합 부위의 부재 하의 CD40 활성 또는 기능과 비교하여 CD40 활성 또는 기능의 저하를 유발하는 길항제 항체 또는 이의 항원 결합 부위이다. 특정 구현예에서, 항체 또는 이의 항원 결합 부위는 효능제 활성이 실질적으로 없으며, 즉, 항체 또는 이의 항원 결합 부위는 상기 항체 또는 이의 항원 결합 부위의 부재 하의 CD40 활성 또는 기능과 비교하여 CD40 활성 또는 기능의 규모(magnitude)의 증가를 유발하지 않는다. 소정의 구현예에서, 항-CD40 항체는 폴리클로날 항체, 모노클로날 항체, 키메라 항체, 인간화 항체, 인간 항체, 또는 이의 항원 결합 부위이다.
- [0055] 소정의 구현예에서, 항-CD40 항체는 루카투무맙(lucatumumab)(Novartis; 미국 특허 8277810호에 기술된 바와 같음); 항체 5D12, 3A8 및 3C6, 또는 이의 인간화 버전(Novartis; 미국 특허 5874082호에 기술된 바와 같음); 항체 15B8(Novartis; 미국 특허 7445780호에 기술된 바와 같음); 항체 4D11(Kyowa Hakko Kirin; 미국 특허 7193064호에 기술된 바와 같음); 테멜리시맙.temeliximab(Bristol Myers Squibb; 미국 특허 6051228호에 기술된 바와 같음); 항체 PG102(PanGenetics; 미국 특허 8669352호에 기술된 바와 같음); 항체 2C10(Primatope; 미국 특허 출원 공보 20140093497); 미국 특허 8591900 및 8778345호에 기술된 항-CD40 항체(Boehringer Ingelheim); 미국 특허 5801227호에 기술된 항-CD40 항체(Amgen); 또는 APX005(Boehringer Ingelheim; 미국 특허 출원 공보 20120301488호에 기술된 바와 같음)이다.
- [0056] 소정의 구현예에서, 항-CD40 항체는 SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 11 및 SEQ ID NO: 12로 제시된 바와 같은 상보성 결정 영역(CDR)을 포함한다.
- [0057] 소정의 구현예에서, 항-CD40 항체는 SEQ ID NO: 5로 제시된 바와 같은 중쇄 가변 영역을 포함한다. 소정의 구현예에서, 항-CD40 항체는 SEQ ID NO: 6으로 제시된 바와 같은 경쇄 가변 영역을 포함한다. 소정의 구현예에서, 항-CD40 항체는 SEQ ID NO: 5로 제시된 바와 같은 중쇄 가변 영역 및 SEQ ID NO: 6으로 제시된 바와 같은 경쇄 가변 영역을 포함한다.
- [0058] 소정의 구현예에서, 항-CD40 항체는 SEQ ID NO: 3으로 제시된 바와 같은 중쇄 가변 영역을 포함한다. 소정의 구현예에서, 항-CD40 항체는 SEQ ID NO: 4로 제시된 경쇄를 포함한다. 소정의 구현예에서, 항-CD40 항체는 미국 공보 2016/0347850호에 기술되고 SEQ ID NO: 3으로 제시된 중쇄 및 SEQ ID NO: 4로 제시된 경쇄(볼드체는 CDR

영역; 밑줄은 불변 영역)를 포함하는 전장 항체, Ab102이다.

표 3: 항-CD40 항체 서열 (Ab102)	
항체 영역	아미노산 서열
인간 Ab102-HC (중쇄)	EVQLVESGGGLVKGPGSLRLSCAASGFTFSDYGMNWVRQAPGKG LEWIAYISSGRGNIYYADTVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAE DTAVYYCARSWGYFDVGQGTTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKST <u>SGGTAALGCLVKDYLPEPVTVWSNGALTSGVHTFPNAVQSSGLY</u> <u>SLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVVDKKVEPKSCDKTHTC</u> <u>PPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDQLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEV</u> KFNWYVDGVEVHNAAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNG KEYKCKVSNKALPAPIEKTSKAKGQPREGQVYTLPPSREEMTKNQ VSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYS KLTVDKSRWQQGNVFSCSVLHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO: 3)
인간 Ab102-LC (경쇄)	DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQSLLNRGNQKNYLTWFQQK PGQPPKLLIYWASTRESGVPDFSGSGSGTDFLTISLQAEDVAV YYCQNDYTYPLTFGQGTKEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTAS <u>VVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLS</u> <u>STLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC</u> (SEQ ID NO:4)
중쇄 가변 영역	EVQLVESGGGLVKGPGSLRLSCAASGFTFSDYGMNWVRQAPGKG LEWIAYISSGRGNIYYADTVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAE DTAVYYCARSWGYFDVGQGTTVTVSS (SEQ ID NO:5)
경쇄 가변 영역	DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQSLLNRGNQKNYLTWFQQK PGQPPKLLIYWASTRESGVPDFSGSGSGTDFLTISLQAEDVAV YYCQNDYTYPLTFGQGTKEIK (SEQ ID NO:6)
VH-CDR1	GFTFSDYGMN (SEQ ID NO:7)
VH-CDR2	YISSGRGNIYYADTVKG (SEQ ID NO:8)
VH-CDR3	SWGYFDV (SEQ ID NO:9)
VL-CDR1	KSSQSLNRGNQKNYLT (SEQ ID NO:10)
VL-CDR2	WASTRES (SEQ ID NO:11)
VL-CDR3	QNDYTYPLT (SEQ ID NO:12)

[0059]

항-CD40 항체는 소수 개의 또는 심지어 하나의 단일 아미노산의 부분 결실 또는 치환에 의해 제공될 수 있는 것으로 이해될 것이다. 예를 들어, CH2 도메인의 선별된 영역에서 단일 아미노산의 돌연변이는 Fc 결합을 실질적으로 감소시키기에 충분할 수 있다. 유사하게는, 조정되는 효과기 기능(예를 들어, 보체 C1Q 결합)을 조절하는 하나 이상의 불변 영역 도메인의 해당 부분을 단순히 결실시키는 것이 바람직할 수 있다. 불변 영역의 이러한 부분 결실은 주제(subject) 불변 영역 도메인과 연관된 다른 바람직한 기능을 온전하게 놔두는 한편, 항체의 선별된 특징(혈청 반감기)을 향상시킬 수 있다. 더욱이, 개시된 항체의 불변 영역은 생성된 작제물의 프로파일을 증강시키는 하나 이상의 아미노산의 돌연변이 또는 치환을 통해 변형될 수 있다. 이러한 측면에서, 항체의 입체 배열 및 면역원성 프로파일을 실질적으로 유지시키는 한편, 보존된 결합 부위에 의해 제공되는 활성(예를 들어, Fc 결합)을 교란시키는 것이 가능할 수 있다. 소정의 구현에는 효과기 기능을 저하시키거나 증가시키는 것과 같은 바람직한 특징을 증강시키거나 더 많은 글루코코티코이드 수용체 효능제 부착을 제공하기 위해 하나 이상의 아미노산을 불변 영역에 첨가하는 것을 포함할 수 있다. 이러한 구현예에서, 선별된 불변 영역 도메인으로부터 유래되는 특이적인 서열을 삽입하거나 복제하는 것이 바람직할 수 있다.

[0060]

나아가, 본 개시내용은 본원에 제시된 항-CD40 항체에 실질적으로 상동성인 변이체 및 등가물을 포함한다. 이들은 예를 들어, 보존적 치환 돌연변이, 즉, 유사한 아미노산으로의 하나 이상의 아미노산의 치환을 함유할 수 있다. 예를 들어, 보존적 치환은 동일한 일반 클래스(class) 내의 다른 아미노산으로의 아미노산, 예를 들어, 다른 산성 아미노산으로의 하나의 산성 아미노산, 다른 염기성 아미노산으로의 하나의 염기성 아미노산, 또는 다른 중성 아미노산으로의 하나의 중성 아미노산의 치환을 지칭한다. 보존적 아미노산 치환에 의해 의도되는 것은 당업계에 잘 알려져 있다.

[0062]

항-CD40 항체는 항체의 재조합 폴리펩타이드, 천연 폴리펩타이드 또는 합성 폴리펩타이드일 수 있다. 본 개시내용의 일부 아미노산 서열은 단백질의 구조 또는 기능의 유의한 효과 없이 다양해질 수 있는 것으로 인지될 것이다. 따라서, 본 개시내용은 항체의 실질적인 활성을 나타내거나 영역을 포함하는 폴리펩타이드의 변이를 추가로

포함한다. 이러한 돌연변이체는 결실, 삽입, 역위, 반복 및 유형 치환을 포함한다.

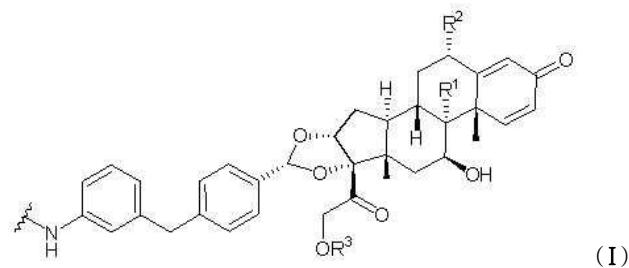
- [0063] 본원에 기술된 항-CD40 항체는 당업계에 알려진 임의의 적합한 방법에 의해 생성될 수 있다. 이러한 방법은 직접적인 단백질 합성 방법으로부터, 단리된 폴리펩타이드 서열을 인코딩하고 적합한 형질전환된 숙주에서 이들 서열을 발현시키는 DNA 서열의 작제까지의 범위이다. 일부 구현예에서, DNA 서열은 관심 야생형 단백질을 인코딩하는 DNA 서열을 단리하거나 합성함으로써 재조합 기술(technology)을 사용하여 작제된다. 선택적으로, 서열은 이의 기능적 유사체를 제공하도록 부위-특이적 돌연변이생성에 의해 돌연변이화될 수 있다. 예를 들어, 문헌 [Zoeller et al., Proc. Nat'l. Acad. Sci. USA 81:5662-5066 (1984)] 및 미국 특허 4,588,585호를 참조한다.
- [0064] 일부 구현예에서, 항-CD40 항체를 인코딩하는 DNA 서열은 올리고뉴클레오타이드 합성기를 사용하여 화학적 합성에 의해 작제될 것이다. 이러한 올리고뉴클레오타이드는 요망되는 폴리펩타이드의 아미노산 서열에 기초하고, 관심 재조합 폴리펩타이드가 생성될 숙주 세포에서 선호되는 코돈을 선별하는 것에 기초하여 설계될 수 있다. 표준 방법은 단리된 관심 폴리펩타이드를 인코딩하는 단리된 폴리펩타이드 서열을 합성하기 위해 적용될 수 있다.
- [0065] 소정의 구현예에서, 재조합 발현 벡터는 항체 항-CD40 항체를 인코딩하는 DNA를 증폭시키고 발현하기 위해 사용된다. 광범위하게 다양한 발현 숙주/벡터 조합이 이용될 수 있다. 진핵 숙주에 유용한 발현 벡터는 예를 들어, SV40, 소 유두종 바이러스, 아데노바이러스 및 사이토메갈로바이러스로부터의 발현 조절 서열을 포함하는 벡터를 포함한다. 박테리아 숙주에 유용한 발현 벡터는 기지의 박테리아 플라스미드, 예컨대 pCR1, pBR322, pMB9 및 이들의 유도체를 포함하여 에스케리키아 콜라이(*Escherichia coli*)로부터의 플라스미드, 더 광범위한 숙주 범위의 플라스미드, 예컨대 M13 및 사상(*filamentous*) 단일-가닥 DNA 과자를 포함한다.
- [0066] 항-CD40 항체의 발현에 적합한 숙주 세포는 적절한 프로모터의 조절 하에 원핵생물, 효모, 곤충 또는 고차(higer) 진핵 세포를 포함한다. 원핵생물은 그람 음성 또는 그람 양성 유기체, 예를 들어, 이. 콜라이(*E. coli*) 또는 바실러스(*bacilli*)를 포함한다. 고차 진핵 세포는 포유류 기원의 확립된 세포주를 포함한다. 세포-무함유 번역 시스템이 또한, 이용될 수 있을 것이다. 박테리아, 진균류, 효모 및 포유류 세포 숙주와 함께 사용하기에 적절한 클로닝 및 발현 벡터는 Pouwels 등(문헌[*Cloning Vectors: A Laboratory Manual*, Elsevier, N.Y., 1985])에 의해 기술되어 있다. 항체 생성을 포함한 단백질 생성의 방법에 관한 부가적인 정보는 예를 들어, 미국 특허 공보 2008/0187954호, 미국 특허 6,413,746호와 6,660,501호 및 국제 특허 공보 WO 04009823호에서 찾을 수 있다.
- [0067] 다양한 포유류 또는 곤충 세포 배양 시스템은 또한, 재조합 단백질을 발현시키기 위해 유리하게 이용된다. 포유류 세포에서 재조합 단백질의 발현은, 이러한 단백질이 일반적으로 올바르게 접하며, 적절하게 변형되고 완전히 기능적이기 때문에 수행될 수 있다. 적합한 포유류 숙주 세포주의 예는 HEK-293 및 HEK-293T, Gluzman(문헌 [Cell 23:175, 1981])에 의해 기술된 COS-7 원숭이 신장 세포주, 및 예를 들어, L 세포, C127, 3T3, 차이니즈 햄스터 난소(CH0), HeLa 및 BHK 세포주를 포함한 다른 세포주를 포함한다. 포유류 발현 벡터는 비전사 요소, 예컨대 발현되는 유전자에 연결된 복제 기원, 적합한 프로모터 및 인핸서, 및 다른 5' 또는 3' 측부(*flanking*) 비전사 서열, 및 5' 또는 3' 비번역 서열, 예컨대 필수적인 리보솜 결합 부위, 폴리아데닐화 부위, 스플라이스 공여자 및 수용자 부위, 및 전사 종결 서열을 포함할 수 있다. 곤충 세포에서 이종성 단백질의 생성을 위한 바쿨로바이러스(*baculovirus*) 시스템은 문헌[Luckow and Summers, Bio/Technology 6:47 (1988)]에 의해 검수된다.
- [0068] 형질전환된 숙주에 의해 생성되는 단백질은 임의의 적합한 방법에 따라 정제될 수 있다. 이러한 표준 방법은 크로마토그래피(예를 들어, 이온 교환, 친화도 및 사이징(sizing) 컬럼 크로마토그래피), 원심분리, 차별 용해도(differential solubility), 또는 단백질 정제를 위한 임의의 다른 표준 기법을 포함한다. 친화도 태그, 예컨대 헥사히스티딘, 말토스 결합 도메인, 인플루엔자 코트(coat) 서열 및 글루타티온-S-트랜스퍼라제는 적절한 친화도 컬럼에 걸친 통과에 의한 용이한 정제를 가능하게 하도록 단백질에 부착될 수 있다. 단리된 단백질은 또한, 단백질분해, 핵 자기 공명 및 x-선 결정법과 같은 기법을 사용하여 물리적으로 특징화될 수 있다.
- [0069] 박테리아 배양물에서 생성된 재조합 단백질은 예를 들어, 세포 펠렛으로부터의 초기 추출, 뒤이어 하나 이상의 농축, 염석(salting-out), 수성 이온 교환 또는 크기 배제 크로마토그래피 단계에 의해 단리될 수 있다. 고성능 액체 크로마토그래피(HPLC)는 최종 정제 단계에 이용될 수 있다. 재조합 단백질의 발현에 이용되는 미생물 세포는 동결-해동 사이클링, 초음파처리, 기계적 교란, 또는 세포 용해제(lysing agent)의 사용을 포함한 임의의 편리한 방법에 의해 교란될 수 있다.
- [0070] 항체를 정제하는 방법은 예를 들어, 미국 특허 공보 2008/0312425호, 2008/0177048호 및 2009/0187005호에 기

술된 방법을 포함한다.

[0071] II. 글루코코티코이드 수용체 효능제에 연결된 항-CD40 항체

항-CD40 항체에 연결된 글루코코티코이드 수용체 효능제를 포함하는 항체 약물 공액체(ADC)가 본원에 제공된다. 일부 구현예에서, ADC는 Fc 감마 수용체에 결합한다. 일부 구현예에서, ADC는 Jurkat 세포 리포터 검정법에서 활성이다. 일부 구현예에서, ADC는 CD40L 리포터 검정법에서 활성이다. 일부 구현예에서, ADC는 항-CD40 항체 단독과 비교하여 감소된 면역원성(감소된 항-약물 면역 반응(ADA))을 나타낸다.

[0073] 일부 구현예에서, (a) 항-CD40 항체; 및 (b) 화학식 (I)의 글루코코티코이드 수용체 효능제의 라디칼을 포함하는 항체 약물 공액체가 제공되며:



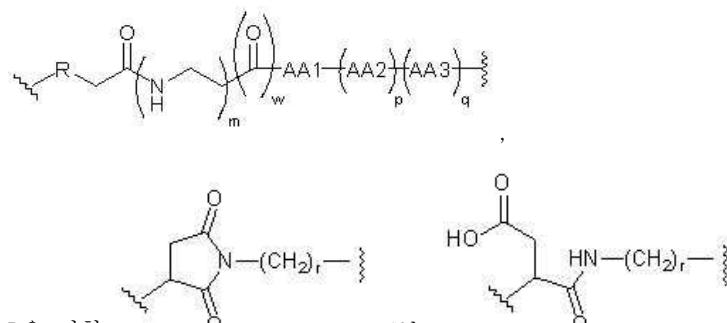
[0074] 상기 화학식 (I)에서:

[0076] R¹은 수소 또는 플루오로이며;

[0077] R²는 수소 또는 플루오로이고;

[0078] R³은 수소 또는 $-P(=O)(OH)_2$ 이고;

[0079] 추가로, 항체는 화학식의 링커에 의해 글루코코티코이드 수용체 효능제에 공액되며:



[0080] R은 결합, 또는 이며, 여기서, r은 0 또는 1이며;

[0082] AA1, AA2 및 AA3은 독립적으로, 알라닌(Ala), 글리신(Gly), 이소류신(Ile), 류신(Leu), 프롤린(Pro), 발린(Val), 페닐알라닌(Phe), 트립토판(Trp), 티로신(Tyr), 아스파르트산(Asp), 글루탐산(Glu), 아르기닌(Arg), 히스티딘(His), 라이신(Lys), 세린(Ser), 트레오닌(Thr), 시스테인(Cys), 메티오닌(Met), 아스파라진(Asn) 및 글루타민(Gln)으로 이루어진 군으로부터 선택되며;

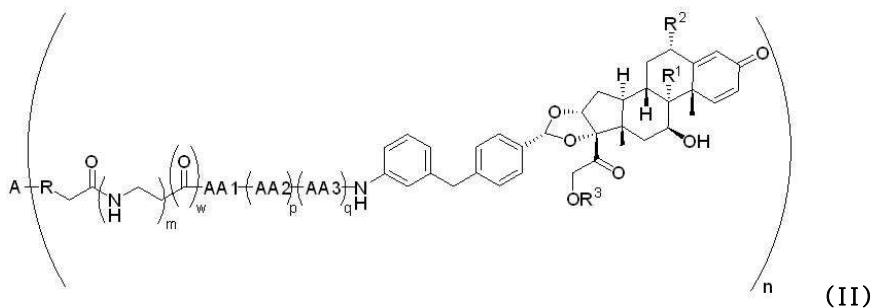
[0083] m은 0 또는 1이며;

[0084] w는 0 또는 1이며;

[0085] p는 0 또는 1이고;

[0086] q는 0 또는 1이다.

[0087] 또 다른 구현예에서, 화학식 (II)의 항체 약물 공액체가 제공되며:



[0088]

상기 화학식 (II)에서:

[0089]

A는 항-CD40 항체이고;

[0090]

n은 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 또는 10이다.

[0091]

소정의 구현예에서, 항-CD40 항체는 SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 11 및 SEQ ID NO: 12로 제시된 바와 같은 상보성 결정 영역(CDR)을 포함한다. 소정의 구현예에서, 항-CD40 항체는 SEQ ID NO: 5로 제시된 바와 같은 중쇄 가변 영역 및 SEQ ID NO: 6으로 제시된 바와 같은 경쇄 가변 영역을 포함한다. 소정의 구현예에서, 항-CD40 항체는 SEQ ID NO: 3으로 제시된 중쇄 및 SEQ ID NO: 4로 제시된 경쇄를 포함한다.

[0092]

상기 항체는 친핵성 기, 예를 들어, OH 기(연결되는 경우, -O- 기를 제공하기 위해), -SH 기(연결되는 경우, -S- 기를 제공하기 위해), 또는 -NH₂ 기(연결되는 경우, -NH- 기를 제공하기 위해)를 갖는 항체 상에서 임의의 모이어티에 의해 가변 R에 연결될 수 있다. 소정의 구현예에서, 가변 R에의 항체의 부착점은 상기 항체의 시스테인 잔기의 SH 기를 통해서이다(연결되는 경우, -S- 기를 제공하기 위해).

[0093]

소정의 구현예에서, R¹은 수소이고, R²는 수소이다.

[0094]

소정의 구현예에서, R¹은 플루오로이고, R²는 수소이다.

[0095]

소정의 구현예에서, R¹은 플루오로이고, R²는 플루오로이다.

[0096]

소정의 구현예에서, R³은 수소이다.

[0097]

소정의 구현예에서, R³은 -P(=O)(OH)₂이다.

[0098]

소정의 바람직한 구현예에서, R¹ 및 R² 중 적어도 하나는 플루오로이고, R³은 -P(=O)(OH)₂이다.

[0099]

소정의 구현예에서, -AA1-(AA2)_p-(AA3)_q-는 -Gly-Glu-; -Ala-Ala-; -Glu-Ala-Ala-; -Gly-Lys-; -Glu-; -Glu-Ser-Lys-; 및 -Gly-Ser-Lys-로 이루어진 군으로부터 선택된다.

[0100]

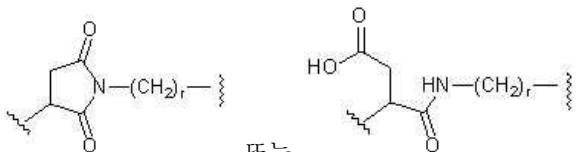
아미노산의 이러한 목록은 좌측으로부터 우측으로 읽어야 하고, 여기서, 가장 좌측의 아미노산은 AA1에 상응하고, 가장 우측의 아미노산은 AA2(q가 0인 경우) 또는 AA3(q가 1인 경우)에 상응하는 것으로 이해되어야 한다.

[0101]

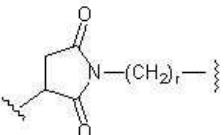
소정의 바람직한 구현예에서, 링커 모이어티는 1, 2 또는 3개의 친수성 아미노산 -AA1-(AA2)_p-(AA3)_q-를 포함하며, 여기서, AA1, AA2 및/또는 AA3의 측쇄는 수소 결합기, 예컨대 =O 및/또는 수소 공여기(donating group), 예컨대 -OH, -NH₂ 또는 -SH를 포함한다. 링커의 친수성을 증가시키는 것은 ADC의 장기간 안정성 및 저장을 야기할 수 있다. 예를 들어, 소정의 바람직한 구현예에서, -AA1-(AA2)_p-(AA3)_q-는 -Gly-Glu-; -Gly-Lys-; -Glu-Ser-Lys-; 및 -Gly-Ser-Lys-로 이루어진 군으로부터 선택된다.

[0102]

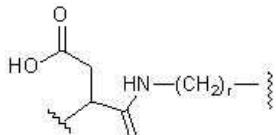
소정의 구현예에서, m이 0인 경우, w는 0이다. 소정의 구현예에서, m이 1인 경우, w는 1이다.



- [0104] 소정의 구현예에서, m 은 0이며; q 는 0이고; R 은 또는 r 은 0 또는 1이다. 소정의 구현예에서, w 는 0이다. 소정의 구현예에서, r 은 0이다. 소정의 구현예에서, r 은 1이다.



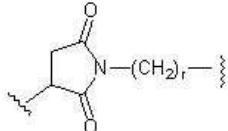
- [0105] 소정의 바람직한 구현예에서, R 은 결합이다. 화학식



의 R 기를 포함하는 ADC는 생체내에서

불안정할 수 있다. 화학식

의 고리-열린 R 기를 포함하는 ADC는 액체 부형제에서 연장된



저장에 걸쳐 화학식의 기로 고리-닫힐 수 있다. 더욱이, 고리-닫힌 ADC로부터 고리-열린 ADC를 제조하는 것은 연장된 기간 동안 염기성 pH 조건을 필요로 할 수 있으며, 이는 더 긴 생성 시간 및 더 높은 제조 비용, 뿐만 아니라 높은 pH로 인해 ADC의 바람직하지 못한 분해를 야기할 수 있다.

- [0106] 소정의 구현예에서, m 은 0 또는 1이며; p 는 1이고; R 은 결합이다. 소정의 구현예에서, w 는 0이다. 소정의 구현예에서 q 는 0이다. 소정의 구현예에서, q 는 1이다.

- [0107] 소정의 구현예에서, m 은 1이고; q 는 0이다. 소정의 구현예에서, w 는 1이다. 소정의 구현예에서, m 은 1이고; w 는 1이다. 소정의 구현예에서, m 은 1이며; w 는 1이고; q 는 0이다.

- [0108] 소정의 구현예에서, m 은 0이다.

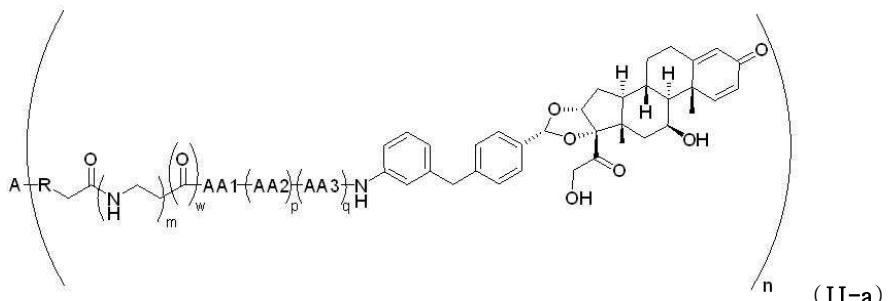
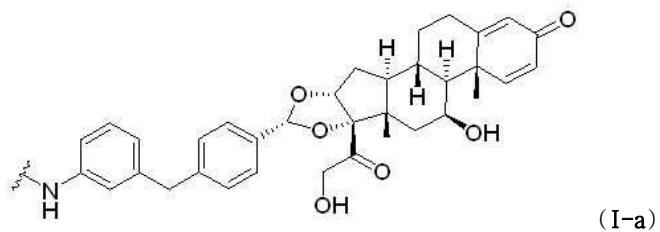
- [0109] 소정의 바람직한 구현예에서, p 는 1이다. 소정의 바람직한 구현예에서, p 는 1이고, m 은 0이다. 소정의 바람직한 구현예에서, p 는 1이며, m 은 0이고, w 는 0이다. 소정의 바람직한 구현예에서, p 는 1이며, m 은 0이며, w 는 0이며, q 는 0이고, R 은 결합이다. 소정의 대안적인 바람직한 구현예에서, p 는 1이며, m 은 0이며, w 는 0이며, q 는 1이고, R 은 결합이다.

- [0110] 소정의 구현예에서, 화학식 (I)의 라디칼을 포함하는 항체 약물 공액체에서, 약물 부하는 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 또는 10이다. 소정의 구현예에서, 약물 부하는 2, 3, 4, 5, 6, 7 또는 8이다. 다른 구현예에서, 약물 부하는 1, 2, 3, 4 또는 5이다. 다른 구현예에서, 약물 부하는 2, 3, 4 또는 5이다. 다른 구현예에서, 약물 부하는 2, 4, 6 또는 8이다. 다른 구현예에서, 약물 부하는 1이다. 다른 구현예에서, 약물 부하는 2이다. 다른 구현예에서, 약물 부하는 3이다. 다른 구현예에서, 약물 부하는 4이다. 다른 구현예에서, 약물 부하는 5이다. 다른 구현예에서, 약물 부하는 6이다. 다른 구현예에서, 약물 부하는 7이다. 다른 구현예에서, 약물 부하는 8이다. 바람직한 구현예에서, 약물 부하는 2 또는 4이다.

- [0111] 화학식 (II)의 소정의 구현예에서, n 은 2, 3, 4, 5, 6, 7 또는 8이다. 화학식 (II)의 소정의 구현예에서, n 은 1, 2, 3, 4 또는 5이다. 화학식 (II)의 소정의 구현예에서, n 은 2, 3, 4 또는 5이다. 화학식 (II)의 소정의 구현예에서, n 은 2, 4, 6 또는 8이다. 화학식 (II)의 소정의 구현예에서, n 은 1이다. 화학식 (II)의 소정의 구현예에서, n 은 2이다. 화학식 (II)의 소정의 구현예에서, n 은 3이다. 화학식 (II)의 소정의 구현예에서, n 은 4이다. 화학식 (II)의 소정의 구현예에서, n 은 5이다. 화학식 (II)의 소정의 구현예에서, n 은 6이다. 화학식 (II)의 소정의 구현예에서, n 은 7이다. 화학식 (II)의 소정의 구현예에서, n 은 8이다. 화학식 (II)의 바람직한 구현예에서, n 은 2 또는 4이다.

- [0112] 상기 기술된 구현예의 다양한 조합은 본원에서 추가로 고려된다.

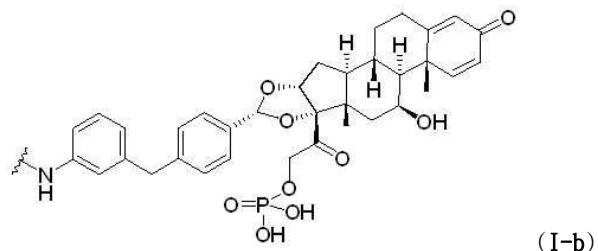
[0113] 예를 들어, R^1 이 수소이며, R^2 가 수소이고, R^3 이 수소인 소정의 구현예에서, 화학식 (I-a)의 라디칼을 포함하는 항체 약물 공액체, 또는 화학식 (II-a)의 항체 약물 공액체가 제공된다:



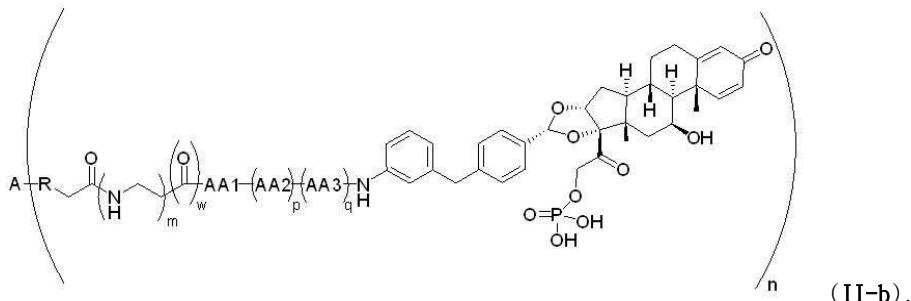
[0115]

[0116] 소정의 구현예에서, R은 결합이다. 소정의 구현예에서, R은 결합이며, m은 1이며, p는 1이고, q는 0이다. 소정의 구현예에서, R은 결합이며, m은 1이며, p는 1이며, q는 0이고, -AA1-(AA2)_p-(AA3)_q-는 -Gly-Glu-; -Ala-Ala-; 및 -Gly-Lys-로 이루어진 군으로부터 선택된다. 소정의 구현예에서, R은 결합이며, m은 0이며, p는 1이고, q는 0 또는 1이다. 소정의 구현예에서, R은 결합이며, m은 0이며, p는 1이며, q는 0 또는 1이고, -AA1-(AA2)_p-(AA3)_q-는 -Gly-Glu-; -Ala-Ala-; -Glu-Ala-Ala-; -Gly-Lys-; -Glu-Ser-Lys-; 및 -Gly-Ser-Lys-로 이루어진 군으로부터 선택된다. 그러나, 소정의 구현예에서, -Ala-Ala- 및 -Glu-Ala-Ala-는 배제된다. 소정의 구현예에서, R은 결합이며, m은 0이며, p는 1이며, q는 0이고, -AA1-(AA2)_p-(AA3)_q-는 -Gly-Glu- 또는 -Gly-Lys-이다. 소정의 구현예에서, R은 결합이며, m은 0이며, p는 1이며, q는 1이고, -AA1-(AA2)_p-(AA3)_q-는 -Glu-Ser-Lys-; 및 -Gly-Ser-Lys-이다. 소정의 구현예에서, m이 0인 경우, w는 0이다. 소정의 구현예에서, m이 1인 경우, w는 1이다. 소정의 구현예에서, 항-CD40 항체는 SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 11 및 SEQ ID NO: 12로 제시된 바와 같은 상보성 결정 영역(CDR)을 포함한다. 소정의 구현예에서, 항-CD40 항체는 SEQ ID NO: 5로 제시된 바와 같은 중쇄 가변 영역 및 SEQ ID NO: 6으로 제시된 바와 같은 경쇄 가변 영역을 포함한다. 소정의 구현예에서, 항-CD40 항체는 SEQ ID NO: 3으로 제시된 중쇄 및 SEQ ID NO: 4로 제시된 경쇄를 포함한다. 소정의 구현예에서, n은 2이다. 소정의 구현예에서, n은 4이다.

[0117] R^1 이 수소이며, R^2 가 수소이고, R^3 이 $-P(=O)(OH)_2$ 인 소정의 구현예에서, 화학식 (I-b)의 라디칼을 포함하는 항체 약물 공액체, 또는 화학식 (II-b)의 항체 약물 공액체가 제공된다:



[0118]



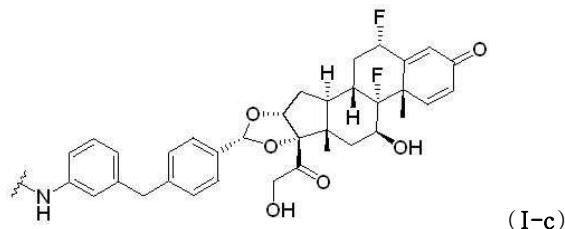
[0119]

[0120]

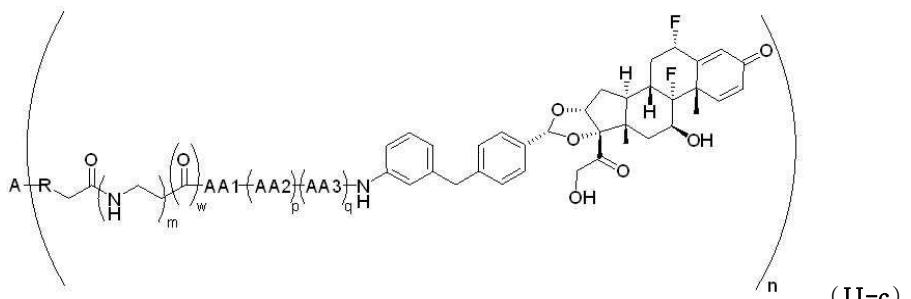
소정의 구현예에서, R은 결합이다. 소정의 구현예에서, R은 결합이며, m은 1이며, p는 1이고, q는 0이다. 소정의 구현예에서, R은 결합이며, m은 1이며, p는 1이며, q는 0이고, -AA1-(AA2)_p-(AA3)_q-는 -Gly-Glu-; -Ala-Ala-; 및 -Gly-Lys-로 이루어진 군으로부터 선택된다. 소정의 구현예에서, R은 결합이며, m은 0이며, p는 1이고, q는 0 또는 1이다. 소정의 구현예에서, R은 결합이며, m은 0이며, p는 1이며, q는 0 또는 1이고, -AA1-(AA2)_p-(AA3)_q-는 -Gly-Glu-; -Ala-Ala-; -Glu-Ala-Ala-; -Gly-Lys-; -Glu-Ser-Lys-; 및 -Gly-Ser-Lys-로 이루어진 군으로부터 선택된다. 그러나, 소정의 구현예에서, -Ala-Ala- 및 -Glu-Ala-Ala-는 배제된다. 소정의 구현예에서, R은 결합이며, m은 0이며, p는 1이며, q는 0이고, -AA1-(AA2)_p-(AA3)_q-는 -Gly-Glu- 또는 -Gly-Lys-이다. 소정의 구현예에서, R은 결합이며, m은 0이며, p는 1이며, q는 1이고, -AA1-(AA2)_p-(AA3)_q-는 -Glu-Ser-Lys-; 및 -Gly-Ser-Lys-이다. 소정의 구현예에서, m이 0인 경우, w는 0이다. 소정의 구현예에서, m이 1인 경우, w는 1이다. 소정의 구현예에서, 항-CD40 항체는 SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 11 및 SEQ ID NO: 12로 제시된 바와 같은 상보성 결정 영역(CDR)을 포함한다. 소정의 구현예에서, 항-CD40 항체는 SEQ ID NO: 5로 제시된 바와 같은 중쇄 가변 영역 및 SEQ ID NO: 6으로 제시된 바와 같은 경쇄 가변 영역을 포함한다. 소정의 구현예에서, 항-CD40 항체는 SEQ ID NO: 3으로 제시된 중쇄 및 SEQ ID NO: 4로 제시된 경쇄를 포함한다. 소정의 구현예에서, n은 2이다. 소정의 구현예에서, n은 4이다.

[0121]

R^1 이 플루오로이며, R^2 가 플루오로이고, R^3 이 수소인 소정의 구현예에서, 화학식 (I-c)의 라디칼을 포함하는 항체 약물 공액체, 또는 화학식 (II-c)의 항체 약물 공액체가 제공된다:



[0122]



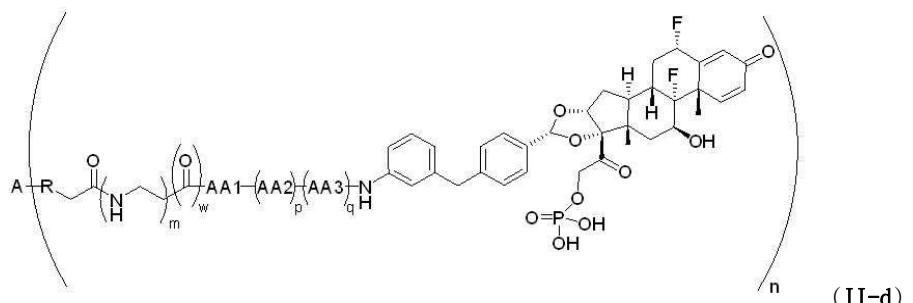
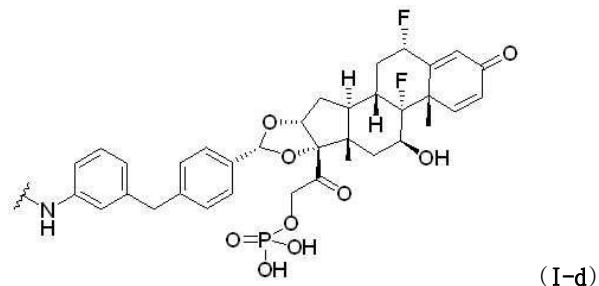
[0123]

[0124]

소정의 구현예에서, R은 결합이다. 소정의 구현예에서, R은 결합이며, m은 1이며, p는 1이고, q는 0이다. 소정의 구현예에서, R은 결합이며, m은 1이며, p는 1이며, q는 0이고, -AA1-(AA2)_p-(AA3)_q-는 -Gly-Glu-; -Ala-Ala-; 및 -Gly-Lys-로 이루어진 군으로부터 선택된다. 소정의 구현예에서, R은 결합이며, m은 0이며, p는 1이고, q는 0 또는 1이다. 소정의 구현예에서, R은 결합이며, m은 0이며, p는 1이며, q는 0 또는 1이고, -AA1-(AA2)_p-(AA3)_q-는 -Gly-Glu-; -Ala-Ala-; -Glu-Ala-Ala-; -Gly-Lys-; -Glu-Ser-Lys-; 및 -Gly-Ser-Lys-로 이루어진 군으로부터 선택된다. 그러나, 소정의 구현예에서, -Ala-Ala- 및 -Glu-Ala-Ala-는 배제된다. 소정의 구현예에서, R은 결합이며, m은 0이며, p는 1이며, q는 0이고, -AA1-(AA2)_p-(AA3)_q-는 -Gly-Glu- 또는 -Gly-Lys-이다. 소정

의 구현예에서, R은 결합이며, m은 0이며, p는 1이며, q는 1이고, -AA1-(AA2)_p-(AA3)_q-는 -Glu-Ser-Lys-; 및 -Gly-Ser-Lys-이다. 소정의 구현예에서, m이 0인 경우, w는 0이다. 소정의 구현예에서, m이 1인 경우, w는 1이다. 소정의 구현예에서, 항-CD40 항체는 SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 11 및 SEQ ID NO: 12로 제시된 바와 같은 상보성 결정 영역(CDR)을 포함한다. 소정의 구현예에서, 항-CD40 항체는 SEQ ID NO: 5로 제시된 바와 같은 중쇄 가변 영역 및 SEQ ID NO: 6으로 제시된 바와 같은 경쇄 가변 영역을 포함한다. 소정의 구현예에서, 항-CD40 항체는 SEQ ID NO: 3으로 제시된 중쇄 및 SEQ ID NO: 4로 제시된 경쇄를 포함한다. 소정의 구현예에서, n은 2이다. 소정의 구현예에서, n은 4이다.

[0125] R¹이 플루오로이며, R²가 플루오로이고, R³이 -P(=O)(OH)₂인 소정의 구현예에서, 화학식 (I-d)의 라디칼을 포함하는 항체 약물 공액체, 또는 화학식 (II-d)의 항체 약물 공액체가 제공된다:



[0126]

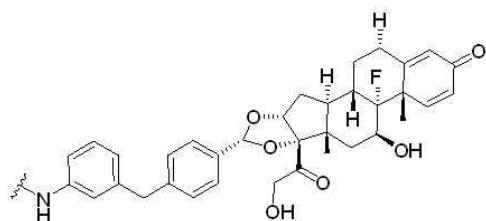
소정의 구현예에서, R은 결합이다. 소정의 구현예에서, R은 결합이며, m은 1이며, p는 1이고, q는 0이다. 소정의 구현예에서, R은 결합이며, m은 1이며, p는 1이며, q는 0이고, -AA1-(AA2)_p-(AA3)_q-는 -Gly-Glu-; -Ala-Ala-; 및 -Gly-Lys-로 이루어진 군으로부터 선택된다. 소정의 구현예에서, R은 결합이며, m은 0이며, p는 1이고, q는 0 또는 1이다. 소정의 구현예에서, R은 결합이며, m은 0이며, p는 1이며, q는 0 또는 1이고, -AA1-(AA2)_p-(AA3)_q-는 -Gly-Glu-; -Ala-Ala-; -Glu-Ala-Ala-; -Gly-Lys-; -Glu-Ser-Lys-; 및 -Gly-Ser-Lys-로 이루어진 군으로부터 선택된다. 그러나, 소정의 구현예에서, -Ala-Ala- 및 -Glu-Ala-Ala-는 배제된다. 소정의 구현예에서, R은 결합이며, m은 0이며, p는 1이며, q는 0이고, -AA1-(AA2)_p-(AA3)_q-는 -Gly-Glu- 또는 -Gly-Lys-이다. 소정의 구현예에서, R은 결합이며, m은 0이며, p는 1이며, q는 1이고, -AA1-(AA2)_p-(AA3)_q-는 -Glu-Ser-Lys-; 및 -Gly-Ser-Lys-이다. 소정의 구현예에서, m이 0인 경우, w는 0이다. 소정의 구현예에서, m이 1인 경우, w는 1이다. 소정의 구현예에서, 항-CD40 항체는 SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 11 및 SEQ ID NO: 12로 제시된 바와 같은 상보성 결정 영역(CDR)을 포함한다. 소정의 구현예에서, 항-CD40 항체는 SEQ ID NO: 5로 제시된 바와 같은 중쇄 가변 영역 및 SEQ ID NO: 6으로 제시된 바와 같은 경쇄 가변 영역을 포함한다. 소정의 구현예에서, 항-CD40 항체는 SEQ ID NO: 3으로 제시된 중쇄 및 SEQ ID NO: 4로 제시된 경쇄를 포함한다. 소정의 구현예에서, n은 2이다. 소정의 구현예에서, n은 4이다.

[0127]

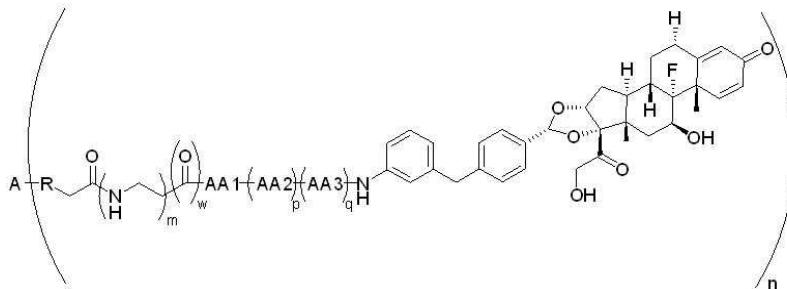
[0128]

[0129]

R¹이 플루오로이며, R²가 수소이고, R³이 수소인 소정의 구현예에서, 화학식 (I-e)의 라디칼을 포함하는 항체 약물 공액체, 또는 화학식 (II-e)의 항체 약물 공액체가 제공된다:



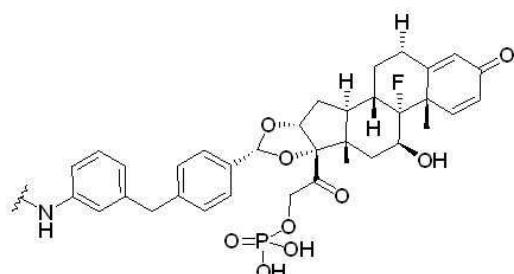
(I-e)



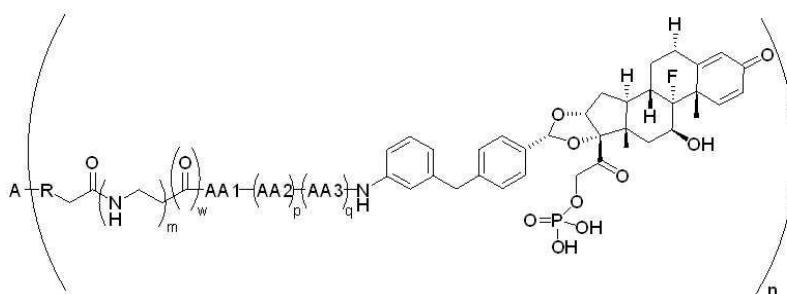
(II-e).

[0130] 소정의 구현예에서, R은 결합이다. 소정의 구현예에서, R은 결합이며, m은 1이며, p는 1이고, q는 0이다. 소정의 구현예에서, R은 결합이며, m은 1이며, p는 1이며, q는 0이고, -AA1-(AA2)_p-(AA3)_q-는 -Gly-Glu-; -Ala-Ala-; 및 -Gly-Lys-로 이루어진 군으로부터 선택된다. 소정의 구현예에서, R은 결합이며, m은 0이며, p는 1이고, q는 0 또는 1이다. 소정의 구현예에서, R은 결합이며, m은 0이며, p는 1이며, q는 0 또는 1이고, -AA1-(AA2)_p-(AA3)_q-는 -Gly-Glu-; -Ala-Ala-; -Glu-Ala-Ala-; -Gly-Lys-; -Glu-Ser-Lys-; 및 -Gly-Ser-Lys-로 이루어진 군으로부터 선택된다. 그러나, 소정의 구현예에서, -Ala-Ala- 및 -Glu-Ala-Ala-는 배제된다. 소정의 구현예에서, R은 결합이며, m은 0이며, p는 1이며, q는 0이고, -AA1-(AA2)_p-(AA3)_q-는 -Gly-Glu- 또는 -Gly-Lys-이다. 소정의 구현예에서, R은 결합이며, m은 0이며, p는 1이며, q는 1이고, -AA1-(AA2)_p-(AA3)_q-는 -Glu-Ser-Lys-; 및 -Gly-Ser-Lys-이다. 소정의 구현예에서, m이 0인 경우, w는 0이다. 소정의 구현예에서, m이 1인 경우, w는 1이다. 소정의 구현예에서, 항-CD40 항체는 SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 11 및 SEQ ID NO: 12로 제시된 바와 같은 상보성 결정 영역(CDR)을 포함한다. 소정의 구현예에서, 항-CD40 항체는 SEQ ID NO: 5로 제시된 바와 같은 중쇄 가변 영역 및 SEQ ID NO: 6으로 제시된 바와 같은 경쇄 가변 영역을 포함한다. 소정의 구현예에서, 항-CD40 항체는 SEQ ID NO: 3으로 제시된 중쇄 및 SEQ ID NO: 4로 제시된 경쇄를 포함한다. 소정의 구현예에서, n은 2이다. 소정의 구현예에서, n은 4이다.

[0133] R¹이 플루오로이며, R²가 수소이고, R³이 -P(=O)(OH)₂인 소정의 구현예에서, 화학식 (I-f)의 라디칼을 포함하는 항체 약물 공액체, 또는 화학식 (II-f)의 항체 약물 공액체가 제공된다:



(I-f)



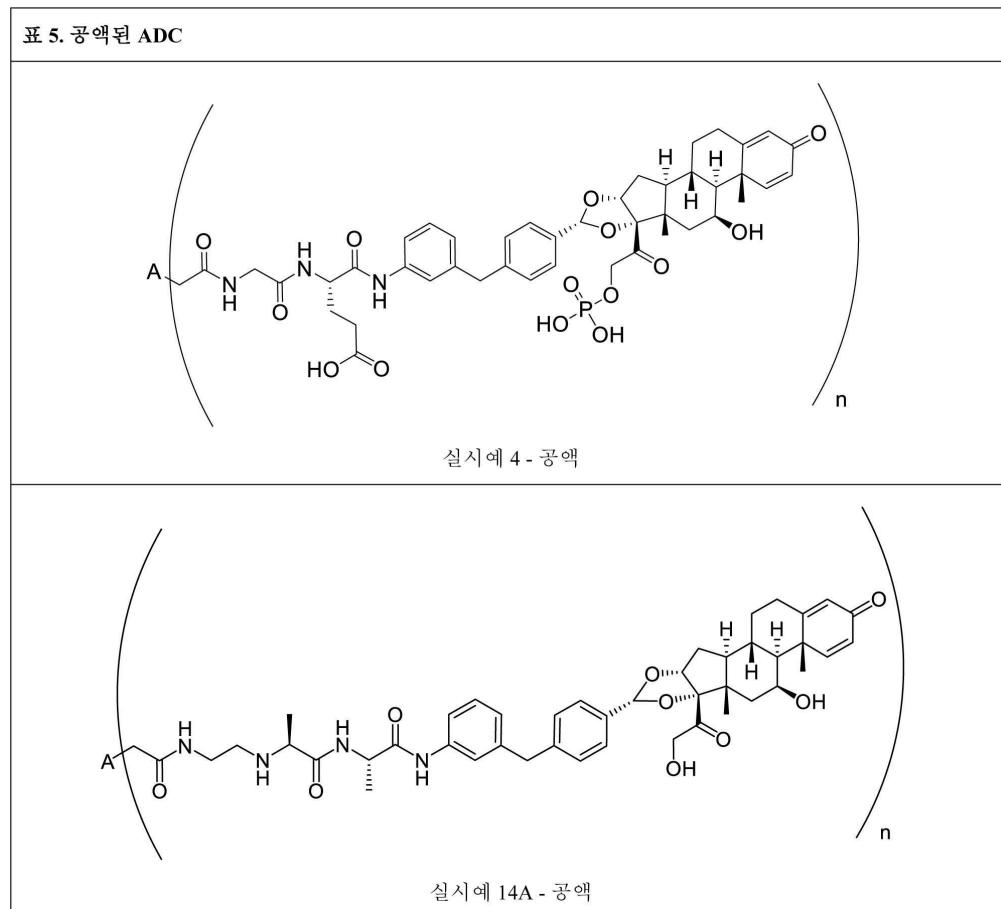
(II-f).

[0136]

소정의 구현예에서, R은 결합이다. 소정의 구현예에서, R은 결합이며, m은 1이며, p는 1이고, q는 0이다. 소정의 구현예에서, R은 결합이며, m은 1이며, p는 1이며, q는 0이고, -AA1-(AA2)_p-(AA3)_q-는 -Gly-Glu-; -Ala-Ala-; 및 -Gly-Lys-로 이루어진 군으로부터 선택된다. 소정의 구현예에서, R은 결합이며, m은 0이며, p는 1이고, q는 0 또는 1이다. 소정의 구현예에서, R은 결합이며, m은 0이며, p는 1이며, q는 0 또는 1이고, -AA1-(AA2)_p-(AA3)_q-는 -Gly-Glu-; -Ala-Ala-; -Glu-Ala-Ala-; -Gly-Lys-; -Glu-Ser-Lys-; 및 -Gly-Ser-Lys-로 이루어진 군으로부터 선택된다. 그러나, 소정의 구현예에서, -Ala-Ala- 및 -Glu-Ala-Ala-는 배제된다. 소정의 구현예에서, R은 결합이며, m은 0이며, p는 1이며, q는 0이고, -AA1-(AA2)_p-(AA3)_q-는 -Gly-Glu- 또는 -Gly-Lys-이다. 소정의 구현예에서, R은 결합이며, m은 0이며, p는 1이며, q는 1이고, -AA1-(AA2)_p-(AA3)_q-는 -Glu-Ser-Lys-; 및 -Gly-Ser-Lys-이다. 소정의 구현예에서, m이 0인 경우, w는 0이다. 소정의 구현예에서, m이 1인 경우, w는 1이다. 소정의 구현예에서, 항-CD40 항체는 SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 11 및 SEQ ID NO: 12로 제시된 바와 같은 상보성 결정 영역(CDR)을 포함한다. 소정의 구현예에서, 항-CD40 항체는 SEQ ID NO: 5로 제시된 바와 같은 중쇄 가변 영역 및 SEQ ID NO: 6으로 제시된 바와 같은 경쇄 가변 영역을 포함한다. 소정의 구현예에서, 항-CD40 항체는 SEQ ID NO: 3으로 제시된 중쇄 및 SEQ ID NO: 4로 제시된 경쇄를 포함한다. 소정의 구현예에서, n은 2이다. 소정의 구현예에서, n은 4이다.

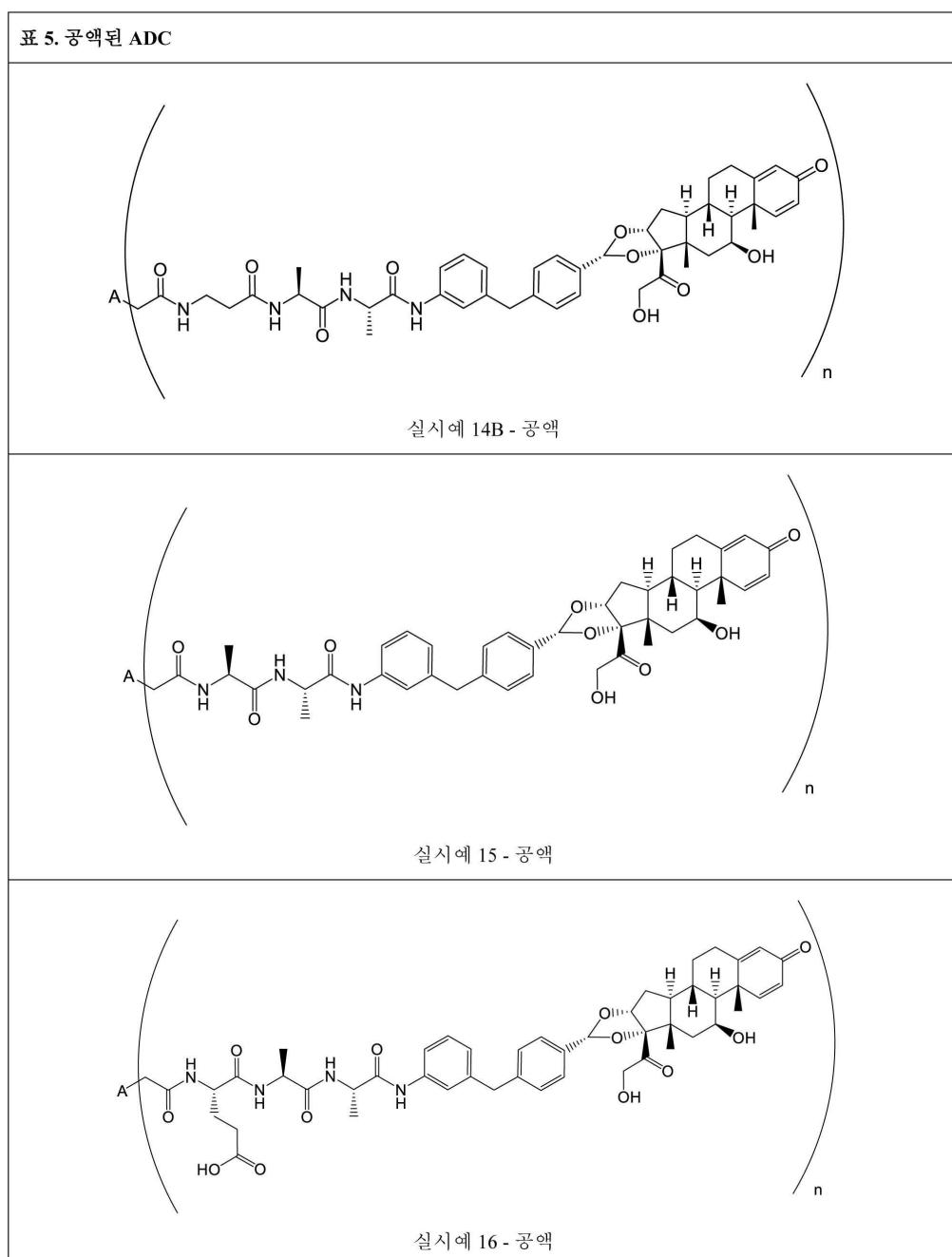
[0137]

화학식 (I)의 라디칼을 포함하는 항체 약물 공액체, 및 화학식 (II)의 항체 약물 공액체의 예는 표 5, 6A 및 6B에 열거된 항체 약물 공액체를 포함하고, 여기서, n은 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 또는 10이고, A는 항-CD40 항체이다.



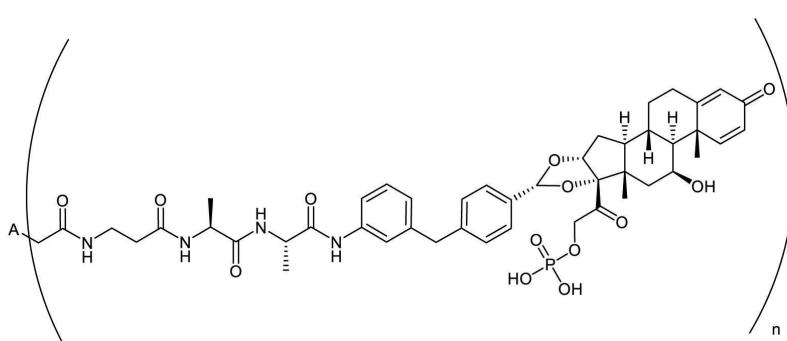
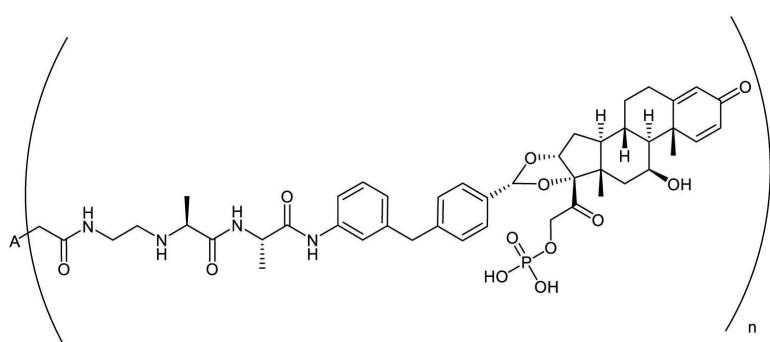
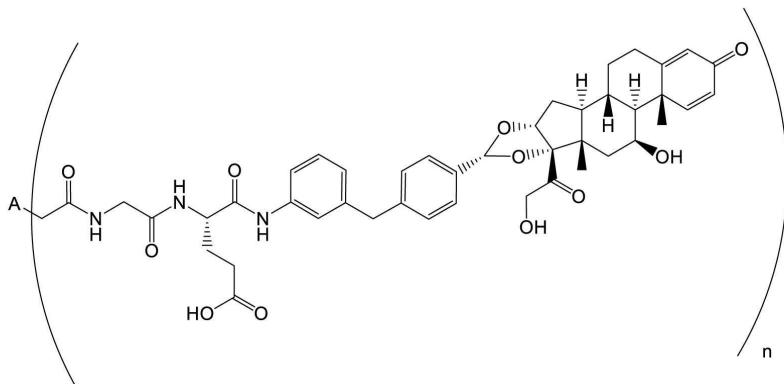
[0138]

표 5. 공액된 ADC



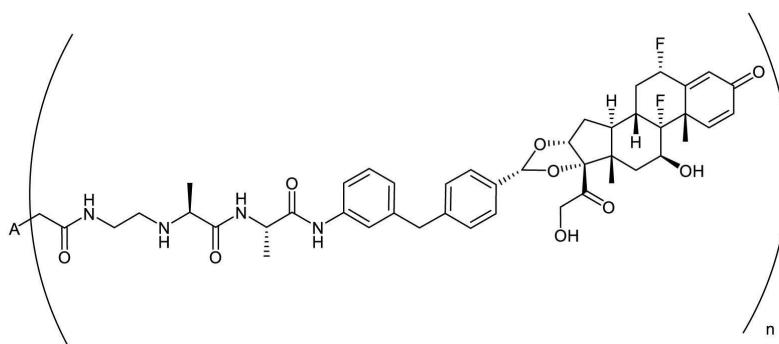
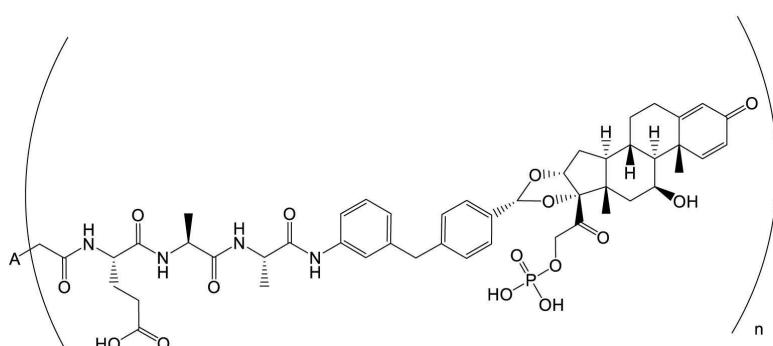
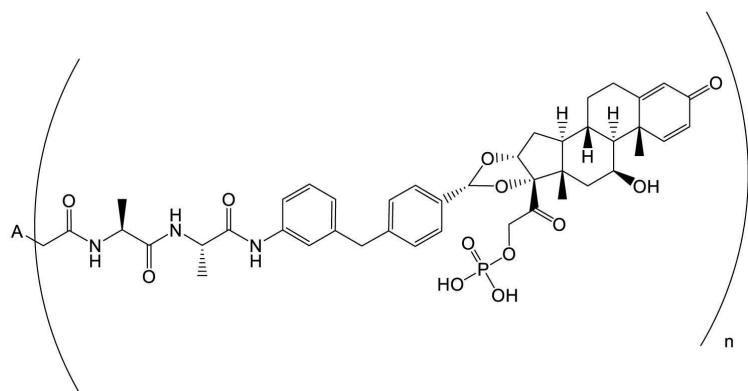
[0139]

표 5. 공액된 ADC



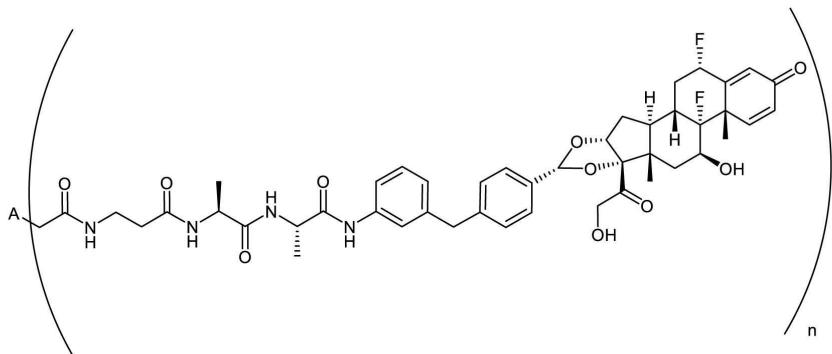
[0140]

표 5. 공액된 ADC

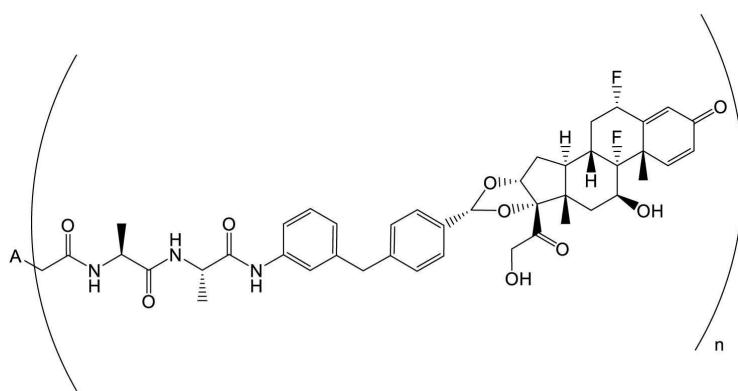


[0141]

표 5. 공액된 ADC



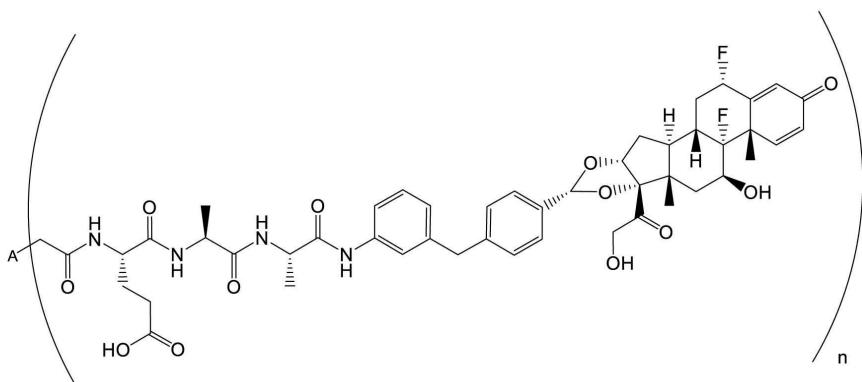
실시 예 21B - 공액



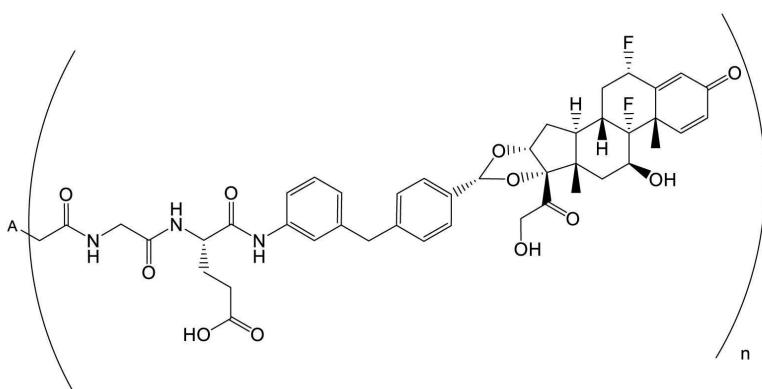
실시 예 22 - 공액

[0142]

표 5. 공액된 ADC



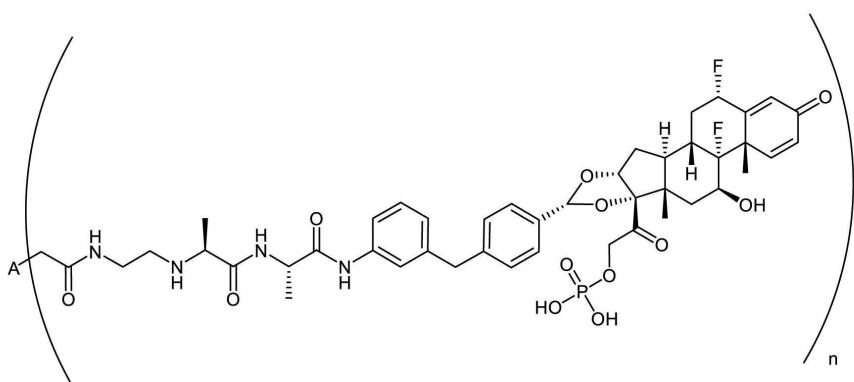
실시 예 23 - 공액



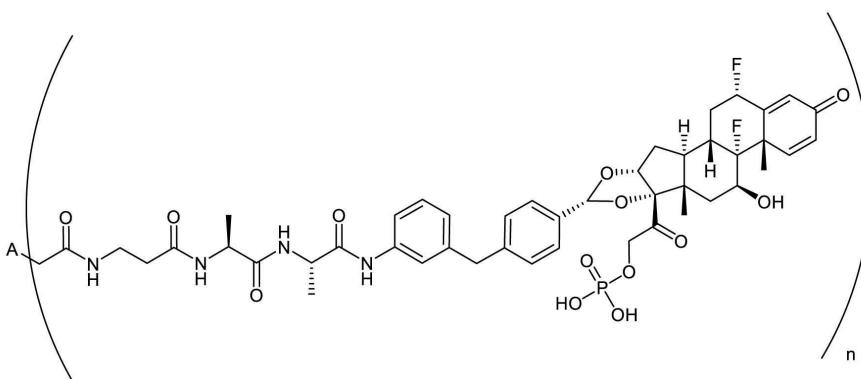
실시 예 24 - 공액

[0143]

표 5. 공액된 ADC



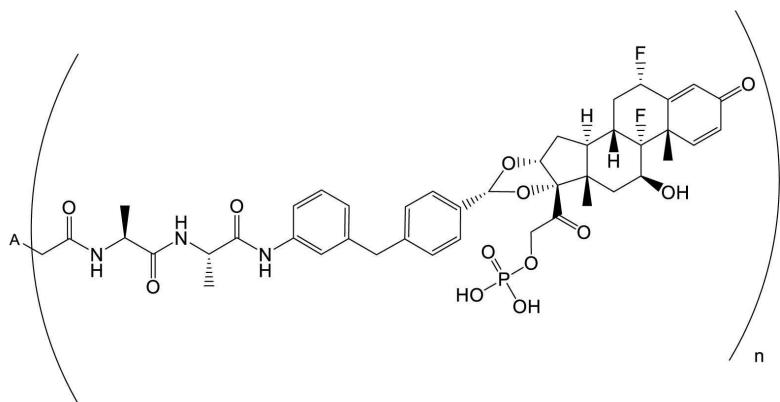
실시예 25A - 공액



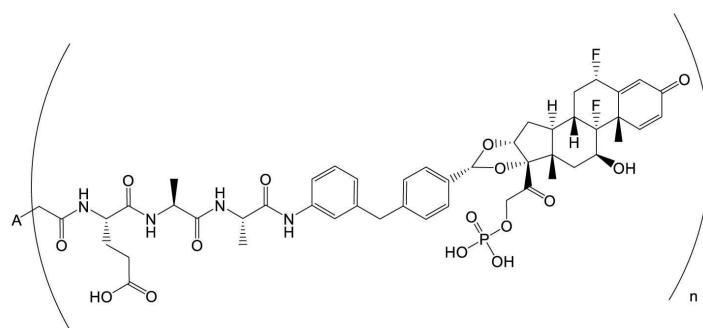
실시예 25B - 공액

[0144]

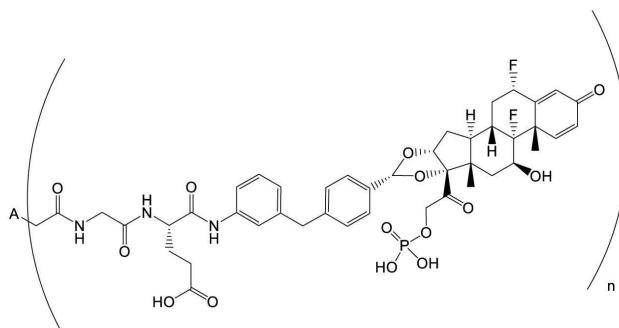
표 5. 공액된 ADC



실시 예 26 - 공액



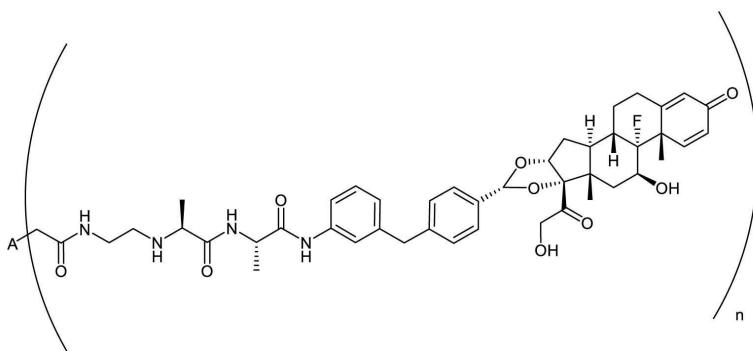
실시 예 27 - 공액



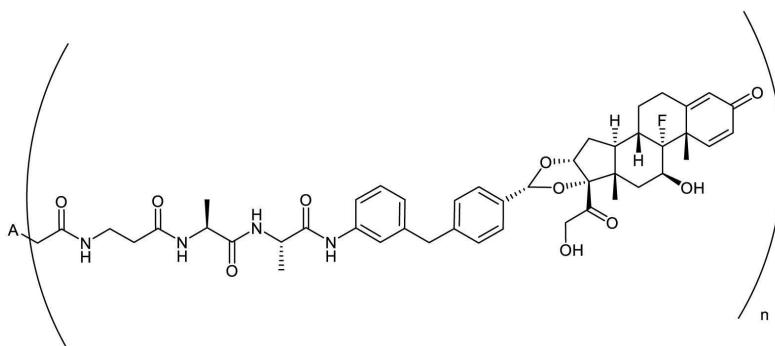
실시 예 28 - 공액

[0145]

표 5. 공액된 ADC



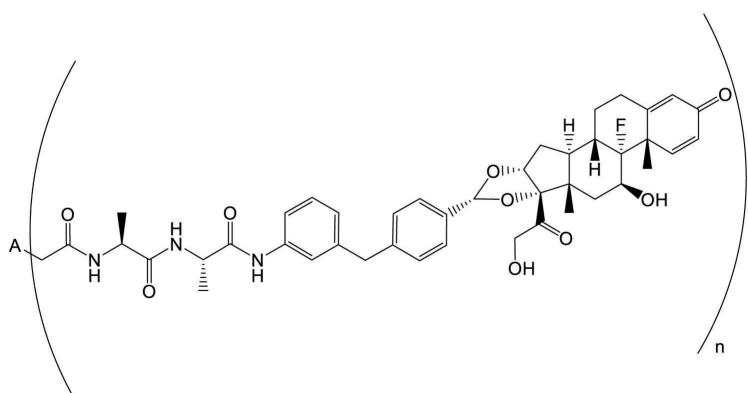
실시 예 29A - 공액



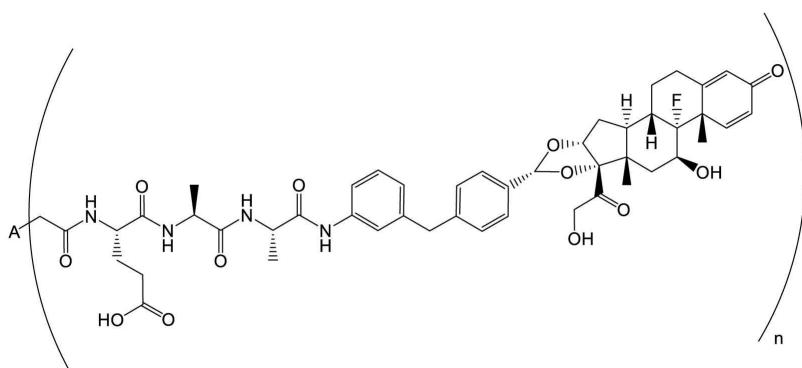
실시 예 29B - 공액

[0146]

표 5. 공액된 ADC



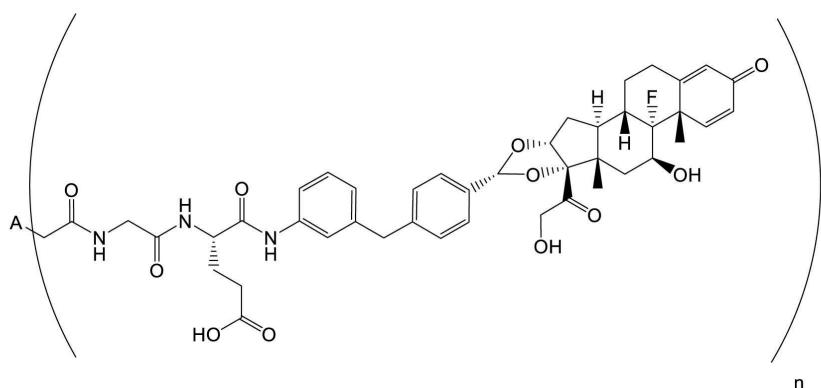
실시 예 30 - 공액



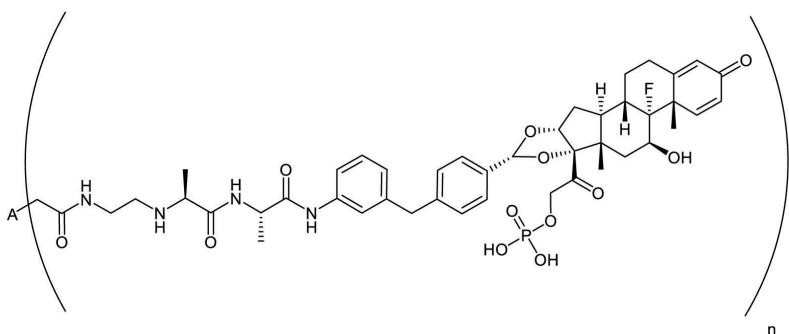
실시 예 31 - 공액

[0147]

표 5. 공액된 ADC



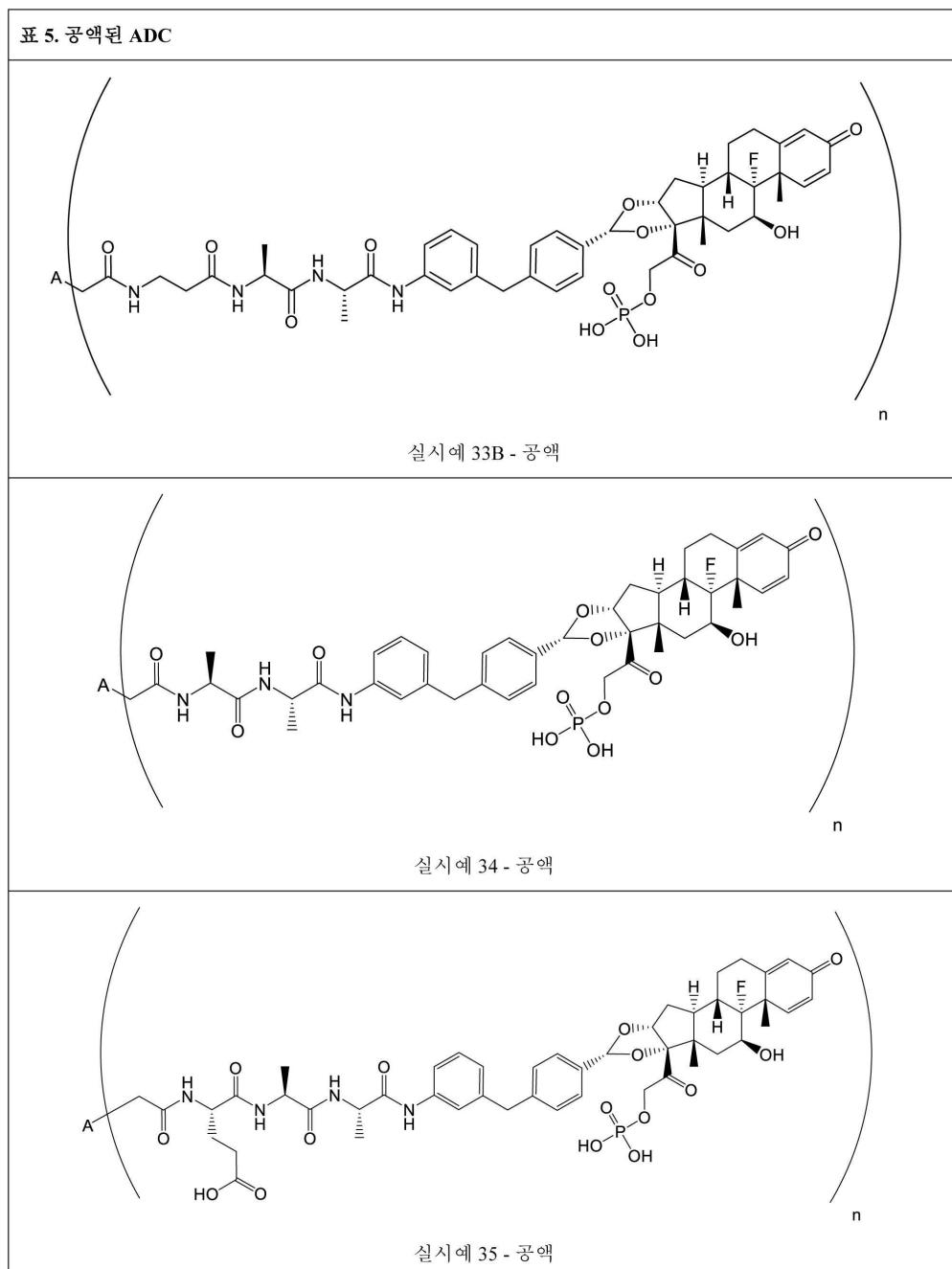
실시 예 32 - 공액



실시 예 33A - 공액

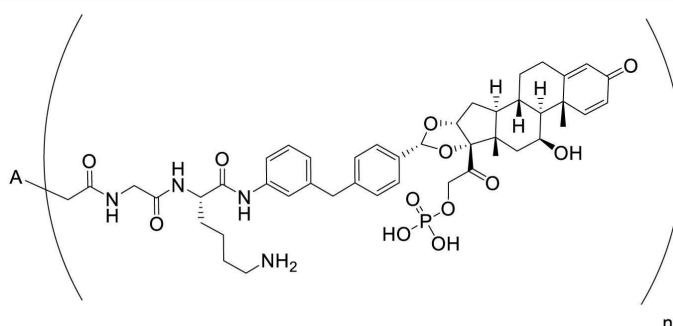
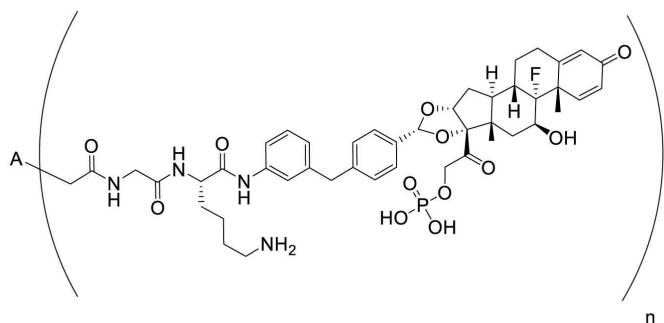
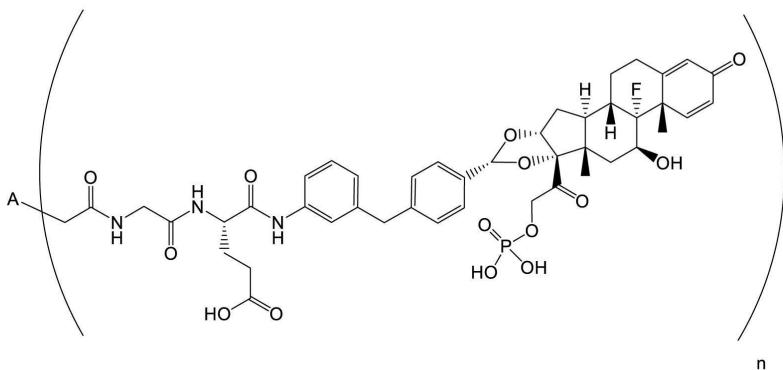
[0148]

표 5. 공액된 ADC



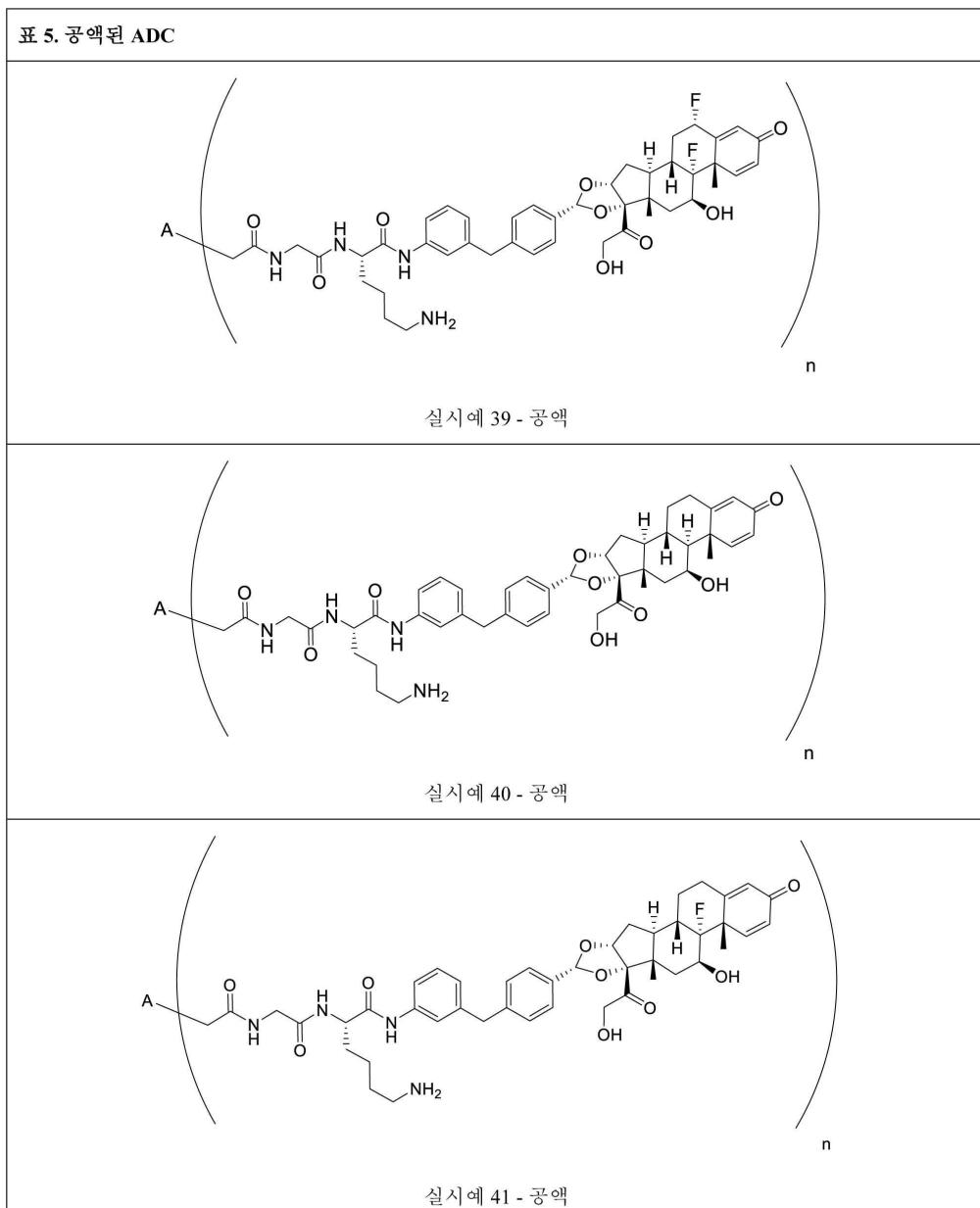
[0149]

표 5. 공액된 ADC



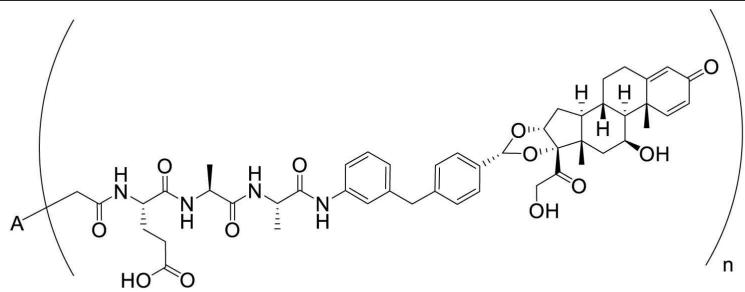
[0150]

표 5. 공액된 ADC

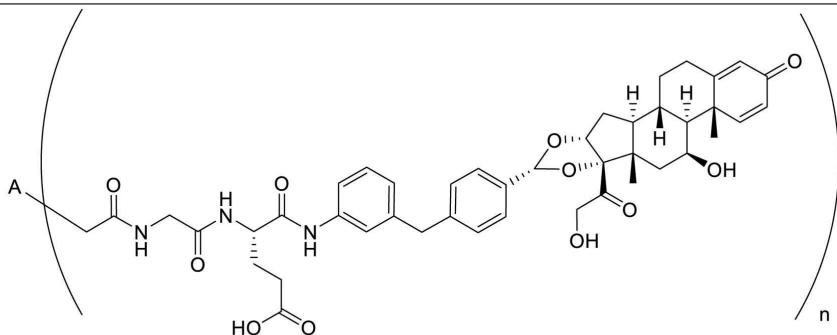


[0151]

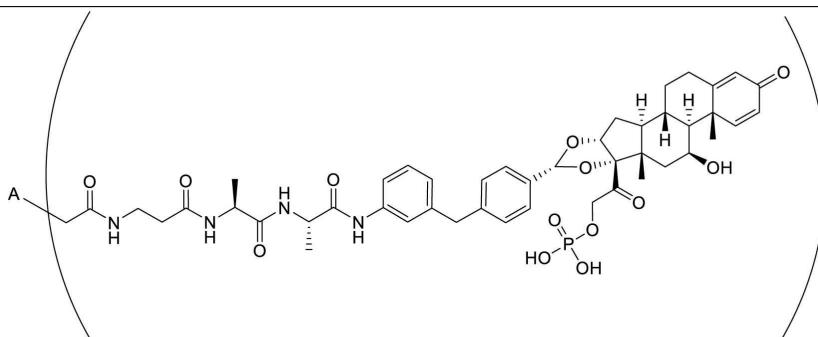
표 5. 공액된 ADC



실시예 42 - 공액



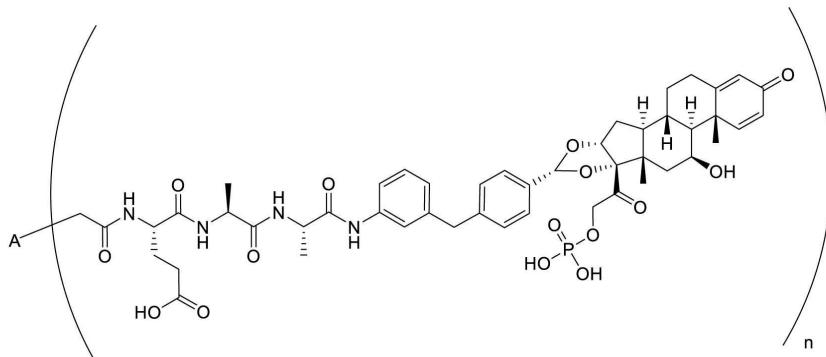
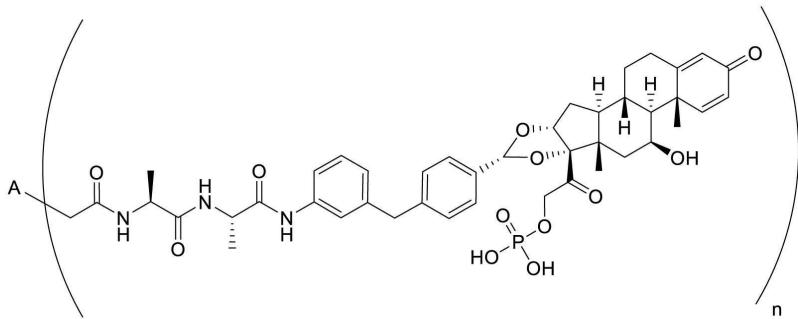
실시예 43 - 공액



신시예 44. 곤충

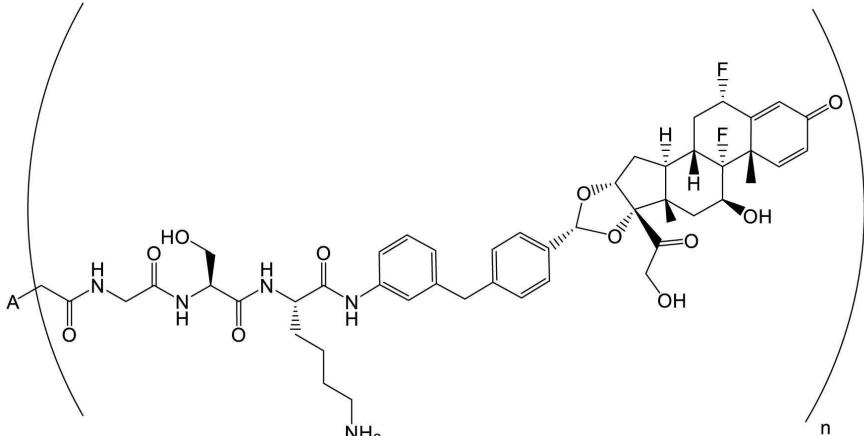
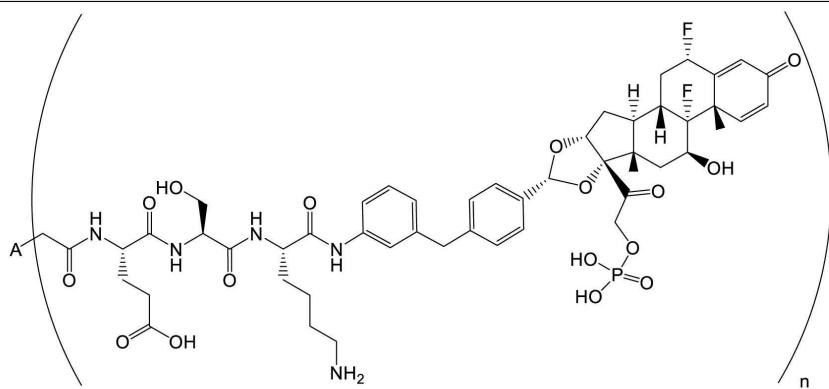
[0152]

표 5. 공액된 ADC



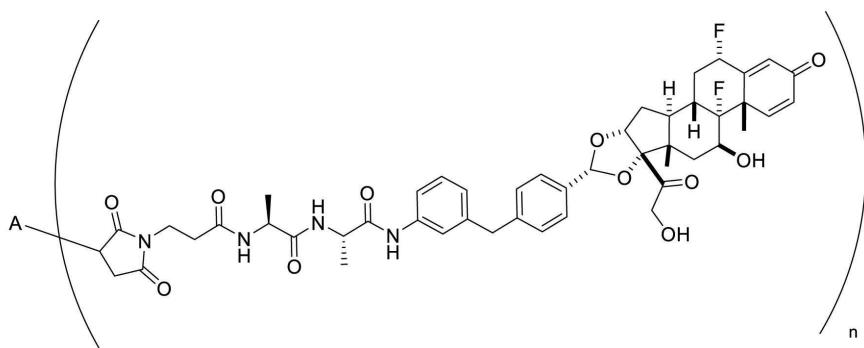
[0153]

표 5. 공액된 ADC

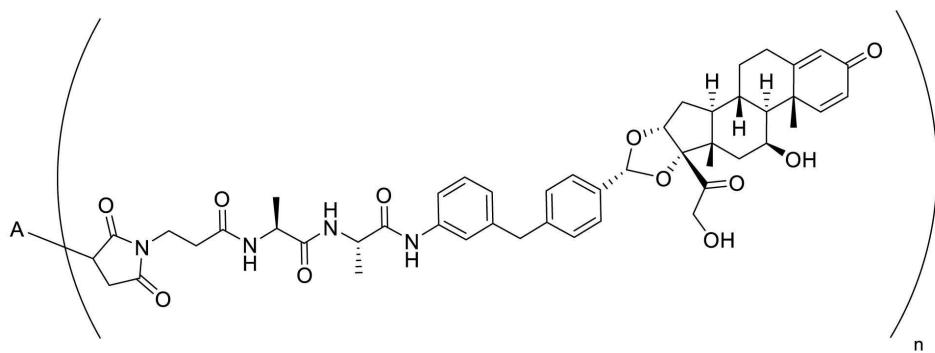


[0154]

표 6a. 공액된 ADC



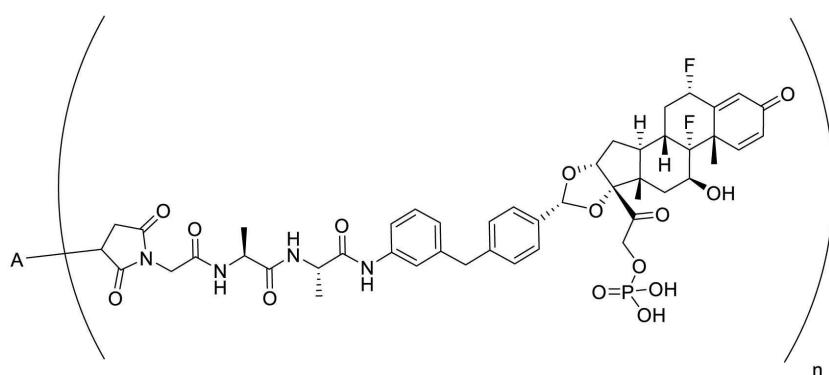
실시 예 6 - 공 액



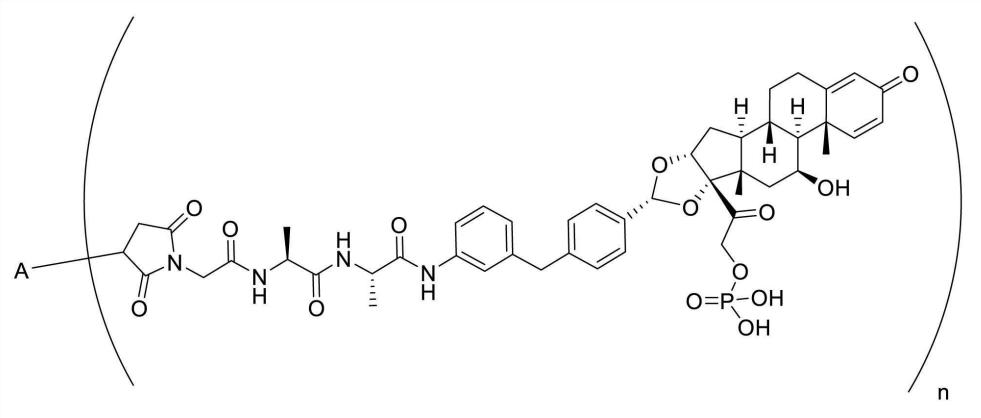
실시 예 7 - 공 액

[0155]

표 6a. 공액된 ADC

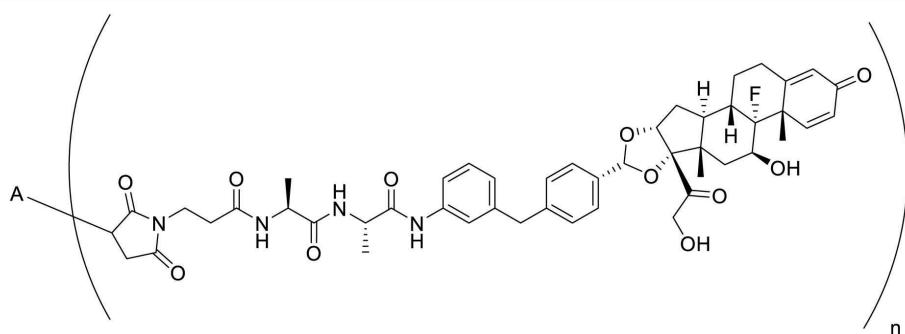


설시 예 12 - 공액

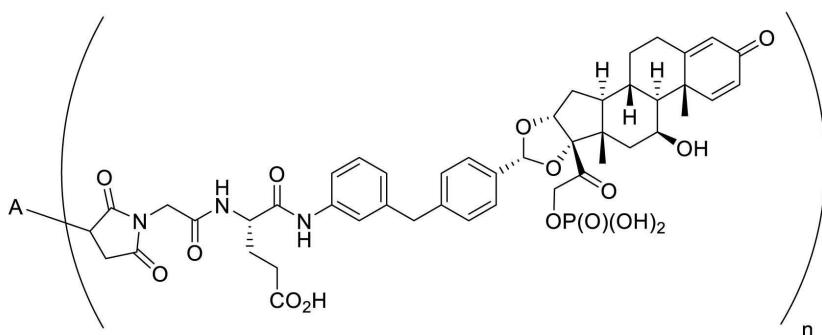


[0156]

표 6a. 공액된 ADC



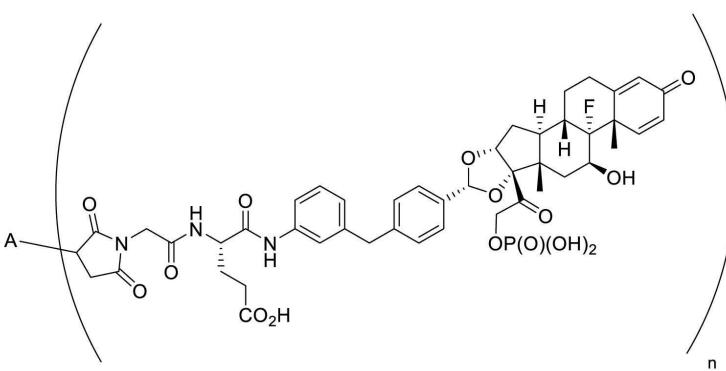
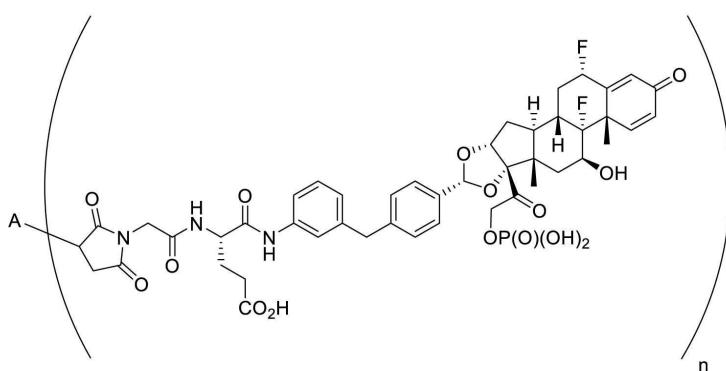
실시 예 8 - 공액



실시 예 9 - 공액

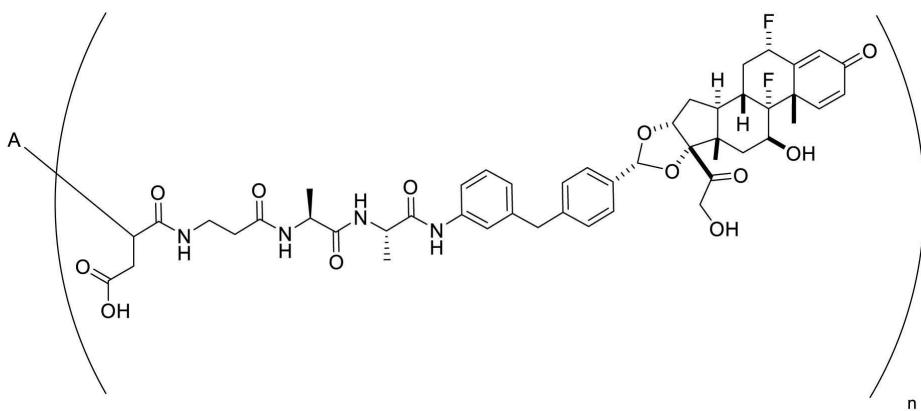
[0157]

표 6a. 공액된 ADC

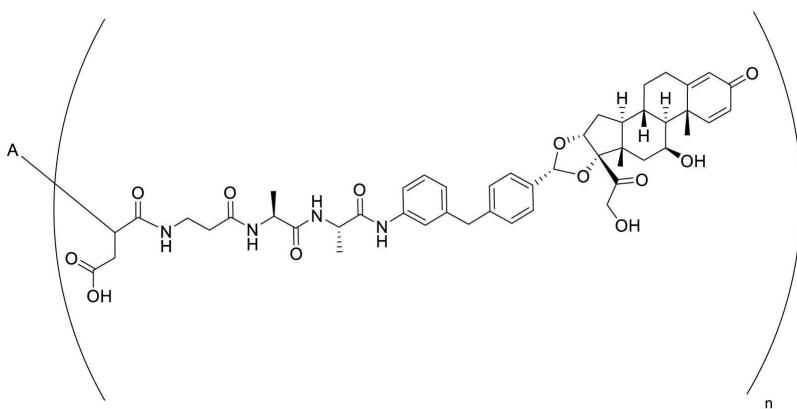


[0158]

표 6b. 공액되고 가수분해된 ADC



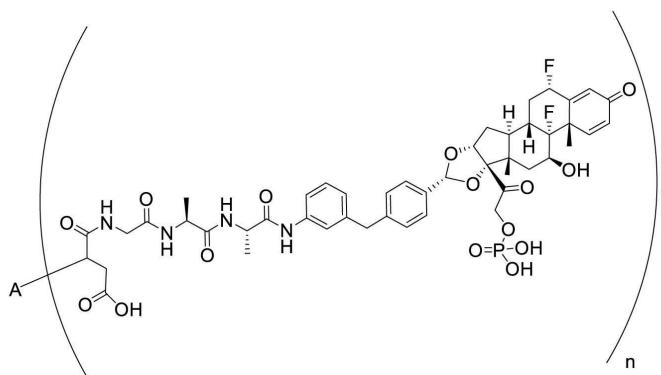
실시 예 6 - 가수분해



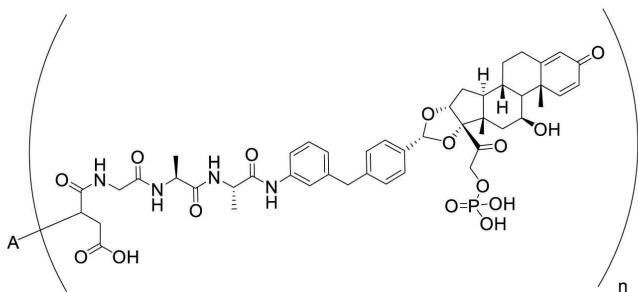
실시 예 7 - 가수분해

[0159]

표 6b. 공액되고 가수분해된 ADC



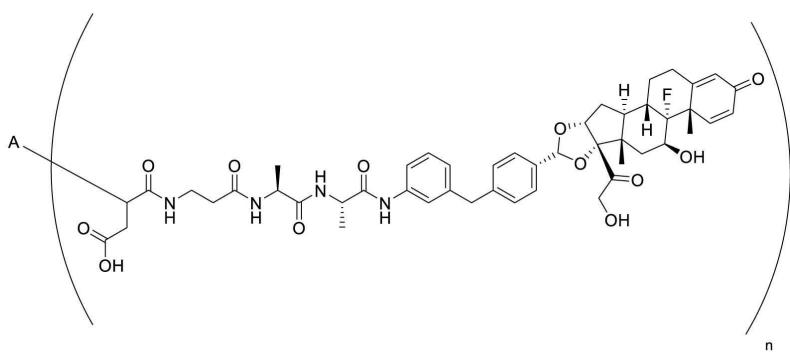
실시예 12 - 가수분해



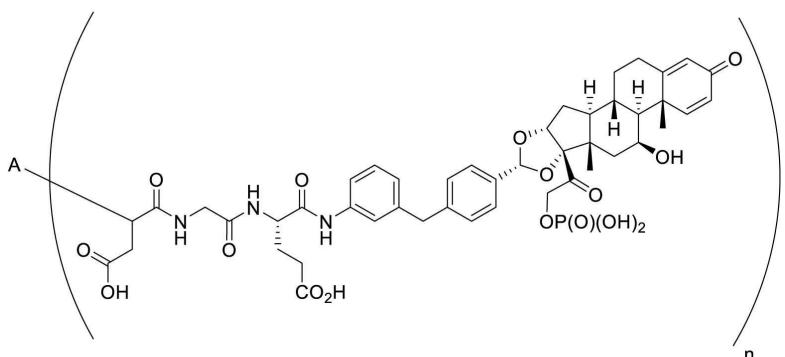
실시예 13 - 가수분해

[0160]

표 6b. 공액되고 가수분해된 ADC



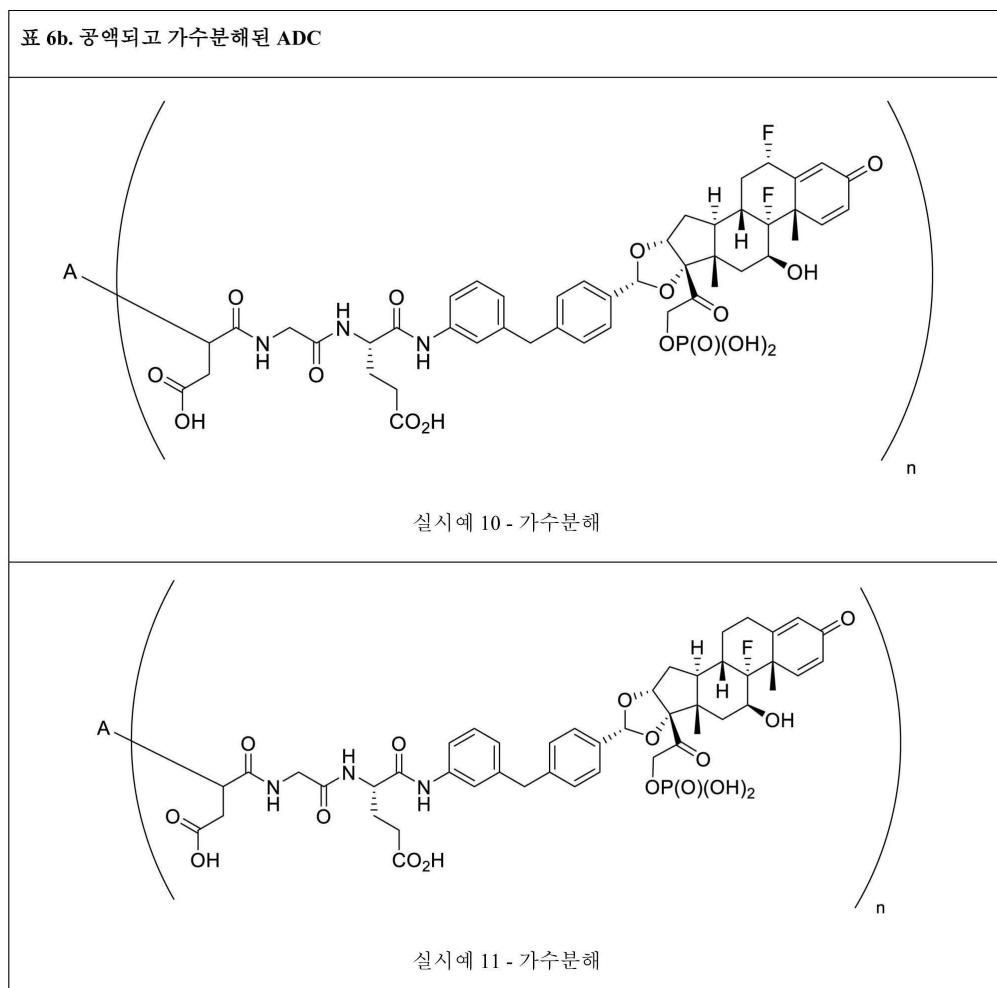
실시 예 8 - 가수분해



실시 예 9 - 가수분해

[0161]

표 6b. 공액되고 가수분해된 ADC



[0162]

[0163]

표 5의 소정의 구현예에서, 항체 약물 공액체는 실시예 4-공액 또는 실시예 28-공액이다. 소정의 구현예에서, 항-CD40 항체는 SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 11 및 SEQ ID NO: 12로 제시된 바와 같은 상보성 결정 영역(CDR)을 포함한다. 소정의 구현예에서, 항-CD40 항체는 SEQ ID NO: 5로 제시된 바와 같은 중쇄 가변 영역 및 SEQ ID NO: 6으로 제시된 바와 같은 경쇄 가변 영역을 포함한다. 소정의 구현예에서, 항-CD40 항체는 SEQ ID NO: 3으로 제시된 중쇄 및 SEQ ID NO: 4로 제시된 경쇄를 포함한다. 소정의 구현예에서, n은 2이다. 소정의 구현예에서, n은 4이다. 표 5의 소정의 구현예에서, 항체 약물 공액체는 실시예 4-공액, 실시예 28-공액, 또는 실시예 47-공액이며, 여기서, n은 2 또는 4이다. 표 5의 소정의 구현예에서, 항체 약물 공액체는 실시예 47-공액이며, 여기서, n은 2이다. 표 5의 소정의 구현예에서, 항체 약물 공액체는 실시예 47-공액이며, 여기서, n은 4이다. 표 5의 소정의 구현예에서, 항체 약물 공액체는 실시예 28-공액이며, 여기서, n은 2이다. 표 5의 소정의 구현예에서, 항체 약물 공액체는 실시예 28-공액이며, 여기서, n은 4이다.

[0164]

표 6a 및 6b의 소정의 구현예에서, 항체 약물 공액체는 실시예 6-공액, 실시예 6-가수분해, 실시예 7-공액, 실시예 7-가수분해, 실시예 12-공액, 실시예 12-가수분해, 실시예 13-공액 또는 실시예 13-가수분해이다. 소정의 구현예에서, 항체 약물 공액체는 실시예 6-가수분해, 실시예 7-가수분해, 실시예 12-가수분해 또는 실시예 13-가수분해이다. 소정의 구현예에서, 화합물은 실시예 6-가수분해, 실시예 7-가수분해 또는 실시예 12-가수분해이다. 소정의 구현예에서, 항체 약물 공액체는 실시예 12-가수분해 또는 실시예 13-가수분해이다. 소정의 구현예에서, 항-CD40 항체는 SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 11 및 SEQ ID NO: 12로 제시된 바와 같은 상보성 결정 영역(CDR)을 포함한다. 소정의 구현예에서, 항-CD40 항체는 SEQ ID NO: 5로 제시된 바와 같은 중쇄 가변 영역 및 SEQ ID NO: 6으로 제시된 바와 같은 경쇄 가변 영역을 포함한다. 소정의 구현예에서, 항-CD40 항체는 SEQ ID NO: 3으로 제시된 중쇄 및 SEQ ID NO: 4로 제시된 경쇄를 포함한다. 소정의 구현예에서, n은 2이다. 소정의 구현예에서, n은 4이다.

III. 사용 방법 및 약제학적 조성물

[0165]

시험관내 또는 생체내에서 사용될 수 있는 화학식 (I) 또는 (II)의 항체 약물 공액체가 본원에 제공된다. 따라

서, 소정의 생체내 사용을 위한 조성물, 예를 들어, 약제학적 조성물이 또한 제공되며, 상기 조성물은 생리학적으로 허용 가능한 담체, 부형제 또는 안정화제에서 요망되는 순도를 갖는 화학식 (I) 또는 (II)의 항체 약물 공액체를 포함한다(문헌[Remington's Pharmaceutical Sciences (1990) Mack Publishing Co., Easton, PA]). 허용 가능한 담체, 부형제 또는 안정화제는 이용되는 투약량 및 농도에서 수혜자에게 무독성이다.

- [0167] 생체내 투여에 사용되는 상기 조성물(예를 들어, 약제학적 조성물)은 멸균일 수 있으며, 이러한 멸균은 예를 들어, 멸균 여과 막을 통한 여과에 의해 달성될 수 있다. 생체내 투여에 사용되는 조성물(예를 들어, 약제학적 조성물)은 보존제일 수 있다.
- [0168] 항체 약물 공액체는 투약량 형태로 제제화되고 당업계의 지식에 따라 (예를 들어, 정맥내 투여 또는 주입을 통해) 투여될 수 있다.
- [0169] 본원에 기술된 항체 약물 공액체 및/또는 상기 항체 약물 공액체를 포함하는 약제학적 조성물은 CD40(시험관내 또는 생체내)을 발현하는 세포를 용해시키고/거나 증가된 CD40을 특징으로 하는 질환 또는 장애의 치료에 유용할 수 있다. 일부 구현예에서, 항체 약물 공액체 및/또는 조성물은 사이토카인 방출(시험관내 또는 생체내)을 저해하고/하거나 자가면역 또는 염증성 질환의 치료에 유용하다.
- [0170] 소정의 구현예에서, 치료를 필요로 하는 대상체에서 염증성 장 질환(IBD), 전신 홍반성 루푸스(SLE), 다발성 경화증, 류마티스 관절염, 쇼그렌 증후군 및 화농성 한선염(HS)으로 이루어진 군으로부터 선택되는 질병을 치료하는 방법이 제공되며, 상기 방법은 본원에 기술된 바와 같은 유효량의 항체 약물 공액체 또는 약제학적 조성물을 상기 대상체에게 투여하는 단계를 포함한다. 소정의 구현예에서, 질병은 염증성 장 질환(IBD)이다. 소정의 구현예에서, IBD는 궤양성 결장염(UC) 또는 크론 질환이다. 소정의 구현예에서, 질병은 전신 홍반성 루푸스(SLE)이다. 소정의 구현예에서, 질병은 다발성 경화증이다. 소정의 구현예에서, 질병은 류마티스 관절염이다. 소정의 구현예에서, 질병은 쇼그렌 증후군이다. 소정의 구현예에서, 질병은 화농성 한선염(HS)이다.
- [0171] 또 다른 구현예에서, 염증성 장 질환(IBD), 전신 홍반성 루푸스(SLE), 다발성 경화증, 류마티스 관절염, 쇼그렌 증후군 및 화농성 한선염(HS)으로 이루어진 군으로부터 선택되는 질병의 치료에 사용하기 위한, 본원에 기술된 바와 같은 항체 약물 공액체 또는 약제학적 조성물이 제공된다.
- [0172] 또 다른 구현예에서, 염증성 장 질환(IBD), 전신 홍반성 루푸스(SLE), 다발성 경화증, 류마티스 관절염, 쇼그렌 증후군 및 화농성 한선염(HS)으로 이루어진 군으로부터 선택되는 질병 치료용 약제의 제조를 위한, 본원에 기술된 바와 같은 항체 약물 공액체 또는 약제학적 조성물이 제공된다.
- [0173] 일부 구현예는 글루코코티코이드 수용체 효능제를 CD40-발현 세포에 전달하는 방법을 포함한다. 이러한 방법은 CD40-발현 세포를 본원에 기술된 바와 같은 항체 약물 공액체와 접촉시키는 단계를 포함할 수 있다. 일부 구현예는 글루코코티코이드 수용체 효능제를 CD40-발현 세포에 전달하는 시험관내 방법을 포함한다.
- [0174] 항체 약물 공액체의 항-염증성 활성을 결정하는 방법이 또한, 제공된다. 이러한 방법은 CD40-발현 세포를 본원에 기술된 바와 같은 항체 약물 공액체와 접촉시키는 단계를 포함할 수 있다. 일부 구현예는 CD40-발현 세포를 본원에 기술된 바와 같은 항체 약물 공액체와 접촉시키는 단계 및 대조군 세포와 비교하여 세포로부터의 전-염증성 사이토카인의 감소된 방출을 결정하는 단계를 포함한다. 일부 구현예는 항체 약물 공액체의 항-염증성 활성을 결정하는 시험관내 방법을 포함한다.
- [0175] 일부 구현예는 세포(예를 들어, CD40-발현 세포)를 항체 약물 공액체와 직접적으로 또는 간접적으로 접촉시키는 단계, 및 상기 항체 약물 공액체가 세포의 활성 또는 기능을 조정하는지를 예를 들어, 세포 형태(morphology) 또는 생존능의 변화, 마커의 발현, 분화 또는 탈-분화, 세포 호흡, 미토콘드리아 활성, 막 운전성, 돌연변이, 증식, 생존능, 세포자멸사 또는 세포 사멸로 반영되는 바와 같이 결정하는 단계를 포함하는 스크리닝 방법(예를 들어, 시험관내 방법)을 포함한다. 직접 상호작용의 일례는 물리적 상호작용인 한편, 간접 상호작용은 예를 들어, 다시 말해 기준 독립체(entity)(예를 들어, 세포 또는 세포 배양물)에 작용하는 중개(intermediary) 분자에 대한 조성물의 작용을 포함한다.
- [0176] 따라서, 소정의 구현예에서, 글루코코티코이드 수용체 효능제를 CD40-발현 세포에 전달하는 방법이 제공되며, 상기 방법은 상기 세포를 본원에 기술된 바와 같은 항체 약물 공액체 또는 약제학적 조성물과 접촉시키는 단계를 포함한다.
- [0177] 소정의 추가의 구현예에서, 항체 약물 공액체의 항-염증성 활성을 결정하는 방법이 제공되며, 상기 방법은 CD40-발현 세포를 본원에 기술된 바와 같은 항체 약물 공액체와 접촉시키는 단계; 및 대조군 세포와 비교하여

상기 세포로부터의 전-염증성 사이토카인의 감소된 방출을 결정하는 단계를 포함한다.

[0178] IV. 제조 물품

[0179] 본 개시내용은 또한, 하나 이상의 용기를 포함하는 약제학적 팩(pack) 및 키트를 포함하며, 여기서, 용기는 본원에 기술된 바와 같은 하나 이상의 용량의 항체 약물 공액체 또는 조성물을 포함할 수 있다. 소정의 구현예에서, 상기 팩 또는 키트는 단위 투약량을 함유하며, 이는 하나 이상의 부가적인 작용제와 함께 또는 없이 사전결정된(predetermined) 양의 조성물 또는 항체 약물 공액체를 의미한다.

[0180] 일부 구현예에서, 상기 키트는 비-수성 또는 수용액일 수 있는 하나 이상의 액체 용액에 제공된다. 일부 구현예에서, 용액은 멸균 용액이다. 키트 내의 조성물은 또한, 적절한 액체의 첨가 시 재구성(reconstitute)될 수 있는 건조된 분말(들)로서 또는 동결건조된 형태에 제공될 수 있다. 재구성에 사용되는 액체는 별개의 용기에 함유될 수 있다. 이러한 액체는 멸균, 약제학적으로 허용 가능한 완충제(들) 또는 다른 희석제(들), 예컨대 주사용 정균수(bacteriostatic water), 포스페이트-완충 식염수, 링거 용액 또는 텍스트로스 용액을 포함할 수 있다.

[0181] 키트는 하나 또는 다수의 용기, 및 상기 용기(들) 내의, 용기(들) 상의 또는 용기(들)와 연관된 표지 또는 패키지 삽입물을 포함할 수 있으며, 이는 봉입된 조성물은 선택 질환 질병을 치료하는 데 사용된다. 적합한 용기는 예를 들어, 병, 바이얼, 주사기 등을 포함한다. 상기 용기는 여러 가지 물질, 예컨대 유리 또는 플라스틱으로부터 형성될 수 있다. 용기(들)는 멸균 접근 포트를 포함할 수 있으며, 예를 들어, 용기는 피하(hypodermic) 주사바늘에 의해 관통될 수 있는 마개를 갖는 정맥내 용액 백(bag) 또는 바이얼일 수 있다.

[0182] 일부 구현예에서, 키트는 항체 약물 공액체 및 임의의 선택적인 구성성분을 이를 필요로 하는 대상체에게 투여하는 수단, 예를 들어, 하나 이상의 바늘 또는 주사기(사전-충전된 또는 비어 있는), 점안기, 파이펫, 또는 다른 것들, 예컨대 유사한 장치를 함유할 수 있으며, 이로부터 조성물은 대상체 내로 주사 또는 도입되거나 신체의 질환 영역에 적용될 수 있다. 본 개시내용의 키트는 또한 전형적으로, 바이얼 또는 이러한 유사한 것, 및 다른 구성성분을 상업적 판매를 위해 밀폐형 용기(confinement)에 함유하는 수단, 예컨대 중공-성형된 플라스틱 용기를 포함할 것이며, 이러한 용기 내로 요망되는 바이얼 및 다른 장치가 놓이고 보유된다.

[0183] 따라서, 소정의 구현예에서, 키트가 제공되며, 상기 키트는

[0184] (a) 본원에 기술된 바와 같은 항체 약물 공액체 또는 약제학적 조성물을 포함하는 용기; 및

[0185] (b) 하나 이상의 용기 상의 또는 용기와 연관된 표지 또는 패키지 삽입물로서, 여기서, 상기 표지 또는 패키지 삽입물은 상기 항체 약물 공액체 또는 약제학적 조성물이 염증성 장 질환(IBD), 전신 홍반성 루푸스(SLE), 다발성 경화증, 류마티스 관절염, 쇼그伦 증후군 및 화농성 한선염(HS)으로 이루어진 군으로부터 선택되는 질병을 치료하는 데 사용됨을 나타내는, 표지 또는 패키지 삽입물을 포함한다.

[0186] 실시예

[0187] 본원에 기술된 실시예 및 구현예는 단지 예시적인 목적을 위한 것이고, 이의 측면에서의 다양한 변형 또는 변화는 당업자에게 시사될 것이고 본 개시내용의 사상 및 범위 내에 포함되고자 하는 것으로 이해된다.

[0188] 분석 방법

[0189] 1. 저분자 분석 절차

[0190] 다르게 언급되지 않는 한, 모든 ^1H 및 ^{13}C NMR(핵 자기 공명) 데이터는 Varian Mercury Plus 400 MHz 또는 Bruker AVIII 300 MHz 장비 상에서 수합되었으며; 화학적 시프트(shift)는 백만분율(ppm; parts per million)로 표시된다. 고성능 액체 크로마토그래피(HPLC) 및 LCMS 분석 데이터는 실험 내에서 상술되거나 표 7에 열거된 질병을 참조로 한다.

표 7. LCMS 및 HPLC 방법의 목록

방법	조건
a	구배는 3.4 분 이내에 1-90% B, 0.45 분 이내에 90-100% B, 0.01 분 이내에 100-1% B 인 다음, 1% B 에서 0.65 분 동안 유지되었다(0.8 mL/분 유속). 이동상 A는 H ₂ O 중 0.0375% 트리플루오로 아세트산이었고, 이동상 B 는 아세토니트릴 중 0.018% 트리플루오로아세트산이었다. 크로마토그래피에 사용되는 컬럼은 2.0 X 50 mm Phenomenex Luna-C18 컬럼(5 μm 입자)이었다. 검출 방법은 다이오드 어레이(DAD) 및 증발 광 산란 검출기(ELSD)뿐만 아니라 양성 전기분무 이온화이다.
b	5-100% 아세토니트릴(A) 및 수중 0.1% 트리플루오로 아세트산(B)의 구배가 1.5 mL/분의 유속(0-0.05 분 5% A, 0.05-1.2 분 5-100% A, 1.2-1.4 분 100% A, 1.4-1.5 분 100-5% A. 0.25 분 진행-후(post-run) 지연)에서 사용되었다.
c	구배는 3.4 분 이내에 5-90% B, 0.45 분 이내에 90-100% B, 0.01 분 이내에 100-1% B 인 다음, 5% B 에서 0.65 분 동안 유지되었다(0.8 mL/분 유속). 이동상 A 는 10 mM NH ₄ HCO ₃ 이었고, 이동상 B 는 HPLC 등급 아세토니트릴이었다. 크로마토그래피에 사용되는 컬럼은 2.1 x 50 mm Xbridge Shield RPC18 컬럼(5 μm 입자)이다. 검출 방법은 다이오드 어레이(DAD) 및 증발 광 산란 검출기(ELSD)뿐만 아니라 양성 전기분무 이온화이다.
AA1	장비: Shimadzu LC-8A 분취 HPLC. 컬럼: Phenomenex Luna C18 200*40mm*10um. 이동상 A: H ₂ O (0.09 % 트리플루오로아세트산) 및 B: 아세토니트릴. 구배: 20 분 이내에 40%로부터 60%까지 B. 유속: 60 mL/분. 파장: 220 & 254 nm.
AA2	장비: Gilson 281 반-분취 HPLC 시스템. 이동상 A: 트리플루오로아세트산 /H ₂ O = 0.075 % v/v; B: 아세토니트릴. 컬럼: Nano-micro Kromasil C18 100*30 mm 5 um. 유속: 25 mL/분. 모니터 파장: 220 & 254 nm.
AA3	장비: Gilson 281 반-분취 HPLC 시스템. 이동상 A: 트리플루오로아세트산 /H ₂ O = 0.075 % v/v; B: 아세토니트릴. 컬럼: Phenomenex Synergi C18 100*30mm*4 um 유속: 25 mL/분. 모니터 파장: 220 & 254 nm.
AA4	구배는 3.4 분 이내에 1-90% B, 0.45 분 이내에 90-100% B, 0.01 분 이내에 100-1% B 인 다음, 1% B 에서 0.65 분 동안 유지되었다(0.8 mL/분 유속). 이동상 A: 수중 0.0375% 트리플루오로아세트산, B: 아세토니트릴 중 0.018% 트리플루오로아세트산. 크로마토그래피에 사용되는 컬럼은 2.0 x 50 mm Phenomenex Luna-C18 컬럼(5 μm 입자)이었다. 검출 방법은 DAD 및 ELSD 검출뿐만 아니라 양성 전기분무 이온화이다 (MS).

[0191]

표 7. LCMS 및 HPLC 방법의 목록

방법	조건
AA5	장비: Gilson 281 반-분취 HPLC 시스템. 이동상 A: 트리플루오로아세트산 /H ₂ O=0.075% v/v; B: 아세토니트릴. 컬럼: Luna C18 100*30 5um. 유속: 25 mL/분. 모니터 파장: 220 & 254 nm. 구배 B 25 - 10 분에 걸쳐 100%.
AA6	장비: Shimadzu LC-8A 분취 HPLC. 컬럼: Phenomenex Luna C18 200*40 mm*10 um. 이동상 A: H ₂ O (0.09 % 트리플루오로아세트산); B: 아세토니트릴. 구배: 20 분 이내에 15%로부터 45%까지 B. 유속: 60 mL/분. 파장: 220 & 254 nm.
AA7	장비: Shimadzu LC-8A 분취 HPLC. 컬럼: Phenomenex Luna C18 200*40 mm*10 um. 이동상 A: H ₂ O 및 B: 아세토니트릴. 구배: 30 분 이내에 50%로부터 100%까지 B.. 유속: 60 mL/분. 파장: 220 & 254 nm.
AA8	컬럼: Phenomenex Luna C18 200*40mm*10 um. 이동상 A: H ₂ O (0.09 % 트리플루오로아세트산) 및 B: 아세토니트릴. 구배: 20 분 이내에 35%로부터 55%까지 B.. 유속: 60 mL/분. 파장: 220 & 254 nm.
AA9	장비: Gilson 281 반-분취 HPLC 시스템. 이동상 A: 트리플루오로아세트산 /H ₂ O=0.075% v/v; B: 아세토니트릴. 컬럼: Luna C18 100*30 5 um. 유속: 15 mL/분. 모니터 파장: 220 & 254 nm. 구배 B 15 - 10 분에 걸쳐 100%.
AA10	장비: Shimadzu LC-8A 분취 HPLC. 컬럼: Phenomenex Luna C18 200*40mm*10 um. 이동상 A H ₂ O (0.09% 트리플루오로아세트산) 및 B: 아세토니트릴. 구배: 20 분 이내에 20%로부터 40%까지 B.. 유속: 60 mL/분. 파장: 220 & 254 nm.
AA11	장비: Gilson 281 반-분취 HPLC 시스템. 이동상 A: 트리플루오로아세트산 /H ₂ O=0.075% v/v; B: 아세토니트릴. 컬럼: Luna C18 100*30 5 um. 유속: 15 mL/분. 모니터 파장: 220 & 254 nm. 구배 B 50 - 10 분에 걸쳐 100%.
AA12	장비: Gilson 281 반-분취 HPLC 시스템. 이동상 A: 트리플루오로아세트산 /H ₂ O=0.075% v/v; B: 아세토니트릴. 컬럼: Luna C18 100*30 5um. 유속: 25 mL/분. 모니터 파장: 220 & 254 nm. 구배 B 10 - 10 분에 걸쳐 100%.
AA13	구배는 0.7 분 이내에 5-95% B, 0.45 분 이내에 95-95% B, 0.01 분 이내에 95-5% B 인 다음, 0% B에서 0.44 분 동안 유지되었다(1.5 mL/분 유속). 이동상 A: 수중 0.0375% 트리플루오로아세트산, 이동상 B: 아세토니트릴 중 0.018% 트리플루오로아세트산. 크로마토그래피에 사용되는 컬럼은 Chromolith Flash RP-18e 25-2 mm 컬럼이다. 검출 방법은 DAD 및 ELSD 검출뿐만 아니라 양성 전기분무 이온화이다(MS).
AA14	장비: Shimadzu LC-8A 분취 HPLC. 컬럼: Phenomenex Luna C18 200*40 mm*10 um. 이동상 A: H ₂ O (0.05% 트리플루오로아세트산) 및 B: 아세토니트릴. 구배: 30 분 이내에 30%로부터 100%까지 B. 유속: 60 mL/분. 파장: 220 & 254 nm.

표 7. LCMS 및 HPLC 방법의 목록

방법	조건
AA15	구배는 4 분 이내에 10-80% B 였고, 80% B에서 0.9 분 동안 유지되고, 0.01 분 이내에 80-10% B인 다음, 10% B에서 1 분 동안 유지되었다(0.8 mL/분 유속). 이동상 A는 수중 0.0375% 트리플루오로아세트산이었고, 이동상 B는 아세토니트릴 중 0.018% 트리플루오로아세트산이었다. 크로마토그래피에 사용되는 컬럼은 2.0 x 50 mm phenomenex Luna-C18 컬럼(5 μm 입자)이었다. 검출 방법은 DAD이다.
AA16	구배는 8.00 분 이내에 15-100% B 였고, 100% B에서 2 분 동안 유지되고, 0.01 분 이내에 100-15% B인 다음, 15% B에서 5.00 분 동안 유지되었고, 유속은 0.80 mL/분이었다. 이동상 A는 10 mM 암모늄 비카르보네이트였고, 이동상 B는 HPLC 등급 아세토니트릴이었다. 크로마토그래피에 사용된 컬럼은 2.1*50mm Xbridge Shield RPC18 컬럼(5 um 입자)이었다.. 검출 방법은 DAD 및 ELSD 검출뿐만 아니라 양성 전기분무 이온화이다.
AA17	장비: Shimadzu LC-8A 분류 HPLC. 컬럼: Phenomenex Luna C18 200*40 mm*10 um. 이동상: H ₂ O(0.09 % 트리플루오로아세트산)에 대해 A 및 아세토니트릴에 대해 B. 구배: 20 분 이내에 30%로부터 40%까지 B. 유속: 60 mL/분. 파장: 220&254 nm
AA18	구배는 1.0 분 이내에 5-95% B, 0.80 분 이내에 95-100% B, 0.01 분 이내에 100-5% B인 다음, 5% B에서 0.39 분 동안 유지되었다(1.0 mL/분 유속). 이동상 A는 수중 0.0375% TFA 이었고, 이동상 B는 MeCN 중 0.018% TFA 이었다. 크로마토그래피에 사용되는 컬럼은 ZORBAX Eclipse XDB-C18 2.1*30 mm, 3.5 um 이었다. 검출 방법은 다이오드 어레이(DAD) 및 양성 전기분무 이온화(MS)이다.
AA19	구배는 1.15 분 이내에 10-90% B 였고, 90% B에서 0.50 분 동안 유지되고, 0.01 분 이내에 90-10% B인 다음, 10% B에서 0.34 분 동안 유지되었다. 이동상 A는 수중 10 mM NH ₄ HCO ₃ 였고, 이동상 B는 MeCN 이었다. 크로마토그래피에 사용되는 컬럼은 Xbridge Shield RP18 2.1*50 mm, 5 um 이었다. 검출 방법은 다이오드 어레이(DAD) 및 양성 전기분무 이온화(MS)이다. 시스템 유속은 0.8 mL/분(0.00-1.51 분) 1.2 mL/분(1.52-2.00 분)이었다.
AA20	장비: Gilson 281 반-분류 HPLC 시스템. 이동상: A: NH ₄ OH/H ₂ O=0.040% v/v; B: MeCN. 컬럼: YMC-Actus Triart C18 100*30mm*5um. 유속: 25 mL/분. 모니터 파장: 220 & 254 nm. 구배 B 12 분에 걸쳐 10 내지 30%.

[0193]

2. ADC 분석 절차

[0194]

ADC를 음이온 교환 크로마토그래피(AEC) 또는 소수성 상호작용 크로마토그래피(HIC)에 의해 프로파일링하여, ADC의 공액 및 순도의 정도를 결정하였다.

[0195]

음이온 교환 크로마토그래피(AEC).

[0196]

대략 20 ug의 ADC를 4 X 250 mm PropacTM WAX-10 컬럼(Tosoh Bioscience, cat. 054999)이 장착된 Ultimate 3000 Dual LC 시스템(Thermo Scientific) 상으로 로딩하였다. 컬럼을 100% 완충제 A로 평형화시키고, 1.0 mL/분에서 18분에 걸쳐 100% 완충제 A로부터 100% 완충제 B까지 선형 구배를 사용하여 용출하였으며, 이때, 완충제 A는 20 mM MES, pH 6.7이고, 완충제 B는 20 mM MES, 500 소듐 클로라이드, pH 6.7이다.

[0197]

소수성 상호작용 크로마토그래피(HIC).

[0198]

대략 20 ug의 ADC를 4.6 X 35 mm 부틸-NPR 컬럼(Tosoh Bioscience, cat. 14947)이 장착된 Ultimate 3000 Dual LC 시스템(Thermo Scientific) 상으로 로딩하였다. 컬럼을 100% 완충제 A로 평형화시키고, 0.8 mL/분에서 12분에 걸쳐 100% 완충제 A로부터 100% 완충제 B까지 선형 구배를 사용하여 용출하였으며, 이때, 완충제 A는 25 mM 소듐 포스페이트, 1.5 M 암모늄 살레이트, pH 7.0이고, 완충제 B는 25 mM 소듐 포스페이트, 25% 이소프로판올, pH 7.0이다.

[0199]

크기 배제 크로마토그래피(SEC).

[0200]

ADC의 크기 분포를 7.8 X 300 mm TSK-겔 3000SW_{XL} 컬럼(Tosoh Bioscience, cat. 08541)이 장착된 Ultimate 3000 Dual LC 시스템(Thermo Scientific)을 사용한 크기 배제 SEC에 의해 프로파일링하였다. 대략 20 ug의 ADC

를 컬럼 상으로 로딩하고, 1.0 mL/분의 유속에서 100 mM 소듐 살페이트, 100 mM 소듐 포스페이트, pH 6.8의 등용매(isocratic) 구배를 사용하여 17분에 걸쳐 용출하였다.

[0202] 응집 연구를 또한, SEC를 사용하여 수행할 수 있고, 겔 여과 표준(Bio-rad, 151-1901)에 의해 결정된 바와 같이 응집물 피크의 영역을 적분함으로써 응집물의 퍼센트를 측정할 수 있다.

[0203] 질량 분광법(MS).

[0204] 환원된 시료(10 μL)를 온도 조절된(5°C) CTC 자동시료화기(autosampler)를 통해 Agilent 6550 QToF LC/MS 시스템에 주입하였다. 시료 용출을 Waters C-4, 3.5 μm, 300 Å, 2.1 x 50 mm i.d. HPLC 컬럼 상에서 달성하였다. 이동상은: A: 수중 0.1% 포름산 및 B: 아세토니트릴 중 0.1% 포름산이고; 유속은 0.45 mL/분이었고, 컬럼 구획은 40°C에서 유지되었다. HPLC 구배는 하기와 같다:

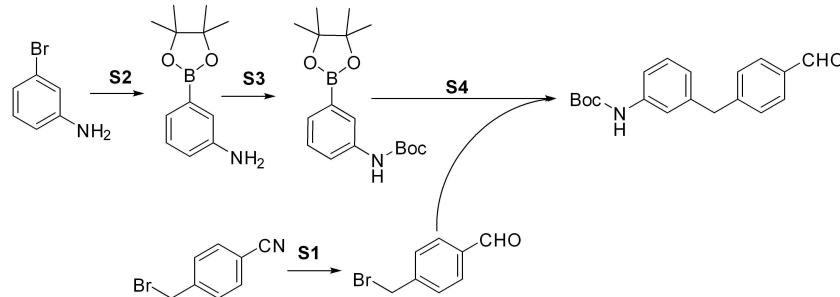
표 8. LCMS에 대한 구배

시간(분)	%A	%B
0	95	5
0.6	95	5
1.1	10	90
2.2	10	90
2.4	95	5
3.5	95	5

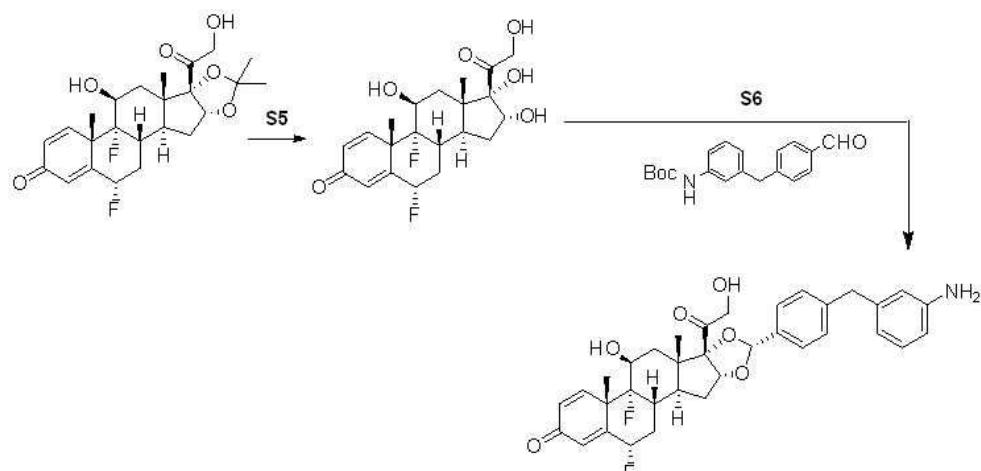
[0205]

[0206] 전구체 분자의 합성

[0207] 전구체 실시예 1: (2S,6aS,6bR,7S,8aS,8bS,10R,11aR,12aS,12bS)-10-(4-(3-아미노벤질)페닐)-2,6b-디플루오로-7-하이드록시-8b-(2-하이드록시아세틸)-6a,8a-디메틸-1,2,6a,6b,7,8,8a,8b,11a,12,12a,12b-도데카하이드로-4H-나프토[2',1':4,5]인데노[1,2-d][1,3]디옥솔-4-온의 합성



[0208]



[0209]

[0210] 단계 1: 4-(브로모메틸)벤즈알데하이드의 합성. 디이소부틸알루미늄 하이드라이드(153 mL, 153 mmol, 톨루엔 중 1 M)를 톨루엔(400 mL) 중 4-(브로모메틸)벤조니트릴(20 g, 102 mmol)의 0°C 용액에 1시간에 걸쳐 적가하였다. 2개의 부가적인 반응을 상기 기술된 바와 같이 설정하였다. 모든 3개의 반응 혼합물을 조합하였다. 혼합물에 10% 수성 HCl(1.5 L)을 첨가하였다. 혼합물을 디클로로메탄(3 x 500 mL)으로 추출하였다. 유기층을 Na2SO4에

걸쳐 건조하고, 여과하고, 감압 하에 농축시켰다. 잔여물을 실리카 겔(석유 에테르/ 에틸 아세테이트 = 10/1로 용출됨) 상에서의 컬럼 크로마토그래피에 의해 정제하여, 표제 화합물(50 g, 수율 82%)을 수득하였다. ^1H NMR (400MHz, CDCl_3) δ 10.02 (s, 1H), 7.91 - 7.82 (m, 2H), 7.56 (d, $J=7.9$ Hz, 2H), 4.55 - 4.45 (m, 2H).

[0211] 단계 2: 3-(4,4,5,5-테트라메틸-1,3,2-디옥사보를란-2-일)아닐린의 합성. 1,4-디옥산(480 mL) 중 3-브로모아닐린(40 g, 233 mmol)의 용액에 4,4,4',4',5,5,5',5'-테트라메틸-2,2'-비(1,3,2-디옥사보를란)(94 g, 372 mmol), 포타슘 아세테이트(45.6 g, 465 mmol), 2-디사이클로헥실포스피노-2',4',6'-트리-i-프로필-1,1'-비페닐(8.07 g, 13.95 mmol), 트리스(디벤질리텐아세톤)디팔라듐(0)(8.52 g, 9.30 mmol)을 첨가하였다. 그 후에, 생성된 혼합물을 80°C에서 4시간 동안 질소 하에 가열하였다. 부가적인 반응을 상기 기술된 바와 같이 설정하였다. 2개의 반응 혼합물을 조합하고, 농축시키고, 잔여물을 실리카 겔(석유 에테르: 에틸 아세테이트 = 10:1로 용출됨) 상에서의 컬럼 크로마토그래피에 의해 정제하여, 표제 화합물(60 g, 수율 55.4%)을 수득하였다. ^1H NMR (400MHz, CDCl_3) δ 7.23 - 7.13 (m, 3H), 6.80 (d, $J=7.5$ Hz, 1H), 3.82 - 3.38 (m, 2H), 1.34 (s, 12H).

[0212] 단계 3: tert-부틸 (3-(4,4,5,5-테트라메틸-1,3,2-디옥사보를란-2-일)페닐) 카르바메이트의 합성. 전구체 실시 예 1, 단계 2로부터의 생성물(30 g, 137 mmol) 및 디-tert-부틸 디카르보네이트(38.9 g, 178 mmol)를 틀루엔(600 mL)에서 100°C에서 24시간 동안 혼합하였다. 다른 반응을 상기 기술된 바와 같이 설정하였다. 2개의 반응 혼합물을 조합하고, 갈색 혼합물을 증발시키고, 에틸 아세테이트(1.5 L)에 용해시키고, 0.1 N HCl(3 x 2 L) 및 염수(3 L)로 세척하고, Na_2SO_4 에 걸쳐 건조하고, 여과하고, 감압 하에 농축시켜, 표제 화합물(50 g, 수율 57%)을 제공하였다. ^1H NMR (400MHz, CDCl_3) δ 7.63 (br m, 2H), 7.48 (d, $J=7.1$ Hz, 1H), 7.37 - 7.28 (m, 1H), 1.52 (s, 9H), 1.34 (s, 12H). Boc = tert-부톡시카르보닐.

[0213] 단계 4: tert-부틸 (3-(4-포르밀벤질)페닐)카르바메이트의 합성. 테트라하이드로푸란(400 mL) 중 전구체 실시 예 1, 단계 1로부터의 생성물(24.94 g, 125 mmol), 1,1'-비스(디페닐포스피노)페로센디클로로 팔라듐(II) 디클로로메탄 복합체(13.75 g, 18.80 mmol), 전구체 실시 예 1, 단계 3으로부터의 생성물(20 g, 62.7 mmol) 및 포타슘 카르보네이트(43.3 g, 313 mmol)의 혼합물을 80°C까지 12시간 동안 가열하였다. 다른 부가적인 반응을 상기 기술된 바와 같이 설정하였다. 2개의 반응 혼합물을 조합하고, 물(500 mL)로 희석시켰다. 수성 혼합물을 에틸 아세테이트(3 x 500 mL)로 추출하였다. 유기층을 조합하고, Na_2SO_4 에 걸쳐 건조하고, 여과하고, 감압 하에 농축시켰다. 잔여물을 실리카 겔(석유 에테르: 에틸 아세테이트 = 10:1로 용출됨) 상에서의 컬럼 크로마토그래피에 의해 정제하여, 표제 화합물(15 g, 수율 38.4%)을 수득하였다. ^1H NMR (400MHz, CDCl_3) δ 9.95 (s, 1H), 7.78 (d, $J=7.9$ Hz, 2H), 7.33 (d, $J=7.9$ Hz, 2H), 7.27 - 7.13 (m, 3H), 6.82 (d, $J=7.1$ Hz, 1H), 6.47 (br. s., 1H), 4.00 (s, 2H), 1.48 (s, 9H).

[0214] 단계 5: (6S,8S,9R,10S,11S,13S,14S,16R,17S)-6,9-디플루오로-11,16,17-트리하이드록시-17-(2-하이드록시아세틸)-10,13-디메틸-6,7,8,9,10,11,12,13,14,15,16,17-도데카하이드로-3H-사이클로펜타[a]페난트렌-3-온의 합성. (2S,6aS,6bR,7S,8aS,8bS,11aR,12aS,12bS)-2,6b-디플루오로-7-하이드록시-8b-(2-하이드록시아세틸)-6a,8a,10,10-테트라메틸-1,2,6a,6b,7,8,8a,8b,11a,12,12a,12b-도데카하이드로-4H-나프토[2',1':4,5]인페노[1,2-d][1,3]디옥솔-4-온(20 g, 44.2 mmol)을 40% 수성 HBF_4 (440 mL)에 혼탁시키고, 혼합물을 25°C에서 48시간 동안 교반하였다. 반응을 완료한 후, 2 L의 H_2O 를 첨가하고, 고체를 여과에 의해 수합하였다. 이 고체를 $\text{H}_2\text{O}(1\text{ L})$, 그 다음 메탄올(200 mL)로 세척하여, 표제 화합물(11 g, 수율 60.3%)을 제공하였다. ^1H NMR (400MHz, 디메틸설폐사이드-d6) δ 7.25 (d, $J=10.1$ Hz, 1H), 6.28 (d, $J=10.1$ Hz, 1H), 6.10 (s, 1H), 5.73 - 5.50 (m, 1H), 5.39 (br. s., 1H), 4.85 - 4.60 (m, 2H), 4.50 (d, $J=19.4$ Hz, 1H), 4.20 - 4.04 (m, 2H), 2.46 - 2.06 (m, 6H), 1.87 - 1.75 (m, 1H), 1.56 - 1.30 (m, 6H), 0.83 (s, 3H). 디메틸설폐사이드 = 디메틸설폐사이드.

[0215] 단계 6: (2S,6aS,6bR,7S,8aS,8bS,10S,11aR,12aS,12bS)-10-(4-(3-아미노벤질)페닐)-2,6b-디플루오로-7-하이드록시-8b-(2-하이드록시아세틸)-6a,8a-디메틸-1,2,6a,6b,7,8,8a,8b,11a,12,12a,12b-도데카하이드로-4H-나프토[2',1':4,5]인페노[1,2-d][1,3]디옥솔-4-온의 합성. 아세토니트릴(100 mL) 중 전구체 실시 예 1, 단계 5로부터의 생성물(4.4 g, 10.67 mmol) 및 MgSO_4 (6.42 g, 53.3 mmol)의 혼탁액을 20°C에서 1시간 동안 교반하였다. 아세토니트릴(100 mL) 중 전구체 실시 예 1, 단계 4로부터의 생성물(3.65 g, 11.74 mmol)의 용액을 한번에 첨가하였

다. 트리플루오로메탄설플산(9.01 mL, 53.3 mmol)을, 내부 온도를 얼음 배쓰에서 실온 미만으로 유지시키면서 적가하였다. 첨가 후, 혼합물을 20°C에서 2시간 동안 교반하였다. 3개의 부가적인 반응을 상기 기술된 바와 같이 설정하였다. 모든 4개의 반응 혼합물을 조합하고, 농축시키고, 잔여물을 Prep HPLC에 의해 정제하여, 표제화합물(4.5 g, 수율 14.2%)을 제공하였다. LCMS (방법 a, 표 7) $R_t = 2.65$ 분; MS $m/z = 606.2$ ($M+H$)⁺. 1H NMR (400MHz, 디메틸설폐사이드-d₆) δ 7.44 – 7.17 (m, 5H), 6.89 (t, $J=7.7$ Hz, 1H), 6.44 – 6.25 (m, 4H), 6.13 (br. s., 1H), 5.79 – 5.52 (m, 2H), 5.44 (s, 1H), 5.17 – 4.89 (m, 3H), 4.51 (d, $J=19.4$ Hz, 1H), 4.25 – 4.05 (m, 2H), 3.73 (s, 2H), 3.17 (br. s., 1H), 2.75 – 2.55 (m, 1H), 2.36 – 1.97 (m, 3H), 1.76 – 1.64 (m, 3H), 1.59 – 1.39 (m, 4H), 0.94 – 0.78 (m, 3H). Prep HPLC 방법: 장비: Gilson 281 반-분취 HPLC 시스템; 이동상: A: 포름산/H₂O=0.01% v/v; B: 아세토니트릴 ; 컬럼: Luna C18 150*25 5 미크론; 유속: 25 mL/분; 모니터 파장: 220 및 254 nm.

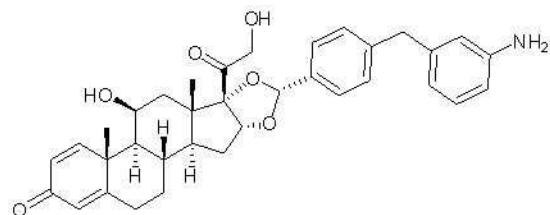
표 9. 용출물 B에 대한 이동상 조건

시간(분)	0.0	10.5	10.6	10.7	13.7	13.8	15.0
B%	15	35	35	100	100	10	10

[0216]

[0217]

전구체 실시예 2: (6aR,6bS,7S,8aS,8bS,10R,11aR,12aS,12bS)-10-(4-(3-아미노벤질)페닐)-7-하이드록시-8b-(2-하이드록시아세틸)-6a,8a-디메틸-1,2,6a,6b,7,8,8a,8b,11a,12,12a,12b-도데카하이드로-4H-나프토[2',1':4,5]인데노[1,2-d][1,3]디옥솔-4-온의 합성.



[0218]

[0219]

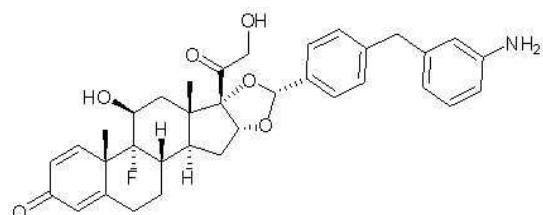
전구체 실시예 2 생성물을 전구체 실시예 1과 유사한 절차에서 (6aR,6bS,7S,8aS,8bS,11aR,12aS,12bS)-7-하이드록시-8b-(2-하이드록시아세틸)-6a,8a,10,10-테트라메틸-1,2,6a,6b,7,8,8a,8b,11a,12,12a,12b-도데카하이드로-4H-나프토[2',1':4,5]인데노[1,2-d][1,3]디옥솔-4-온을 사용하여 합성하였다.

[0220]

1H NMR (400MHz, 디메틸설폐사이드-d₆) δ 7.36 (d, $J=7.9$ Hz, 2H), 7.31 (d, $J=10.1$ Hz, 1H), 7.20 (d, $J=7.9$ Hz, 2H), 6.89 (t, $J=7.9$ Hz, 1H), 6.39 – 6.28 (m, 3H), 6.16 (dd, $J=1.5, 9.9$ Hz, 1H), 5.93 (s, 1H), 5.39 (s, 1H), 5.08 (t, $J=5.7$ Hz, 1H), 4.98 – 4.87 (m, 3H), 4.78 (d, $J=3.1$ Hz, 1H), 4.49 (dd, $J=6.2, 19.4$ Hz, 1H), 4.29 (br. s., 1H), 4.17 (dd, $J=5.5, 19.6$ Hz, 1H), 3.74 (s, 2H), 2.61 – 2.53 (m, 1H), 2.36 – 2.26 (m, 1H), 2.11 (d, $J=11.0$ Hz, 1H), 2.07 (s, 1H), 2.02 (d, $J=12.8$ Hz, 1H), 1.83 – 1.54 (m, 5H), 1.39 (s, 3H), 1.16 – 0.96 (m, 2H), 0.85 (s, 3H). LCMS (방법 a, 표 7) $R_t = 2.365$ 분; $m/z = 570.2$ ($M+H$)⁺.

[0221]

전구체 실시예 3: (6aS,6bR,7S,8aS,8bS,10R,11aR,12aS,12bS)-10-(4-(3-아미노벤질)페닐)-6b-플루오로-7-하이드록시-8b-(2-하이드록시아세틸)-6a,8a-디메틸-1,2,6a,6b,7,8,8a,8b,11a,12,12a,12b-도데카하이드로-4H-나프토[2',1':4,5]인데노[1,2-d][1,3]디옥솔-4-온의 합성.



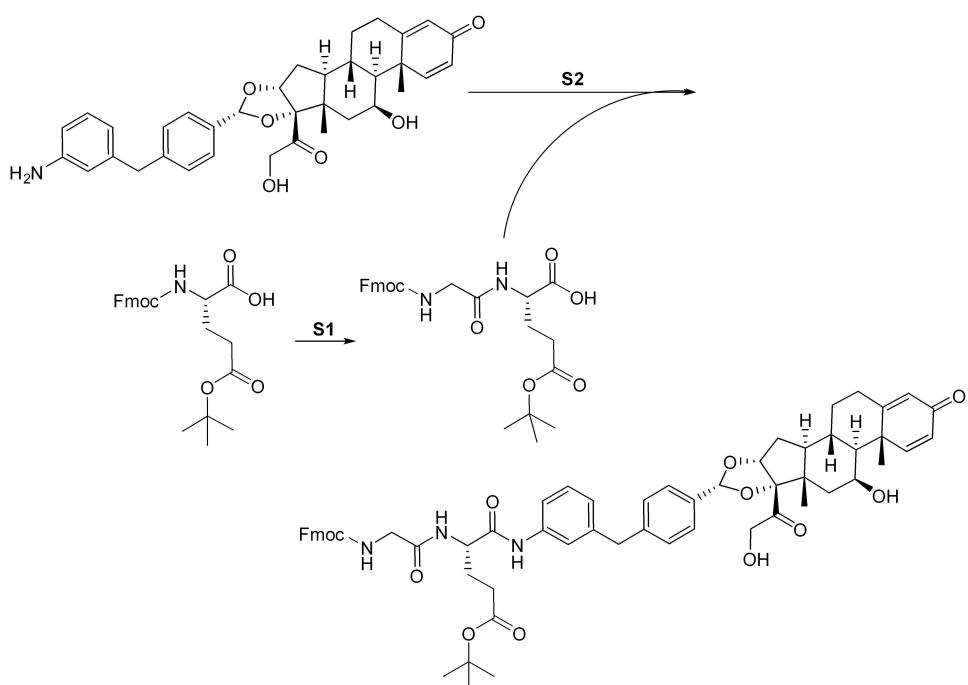
[0222]

[0223]

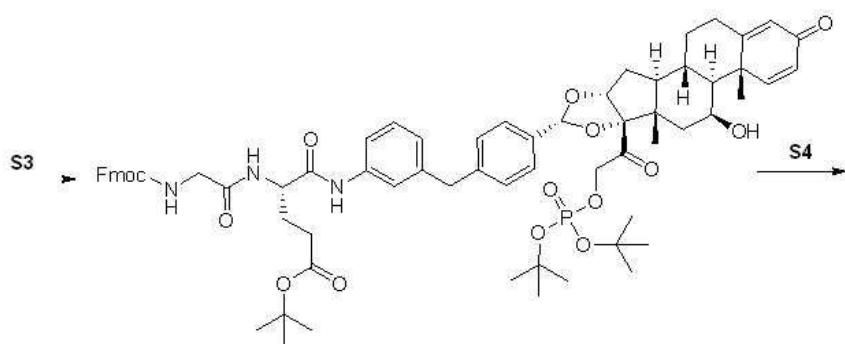
전구체 실시예 3 생성물을 전구체 실시예 1과 유사한 절차에서 (6aS,6bR,7S,8aS,8bS,11aR,12aS,12bS)-6b-플루오로-7-하이드록시-8b-(2-하이드록시아세틸)-6a,8a,10,10-테트라메틸-1,2,6a,6b,7,8,8a,8b,11a,12,12a,12b-도데카하이드로-4H-나프토[2',1':4,5]인데노[1,2-d][1,3]디옥솔-4-온을 사용하여 합성하였다.

[0224] ^1H NMR (400MHz, 디메틸실록사이드-d₆) δ 7.37 – 7.26 (m, 3H), 7.21 (d, *J*=7.9 Hz, 2H), 6.89 (t, *J*=7.7 Hz, 1H), 6.43 – 6.30 (m, 3H), 6.23 (d, *J*=10.1 Hz, 1H), 6.04 (s, 1H), 5.75 (s, 1H), 5.44 (s, 2H), 5.09 (t, *J*=5.7 Hz, 1H), 4.93 (br. s., 3H), 4.50 (dd, *J*=6.2, 19.4 Hz, 1H), 4.28 – 4.09 (m, 2H), 3.74 (s, 2H), 2.73 – 2.54 (m, 2H), 2.35 (d, *J*=13.2 Hz, 1H), 2.25 – 2.12 (m, 1H), 2.05 (d, *J*=15.0 Hz, 1H), 1.92 – 1.77 (m, 1H), 1.74 – 1.58 (m, 3H), 1.50 (s, 3H), 1.45 – 1.30 (m, 1H), 0.87 (s, 3H). LCMS (방법 a, 엑시온) 7) R_t = 2.68분; m/z = 588.1 (M+H)⁺.

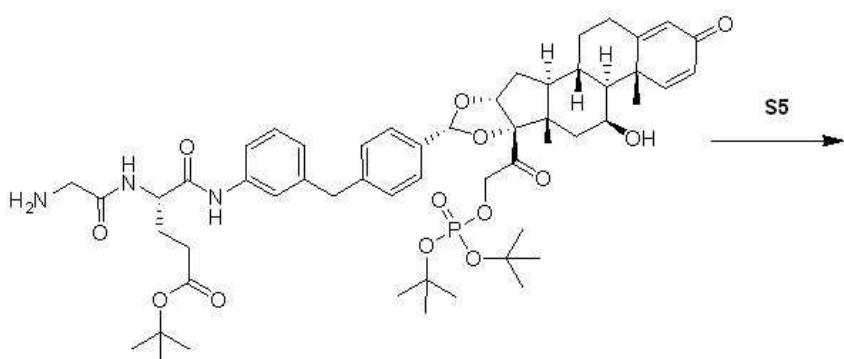
[0225] 전구체 실시예 4: (S)-4-(2-(2-브로모아세타미도)아세타미도)-5-((3-(4-((6aR, 6bS, 7S, 8aS, 8bS, 10R, 11aR, 12aS, 12bS)-7-하이드록시-6a, 8a-디메틸-4-옥소-8b-(2-(포스포노옥시)아세틸)-2, 4, 6a, 6b, 7, 8, 8a, 8b, 11a, 12, 12a, 12b-도테카하이드로-1H-나프토[2', 1':4, 5]인페노[1, 2-d][1, 3]디옥솔-10-일)벤질)페닐)아미노)-5-옥소펜탄산의 합성.



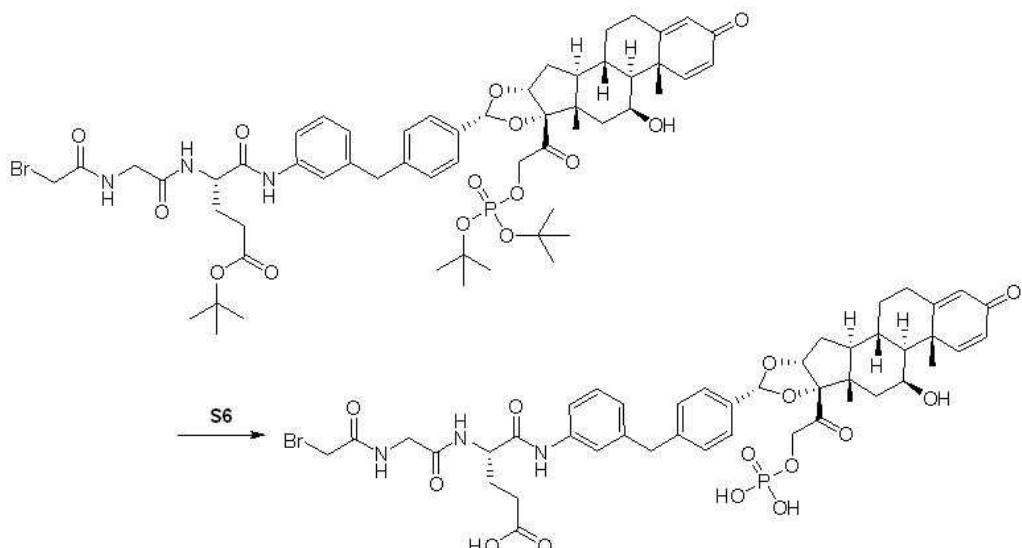
[0226]



[0227]



[0228]



[0229]

[0230]

단계 1: (S)-2-(2-(((9H-플루오렌-9-일)메톡시)카르보닐)아미노)아세타미도-5-(tert-부톡시)-5-옥소펜탄산의 합성. 건조 디클로로메탄(200 mL) 중 2-클로로트리틸 클로라이드 수지(30 g, 92 mmol), 트리에틸아민(46.4 g, 458 mmol) 및 (S)-2-(((9H-플루오렌-9-일)메톡시)카르보닐)아미노)-5-(tert-부톡시)-5-옥소펜탄산(25.5 g, 60 mmol)의 혼합물을 20°C에서 8시간 동안 N₂로 베블링하였다. 혼합물을 여과하고, 수지를 디클로로메탄(2 x 200 mL), 메탄올(MeOH)(2 x 200 mL) 및 디메틸 포름아미드(2 x 200 mL)로 세척하였다. 수지를 피페리딘:디메틸 포름 아미드의 용액(1:4, 400 mL)에 첨가하고, 혼합물을 N₂로 8분 동안 베블링한 다음, 여과하였다. 이 작동을 5회 반복하여, 9-플루오레닐메틸옥시카르보닐(Fmoc) 보호기의 완전한 제거를 제공하였다. 수지를 디메틸 포름아미드(5 x 500 mL)로 세척하여, 수지 결합된 (S)-2-아미노-5-(tert-부톡시)-5-옥소펜탄산을 수득하였다. 디메틸 포름 아미드(200 mL) 중 2-(((9H-플루오렌-9-일)메톡시)카르보닐)아미노)아세트산(13.38 g, 45.0 mmol), N,N-디이소프로필에틸아민(7.86 mL, 45 mmol), 하이드록시벤조트리아졸(6.89 g, 45 mmol), 2-(6-클로로-1H-벤조[d][1,2,3]트리아졸-1-일)-1,1,3,3-테트라메틸이소우로늄 헥사플루오로포스페이트(V)(18.62 g, 45.0 mmol)의 혼합물을 20°C에서 30분 동안 교반하였다. 혼합물에 상기 수지 결합된 (S)-2-아미노-5-(tert-부톡시)-5-옥소펜탄산을 첨가하고, 생성된 혼합물을 N₂로 25°C에서 1.5시간 동안 베블링하였다. 혼합물을 여과하고, 수지를 디메틸 포름아미드(4 x 500 mL) 및 디클로로메탄(2 x 500 mL)으로 세척하였다. 혼합물에 1% 트리플루오로 아세트산/디클로로메탄(5 x 500 mL)을 첨가하고, N₂로 5분 동안 베블링하였다. 혼합물을 여과하고, 여과물을 NaHCO₃의 포화 용액(200 mL)에 직접적으로 첨가하였다. 조합된 혼합물을 분리하고, 유기상을 포화 시트르산 수용액(4 x 400 mL) 및 염수(2 x 300 mL)로 세척하였다. 최종 유기 용액을 Na₂SO₄(20 g)에 걸쳐 건조하고, 여과하고, 감압 하에 농축시켜, 표제 화합물(10 g, 수율 20%)을 수득하였다. ¹H NMR: (CDCl₃, 400 MHz) δ 7.75 (d, J = 7.5 Hz, 2H), 7.59 (br d, J = 7.5 Hz, 2H), 7.41 – 7.36 (m, 2H), 7.30 (t, J = 7.0 Hz, 2H), 5.82 (br s, 1H), 4.57 (br d, J = 4.8 Hz, 1H), 4.38 (br d, J = 7.5 Hz, 2H), 4.27 – 4.15 (m, 1H), 4.06 – 3.83 (m, 2H), 2.50 – 2.29 (m, 2H), 2.26 – 2.13 (m, 1H), 2.06 – 2.02 (m, 1H), 1.43 (s, 9H).

[0231]

단계 2: tert-부틸 (S)-4-(2-(((9H-플루오렌-9-일)메톡시)카르보닐)아미노)아세타미도-5-((3-(4-((6aR,6bS,7S,8aS,8bS,10R,11aR,12aS,12bS)-7-하이드록시-8b-(2-하이드록시아세틸)-6a,8a-디메틸-4-옥소-2,4,6a,6b,7,8,8a,8b,11a,12,12a,12b-도데카하이드로-1H-나프토[2',1':4,5]인테노[1,2-d][1,3]디옥솔-10-일)벤질)페닐)아미노)-5-옥소펜타노에이트의 합성. 디메틸 포름아미드(3.5 mL) 중 실시예 4, 단계 1로부터의 생성물(424 mg, 0.878 mmol)의 용액에 실시예 2(500 mg, 0.878 mmol) 및 트리에틸아민(0.3 mL, 2.63 mmol)을 25 °C에서 첨가하였다. 용액을 0°C까지 냉각시킨 다음, 2,4,6-트리프로필-1,3,5,2,4,6-트리옥사트리포스파닌 2,4,6-트리옥사이드(1.12 g, 1.755 mmol)를 첨가하였다. 반응 혼합물을 25°C에서 12시간 동안 교반하였다. LCMS는 반응이 완료되었음을 나타내었다. 14개의 부가적인 반응을 상기 기술된 바와 같이 설정하였다. 모든 15개의 반응 혼합물을 조합하였다. 상기 혼합물을 역상 컬럼에 의해 정제하여, 표제 화합물(5 g, 수율 38.4%)을 황색 고체로서 수득하였다. 역상 컬럼 방법: 장비: Shimadzu LC-8A 분류 HPLC; 컬럼: Phenomenex Luna C18 200*40 mm*10 μm; 이동상: H₂O(0.05% 트리플루오로 아세트산)에 대해 A 및 아세토니트릴에 대해 B; 구배: 30분 이내에

30%로부터 100%까지의 B; 유속: 60 mL/분; 파장: 220 & 254 nm. LCMS (방법 a, 표 7) $R_t = 1.34$ 분; m/z 1016.6 ($M+H-18$)⁺.

[0232]

단계 3: tert-부틸 (S)-4-(2-(((9H-플루오렌-9-일)메톡시)카르보닐)아미노)아세타미도)-5-((3-(4-((6aR,6bS,7S,8aS,8bS,10R,11aR,12aS,12bS)-8b-(2-((디-tert-부톡시포스포릴)옥시)아세틸)-7-하이드록시-6a,8a-디메틸-4-옥소-2,4,6a,6b,7,8,8a,8b,11a,12,12a,12b-도데카하이드로-1H-나프토[2',1':4,5]인데노[1,2-d][1,3]디옥솔-10-일)벤질)페닐)아미노)-5-옥소펜타노에이트의 합성. 디메틸 포름아미드(2.5 mL) 중 실시예 4, 단계 2로부터의 생성물(400 mg, 0.387 mmol)의 용액에 1H-테트라졸(271 mg, 3.87 mmol) 및 디-tert-부틸 디에틸포스포라미다이트(1.16 g, 4.64 mmol)를 첨가하였다. 반응을 실온에서 2.5시간 동안 교반한 다음, 0°C까지 냉각시켰다. 수소 퍼옥사이드(241 mg, 2.127 mmol)를 생성된 혼합물을 첨가하고, 실온까지 가온시키고, 1시간 동안 교반하였으며, 이후에 LCMS는 반응이 완료되었음을 나타내었다. 11개의 부가적인 반응을 상기 기술된 바와 같이 설정하였다. 모든 12개의 반응 혼합물을 조합하였다. 혼합물을 역상 컬럼에 의해 정제하여, 표제 화합물(4.4 g, 수율 64.2%)을 수득하였다. 역상 컬럼 방법: 장비: Shimadzu LC-8A 분취 HPLC; 컬럼: Phenomenex Luna C18 200*40mm*10 μm; 이동상: H₂O에 대해 A 및 아세토니트릴에 대해 B; 구배: 30분 이내에 50%로부터 100%까지의 B; 유속: 60 mL/분; 파장: 220 & 254 nm. LCMS (방법 a, 표 7) $R_t = 1.41$ 분; m/z 1226.7 ($M+H$)⁺.

[0233]

단계 4: tert-부틸 (S)-4-(2-(((9H-플루오렌-9-일)메톡시)카르보닐)아미노)아세타미도)-5-((3-(4-((6aR,6bS,7S,8aS,8bS,10R,11aR,12aS,12bS)-8b-(2-((디-tert-부톡시포스포릴)옥시)아세틸)-7-하이드록시-6a,8a-디메틸-4-옥소-2,4,6a,6b,7,8,8a,8b,11a,12,12a,12b-도데카하이드로-1H-나프토[2',1':4,5]인데노[1,2-d][1,3]디옥솔-10-일)벤질)페닐)아미노)-5-옥소펜타노에이트의 합성. 아세토니트릴(6 mL) 중 실시예 4, 단계 3로부터의 생성물(1.1 g, 0.897 mmol)의 용액에 피페리딘(0.75 mL, 7.58 mmol)을 25°C에서 첨가하였다. 반응을 실온에서 20분 동안 교반하였으며, 이후에 LCMS는 반응이 완료되었음을 나타내었다. 3개의 부가적인 반응을 상기 기술된 바와 같이 설정하였다. 모든 4개의 반응 혼합물을 조합하였다. 혼합물을 농축시켜 잔여물을 수득하고, 상기 잔여물을 2시간 동안 교반 하에 석유 에테르(10 mL)로 처리하였다. 생성된 고체를 여과에 의해 수합하고, 감압 하에 건조하여, 표제 화합물(3.8 g, 수율 90%)을 수득하였다. LCMS (방법 a, 표 7) $R_t = 1.16$ 분; m/z 1004.6 ($M+H$)⁺.

[0234]

단계 5: tert-부틸 (S)-4-(2-(2-브로모아세타미도)아세타미도)-5-((3-(4-((6aR,6bS,7S,8aS,8bS,10R,11aR,12aS,12bS)-8b-(2-((디-tert-부톡시포스포릴)옥시)아세틸)-7-하이드록시-6a,8a-디메틸-4-옥소-2,4,6a,6b,7,8,8a,8b,11a,12,12a,12b-도데카하이드로-1H-나프토[2',1':4,5]인데노[1,2-d][1,3]디옥솔-10-일)벤질)페닐)아미노)-5-옥소펜타노에이트의 합성. 디메틸 포름아미드(2.5 mL) 중 2-브로모아세트산(97 mg, 0.697 mmol)의 용액에 2-에톡시-1-에톡시카르보닐-1,2-디하이드로퀴논(EEDQ)(172 mg, 0.697 mmol)을 실온에서 첨가하였다. 혼합물을 실온에서 1시간 동안 교반하였다. 실시예 4, 단계 4로부터의 생성물(350 mg, 0.349 mmol)을 첨가하고, 생성물을 2.5시간 동안 교반하였으며, 이후에 LCMS는 반응이 완료되었음을 나타내었다. 7개의 부가적인 반응을 상기 기술된 바와 같이 설정하였다. 모든 8개의 반응 혼합물을 조합하였다. 반응을 디클로로메탄(100 mL)으로 희석시키고, 수성 HBr(1 M, 2 x 80 mL), 수성 NaHCO₃(60 mL), 염수(60 mL)로 세척하였다. 유기층을 Na₂SO₄에 걸쳐 건조하고, 여과하고, 감압 하에 농축시켜, 표제 화합물(2 g, 수율 63.7%)을 수득하였다. LCMS (방법 a, 표 7) $R_t = 1.30$ 분; m/z 1126.4 ($M+H$)⁺.

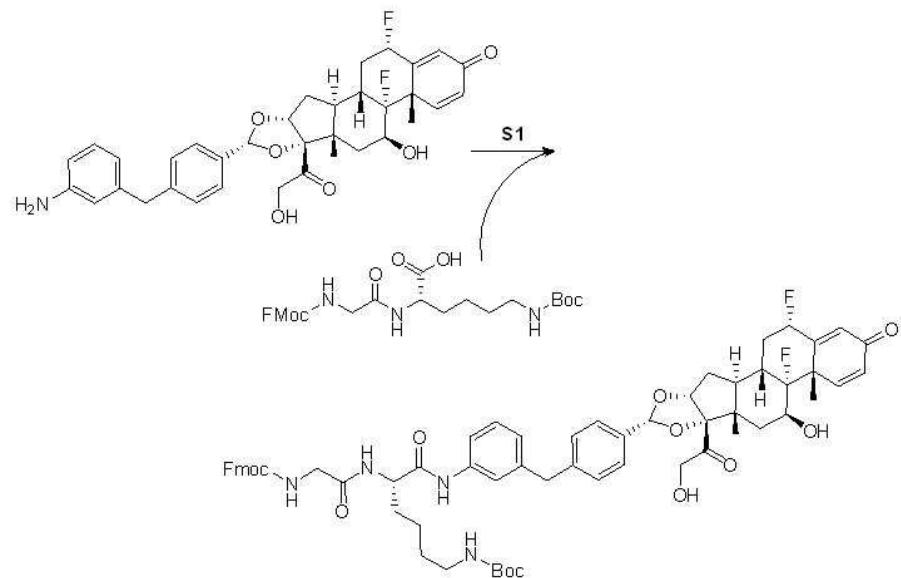
[0235]

단계 6: (S)-4-(2-(2-브로모아세타미도)아세타미도)-5-((3-(4-((6aR,6bS,7S,8aS,8bS,10R,11aR,12aS,12bS)-7-하이드록시-6a,8a-디메틸-4-옥소-8b-(2-(포스포노옥시)아세틸)-2,4,6a,6b,7,8,8a,8b,11a,12,12a,12b-도데카하이드로-1H-나프토[2',1':4,5]인데노[1,2-d][1,3]디옥솔-10-일)벤질)페닐)아미노)-5-옥소펜타노의 합성. 디클로로메탄(16 mL) 중 실시예 4, 단계 5로부터의 생성물(2 g, 1.778 mmol)의 용액에 트리플루오로 아세트산(8 mL, 104 mmol)을 첨가하고, 생성된 혼합물을 실온에서 40분 동안 교반하였으며, 이후에 LCMS는 반응이 완료되었음을 나타내었다. 용매를 감압 하에 제거하였다. 생성된 잔여물을 Prep HPLC에 의해 정제하였다. 이동상을 직접적으로 동결건조하여, 표제 화합물(640 mg, 수율 35.3%)을 수득하였다. Prep HPLC 방법: 장비: Shimadzu LC-8A 분취 HPLC; 컬럼: Phenomenex Luna C18 200*40mm*10 μm; 이동상: H₂O(0.09% 트리플루오로 아세트산)에 대해 A 및 아세토니트릴에 대해 B; 구배: 20분 이내에 30%로부터 40%까지의 B; 유속: 60 mL/분; 파장: 220 & 254 nm. ¹H NMR: (디메틸설록사이드-d6, 400 MHz) δ 9.88 (s, 1H), 8.52 (s, 1H), 8.24 (br d, J = 8.4 Hz, 1H), 7.46

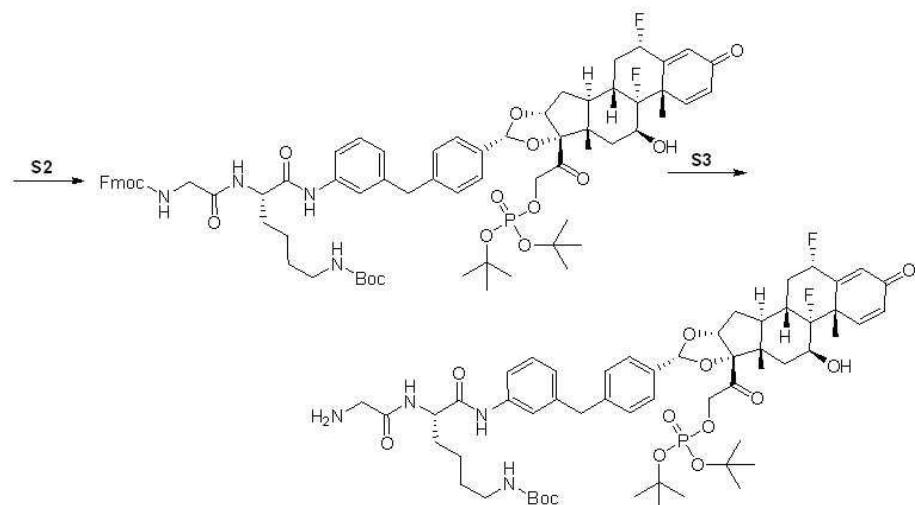
(br d, $J = 7.9$ Hz, 1H), 7.42 (s, 1H), 7.36 (br d, $J = 7.9$ Hz, 2H), 7.30 (br d, $J = 9.7$ Hz, 1H), 7.23 – 7.17 (m, 3H), 6.90 (br d, $J = 6.8$ Hz, 1H), 6.16 (br d, $J = 10.4$ Hz, 1H), 5.93 (s, 1H), 5.47 (s, 1H), 4.96 – 4.85 (m, 3H), 4.58 (br dd, $J = 7.9, 18.7$ Hz, 1H), 4.38 (br d, $J = 5.3$ Hz, 1H), 4.29 (br s, 1H), 3.93 (s, 2H), 3.89 (s, 2H), 3.80 (br s, 2H), 2.30 – 2.22 (m, 2H), 2.16 – 1.91 (m, 4H), 1.85 – 1.62 (m, 6H), 1.39 (s, 3H), 1.00 (br s, 2H), 0.87 (s, 3H). LCMS (방법 a, 표 7) $R_t = 2.86$ 분; m/z 956.0, 958.0 ($M+H$)⁺.

[0236]

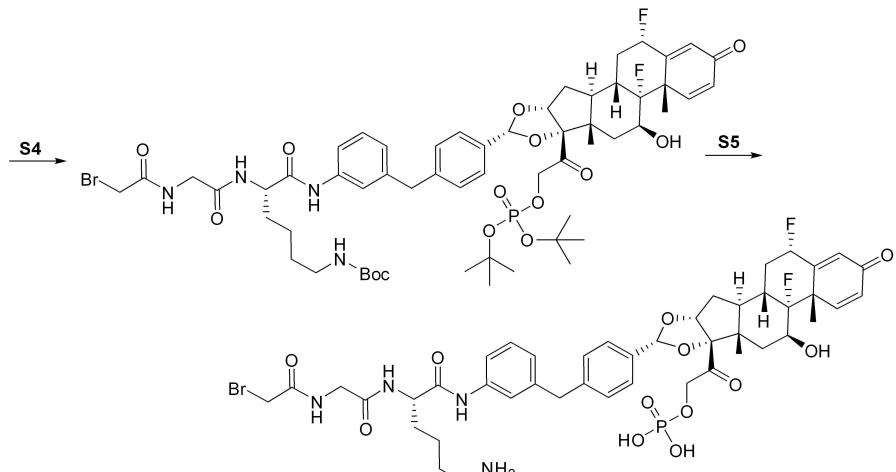
전구체 실시예 5: 2-((2S,6aS,6bR,7S,8aS,8bS,10R,11aR,12aS,12bS)-10-(4-(3-((S)-6-아미노-2-(2-브로모아세타미도)아세타미도)헥산아미도)벤질)-2,6b-디플루오로-7-하이드록시-6a,8a-디메틸-4-옥소-1,2,4,6a,6b,7,8,8a,11a,12,12a,12b-도테카하이드로-8bH-나프토[2',1':4,5]인페노[1,2-d][1,3]디옥솔-8b-일)-2-옥소에틸 디하이드로겐 포스페이트의 합성



[0237]



[0238]



[0239]

[0240]

단계 1: tert-부틸 ((S)-5-(2-(((9H-플루오렌-9-일)메톡시)카르보닐)아미노)아세타미도)-6-((3-(4-((2S,6aS,6bR,7S,8aS,8bS,10R,11aR,12aS,12bS)-2,6b-디플루오로-7-하이드록시-8b-(2-하이드록시아세틸)-6a,8a-디메틸-4-옥소-2,4,6a,6b,7,8,8a,8b,11a,12,12a,12b-도데카하이드로-1H-나프토[2',1':4,5]인데노[1,2-d][1,3]디옥솔-10-일)벤질)페닐)아미노)-6-옥소헥실)카르바메이트의 합성. 디메틸 포름아미드(60 mL) 중 N²-(((9H-플루오렌-9-일)메톡시)카르보닐)글리실)-N6-(tert-부톡시카르보닐)-L-라이신(5.58 g, 8.26 mmol)의 용액에 0°C에서 2,4,6-트리프로필-1,3,5,2,4,6-트리옥사트리포스피난 2,4,6-트리옥사이드(10.51 g, 16.51 mmol) 및 트리에틸아민(3.45 mL, 24.77 mmol)을 첨가하였다. 생성된 혼합물을 실온에서 1시간 동안 교반한 다음, 전구체 실시예 1, 단계 6으로부터의 생성물(5 g, 8.26 mmol)을 첨가하였다. 생성된 혼합물을 실온에서 5시간 동안 교반하였으며, 이후에 LCMS 반응이 완료되었음을 나타내었다. 6개의 부가적인 반응을 상기 기술된 바와 같이 설정하였다. 모든 7개의 반응 혼합물을 조합하였다. 반응을 역상 컬럼에 의해 정제하여, 표제 화합물(24 g, 수율 24.62%)을 수득하였다. 역상 컬럼 방법: 장비: Shimadzu LC-8A prep HPLC; 컬럼: Phenomenex Luna C18 200*40 mm*10 μm; 이동상: H₂O(0.05% 트리플루오로 아세트산)에 대해 A 및 아세토니트릴에 대해 B; 구배: 30분 이내에 30%로부터 100%까지 B; 유속: 60 mL/분; 파장: 220 & 254 nm. LCMS (방법 a, 표 7) R_t = 1.29분; m/z 1095.6 (M+H-18)⁺. Fmoc = 플루오레닐메틸옥시카르보닐; Boc = tert부톡시카르보닐.

[0241]

단계 2: tert-부틸 ((S)-5-(2-(((9H-플루오렌-9-일)메톡시)카르보닐)아미노)아세타미도)-6-((3-(4-((2S,6aS,6bR,7S,8aS,8bS,10R,11aR,12aS,12bS)-8b-(2-(디-tert-부톡시포스포릴)옥시)아세틸)-2,6b-디플루오로-7-하이드록시-6a,8a-디메틸-4-옥소-2,4,6a,6b,7,8,8a,8b,11a,12,12a,12b-도데카하이드로-1H-나프토[2',1':4,5]인데노[1,2-d][1,3]디옥솔-10-일)벤질)페닐)아미노)-6-옥소헥실)카르바메이트의 합성. 디메틸 포름아미드(30 mL) 중 실시예 5, 단계 1로부터의 생성물(3 g, 2.69 mmol)의 용액에 1H-테트라졸(1.888 g, 26.9 mmol) 및 디-tert-부틸 디에틸포스포라미다이트(8.06 g, 32.3 mmol)를 첨가하고, 반응을 실온에서 3.5시간 동안 교반하였다. 수소 페옥사이드(224 mg, 1.97 mmol)를 반응에 첨가하고, 0.5시간 동안 교반하였으며, 이후에 LCMS는 반응이 완료되었음을 나타내었다. 6개의 부가적인 반응을 상기 기술된 바와 같이 설정하였다. 모든 7개의 반응 혼합물을 조합하였다. 반응을 역상 컬럼에 의해 정제하여, 표제 화합물(10 g, 순도: 78%, 수율 37.1%)을 수득하였다. 역상 컬럼 방법: 장비: Shimadzu LC-8A prep HPLC; 컬럼: Phenomenex Luna C18 200*40mm*10 μm; 이동상: H₂O에 대해 A 및 아세토니트릴에 대해 B; 구배: 30분 이내에 50%로부터 100%까지 B; 유속: 60 mL/분; 파장: 220 & 254 nm. LCMS (방법 a, 표 7) R_t = 1.42분; m/z 1305.7 (M+H)⁺.

[0242]

단계 3: tert-부틸 ((S)-5-(2-아미노아세타미도)-6-((3-(4-((2S,6aS,6bR,7S,8aS,8bS,10R,11aR,12aS,12bS)-8b-(2-(디-tert-부톡시포스포릴)옥시)아세틸)-2,6b-디플루오로-7-하이드록시-6a,8a-디메틸-4-옥소-2,4,6a,6b,7,8,8a,8b,11a,12,12a,12b-도데카하이드로-1H-나프토[2',1':4,5]인데노[1,2-d][1,3]디옥솔-10-일)벤질)페닐)아미노)-6-옥소헥실)카르바메이트의 합성. 아세토니트릴(10 mL) 중 실시예 5, 단계 2로부터의 생성물(2.5 g, 1.969 mmol)의 용액에 피페리딘(2 mL, 1.969 mmol)을 첨가하고, 반응을 실온에서 1시간 동안 교반하였으며, 이후에 LCMS는 반응이 완료되었음을 나타내었다. 3개의 부가적인 반응을 상기 기술된 바와 같이 설정하였다. 모든 4개의 반응 혼합물을 조합하였다. 반응을 농축시켜, 조(crude) 생성물을 수득하였으며, 이를 석유에테르(30 mL)에서 2시간 동안 교반하였다. 생성된 고체 여과에 의해 수합하고, 감압 하에 건조하여, 표제 화합

물(7 g, 순도: 83%, 수율 70.4%)을 황색 고체로서 수득하였다. LCMS (방법 a, 표 7) $R_t = 1.17$ 분; m/z 1083.5 ($M+H$)⁺.

[0243]

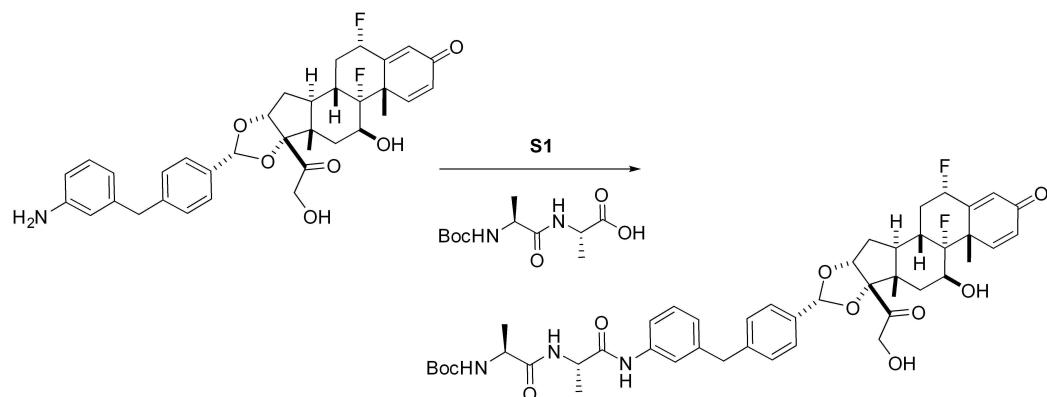
단계 4: tert-부틸 ((S)-5-(2-(2-브로모아세타미도)아세타미도)-6-((3-(4-((2S,6aS,6bR,7S,8aS,8bS,10R,11aR,12aS,12bS)-8b-(2-((디-tert-부톡시포스포릴)옥시)아세틸)-2,6b-디플루오로-7-하이드록시-6a,8a-디메틸-4-옥소-2,4,6a,6b,7,8,8a,8b,11a,12,12a,12b-도데카하이드로-1H-나프토[2',1':4,5]인데노[1,2-d][1,3]디옥솔-10-일)벤질)페닐)아미노)-6-옥소헥실)카르바메이트의 합성. 디메틸 포름아미드(35 mL) 중 2-브로모아세트산(0.929 g, 6.68 mmol)의 용액에 2-에톡시-1-에톡시카르보닐-1,2-디하이드로퀴논(1.653 g, 6.68 mmol)을 첨가하고, 생성된 혼합물을 실온에서 1시간 동안 교반하였다. 실시예 5, 단계 3으로부터의 생성물(3.5 g, 3.34 mmol)을 첨가하고, 생성된 혼합물을 실온에서 2시간 동안 교반하였다. LCMS는 반응이 완료되었음을 나타내었다. 반응을 디클로로메탄(100 mL)으로 희석시키고, 수성 HBr(1 M, 2 X 80 mL), 수성 NaHCO₃(60 mL) 및 염수(60 mL)로 세척하였다. 유기층을 Na₂SO₄에 걸쳐 건조하고, 여과하고, 감압 하에 농축시켜, 표제 화합물(2 g, 수율 51.2%)을 수득하였다. LCMS (방법 a, 표 7) $R_t = 1.32$ 분; m/z 1205.5 ($M+H$)⁺.

[0244]

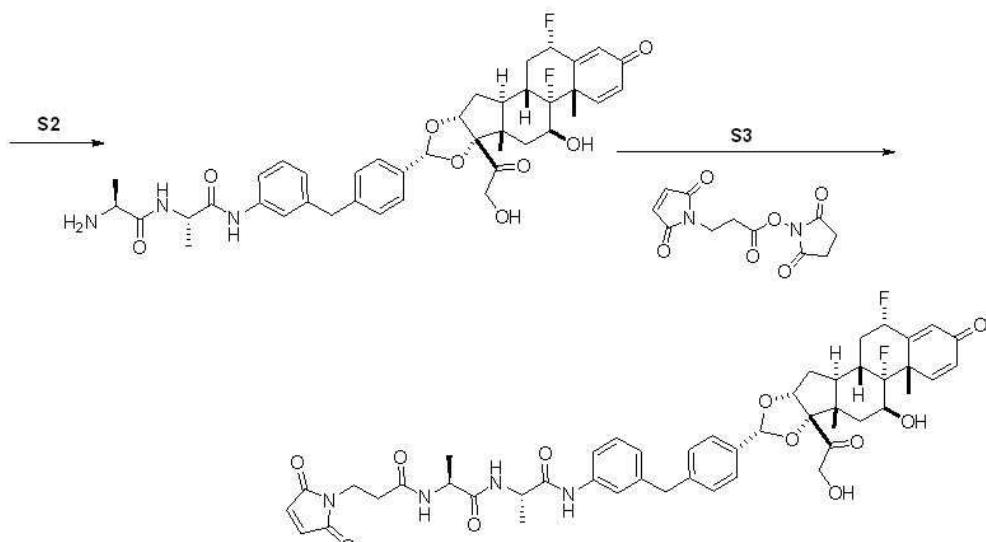
단계 5: 2-((2S,6aS,6bR,7S,8aS,8bS,10R,11aR,12aS,12bS)-10-(4-(3-((S)-6-아미노-2-(2-브로모아세타미도)아세타미도)헥산아미도)벤질)-2,6b-디플루오로-7-하이드록시-6a,8a-디메틸-4-옥소-1,2,4,6a,6b,7,8,8a,11a,12,12a,12b-도데카하이드로-8bH-나프토[2',1':4,5]인데노[1,2-d][1,3]디옥솔-8b-일)-2-옥소에틸 디하이드로겐 포스페이트의 합성. 디클로로메탄(10 mL) 중 실시예 5, 단계 4로부터의 생성물(2 g, 1.661 mmol)의 용액에 트리플루오로 아세트산(5 mL, 64.9 mmol)을 첨가하고, 반응을 실온에서 40분 동안 교반하였으며, 이후에 LCMS는 반응이 완료되었음을 나타내었다. 용매를 감압 하에 제거하고, 조 생성물을 Prep HPLC에 의해 정제하였다. 이동상을 직접적으로 동결건조하여, 표제 화합물(550 mg, 순도: 96.9%, 수율 32.3%)을 수득하였다. Prep-HPLC 방법: 장비: Shimadzu LC-8A prep HPLC; 컬럼: Phenomenex Luna C18 200*40 mm*10 μ m; 이동상: H₂O(0.09% 트리플루오로 아세트산)에 대해 A 및 아세토니트릴에 대해 B; 구배: 20분 이내에 30%로부터 40% 까지 B; 유속: 60 mL/분; 파장: 220 & 254 nm. LCMS (방법 a, 표 7) $R_t = 2.31$ min. ¹H NMR: (디메틸설록사이드-d₆, 400 MHz) δ ppm 0.90 (s, 3 H) 1.19 - 1.41 (m, 2 H) 1.43 - 1.62 (m, 7 H) 1.64 - 1.77 (m, 3 H) 1.84 (br d, $J=14.55$ Hz, 1 H) 1.95 - 2.07 (m, 1 H) 2.18 - 2.36 (m, 3 H) 2.65 - 2.78 (m, 3 H) 3.71 - 3.86 (m, 3 H) 3.89 (s, 2 H) 3.93 (s, 2 H) 4.20 (br d, $J=9.48$ Hz, 1 H) 4.33 - 4.41 (m, 1 H) 4.59 (br dd, $J=18.41, 8.05$ Hz, 1 H) 4.81 (br dd, $J=18.52, 8.60$ Hz, 1 H) 4.94 (d, $J=4.63$ Hz, 1 H) 5.50 (s, 1 H) 5.54 - 5.76 (m, 1 H) 6.13 (s, 1 H) 6.29 (dd, $J=10.14, 1.32$ Hz, 1 H) 6.95 (d, $J=7.72$ Hz, 1 H) 7.15 - 7.28 (m, 4 H) 7.30 - 7.41 (m, 3 H) 7.51 (br d, $J=7.94$ Hz, 1 H) 7.72 (br s, 3 H) 8.21 (br d, $J=7.72$ Hz, 1 H) 8.54 (t, $J=5.62$ Hz, 1 H) 9.93 (br d, $J=2.65$ Hz, 1 H).

[0245]

전구체 실시예 6: (S)-N-(3-(4-((2S,6aS,6bR,7S,8aS,8bS,10R,11aR,12aS,12bS)-2,6b-디플루오로-7-하이드록시-8b-(2-하이드록시아세틸)-6a,8a-디메틸-4-옥소-2,4,6a,6b,7,8,8a,8b,11a,12,12a,12b-도데카하이드로-1H-나프토[2',1':4,5]인데노[1,2-d][1,3]디옥솔-10-일)벤질)-2-((S)-2-(3-(2,5-디옥소-2,5-디하이드로-1H-페롤-1-일)프로판아미도)프로판아미드의 합성.



[0246]



[0247]

[0248]

단계 1: *tert*-부틸 ((S)-1-(((S)-1-((3-(4-((2S,6aS,6bR,7S,8aS,8bS,10R,11aR,12aS,12bS)-2,6b-디플루오로-7-하이드록시-8b-(2-하이드록시아세틸)-6a,8a-디메틸-4-옥소-2,4,6a,6b,7,8,8a,8b,11a,12,12a,12b-도데카하이드로-1H-나프토[2',1':4,5]인데노[1,2-d][1,3]디옥솔-10-일)벤질)페닐)아미노)-1-옥소프로판-2-일)아미노)-1-옥소프로판-2-일)카르바메이트의 합성. 1-[비스(디메틸아미노)메틸렌]-1H-1,2,3-트리아졸로[4,5-b]파리디늄 3-옥시드 혼합물(HATU)(610 mg, 1.605 mmol) 및 2,6-루티딘(0.3 mL, 2.58 mmol)을 실온에서 THF(11.5 mL) 중 전구체 실시예 1, 단계 6로부터의 생성물(648.1 mg, 1.070 mmol)과 (S)-2-((S)-2-((*tert*-부톡시카르보닐)아미노)프로판아미도)프로판산(334 mg, 1.284 mmol)의 혼합물에 첨가하였다. 9시간 후, 반응을 에틸 아세테이트(16 mL)로 희석시킨 다음, HCl의 1 N 수용액(3 X 4 mL), 뒤이어 염수의 포화 수용액(4 mL)으로 세척하였다. 0-10% 메탄올/디클로로메탄의 구배로 용출하는 크로마토그래피(실리카, 40 g)에 의한 정제는 표제 화합물(773.7 mg, 0.912 mmol, 85% 수율)을 제공하였다. LCMS (방법 b, 표 7) $R_t = 0.92$ 분, $m/z = 848.53 [M+H]^+$.

[0249]

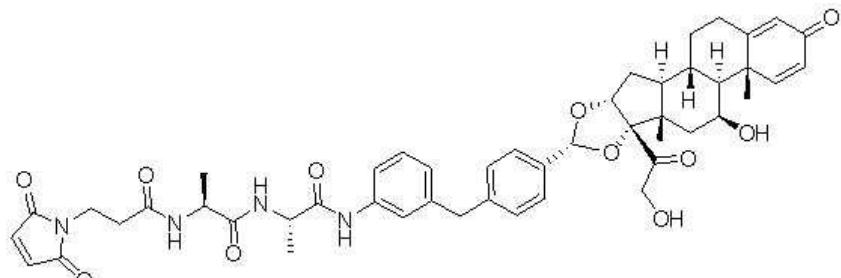
단계 2: (S)-2-아미노-*N*-(*(S*)-1-((3-(4-((2S,6aS,6bR,7S,8aS,8bS,10R,11aR,12aS,12bS)-2,6b-디플루오로-7-하이드록시-8b-(2-하이드록시아세틸)-6a,8a-디메틸-4-옥소-2,4,6a,6b,7,8,8a,8b,11a,12,12a,12b-도데카하이드로-1H-나프토[2',1':4,5]인데노[1,2-d][1,3]디옥솔-10-일)벤질)페닐)아미노)-1-옥소프로판-2-일)프로판아미드의 합성. 트리플루오로 아세트산(1.97 mL, 25.6 mmol)를 디클로로메탄(6.0 mL) 중 실시예 6, 단계 1로부터의 생성물(0.7683 g, 0.906 mmol)의 실온 용액에 적가하였다. 50분 후, 용매를 감압 하에 제거하여, 갈색 시럽을 제공하였다. 잔여물을 1:1 디메틸 셀록사이드: 메탄올(12 mL)에 용해시키고, Phenomenex C18(2) 10 미크론 컬럼(250 x 50 mm 컬럼) 상에서의 역상 HPLC에 의해 정제하였다. 아세토니트릴 (A) 및 수중 0.1% 트리플루오로아세트산 (B)의 구배를 90 mL/분의 유속(0-5.0분 15% A, 5.0-20분 선형 구배 15-75% A, 2분 유지, 22.0-22.5분 선형 구배 75-95% A, 4분 유지)에서 사용하였다. 조합된 분획을 감압 하에 농축 건조하고, 잔여물을 진공 오븐에서 50 °C에서 밤새 건조하여, 표제 화합물(230 mg, 0.308 mmol, 34% 수율)을 제공하였다. LC-MS (방법 b, 표 7) 주(major) 아세탈 이성질체 $R_t = 0.73$ 분, $m/z = 748.78 [M+H]^+$. ^1H NMR (400 MHz, 디메틸셀록사이드- d_6) 8.10.01 (s, 1H), 8.62 (d, $J = 7.2$ Hz, 1H), 8.04 (d, $J = 5.4$ Hz, 3H), 7.46 - 7.31 (m, 4H), 7.31 - 7.13 (m, 4H), 6.91 (d, $J = 7.6$ Hz, 1H), 6.27 (dd, $J = 10.2$, 1.9 Hz, 1H), 6.11 (s, 1H), 5.76 - 5.47 (m, 2H), 5.43 (s, 1H), 4.93 (d, $J = 4.6$ Hz, 1H), 4.49 (d, $J = 19.5$ Hz, 1H), 4.42 (q, $J = 7.1$ Hz, 1H), 4.23 - 4.13 (m, 2H), 2.72 - 2.54 (m, 1H), 2.33 - 2.16 (m, 2H), 2.02 (dt, $J = 13.6$, 3.6 Hz, 1H), 1.69 (h, $J = 5.9$, 5.1 Hz, 3H), 1.48 (s, 4H), 1.33 (d, $J = 7.0$ Hz, 3H), 1.30 (d, $J = 7.1$ Hz, 3H), 0.85 (s, 3H).

[0250]

단계 3: (S)-*N*-(3-(4-((2S,6aS,6bR,7S,8aS,8bS,10R,11aR,12aS,12bS)-2,6b-디플루오로-7-하이드록시-8b-(2-하이드록시아세틸)-6a,8a-디메틸-4-옥소-2,4,6a,6b,7,8,8a,8b,11a,12,12a,12b-도데카하이드로-1H-나프토[2',1':4,5]인데노[1,2-d][1,3]디옥솔-10-일)벤질)페닐)-2-((S)-2-(3-(2,5-디옥소-2,5-디하이드로-1H-페롤-1-일)프로판아미도)프로판아미드의 합성. 디이소프로필에틸아민(0.1 mL, 0.573 mmol)를 디메틸 포름아미드(2.8 mL) 중 실시예 6, 단계 2로부터의 생성물(0.220 g, 0.294 mmol) 및 *N*-숙신이미딜 3-말레이이미도프로페오네이트(0.086 g, 0.324 mmol)의 실온 용액에 첨가하였다. 30분 후, 수중 트리플루오로아세트산의 7% 용액(1.0 mL)을 적가하여, 반응 혼합물의 pH를 4-5까지 조정하였다. 조 혼합물을 Phenomenex C18(2) 10 미크론 컬럼(250

x 50 mm 컬럼) 상에서 역상 HPLC에 의해 정제하였다. 아세토니트릴 (A) 및 수중 0.1% 트리플루오로아세트산(B)의 구배를 90 mL/분의 유속(0-5.0분 15% A, 5.0-20분 선형 구배 15-85% A, 2분 유지)에서 사용하였다. 조합된 분획을 감압 하에 농축시켜, 휘발성 용매를 제거하고, 생성된 용액을 냉동시키고 동결건조하여, 표제 화합물 (175.2 mg, 0.195 mmol, 66% 수율)을 제공하였다. LCMS (방법 b, 표 7) $R_t = 0.82$ 분, $m/z = 899.87 [M+H]^+$. ^1H NMR (400 MHz, 디메틸설폐사이드- d_6) δ 9.70 (s, 1H), 8.14 (d, $J = 7.0$ Hz, 1H), 8.01 (d, $J = 7.2$ Hz, 1H), 7.47 - 7.35 (m, 2H), 7.32 (d, $J = 8.1$ Hz, 2H), 7.26 - 7.10 (m, 4H), 6.95 (s, 1H), 6.87 (dt, $J = 7.6$, 1.3 Hz, 1H), 6.26 (dd, $J = 10.2$, 1.9 Hz, 1H), 6.09 (d, $J = 2.0$ Hz, 1H), 5.72 - 5.51 (m, 1H), 5.48 (s, 1H), 5.41 (s, 1H), 4.91 (d, $J = 4.9$ Hz, 1H), 4.47 (d, $J = 19.4$ Hz, 1H), 4.30 (p, $J = 7.1$ Hz, 1H), 4.25 - 4.11 (m, 3H), 3.85 (s, 2H), 3.57 (t, $J = 7.3$ Hz, 2H), 2.71 - 2.48 (m, 1H), 2.36 (dd, $J = 8.0$, 6.7 Hz, 2H), 2.23 (ddt, $J = 25.1$, 12.2, 6.6 Hz, 2H), 2.01 (dt, $J = 13.7$, 3.7 Hz, 1H), 1.75 - 1.57 (m, 3H), 1.48 (p, $J = 11.9$ Hz, 1H), 1.46 (s, 3H), 1.24 (d, $J = 7.2$ Hz, 3H), 1.13 (d, $J = 7.2$ Hz, 3H), 0.83 (s, 3H).

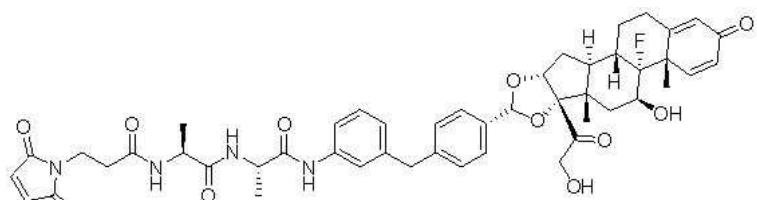
[0251] 전구체 실시예 7: 3-(2,5-디옥소-2,5-디하이드로-1H-파롤-1-일)-N-((S)-1-((3-(4-((6aR,6bS,7S,8aS,8bS,10R,11aR,12aS,12bS)-7-하이드록시-8b-(2-하이드록시아세틸)-6a,8a-디메틸-4-옥소-2,4,6a,6b,7,8,8a,8b,11a,12,12a,12b-도데카하이드로-1H-나프토[2',1':4,5]인데노[1,2-d][1,3]디옥솔-10-일)벤질)페닐)아미노)-1-옥소프로판-2-일)아미노)-1-옥소프로판-2-일)프로판아미드의 합성.



[0252] 전구체 실시예 7 생성물을 실시예 6과 유사한 절차에서 (6aR,6bS,7S,8aS,8bS,10R,11aR,12aS,12bS)-10-(4-(3-아미노벤질)페닐)-7-하이드록시-8b-(2-하이드록시아세틸)-6a,8a-디메틸-1,2,6a,6b,7,8,8a,8b,11a,12,12a,12b-도데카하이드로-4H-나프토[2',1':4,5]인데노[1,2-d][1,3]디옥솔-4-온을 사용하여 합성하였다. LCMS (방법 b, 표 7) $R_t = 0.85$ 분, $m/z = 863.4 [M+H]$.

[0254] ^1H NMR (501 MHz, 디메틸설폐사이드- d_6) δ 9.71 (s, 1H), 8.17 (d, $J = 7.0$ Hz, 1H), 8.03 (d, $J = 7.3$ Hz, 1H), 7.43 (dd, $J = 7.8$, 1.1 Hz, 2H), 7.38 - 7.32 (m, 2H), 7.29 (d, $J = 10.1$ Hz, 1H), 7.22 - 7.15 (m, 3H), 6.96 (s, 2H), 6.88 (dt, $J = 7.8$, 1.3 Hz, 1H), 6.13 (dd, $J = 10.1$, 1.9 Hz, 1H), 5.90 (t, $J = 1.6$ Hz, 1H), 5.37 (s, 1H), 4.90 (d, $J = 5.4$ Hz, 1H), 4.48 (d, $J = 19.4$ Hz, 1H), 4.32 (p, $J = 7.1$ Hz, 1H), 4.27 (q, $J = 3.3$ Hz, 1H), 4.21 (p, $J = 7.1$ Hz, 1H), 4.16 (d, $J = 19.4$ Hz, 1H), 3.87 (s, 2H), 3.59 (t, $J = 7.3$ Hz, 2H), 2.57 - 2.49 (m, 1H), 2.38 (dd, $J = 8.0$, 6.6 Hz, 2H), 2.32 - 2.24 (m, 1H), 2.15 - 2.04 (m, 1H), 2.04 - 1.95 (m, 1H), 1.80 - 1.54 (m, 5H), 1.37 (s, 3H), 1.26 (d, $J = 7.1$ Hz, 3H), 1.15 (d, $J = 7.1$ Hz, 3H), 1.02 (ddd, $J = 21.2$, 12.1, 4.2 Hz, 2H), 0.84 (s, 3H).

[0255] 전구체 실시예 8: 3-(2,5-디옥소-2,5-디하이드로-1H-파롤-1-일)-N-((S)-1-((3-(4-((6aS,6bR,7S,8aS,8bS,10R,11aR,12aS,12bS)-6b-플루오로-7-하이드록시-8b-(2-하이드록시아세틸)-6a,8a-디메틸-4-옥소-2,4,6a,6b,7,8,8a,8b,11a,12,12a,12b-도데카하이드로-1H-나프토[2',1':4,5]인데노[1,2-d][1,3]디옥솔-10-일)벤질)페닐)아미노)-1-옥소프로판-2-일)아미노)-1-옥소프로판-2-일)프로판아미드의 합성.

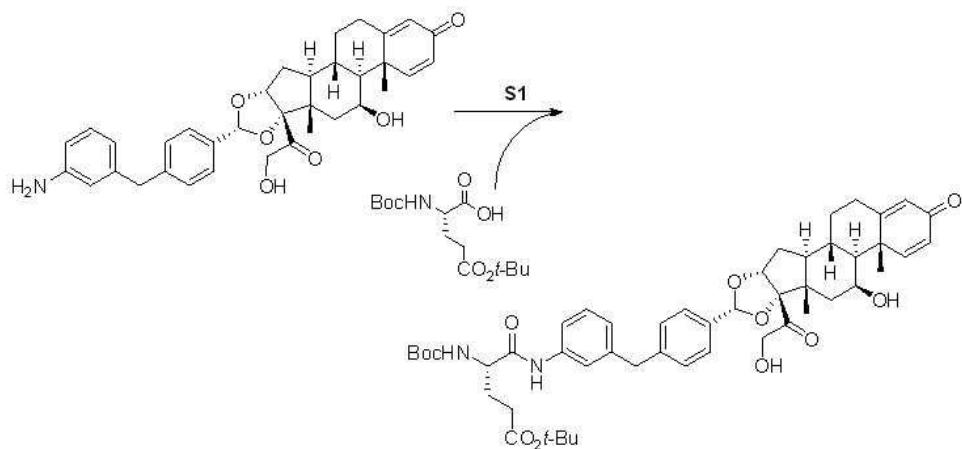


[0256]

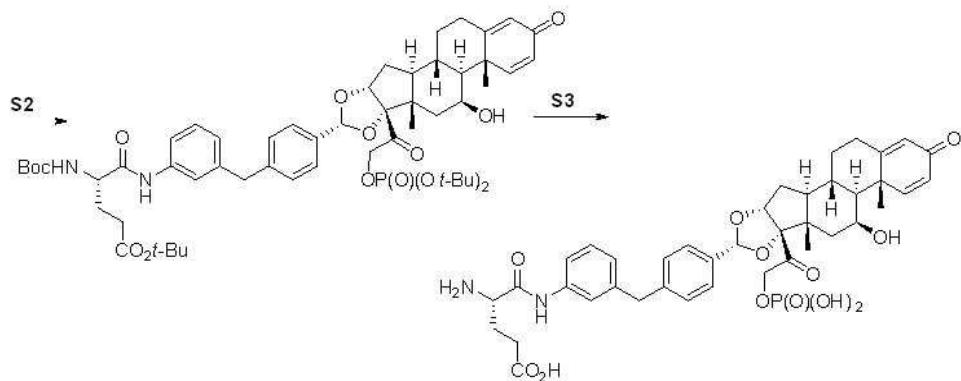
[0257] 전구체 실시예 8 생성물을 실시예 6과 유사한 절차에서 (6aS,6bR,7S,8aS,8bS,10R,11aR,12aS,12bS)-10-(4-(3-아미노벤질)페닐)-6b-플루오로-7-하이드록시-8b-(2-하이드록시아세틸)-6a,8a-디메틸-1,2,6a,6b,7,8,8a,8b,11a,12,12a,12b-도데카하이드로-4H-나프토[2',1':4,5]인페노[1,2-d][1,3]디옥솔-4-온을 사용하여 합성하였다. LCMS (방법 b, 표 7) $R_t = 0.85$ 분; m/z = 881.46 [M+H]⁺.

[0258] ^1H NMR (디메틸실록사이드-d6) δ 0.83 (s, 3H), 1.13 (d, $J = 7.1$ Hz, 3H), 1.24 (d, $J = 7.1$ Hz, 3H), 1.35 (qd, $J = 13.3, 12.8, 5.1$ Hz, 1H), 1.46 (s, 3H), 1.63 (q, $J = 9.7, 8.5$ Hz, 3H), 1.73 – 1.88 (m, 1H), 2.01 (dt, $J = 13.7, 3.5$ Hz, 1H), 2.14 (td, $J = 11.8, 7.2$ Hz, 1H), 2.26 – 2.40 (m, 3H), 2.48 – 2.69 (m, 2H), 3.57 (t, $J = 7.3$ Hz, 2H), 3.85 (s, 2H), 4.17 (ddd, $J = 17.5, 11.7, 6.2$ Hz, 3H), 4.30 (p, $J = 7.2$ Hz, 1H), 4.47 (d, $J = 19.4$ Hz, 1H), 4.83 – 4.95 (m, 1H), 5.40 (s, 2H), 5.99 (d, $J = 1.6$ Hz, 1H), 6.20 (dd, $J = 10.1, 1.9$ Hz, 1H), 6.87 (d, $J = 7.5$ Hz, 1H), 6.95 (s, 2H), 7.16 (t, $J = 7.9$ Hz, 1H), 7.20 (d, $J = 8.1$ Hz, 2H), 7.25 (d, $J = 10.1$ Hz, 1H), 7.31 (d, $J = 8.0$ Hz, 2H), 7.38 (d, $J = 1.9$ Hz, 1H), 7.43 (dd, $J = 8.0, 2.0$ Hz, 1H), 8.01 (d, $J = 7.3$ Hz, 1H), 8.14 (d, $J = 7.1$ Hz, 1H), 9.70 (s, 1H).

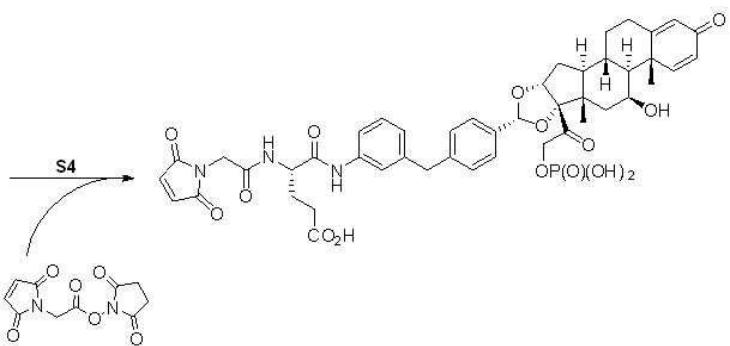
[0259] 전구체 실시예 9: (S)-4-(2-(2,5-디옥소-2,5-디하이드로-1H-페롤-1-일)아세타미도)-5-((3-(4-((6aR,6bS,7S,8aS,8bS,10R,11aR,12aS,12bS)-7-하이드록시-6a,8a-디메틸-4-옥소-8b-(2-(포스포노옥시)아세틸)-2,4,6a,6b,7,8,8a,8b,11a,12,12a,12b-도데카하이드로-1H-나프토[2',1':4,5]인페노[1,2-d][1,3]디옥솔-10-일)벤질)페닐)아미노)-5-옥소펜탄산의 합성.



[0260]



[0261]



[0262]

[0263]

단계 1: *tert*-부틸 (S)-4-((*tert*-부톡시카르보닐)아미노)-5-((3-(4-((6aR,6bS,7S,8aS,8bS,10R,11aR,12aS,12bS)-7-하이드록시-8b-(2-하이드록시아세틸)-6a,8a-디메틸-4-옥소-2,4,6a,6b,7,8,8a,8b,11a,12,12a,12b-도데카하이드로-1H-나프토[2',1':4,5]인데노[1,2-d][1,3]디옥솔-10-일)벤질)페닐)-5-옥소펜타노에이트의 합성. 1-[비스(디메틸아미노)메틸렌]-1H-1,2,3-트리아졸로[4,5-b]페리디늄 3-옥시드 혼사플루오로포스페이트(HATU)(260 mg, 0.685 mmol) 및 2,6-디메틸페리딘(0.184 mL, 1.580 mmol)을 디메틸 포름아미드(6 mL) 중 전구체 실시예 2로부터의 생성물(300 mg, 0.527 mmol) 및 (S)-5-(<i>tert</i>-부톡시)-2-((<i>tert</i>-부톡시카르보닐)아미노)-5-옥소펜탄산(168 mg, 0.553 mmol)의 실온 혼탁액에 첨가하였다. 실온에서 2시간 후, 반응을 에틸 아세테이트(30 mL)로 희석시킨 다음, HCl의 1 N 수용액(2 x 15 mL), NaHCO₃의 포화된 수용액(15 mL) 및 염수(15 mL)로 순차적으로 희석시켰다. 유기층을 건조하고(Na₂SO₄), 용매를 감압 하에 제거하였다. 0-10% 메탄올/디클로로메탄의 구배로 용출하는 크로마토그래피(실리카)에 의한 정제는 표제 화합물(400 mg, 0.47 mmol, 89% 수율)을 황백색 고체로서 제공하였다. LCMS (방법 b, 표 7) R_t=1.09분; MS m/z = 854.9 [M+H]⁺.

[0264]

단계 2: *tert*-부틸 (S)-4-((*tert*-부톡시카르보닐)아미노)-5-((3-(4-((6aR,6bS,7S,8aS,8bS,10R,11aR,12aS,12bS)-8b-(2-((디-*tert*-부톡시포스포릴)옥시)아세틸)-7-하이드록시-6a,8a-디메틸-4-옥소-2,4,6a,6b,7,8,8a,8b,11a,12,12a,12b-도데카하이드로-1H-나프토[2',1':4,5]인데노[1,2-d][1,3]디옥솔-10-일)벤질)페닐)-5-옥소펜타노에이트의 합성. 디-<i>tert</i>-부틸 디에틸포스포라미다이트(0.42 mL, 1.5 mmol)를 디메틸 아세타미드(5 mL) 중 전구체 실시예 9, 단계 1로부터의 생성물(400 mg, 0.468 mmol) 및 1H-테트라졸(0.35 mL, 2.25 mmol)의 실온 용액에 첨가하였다. 반응을 실온에서 2시간 동안 교반하였으며, 이때, 수중 하이드로젠 페옥사이드의 50% 용액(1.5 mL)를 적가하였다. 일단 LCMS가 산화가 완료되었음을 나타내면, 반응을 0°C까지 냉각시키고, Na₂S₂O₃의 1 M 수용액(8 mL)을 첨가하여 켄치(quench)하였다. 혼합물을 에틸 아세테이트(2 X 30 mL)로 추출하고, 조합된 유기층을 염수(15 mL)로 세척하고, 건조하고(Na₂SO₄), 여과하고, 용매를 감압 하에 제거하였다. 분취(preparative) 역상 HPLC에 의한 정제는 표제 화합물(420 mg, 0.40 mmol, 86% 수율)을 제공하였다. LCMS (방법 b, 표 7) R_t=1.27분; MS m/z = 1047.6 [M+H]⁺. ¹H NMR (400 MHz, 디메틸설폐사이드-*d*₆) δ 9.80 (s, 1H), 7.41 (d, *J* = 8.3 Hz, 1H), 7.37 - 7.31 (m, 3H), 7.29 (d, *J* = 10.1 Hz, 1H), 7.20 (d, *J* = 8.0 Hz, 2H), 7.17 (t, *J* = 7.9 Hz, 1H), 6.94 (d, *J* = 8.0 Hz, 1H), 6.88 (d, *J* = 7.5 Hz, 1H), 6.11 (dd, *J* = 10.1, 1.9 Hz, 1H), 5.89 (s, 1H), 5.46 (s, 1H), 5.00 - 4.81 (m, 3H), 4.58 (dd, *J* = 18.0, 9.1 Hz, 1H), 4.26 (s, 1H), 4.00 (d, *J* = 6.7 Hz, 1H), 3.86 (s, 2H), 2.49 (d, *J* = 2.2 Hz, 1H), 2.29 (p, *J* = 2.0 Hz, 1H), 2.27 - 2.16 (m, 2H), 2.06 (d, *J* = 10.3 Hz, 1H), 1.98 (d, *J* = 11.0 Hz, 1H), 1.91 - 1.56 (m, 6H), 1.39 (d, *J* = 1.5 Hz, 18H), 1.35 (s, 3H), 1.33 (s, 18H), 1.01 (t, *J* = 13.7 Hz, 2H), 0.85 (s, 3H).

[0265]

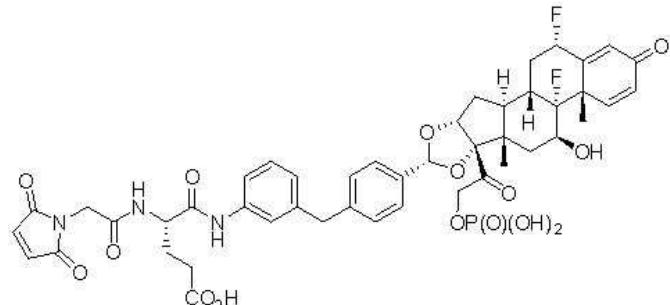
단계 3: (S)-4-아미노-5-((3-(4-((6aR,6bS,7S,8aS,8bS,10R,11aR,12aS,12bS)-7-하이드록시-6a,8a-디메틸-4-옥소-8b-(2-(포스포노옥시)아세틸)-2,4,6a,6b,7,8,8a,8b,11a,12,12a,12b-도데카하이드로-1H-나프토[2',1':4,5]인데노[1,2-d][1,3]디옥솔-10-일)벤질)페닐)-5-옥소펜탄산의 합성. 트리플루오로아세트산(2.0 mL, 0.40 mmol)을 디클로로메탄(6 mL) 중 전구체 실시예 9, 단계 2로부터의 생성물(420 mg, 0.401 mmol)의 실온 용액에 첨가하였다. 혼합물을 실온에서 45분 동안 교반하였으며, 이때, 용매를 감압 하에 제거하였다. 표제 화합물을 추가의 정제 없이 추후에 수행하였다. LCMS (방법 a, 표 7) 주 아세탈 이성질체 R_t=0.69분, MS m/z = 779.8 [M+H]⁺; 부(minor) 아세탈 이성질체 R_t=0.72분, MS m/z = 779.9 [M+H]⁺.

[0266]

단계 4: (S)-4-(2-(2,5-디옥소-2,5-디하이드로-1H-페롤-1-일)아세타미도)-5-((3-(4-((6aR,6bS,7S,8aS,8bS,10R,11aR,12aS,12bS)-7-하이드록시-6a,8a-디메틸-4-옥소-8b-(2-(포스포노옥시)아세틸)-2,4,6a,6b,7,8,8a,8b,11a,12,12a,12b-도데카하이드로-1H-나프토[2',1':4,5]인데노[1,2-d][1,3]디옥솔-10-일)벤질)페닐)-5-옥소펜탄산의 합성. *N,N*-디아이소프로필에틸아민(0.90 mL, 5.1 mmol) 및 말레이미도아세트산 *N*-하이드록시숙신이미드 에스테르(141 mg, 0.561 mmol)를 디메틸 포름아미드(5 mL) 중 전구체 실시예 9, 단계 3으로부터의 생성물(364 mg, 0.467 mmol)의 실온 용액에 순차적으로 첨가하였다. LCMS는 반응이 15분 이내에 완료되었음을 나타내었으며, 이때, 반응을 0°C까지 냉각시키고, 2,2,2-트리플루오로아세트산(0.432 mL, 6.6 mmol)의 첨가에 의해 pH를 1까지 조정하였다. 분취 역상 HPLC에 의한 정제 및 동결건조는 표제 화합물(146 mg, 0.159 mmol, 34% 수율)을 제공하였다. LCMS (방법 b, 표 7) $R_t = 0.79$ 분; MS $m/z = 915.9 [M+H]^+$. ^1H NMR (400 MHz, 디메틸설폐사이드- d_6) δ 9.92 (s, 1H), 8.45 (d, $J = 7.8$ Hz, 1H), 7.43 - 7.38 (m, 1H), 7.35 (d, $J = 8.1$ Hz, 3H), 7.28 (d, $J = 10.1$ Hz, 1H), 7.21 (d, $J = 8.3$ Hz, 3H), 7.16 (d, $J = 7.9$ Hz, 1H), 7.05 (s, 2H), 6.89 (d, $J = 7.6$ Hz, 1H), 6.13 (dd, $J = 10.1, 1.9$ Hz, 1H), 5.89 (d, $J = 1.6$ Hz, 1H), 5.44 (s, 1H), 4.93 - 4.83 (m, 2H), 4.80 (s, 1H), 4.53 (dd, $J = 18.2, 8.2$ Hz, 1H), 4.34 (td, $J = 8.1, 5.3$ Hz, 1H), 4.27 (s, 1H), 4.08 (s, 2H), 3.87 (s, 2H), 2.58 - 2.48 (m, 1H), 2.34 - 2.16 (m, 3H), 2.16 - 2.03 (m, 1H), 2.03 - 1.84 (m, 2H), 1.84 - 1.53 (m, 4H), 1.36 (s, 3H), 1.01 (td, $J = 13.1, 11.3$, 4.0 Hz, 2H), 0.84 (s, 3H).

[0267]

전구체 실시예 10: (S)-4-(2-(2,5-디옥소-2,5-디하이드로-1H-페롤-1-일)아세타미도)-5-((3-(4-((6aR,6bS,7S,8aS,8bS,10R,11aR,12aS,12bS)-7-하이드록시-6a,8a-디메틸-4-옥소-8b-(2-(포스포노옥시)아세틸)-2,4,6a,6b,7,8,8a,8b,11a,12,12a,12b-도데카하이드로-1H-나프토[2',1':4,5]인데노[1,2-d][1,3]디옥솔-10-일)벤질)페닐)-5-옥소펜탄산의 합성.



[0268]

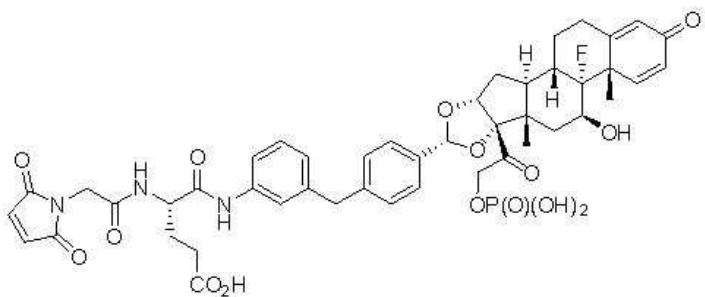
전구체 실시예 10 생성물을 전구체 실시예 9와 유사한 절차에서 전구체 실시예 1, 단계 6으로부터의 생성물을 사용하여 합성하였다. LCMS (방법 b, 표 7) $R_t = 0.79$ 분; MW $m/z = 974.3 [M+Na]^+$.

[0270]

^1H NMR (400 MHz, 디메틸설폐사이드- d_6) δ 9.91 (s, 1H), 8.45 (d, $J = 7.8$ Hz, 1H), 7.42 (dd, $J = 8.0, 1.9$ Hz, 1H), 7.37 - 7.29 (m, 3H), 7.28 - 7.20 (m, 3H), 7.17 (t, $J = 7.9$ Hz, 1H), 7.04 (s, 1H), 6.89 (d, $J = 7.6$ Hz, 1H), 6.26 (dd, $J = 10.2, 1.8$ Hz, 1H), 6.09 (s, 1H), 5.67 (dd, $J = 11.2, 6.7$ Hz, 1H), 5.60 - 5.48 (m, 2H), 4.94 - 4.85 (m, 2H), 4.56 (dd, $J = 18.2, 8.4$ Hz, 1H), 4.34 (td, $J = 8.2, 5.4$ Hz, 1H), 4.23 - 4.13 (m, 1H), 4.08 (s, 2H), 3.86 (s, 2H), 2.69 - 2.52 (m, 1H), 2.32 - 2.12 (m, 4H), 2.03 (dt, $J = 13.7, 3.7$ Hz, 1H), 1.96 - 1.85 (m, 1H), 1.83 - 1.60 (m, 4H), 1.55 - 1.41 (m, 4H), 0.85 (s, 3H).

[0271]

전구체 실시예 11: (S)-4-(2-(2,5-디옥소-2,5-디하이드로-1H-페롤-1-일)아세타미도)-5-((3-(4-((6aS,6bR,7S,8aS,8bS,10R,11aR,12aS,12bS)-6b-플루오로-7-하이드록시-6a,8a-디메틸-4-옥소-8b-(2-(포스포노옥시)아세틸)-2,4,6a,6b,7,8,8a,8b,11a,12,12a,12b-도데카하이드로-1H-나프토[2',1':4,5]인데노[1,2-d][1,3]디옥솔-10-일)벤질)페닐)-5-옥소펜탄산의 합성.



[0272]

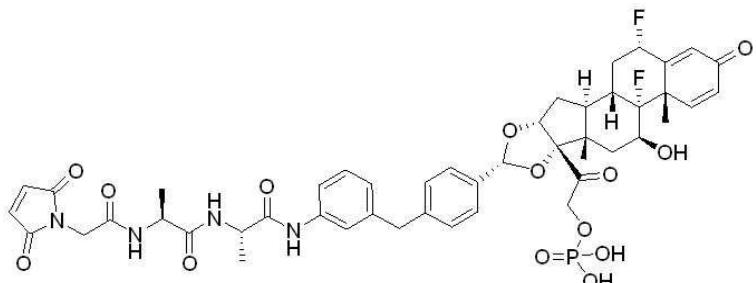
[0273] 전구체 실시예 11 생성물을 전구체 실시예 9와 유사한 절차에서 전구체 실시예 3으로부터의 생성물을 사용하여 합성하였다. LCMS (방법 b, 표 7) $R_t = 0.80$ 분; MW m/z 934 $[M+H]^+$.

[0274]

^1H NMR (400 MHz, 디메틸설폐사이드-d6) δ 0.89 (s, 3H), 1.39 (dd, $J = 12.7, 5.1$ Hz, 1H), 1.50 (s, 3H), 1.67 (q, $J = 6.2$ Hz, 3H), 1.76 – 2.02 (m, 3H), 2.07 (d, $J = 13.1$ Hz, 1H), 2.22 (dt, $J = 16.7, 11.1, 10.4, 4.6$ Hz, 3H), 2.31 – 2.43 (m, 1H), 2.57 – 2.75 (m, 1H), 3.90 (s, 2H), 4.11 (s, 2H), 4.20 (d, $J = 8.9$ Hz, 1H), 4.38 (td, $J = 8.2, 5.5$ Hz, 1H), 4.58 (dd, $J = 18.2, 8.3$ Hz, 1H), 4.84 – 5.00 (m, 2H), 5.51 (d, $J = 8.5$ Hz, 2H), 6.04 (d, $J = 1.7$ Hz, 1H), 6.24 (dd, $J = 10.2, 1.9$ Hz, 1H), 6.88 – 6.99 (m, 1H), 7.09 (s, 2H), 7.15 – 7.32 (m, 4H), 7.32 – 7.42 (m, 3H), 7.42 – 7.53 (m, 1H), 8.48 (d, $J = 7.9$ Hz, 1H), 9.95 (s, 1H).

[0275]

전구체 실시예 12. 2-((2S,6aS.,6bR,7S,8aS,8bS,10R,11aR,12aS,12bS)-10-(4-(3-((S)-2-((S)-2-(2-(2,5-디옥소-2,5-디하이드로-1H-페롤-1-일)아세타미도)프로판아미도)프로판아미도)벤질)페닐)-2,6b-디플루오로-7-하이드록시-6a,8a-디메틸-4-옥소-1,2,4,6a,6b,7,8,8a,11a,12,12a,12b-도데카하이드로-8bH-나프토[2',1':4,5]인데노[1,2-d][1,3]디옥솔-8b-일)-2-옥소에틸 디하이드로겐 포스페이트



[0276]

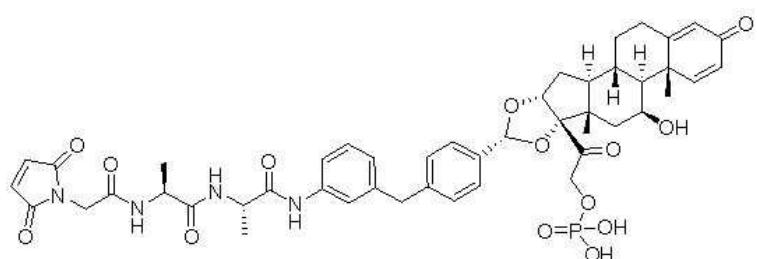
[0277] 전구체 실시예 12 생성물을 전구체 실시예 9와 유사한 절차에서 전구체 실시예 1의 아미노 생성물, 전구체 실시예 6(단계 1)으로부터의 디펩타이드, 및 전구체 실시예 9(단계 4)로부터의 말레이미드 시약을 사용하여 합성하였다. LCMS (방법 b, 표 7) $R_t = 0.82$ 분; m/z = 965.2 $[M+H]^+$.

[0278]

^1H NMR (400 MHz, 디메틸설폐사이드-d6) δ 9.74 (s, 1H), 8.36 (d, $J = 7.3$ Hz, 1H), 8.09 (d, $J = 7.2$ Hz, 1H), 7.40 (dd, $J = 8.0, 2.0$ Hz, 1H), 7.35 (d, $J = 1.8$ Hz, 1H), 7.32 (d, $J = 7.9$ Hz, 2H), 7.26 7.19 (m, 3H), 7.15 (t, $J = 7.8$ Hz, 1H), 7.04 (s, 2H), 6.87 (d, $J = 7.5$ Hz, 1H), 6.26 (dd, $J = 10.1, 1.9$ Hz, 1H), 6.09 (s, 1H), 5.74 5.51 (m, 2H), 5.50 (s, 1H), 4.96 4.83 (m, 2H), 4.56 (dd, $J = 18.2, 8.4$ Hz, 1H), 4.29 (dp, $J = 14.3, 7.1$ Hz, 2H), 4.18 (d, $J = 9.3$ Hz, 1H), 4.11 3.98 (m, 2H), 3.85 (s, 2H), 2.62 (dt, $J = 33.1, 12.3, 4.2$ Hz, 1H), 2.34 2.14 (m, 2H), 2.03 (dt, $J = 13.3, 3.7$ Hz, 1H), 1.67 (dd, $J = 13.2, 5.1$ Hz, 3H), 1.46 (s, 4H), 1.24 (d, $J = 7.1$ Hz, 3H), 1.17 (d, $J = 7.0$ Hz, 3H), 0.85 (s, 3H).

[0279]

전구체 실시예 13. 2-((6aR,6bS,7S,8aS,8bS,10R,11aR,12aS,12bS)-10-(4-(3-((S)-2-((S)-2-(2-(2,5-디옥소-2,5-디하이드로-1H-페롤-1-일)아세타미도)프로판아미도)프로판아미도)벤질)페닐)-7-하이드록시-6a,8a-디메틸-4-옥소-1,2,4,6a,6b,7,8,8a,11a,12,12a,12b-도데카하이드로-8bH-나프토[2',1':4,5]인데노[1,2-d][1,3]디옥솔-8b-일)-2-옥소에틸 디하이드로겐 포스페이트



[0280]

[0281]

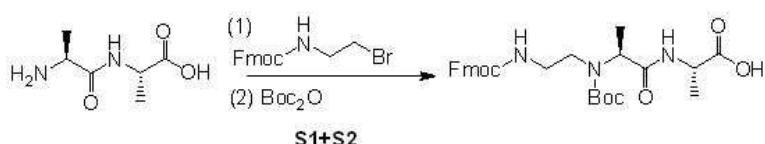
전구체 실시예 13 생성물을 전구체 실시예 9와 유사한 절차에서 전구체 실시예 2로부터의 아미노 생성물, 전구체 실시예 6(단계 1)으로부터의 디펩타이드 및 전구체 실시예 9(단계 4)로부터의 말레이미드 시약을 사용하여 합성하였다. LCMS (방법 c, 표 7) $R_t = 0.82$ 분; $m/z = 929.4 [M+H]^+$.

[0282]

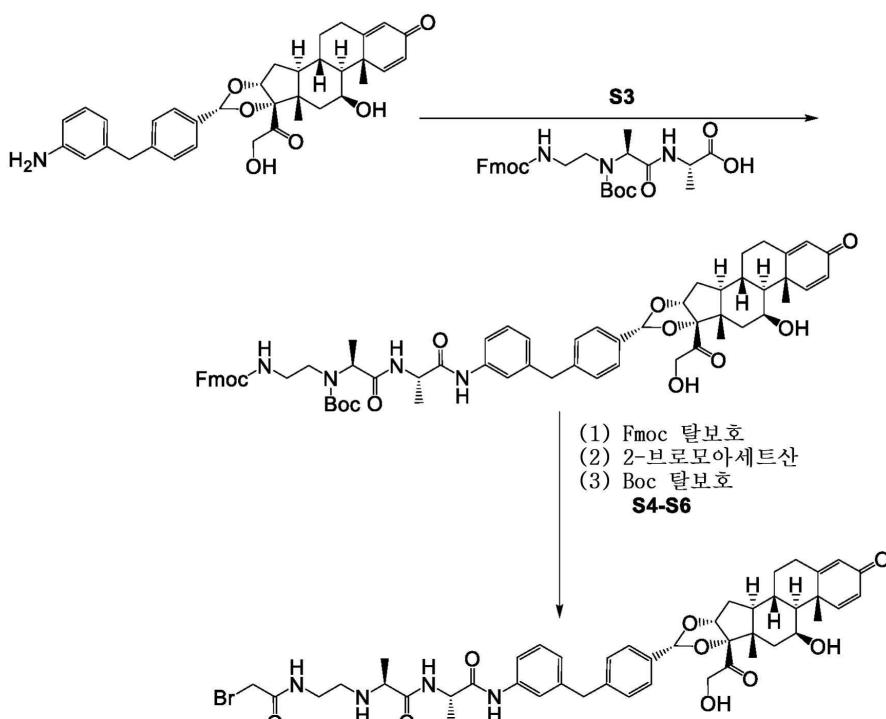
¹H NMR (400MHz, 디메틸실록사이드-d₆) δ = 9.79 (s, 1H), 8.42 (br d, J=7.5 Hz, 1H), 8.15 (br d, J=7.0 Hz, 1H), 7.49 – 7.28 (m, 5H), 7.25 – 7.12 (m, 3H), 7.07 (s, 2H), 6.90 (br d, J=7.5 Hz, 1H), 6.16 (br d, J=10.1 Hz, 1H), 5.92 (s, 1H), 5.48 (s, 1H), 4.96 – 4.85 (m, 2H), 4.56 (dd, J=8.3, 18.4 Hz, 1H), 4.37 – 4.23 (m, 3H), 4.08 (br d, J=2.6 Hz, 2H), 3.89 (s, 2H), 2.19 – 1.95 (m, 3H), 1.84 – 1.60 (m, 6H), 1.38 (s, 3H), 1.27 (br d, J=7.0 Hz, 3H), 1.20 (br d, J=6.6 Hz, 3H), 1.02 (br d, J=11.4 Hz, 2H), 0.87 (s, 3H), 0.00 – 0.00 (m, 1H).

[0283]

전구체 실시 예 14A. (S)-2-((2-(2-브로모아세타미도)에틸)아미노)-N-((S)-1-((3-(4-((6aR, 6bS, 7S, 8aS, 8bS, 10R, 11aR, 12aS, 12bS)-7-하이드록시-8b-(2-하이드록시아세틸)-6a, 8a-디메틸-4-옥소-2, 4, 6a, 6b, 7, 8, 8a, 8b, 11a, 12, 12a, 12b-도데카하이드로-1H-나프토[2', 1':4, 5]인데노[1, 2-d][1, 3]디옥솔-10-일(베질)페닐)아미노)-1-옥소프로파-2-일)프로파아미드



[0284]



[0285]

전구체 식시예

N-(((((9H-플루오렌-9-일)메톡시)카르보닐)아미노)에틸)-N-(tert-부톡시카르보닐)-L-알라닐-L-알라닌(단계 S1 및 S2의 생성물)을 실시예 2의 아미노 생성물을 커플링시키고, 뒤이어 단계 S4-S6: (1) Fmoc 탈보호, (2) 2-브

로모아세트산과의 커플링, 및 (3) Boc 탈보호에 의해 합성할 수 있다. Fmoc = 플루오레닐메틸옥시카르보닐; Boc = tert부록시카르보닐.

[0287] 부가적인 전구체 실시예

표 10에 열거된 실시예 14B-48 브로모 아세타미드 생성물은 본원에 기재된 절차에 따라 합성될 수 있다.

표 10. 부가적인 브로모 아세타미드 전구체

실시예	브로모 아세타미드 생성물	합성 프로토콜
14 B		<p>실시예 6 단계 1과 2 및 실시예 단계 5와 유사한 경로를 사용하여 실시예 2로부터 제조될 수 있다.</p> <p>이 전구체에 대한 합성 프로토콜 및 특징화 또한, 이 표에 따라 제공된다.</p>
15		<p>실시예 6 단계 1과 2 및 실시예 단계 5와 유사한 경로를 사용하여 실시예 2로부터 제조될 수 있다.</p> <p>이 전구체에 대한 합성 프로토콜 및 특징화 또한, 이 표에 따라 제공된다.</p>
16		<p>실시예 4와 유사한 경로를 사용하여 실시예 2로부터 제조될 수 있다.</p>

표 10. 부가적인 브로모 아세타미드 전구체

실시예	브로모 아세타미드 생성물	합성 프로토콜
17		실시예 4와 유사한 경로를 사용하여 실시예 2로부터 제조될 수 있다.
18 A		실시예 14A 와 유사한 경로를 사용하여 실시예 2로부터 제조될 수 있다.
18 B		실시예 6 단계 1과 2 및 실시예 4와 유사한 경로를 사용하여 실시예 2로부터 제조될 수 있다.
19		실시예 6 단계 1과 2 및 실시예 4와 유사한 경로를 사용하여 실시예 2로부터 제조될 수 있다.

[0290]

표 10. 부가적인 브로모 아세타미드 전구체

실시예	브로모 아세타미드 생성물	합성 프로토콜
20		실시예4와 유사한 경로를 사용하여 실시예 2로부터 제조될 수 있다.
21 A		실시예 14A와 유사한 경로를 사용하여 실시예 1로부터 제조될 수 있다.
21 B		실시예 6 단계1과2 및 실시예4 단계5와 유사한 경로를 사용하여 실시예 1로부터 제조될 수 있다. 이 전구체에 대한 합성 프로토콜 및 특징화 또한, 이 표에 따라 제공된다.

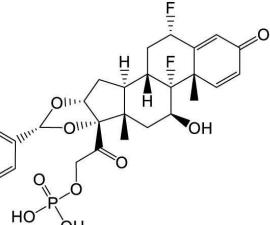
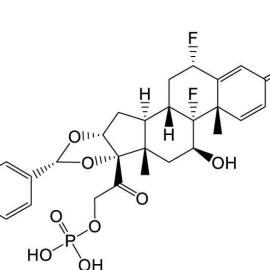
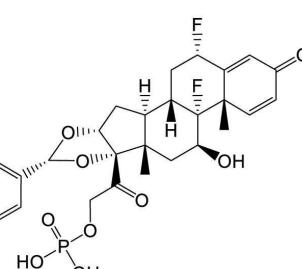
[0291]

표 10. 부가적인 브로모 아세타미드 전구체

실시예	브로모 아세타미드 생성물	합성 프로토콜
22		실시예 6 단계 1 과 2 및 실시예 4 단계 5 와 유사한 경로를 사용하여 실시예 1로부터 제조될 수 있다. 이 전구체에 대한 합성 프로토콜 및 특정화 또한, 이 표에 따라 제공된다.
23		실시예 4 와 유사한 경로를 사용하여 실시예 1로부터 제조될 수 있다. 이 전구체에 대한 합성 프로토콜 및 특정화 또한, 이 표에 따라 제공된다.
24		실시예 4 와 유사한 경로를 사용하여 실시예 1로부터 제조될 수 있다. 이 전구체에 대한 합성

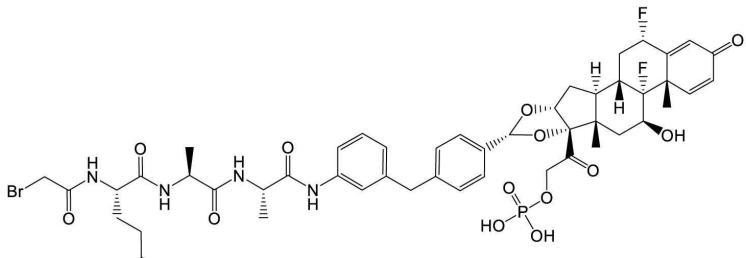
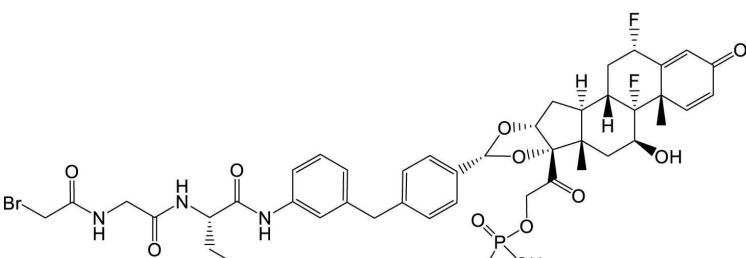
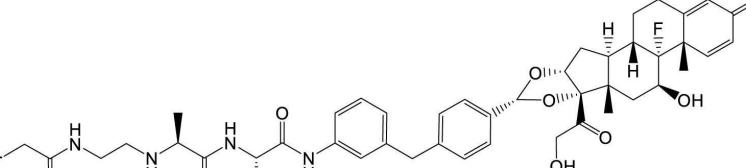
[0292]

표 10. 부가적인 브로모 아세타미드 전구체

실시예	브로모 아세타미드 생성물	합성 프로토콜
		프로토콜 및 특징화 또한, 이 표에 따라 제공된다.
25 A		실시예 14A와 유사한 경로를 사용하여 실시예 1로부터 제조될 수 있다.
25 B		실시예 6 단계 1과 2 및 실시예 4와 유사한 경로를 사용하여 실시예 1로부터 제조될 수 있다. 이 전구체에 대한 합성 프로토콜 및 특징화 또한, 이 표에 따라 제공된다.
26		실시예 6 단계 1과 2 및 실시예 4와 유사한 경로를 사용하여 실시예 1로부터 제조될 수 있다. 이 전구체에 대한 합성

[0293]

표 10. 부가적인 브로모 아세타미드 전구체

실시예	브로모 아세타미드 생성물	합성 프로토콜
		프로토콜 및 특징화 또한, 이 표에 따라 제공된다.
27	 <p>27</p>	실시예 4와 유사한 경로를 사용하여 실시예 1로부터 제조될 수 있다. 이 전구체에 대한 합성 프로토콜 및 특징화 또한, 이 표에 따라 제공된다.
28	 <p>28</p>	실시예 4와 유사한 경로를 사용하여 실시예 1로부터 제조될 수 있다. 이 전구체에 대한 합성 프로토콜 및 특징화 또한, 이 표에 따라 제공된다.
29 A	 <p>29 A</p>	실시예 14A와 유사한 경로를 사용하여 실시예 3으로부터 제조될 수 있다.

[0294]

표 10. 부가적인 브로모 아세타미드 전구체

실시예	브로모 아세타미드 생성물	합성 프로토콜
29 B		실시예 6 단계 1과 2 및 실시예 4 단계 5와 유사한 경로를 사용하여 실시예 3으로부터 제조될 수 있다.
30		실시예 6 단계 1과 2 및 실시예 4 단계 5와 유사한 경로를 사용하여 실시예 3으로부터 제조될 수 있다.
31		실시예 4와 유사한 경로를 사용하여 실시예 3으로부터 제조될 수 있다.
32		실시예 4와 유사한 경로를 사용하여 실시예 3으로부터 제조될 수 있다.

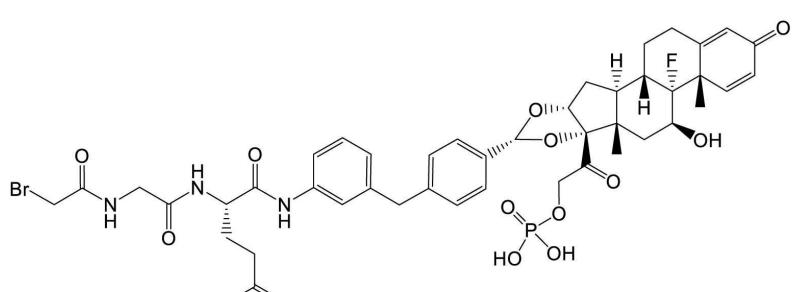
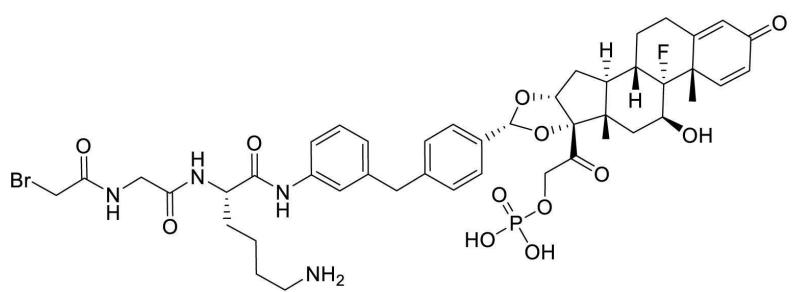
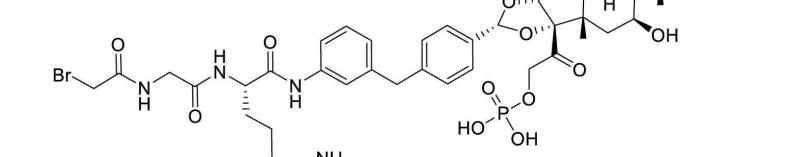
[0295]

표 10. 부가적인 브로모 아세타미드 전구체

실시예	브로모 아세타미드 생성물	합성 프로토콜
33 A		실시예 14A와 유사한 경로를 사용하여 실시예 3으로부터 제조될 수 있다.
33 B		실시예 6 단계 1과 2 및 실시예 4와 유사한 경로를 사용하여 실시예 3으로부터 제조될 수 있다.
34		실시예 6 단계 1과 2 및 실시예 4와 유사한 경로를 사용하여 실시예 3으로부터 제조될 수 있다.
35		실시예 4와 유사한 경로를 사용하여 실시예 3으로부터 제조될 수 있다.

[0296]

표 10. 부가적인 브로모 아세타미드 전구체

설 시 예	브로모 아세타미드 생성물	합성 프로토콜
36		<p>실시예 4 와 유사한 경로를 사용하여 실시예 3 으로부터 제조될 수 있다.</p> <p>이 전구체에 대한 합성 프로토콜 및 특징화 또한, 이 표에 따라 제공된다.</p>
37		<p>실시예 5 와 유사한 경로를 사용하여 실시예 3 으로부터 제조될 수 있다.</p> <p>이 전구체에 대한 합성 프로토콜 및 특징화 또한, 이 표에 따라 제공된다.</p>
38		<p>실시예 5 와 유사한 경로를 사용하여 실시예 2 로부터 제조될 수 있다.</p>

[0297]

표 10. 부가적인 브로모 아세타미드 전구체

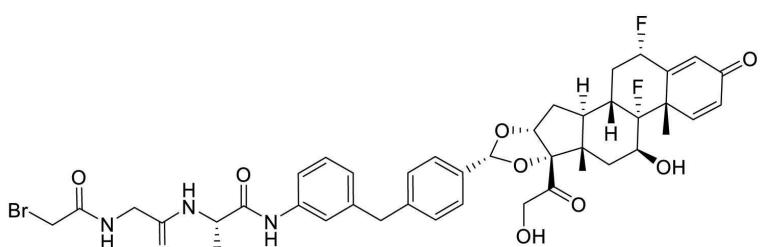
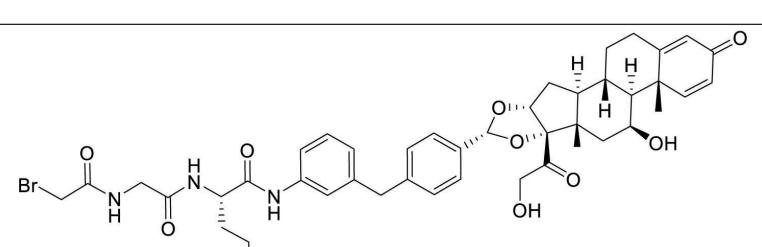
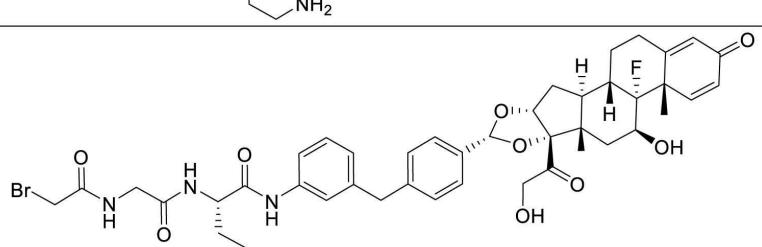
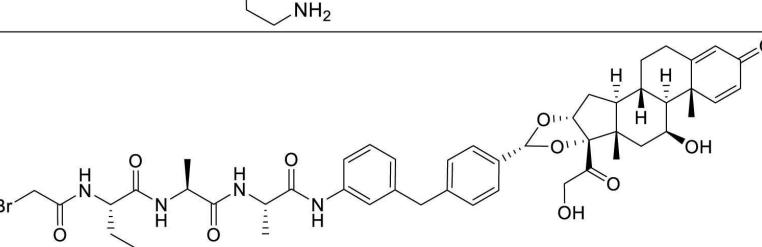
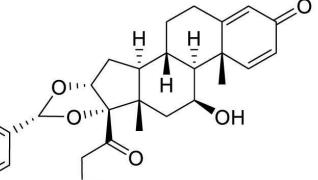
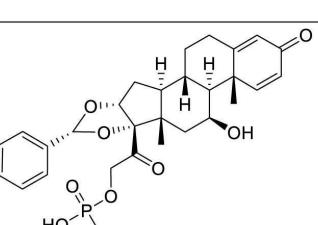
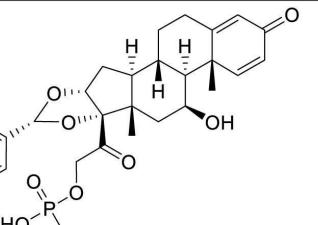
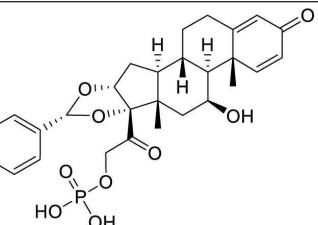
설 시 예	브로모 아세타미드 생성물	합성 프로토콜
39		실시예5와 유사한 경로를 사용하여 실시예 2로부터 제조될 수 있다. 이 전구체에 대한 합성 프로토콜 및 특징화 또한, 이 표에 따라 제공된다.
40		실시예5와 유사한 경로를 사용하여 실시예 2로부터 제조될 수 있다.
41		실시예5와 유사한 경로를 사용하여 실시예 3으로부터 제조될 수 있다.
42		이 전구체에 대한 합성 프로토콜 및 특징화 또한, 이 표에 따라 제공된다.

표 10. 부가적인 브로모 아세타미드 전구체

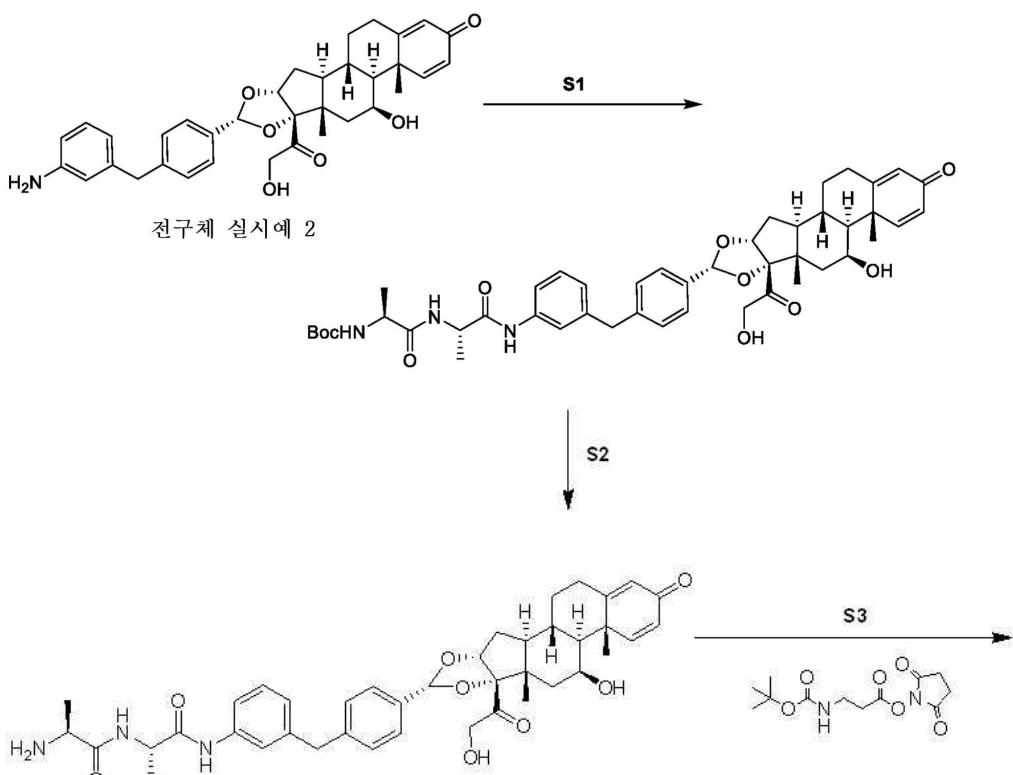
설 시 예	브로모 아세타미드 생성물	합성 프로토콜
43		이 전구체에 대한 합성 프로토콜 및 특징화 또한, 이 표에 따라 제공된다.
44		이 전구체에 대한 합성 프로토콜 및 특징화 또한, 이 표에 따라 제공된다.
45		이 전구체에 대한 합성 프로토콜 및 특징화 또한, 이 표에 따라 제공된다.
46		이 전구체에 대한 합성 프로토콜 및 특징화 또한, 이 표에 따라 제공된다.

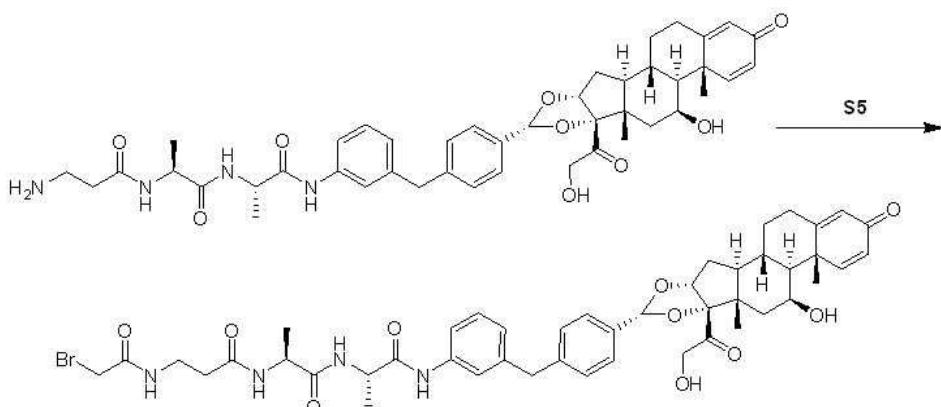
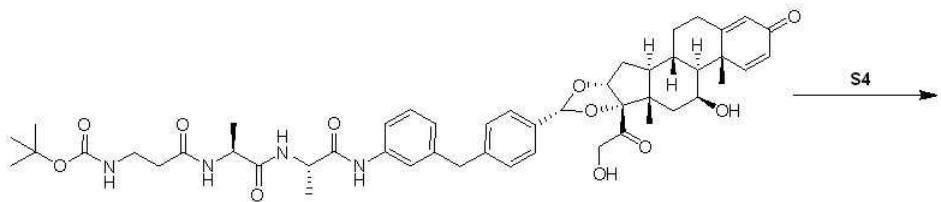
[0299]

표 10. 부가적인 브로모 아세타미드 전구체

실시예	브로모 아세타미드 생성물	합성 프로토콜
47	<p>Chemical structure of compound 47: A complex molecule consisting of a bromoacetyl group, a dipeptide (Boc-Arg-Pro-NH₂), a triphenylmethyl group, and a steroid core substituted with a phosphonate group and two fluorine atoms.</p>	<p>이 전구체에 대한 합성 프로토콜 및 특징화 또한, 이 표에 따라 제공된다.</p>
48	<p>Chemical structure of compound 48: A complex molecule consisting of a bromoacetyl group, a dipeptide (Boc-Arg-Pro-NH₂), a triphenylmethyl group, and a steroid core substituted with a hydroxyl group and two fluorine atoms.</p>	<p>이 전구체에 대한 합성 프로토콜 및 특징화 또한, 이 표에 따라 제공된다.</p>

전구체 실시예 14B. 3-(2-브로모아세타미도)-N-((S)-1-((S)-1-((3-(4-((6aR,6bS,7S,8aS,8bS,10R,11aR,12aS,12bS)-7-하이드록시-8b-(2-하이드록시아세틸)-6a,8a-디메틸-4-옥소-2,4,6a,6b,7,8,8a,8b,11a,12,12a,12b-도데카하이드로-1H-나프토[2',1':4,5]인데노[1,2-d][1,3]디옥솔-10-일)벤질)페닐)아미노)-1-옥소프로판-2-일)아미노)-1-옥소프로판-2-일)프로판아미드





단계 1: *tert*-부틸 ((S)-1-(((S)-1-((3-(4-((6aR,6bS,7S,8aS,8bS,10R,11aR,12aS,12bS)-7-하이드록시-8b-(2-하이드록시아세틸)-6a,8a-디메틸-4-옥소-2,4,6a,6b,7,8,8a,8b,11a,12,12a,12b-도데카하이드로-1H-나프토[2',1':4,5]인데노[1,2-d][1,3]디옥솔-10-일)벤질)페닐)아미노)-1-옥소프로판-2-일)아미노)-1-옥소프로판-2-일)카르바메이트의 합성. 테트라하이드로푸란(140 mL) 중 (*tert*-부톡시카르보닐)-L-알라닐-L-알라닌(11.9 g, 45.6 mmol, 1.30 eq)의 용액에 N-에톡시카르보닐-2-에톡시-1,2-디하이드로퀴논(11.3 g, 45.6 mmol, 1.30 eq)을 첨가하고, 반응 혼합물을 15°C에서 0.5시간 동안 교반하였다. 그 후에, 전구체 실시에 2의 생성물 ((6aR,6bS,7S,8aS,8bS,10R,11aR,12aS,12bS)-10-(4-(3-아미노벤질)페닐)-7-하이드록시-8b-(2-하이드록시아세틸)-6a,8a-디메틸-1,2,6a,6b,7,8,8a,8b,11a,12,12a,12b-도데카하이드로-4H-나프토[2',1':4,5]인데노[1,2-d][1,3]디옥솔-4-온(20.0 g, 35.1 mmol))을 첨가하고, 혼합물을 15°C에서 2시간 동안 교반하였다. 반응 혼합물을 감압 하에 농축시켜, 잔여물을 제공하고, 실리카 젤(SiO₂, 석유 에테르/에틸 아세테이트 = 3/1 → 0/1) 상에 서의 컬럼 크로마토그래피에 의해 정제하여, 표제 화합물(25.0 g, 88% 수율)을 수득하였다. ¹H NMR (400MHz 디메틸실폭사이드-*d*6) δ 9.85 (s, 1H), 7.96 (d, J = 7.2 Hz, 1H), 7.37-7.41 (m, 4H), 7.31 (d, J = 10.0 Hz, 1H), 7.21-7.23 (m, 3H), 6.94 (dd, J = 23.6, 7.2 Hz, 2H), 6.16 (d, J = 10.0 Hz, 1H), 5.93 (s, 1H), 5.41 (s, 1H), 5.08 (t, J = 5.6 Hz, 1H), 4.92 (d, J = 5.2 Hz, 1H), 4.78 (d, J = 3.2 Hz, 1H), 4.50 (dd, J = 19.6, 6.4 Hz, 1H), 4.35-4.38 (m, 1H), 4.29 (s, 1H), 4.18 (dd, J = 19.6, 5.6 Hz, 1H), 3.98-4.16 (m, 1H), 3.89 (s, 2H), 2.54-2.58 (m, 1H), 2.31 (d, J = 10.8 Hz, 1H), 2.03 - 2.10 (m, 2H), 1.67 - 1.77 (m, 6H), 1.39 (s, 3H), 1.37 (s, 9H), 1.16-1.19 (m, 3H), 1.01-1.03 (m, 2H), 0.86 (s, 3H).

단계 2: (S)-2-아미노-N-((S)-1-((3-(4-((6aR,6bS,7S,8aS,8bS,10R,11aR,12aS,12bS)-7-하이드록시-8b-(2-하이드록시아세틸)-6a,8a-디메틸-4-옥소-2,4,6a,6b,7,8,8a,8b,11a,12,12a,12b-도데카하이드로-1H-나프토[2',1':4,5]인데노[1,2-d][1,3]디옥솔-10-일)벤질)페닐)아미노)-1-옥소프로판-2-일)프로판아미드 하이드로클로라이드의 합성. HCl/메틸 *tert*-부틸 에테(ethe)(90 mL, 4 M) 중 *tert*-부틸((S)-1-(((S)-1-((3-(4-((6aR,6bS,7S,8aS,8bS,10R,11aR,12aS,12bS)-7-하이드록시-8b-(2-하이드록시아세틸)-6a,8a-디메틸-4-옥소-2,4,6a,6b,7,8,8a,8b,11a,12,12a,12b-도데카하이드로-1H-나프토[2',1':4,5]인데노[1,2-d][1,3]디옥솔-10-일)벤질)페닐)아미노)-1-옥소프로판-2-일)카르바메이트(15.0 g, 18.5 mmol, 1.0 eq)의 용액을 20°C에서 0.5시간 동안 교반하였다. 반응 혼합물을 여과하고, 필터 점결물(filter cake)을 건조하였다. 잔여물을 prep-HPLC에 의해 정제하여, 표제 화합물(10.2 g, 74% 수율)을 수득하였다. ¹H NMR (400 MHz 디메틸실폭사이드-*d*6) δ 10.0 (s, 1H), 8.68 (d, J = 7.2 Hz, 1H), 8.13 (br d, J = 3.6 Hz, 3H), 7.43 - 7.45 (m, 2H), 7.39 (d, J = 7.6 Hz, 2H), 7.32 (d, J = 10.4 Hz, 1H), 7.21 - 7.24 (m, 3H), 6.93 (br d, J = 7.6 Hz, 1H), 6.16 (dd, J = 10.0, 1.6 Hz, 1H), 5.93 (s, 1H), 5.41 (s, 1H), 4.92 (d, J = 4.8 Hz, 1H), 4.82 (br s, 1H), 4.41 - 4.52 (m, 2H), 4.29 (br s, 1H), 4.18 (d, J = 19.6 Hz, 1H), 3.87 - 3.89 (m, 3H), 2.54 - 2.58 (m, 1H), 2.29 - 2.33 (m, 1H), 2.01 - 2.03 (m, 2H), 1.67 - 1.77 (m, 5H), 1.40 (s, 3H), 1.34

(dd, $J = 14.4, 6.8$ Hz, 6H), 1.02 – 1.03 (m, 2H), 0.86 (s, 3H).

[0308]

단계 3: tert-부틸 (3-(((S)-1-((3-(4-((6aR,6bS,7S,8aS,8bS,10R,11aR,12aS,12bS)-7-하이드록시-8b-(2-하이드록시아세틸)-6a,8a-디메틸-4-옥소-2,4,6a,6b,7,8,8a,8b,11a,12,12a,12b-도데카하이드로-1H-나프토[2',1':4,5]인데노[1,2-d][1,3]디옥솔-10-일)벤질)페닐)아미노)-1-옥소프로판-2-일)아미노)-1-옥소프로판-2-일)아미노)-3-옥소프로필)카르바메이트의 합성. 디메틸포름아미드(3 mL) 중 2,5-디옥소페롤리딘-1-일 3-((tert-부톡시카르보닐)아미노)프로파노에이트(205 mg, 0.716 mmol)의 용액에 (S)-2-아미노-N-((S)-1-((3-(4-((6aR,6bS,7S,8aS,8bS,10R,11aR,12aS,12bS)-7-하이드록시-8b-(2-하이드록시아세틸)-6a,8a-디메틸-4-옥소-2,4,6a,6b,7,8,8a,8b,11a,12,12a,12b-도데카하이드로-1H-나프토[2',1':4,5]인데노[1,2-d][1,3]디옥솔-10-일)벤질)페닐)아미노)-1-옥소프로판-2-일)프로판아미드(333 mg, 0.477 mmol) 및 N,N-디이소프로필에틸아민(0.167 mL, 0.954 mmol)을 25°C에서 첨가하였다. 반응을 25°C에서 2시간 동안 교반하였다. 2개의 부가적인 바이얼을 상기 기술된 바와 같이 설정하였다. 모든 3개의 반응 혼합물을 조합하고, Prep-HPLC(방법 AA1)에 의해 정제하여, 표제 화합물(300 mg, 24% 수율)을 수득하였다. LCMS (방법 AA13) Rt = 1.152분, m/z 883.5 (M+H)⁺.

[0309]

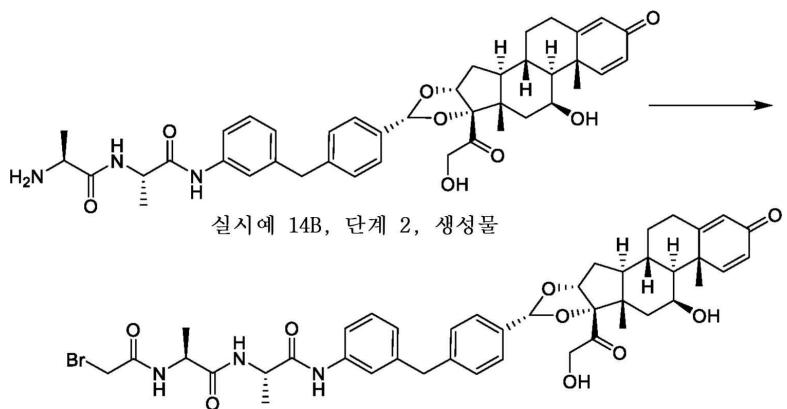
단계 4: 3-아미노-N-((S)-1-((3-(4-((6aR,6bS,7S,8aS,8bS,10R,11aR,12aS,12bS)-7-하이드록시-8b-(2-하이드록시아세틸)-6a,8a-디메틸-4-옥소-2,4,6a,6b,7,8,8a,8b,11a,12,12a,12b-도데카하이드로-1H-나프토[2',1':4,5]인데노[1,2-d][1,3]디옥솔-10-일)벤질)페닐)아미노)-1-옥소프로판-2-일)아미노)-1-옥소프로판-2-일)프로판아미드의 합성. 디클로로메탄(1 mL) 중 tert-부틸 (3-(((S)-1-((3-(4-((6aR,6bS,7S,8aS,8bS,10R,11aR,12aS,12bS)-7-하이드록시-8b-(2-하이드록시아세틸)-6a,8a-디메틸-4-옥소-2,4,6a,6b,7,8,8a,8b,11a,12,12a,12b-도데카하이드로-1H-나프토[2',1':4,5]인데노[1,2-d][1,3]디옥솔-10-일)벤질)페닐)아미노)-1-옥소프로판-2-일)아미노)-1-옥소프로판-2-일)아미노)-3-옥소프로필)카르바메이트(100 mg, 0.113 mmol)의 용액에 트리플루오로아세트산(0.33 mL, 4.28 mmol)을 25°C에서 첨가하였다. 반응을 25°C에서 1시간 동안 교반하였다. 하나의 부가적인 바이얼을 상기 기술된 바와 같이 설정하였다. 두 반응 혼합물 모두를 조합하고, Prep-HPLC(방법 AA2)에 의해 정제하여, 표제 화합물(50 mg, 28% 수율)을 수득하였다. LCMS (방법 AA13) Rt = 0.987분, m/z 783.4 (M+H)⁺.

[0310]

단계 5: 3-(2-브로모아세타미도)-N-((S)-1-((3-(4-((6aR,6bS,7S,8aS,8bS,10R,11aR,12aS,12bS)-7-하이드록시-8b-(2-하이드록시아세틸)-6a,8a-디메틸-4-옥소-2,4,6a,6b,7,8,8a,8b,11a,12,12a,12b-도데카하이드로-1H-나프토[2',1':4,5]인데노[1,2-d][1,3]디옥솔-10-일)벤질)페닐)아미노)-1-옥소프로판-2-일)아미노)-1-옥소프로판-2-일)프로판아미드의 합성. 디메틸포름아미드(1 mL) 중 2-브로모아세트산(35.5 mg, 0.255 mmol)의 용액에 2-에톡시-1-에톡시카르보닐-1,2-디하이드로퀴논(63.2 mg, 0.255 mmol)을 25°C에서 첨가하였다. 반응을 25°C에서 30분 동안 교반한 다음, 3-아미노-N-((S)-1-((3-(4-((6aR,6bS,7S,8aS,8bS,10R,11aR,12aS,12bS)-7-하이드록시-8b-(2-하이드록시아세틸)-6a,8a-디메틸-4-옥소-2,4,6a,6b,7,8,8a,8b,11a,12,12a,12b-도데카하이드로-1H-나프토[2',1':4,5]인데노[1,2-d][1,3]디옥솔-10-일)벤질)페닐)아미노)-1-옥소프로판-2-일)아미노)-1-옥소프로판-2-일)프로판아미드(100 mg, 0.128 mmol)를 25°C에서 첨가하였다. 반응을 25°C에서 2시간 동안 교반하였다. 하나의 부가적인 바이얼을 상기 기술된 바와 같이 설정하였다. 두 반응 혼합물 모두를 조합하고, Prep-HPLC(방법 AA3)에 의해 정제하여, 표제 화합물(80 mg, 35% 수율)을 수득하였다. LCMS (방법 AA4) Rt: 2.993 min. m/z 905.3 (M+H)⁺. ¹H NMR (메탄올-d4, 400MHz) δ 7.53 – 7.48 (m, 1H), 7.46 – 7.40 (m, 2H), 7.34 (dd, $J=1.5, 8.2$ Hz, 2H), 7.23 – 7.14 (m, 3H), 6.92 (t, $J=7.5$ Hz, 1H), 6.24 (d, $J=9.5$ Hz, 1H), 6.01 (s, 1H), 5.42 (d, $J=1.3$ Hz, 1H), 5.04 (d, $J=4.9$ Hz, 1H), 4.62 (d, $J=19.4$ Hz, 1H), 4.48 – 4.21 (m, 4H), 3.93 (d, $J=2.2$ Hz, 2H), 3.76 (s, 1H), 3.65 (s, 1H), 3.45 (quind, $J=6.4, 12.8$ Hz, 2H), 2.65 (dt, $J=5.6, 13.1$ Hz, 1H), 2.52 – 2.34 (m, 3H), 2.25 (dq, $J=3.9, 10.8$ Hz, 1H), 2.13 (br dd, $J=5.7, 12.6$ Hz, 1H), 1.95 (br d, $J=13.7$ Hz, 1H), 1.89 – 1.64 (m, 5H), 1.48 (s, 3H), 1.43 (dd, $J=2.2, 7.3$ Hz, 3H), 1.36 (dd, $J=7.2, 10.7$ Hz, 3H), 1.20 – 1.07 (m, 1H), 1.03 (ddd, $J=3.6, 7.5, 11.1$ Hz, 1H), 0.98 (s, 3H).

[0311]

전구체 실시예 15: (S)-2-(2-브로모아세타미도)-N-((S)-1-((3-(4-((6aR,6bS,7S,8aS,8bS,10R,11aR,12aS,12bS)-7-하이드록시-8b-(2-하이드록시아세틸)-6a,8a-디메틸-4-옥소-2,4,6a,6b,7,8,8a,8b,11a,12,12a,12b-도데카하이드로-1H-나프토[2',1':4,5]인데노[1,2-d][1,3]디옥솔-10-일)벤질)페닐)아미노)-1-옥소프로판-2-일)프로판아미드



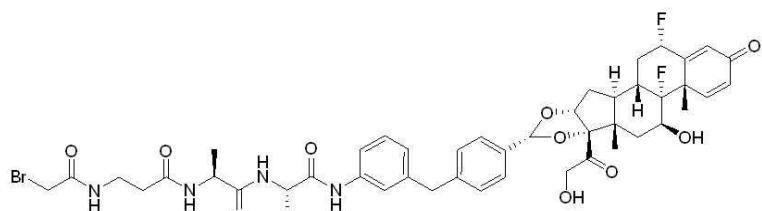
[0312]

[0313]

단계 1: (S)-2-(2-브로모아세타미도)-N-((S)-1-((3-(4-((6aR,6bS,7S,8aS,8bS,10R,11aR,12aS,12bS)-7-하이드록시-8b-(2-하이드록시아세틸)-6a,8a-디메틸-4-옥소-2,4,6a,6b,7,8,8a,8b,11a,12,12a,12b-도데카하이드로-1H-나프토[2',1':4,5]인데노[1,2-d][1,3]디옥솔-10-일)벤질)페닐)아미노)-1-옥소프로판-2-일)프로판아미드의 합성. 디메틸포름아미드(2 mL) 중 2-브로모아세트산(109 mg, 0.787 mmol)의 용액에 2-에톡시-1-에톡시카르보닐-1,2-디하이드로퀴논(195 mg, 0.787 mmol)을 25°C에서 를 첨가하였다. 반응을 25°C에서 30분 동안 교반하였으며, 이때, 전구체 실시예 14B, 단계 2로부터의 생성물 ((S)-2-아미노-N-((S)-1-((3-(4-((6aR,6bS,7S,8aS,8bS,10R,11aR,12aS,12bS)-7-하이드록시-8b-(2-하이드록시아세틸)-6a,8a-디메틸-4-옥소-2,4,6a,6b,7,8,8a,8b,11a,12,12a,12b-도데카하이드로-1H-나프토[2',1':4,5]인데노[1,2-d][1,3]디옥솔-10-일)벤질)페닐)아미노)-1-옥소프로판-2-일)프로판아미드)(280 mg, 0.393 mmol)을 혼합물에 첨가하였다. 반응을 25°C에서 2시간 동안 교반한 다음, Prep-HPLC(방법 AA5)에 의해 정제하여, 표제 화합물(85 mg, 26% 수율)을 수득하였다. LCMS (방법 AA4) Rt = 3.10분, m/z 834.3 ($M+H$)⁺. ¹H NMR (메탄올-*d*4, 400 MHz) δ 0.98 (s, 3H), 1.02 (br s, 1H), 1.12 (br d, J=10.5 Hz, 1H), 1.40 (br dd, J=7.0, 10.5 Hz, 6H), 1.48 (s, 3H), 1.89 – 1.66 (m, 4H), 1.98 – 1.89 (m, 1H), 2.12 (br d, J=12.7 Hz, 1H), 2.24 (br d, J=10.5 Hz, 1H), 2.37 (br d, J=11.0 Hz, 1H), 2.70 – 2.58 (m, 1H), 3.93 – 3.80 (m, 4H), 4.46 – 4.24 (m, 4H), 4.61 (d, J=19.3 Hz, 1H), 5.04 (d, J=4.8 Hz, 1H), 5.43 (s, 1H), 6.01 (s, 1H), 6.24 (br d, J=8.8 Hz, 1H), 6.90 (br d, J=7.0 Hz, 1H), 7.23 – 7.12 (m, 3H), 7.47 – 7.30 (m, 5H).

[0314]

전구체 실시예 21B: (S)-2-((2-(2-브로모아세타미도)에틸)아미노)-N-((S)-1-((3-(4-((2S,6aS,6bR,7S,8aS,8bS,10R,11aR,12aS,12bS)-2,6b-디플루오로-7-하이드록시-8b-(2-하이드록시아세틸)-6a,8a-디메틸-4-옥소-2,4,6a,6b,7,8,8a,8b,11a,12,12a,12b-도테카하이드로-1H-나프토[2',1':4,5]인페노[1,2-d][1,3]디옥솔-10-일)벤질)페닐)아미노)-1-옥소프로판-2-일)프로판아미드



[0315]

[0316]

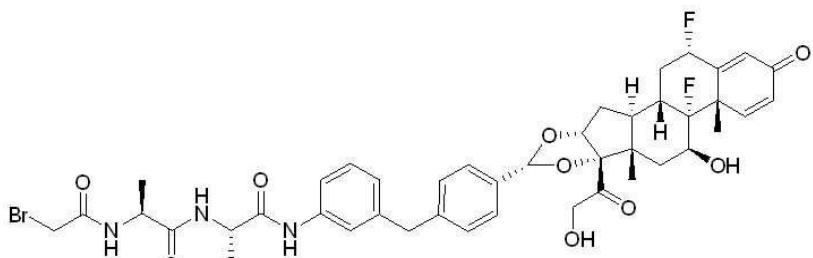
전구체 실시에 14B와 유사한 경로를 사용하여 (2S, 6aS, 6bR, 7S, 8aS, 8bS, 10R, 11aR, 12aS, 12bS)-10-(4-(3-아미노벤질)페닐)-2, 6b-디플루오로-7-하이드록시-8b-(2-하이드록시아세틸)-6a, 8a-디메틸-1, 2, 6a, 6b, 7, 8, 8a, 8b, 11a, 12, 12a, 12b-도데카하이드로-4H-나프토[2', 1':4, 5]인데노[1, 2-d][1, 3]디옥솔-4-온을 사용하여 제조하였다.

[0317]

LCMS (방법 AA4) Rt = 2.942분, m/z 940.3(M+H)⁺. ¹H NMR (디메틸실록사이드-d6) δ = 9.81 - 9.68 (m, 1H), 8.31 - 8.17 (m, 2H), 8.15 - 8.04 (m, 1H), 7.56 - 7.39 (m, 2H), 7.35 (d, J=7.9 Hz, 2H), 7.30 - 7.16 (m, 4H), 6.91 (d, J=7.5 Hz, 1H), 6.30 (dd, J=2.0, 10.3 Hz, 1H), 6.13 (s, 1H), 5.74 - 5.49 (m, 2H), 5.45 (s, 1H), 5.46 - 5.43 (m, 1H), 4.94 (d, J=4.8 Hz, 1H), 4.51 (d, J=19.7 Hz, 1H), 4.40 - 4.15 (m, 4H), 3.88 (s, 2H), 3.82 (d, J=3.9 Hz, 2H), 3.32 - 3.22 (m, 2H), 2.72 - 2.57 (m, 1H), 2.36 - 2.19 (m, 4H), 2.09 - 2.00 (m, 1H), 1.78 - 1.62 (m, 3H), 1.57 - 1.45 (m, 4H), 1.27 (dd, J=2.4, 7.2 Hz, 3H), 1.20 (d,

J=7.0 Hz, 3H), 0.86 (s, 3H).

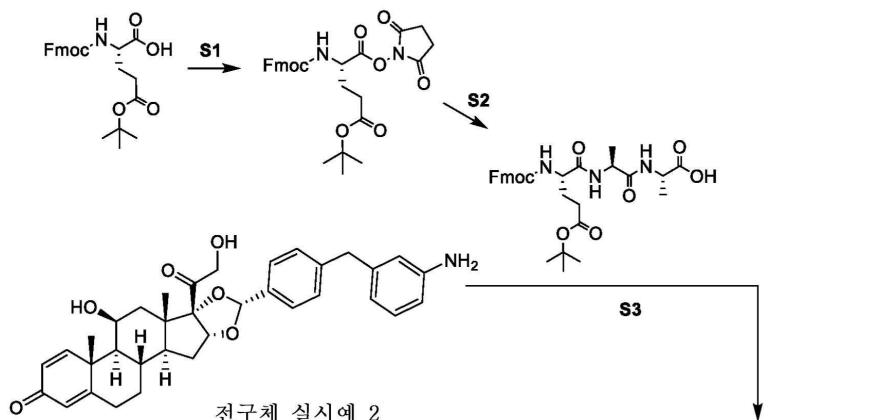
전구체 실시예 22: (S)-2-(2-브로모아세타미도)-N-((S)-1-((3-(4-((2S,6aS,6bR,7S,8aS,8bS,10R,11aR,12aS,12bS)-2,6b-디플루오로-7-하이드록시-8b-(2-하이드록시아세틸)-6a,8a-디메틸-4-옥소-2,4,6a,6b,7,8,8a,8b,11a,12,12a,12b-도데카하이드로-1H-나프토[2',1':4,5]인페노[1,2-d][1,3]디옥솔-10-일)벤질)페닐)아미노)-1-옥소프로판-2-일)프로판아미드.



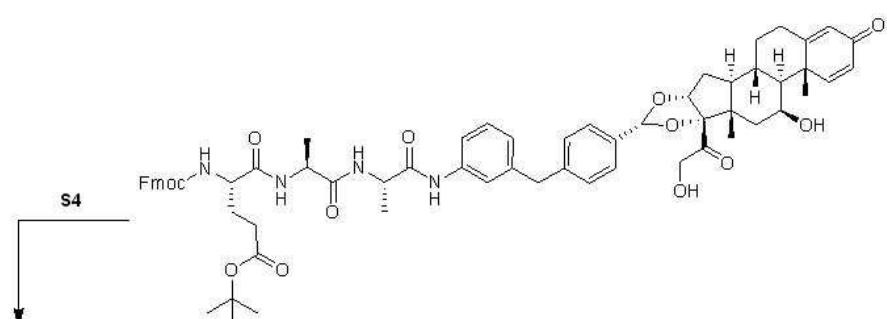
전구체 실시예 15와 유사한 경로를 사용하여 (2S,6aS,6bR,7S,8aS,8bS,10R,11aR,12aS,12bS)-10-(4-(3-아미노벤질)페닐)-2,6b-디플루오로-7-하이드록시-8b-(2-하이드록시아세틸)-6a,8a-디메틸-1,2,6a,6b,7,8,8a,8b,11a,12,12a,12b-도테카하이드로-4H-나프토[2',1':4,5]인데노[1,2-d][1,3]디옥솔-4-온을 사용하여 제조하였다.

LCMS (방법 AA4) Rt = 3.089분, m/z 869.3 ($M+H$)⁺. 1H NMR (메탄올-d4) δ 7.29–7.57 (m, 5H), 7.15–7.26 (m, 3H), 6.93 (br d, J=7.02 Hz, 1H), 6.30–6.38 (m, 2H), 5.47–5.68 (m, 1H), 5.43–5.45 (m, 1H), 5.04 (br d, J=3.95 Hz, 1H), 4.62 (br d, J=19.29 Hz, 1H), 4.25–4.46 (m, 4H), 3.93 (br s, 2H), 3.77–3.90 (m, 2H), 2.60–2.78 (m, 1H), 2.21–2.49 (m, 3H), 1.63–1.85 (m, 4H), 1.58 (s, 3H), 1.35–1.46 (m, 6H), 0.98 (s, 3H).

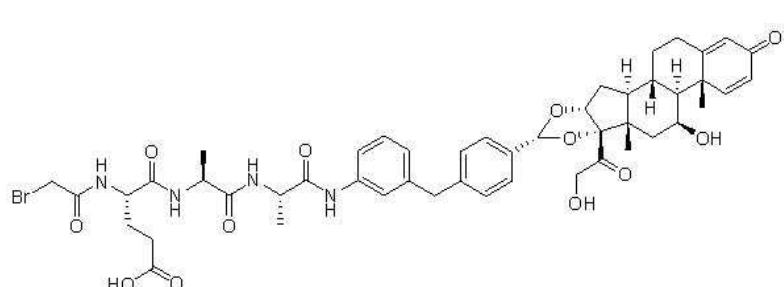
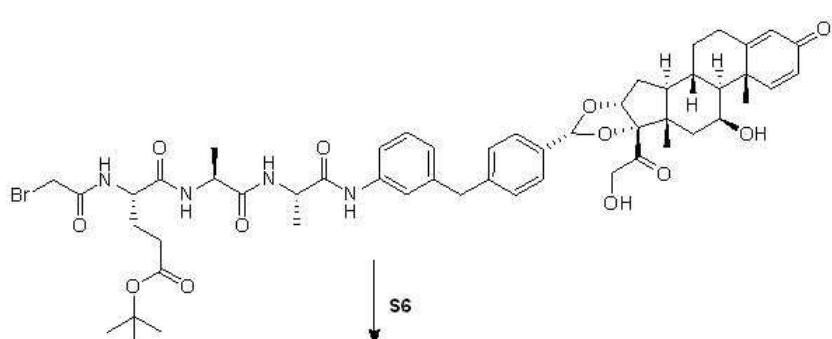
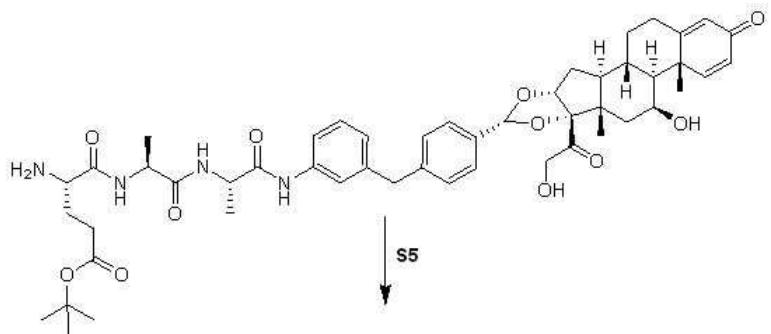
전구체 실시예 42: (S)-4-(2-브로모아세타미도)-5-(((S)-1-((S)-1-((3-(4-((6aR, 6bS, 7S, 8aS, 8bS, 10R, 11aR, 12aS, 12bS)-7-하이드록시-8b-(2-하이드록시아세틸)-6a, 8a-디메틸-4-옥소-2, 4, 6a, 6b, 7, 8, 8a, 8b, 11a, 12, 12a, 12b-도테카하이드로-1H-나프토[2', 1':4, 5]인데노[1, 2-d][1, 3]디옥솔-10-일)벤질)페닐)아미노)-1-옥소프로판-2-일)아미노)-1-옥소프로판-2-일)아미노)-5-옥소펜탄산



[0323]



[0324]



단계 1: 5-(tert-부틸) 1-(2,5-디옥소피롤리딘-1-일)((9H-플루오렌-9-일)메톡시)카르보닐)-L-글루타메이트의 합성. 디클로로메탄(600 mL) 중 (S)-2-(((9H-플루오렌-9-일)메톡시)카르보닐)아미노)-5-(tert-부톡시)-5-옥소펜탄산(50 g, 118 mmol) 및 1-하이드록시피롤리딘-2,5-디온(13.52 g, 118 mmol)의 용액에 *N,N'*-메탄디일리덴디아이클로헥산아민(DCC)(24.25 mg, 118 mmol)을 0°C에서 첨가하고, 혼합물을 25°C에서 4시간 동안 교반하였다. 혼합물을 하소된 유리 깔때기를 통해 여과하고, 디클로로메탄(100 mL)으로 세척하였다. 용매를 감압 하에 제거하여, 표제 화합물(60 g, 96% 수율)을 수득하였다. LCMS (방법 AA13) Rt = 1.663분, m/z 545.0 ($M+Na$)⁺. ¹H NMR ($CDCl_3$, 400 MHz) δ 1.40 – 1.54 (m, 9 H) 2.15 (dq, J=14.53, 7.36 Hz, 1 H) 2.25 – 2.38 (m, 1 H) 2.39 – 2.53 (m, 2 H) 2.82 (s, 4 H) 4.17 – 4.27 (m, 1 H) 4.30 – 4.49 (m, 2 H) 4.72 – 4.83 (m, 1 H) 5.71 (br d, J=8.16 Hz, 1 H) 7.24 – 7.34 (m, 2 H) 7.36 – 7.44 (m, 2 H) 7.55 – 7.63 (m, 2 H) 7.76 (d, J=7.50 Hz, 2 H). Fmoc = 플루오레닐메틸옥시카르보닐

단계 2: ((S)-2-(((9H-플루오렌-9-일)메톡시)카르보닐)아미노)-5-(tert-부톡시)-5-옥소펜타노일)-L-알라닐-L-알라닌의 합성. 1,2-디메톡시에탄(200 mL) 및 물(133 mL) 중 (S)-2-((S)-2-아미노프로판아미도)프로판산(6.13 g, 38.3 mmol)의 용액에 $NaHCO_3$ (12.86 g, 153 mmol) 및 5-(tert-부틸) 1-(2,5-디옥소피롤리딘-1-일)((9H-플루오렌-9-일)메톡시)카르보닐)-L-글루타메이트(20 g, 38.3 mmol)를 첨가하였다. 혼합물을 25°C에서 4시간 동안 교반하였다. 혼합물을 감압 하에 농축시켜, 용매를 제거하였다. 포화된 $NaHCO_3$ 용액(250 mL) 및 에틸 아세테이트(250 mL)를 첨가하고, 층을 분리하였다. 수성 HC1(1 M, 250 mL)을 수성층에 첨가하고, 에틸 아세테이트(300 mL)로 추출하였다. 유기층을 건조하고(Na_2SO_4), 여과하고, 용매를 감압 하에 제거하여, 표제 화합물(15 g, 69% 수율)을 수득하였다. LCMS (방법 AA13) Rt = 1.170분, m/z 568.4 ($M+H$)⁺. ¹H NMR (디메틸실록사이드-d6, 400 MHz) δ 1.15 (t, J=7.06 Hz, 1 H) 1.21 (br d, J=7.06 Hz, 3 H) 1.26 (br d, J=7.28 Hz, 3 H) 1.37 (s, 9 H) 1.65 – 1.78 (m, 1 H) 1.81 – 1.93 (m, 1 H) 1.96 (s, 1 H) 2.23 (br t, J=7.83 Hz, 2 H) 4.01 (quin, J=7.11 Hz, 2 H) 4.15 – 4.23 (m, 2 H) 4.23 – 4.32 (m, 2 H) 7.26 – 7.34 (m, 2 H) 7.36 – 7.43 (m, 2 H) 7.53 (br

d, J=8.16 Hz, 1 H) 7.71 (br t, J=6.73 Hz, 2 H) 7.86 (d, J=7.50 Hz, 2 H) 7.99 (br d, J=7.28 Hz, 1 H) 8.14 (br d, J=7.28 Hz, 1 H) 12.53 (br s, 1 H).

[0330] 단계 3: tert-부틸 (S)-4-(((9H-플루오렌-9-일)메톡시)카르보닐)아미노)-5-(((S)-1-((3-(4-((6aR,6bS,7S,8aS,8bS,10R,11aR,12aS,12bS)-7-하이드록시-8b-(2-하이드록시아세틸)-6a,8a-디메틸-4-옥소-2,4,6a,6b,7,8,8a,8b,11a,12,12a,12b-도데카하이드로-1H-나프토[2',1':4,5]인데노[1,2-d][1,3]디옥솔-10-일)벤질)페닐)아미노)-1-옥소프로판-2-일)아미노)-1-옥소프로판-2-일)아미노)-5-옥소펜타노에이트의 합성. 디메틸포름아미드(5 mL) 중 ((S)-2-(((9H-플루오렌-9-일)메톡시)카르보닐)아미노)-5-(tert-부톡시)-5-옥소펜타노일)-L-알라닐-L-알라닌(1.495 g, 2.63 mmol)의 용액에 2,4,6-트리프로필-1,3,5,2,4,6-트리옥사트리포스피난 2,4,6-트리옥사이드(2.234 g, 3.51 mmol) 및 트리에틸아민(0.533 g, 5.27 mmol)을 0°C에서 첨가하였다. 혼합물을 25°C에서 30분 동안 교반하였다. 전구체 실시예 2 ((6aR,6bS,7S,8aS,8bS,10R,11aR,12aS,12bS)-10-(4-(3-아미노벤질)페닐)-7-하이드록시-8b-(2-하이드록시아세틸)-6a,8a-디메틸-1,2,6a,6b,7,8,8a,8b,11a,12,12a,12b-도데카하이드로-1H-나프토[2',1':4,5]인데노[1,2-d][1,3]디옥솔-4-온)(1 g, 1.755 mmol)을 혼합물에 25°C에서 첨가하고, 반응을 12시간 동안 교반하였다. 혼합물을 얼음물(50 mL)에 첨가하고, 침전물을 여과에 의해 수합하여, 표제 화합물(1.68 g, 86% 수율)을 수득하였다. LCMS (방법 AA13) Rt = 1.344분, m/z 1119.5 (M+H)⁺.

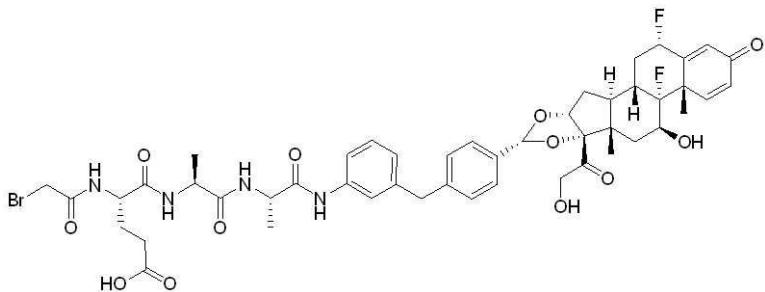
[0331] 단계 4: tert-부틸 (S)-4-아미노-5-(((S)-1-((3-(4-((6aR,6bS,7S,8aS,8bS,10R,11aR,12aS,12bS)-7-하이드록시-8b-(2-하이드록시아세틸)-6a,8a-디메틸-4-옥소-2,4,6a,6b,7,8,8a,8b,11a,12,12a,12b-도데카하이드로-1H-나프토[2',1':4,5]인데노[1,2-d][1,3]디옥솔-10-일)벤질)페닐)아미노)-1-옥소프로판-2-일)아미노)-1-옥소프로판-2-일)아미노)-5-옥소펜타노에이트의 합성. 아세토니트릴(3 mL) 중 tert-부틸 (S)-4-(((9H-플루오렌-9-일)메톡시)카르보닐)아미노)-5-(((S)-1-((3-(4-((6aR,6bS,7S,8aS,8bS,10R,11aR,12aS,12bS)-7-하이드록시-8b-(2-하이드록시아세틸)-6a,8a-디메틸-4-옥소-2,4,6a,6b,7,8,8a,8b,11a,12,12a,12b-도데카하이드로-1H-나프토[2',1':4,5]인데노[1,2-d][1,3]디옥솔-10-일)벤질)페닐)아미노)-1-옥소프로판-2-일)아미노)-1-옥소프로판-2-일)아미노)-5-옥소펜타노에이트(1.68 g, 1.501 mmol)의 용액에 피페리딘(0.6 mL, 1.501 mmol)을 0°C에서 첨가하였다. 혼합물을 0°C에서 10분 동안 교반하였다. 트리플루오로아세트산(0.5 mL)을 첨가하고, 혼합물을 Prep-HPLC(방법 AA6)에 의해 정제하여, 표제 화합물(1.03 g, 76% 수율)을 수득하였다. LCMS (방법 AA13) Rt = 1.080분, m/z 897.5 (M+H)⁺.

[0332] 단계 5: tert-부틸 (S)-4-(2-브로모아세타미도)-5-(((S)-1-((3-(4-((6aR,6bS,7S,8aS,8bS,10R,11aR,12aS,12bS)-7-하이드록시-8b-(2-하이드록시아세틸)-6a,8a-디메틸-4-옥소-2,4,6a,6b,7,8,8a,8b,11a,12,12a,12b-도데카하이드로-1H-나프토[2',1':4,5]인데노[1,2-d][1,3]디옥솔-10-일)벤질)페닐)아미노)-1-옥소프로판-2-일)아미노)-1-옥소프로판-2-일)아미노)-5-옥소펜타노에이트의 합성. 디메틸포름아미드(3 mL) 중 tert-부틸 (S)-4-아미노-5-(((S)-1-((3-(4-((6aR,6bS,7S,8aS,8bS,10R,11aR,12aS,12bS)-7-하이드록시-8b-(2-하이드록시아세틸)-6a,8a-디메틸-4-옥소-2,4,6a,6b,7,8,8a,8b,11a,12,12a,12b-도데카하이드로-1H-나프토[2',1':4,5]인데노[1,2-d][1,3]디옥솔-10-일)벤질)페닐)아미노)-1-옥소프로판-2-일)아미노)-5-옥소펜타노에이트(160 mg, 0.178 mmol)의 용액에 2-브로모아세트산(37.2 mg, 0.268 mmol) 및 에틸 2-에톡시퀴논-1(2H)-카르복실레이트(52.9 mg, 0.214 mmol)를 첨가하였다. 혼합물을 25°C에서 2시간 동안 교반하였다. 반응을 에틸 아세테이트(50 mL)로 희석시키고, 수성 HBr(1 M, 2 X 40 mL), 포화된 수성 NaHCO₃(30 mL) 및 염수(30 mL)로 세척하였다. 유기층을 건조하고(Na₂SO₄), 여과하고, 농축시켜, 표제 화합물(140 mg, 77% 수율)을 수득하였다. LCMS (방법 AA13) Rt = 1.232분, m/z 1019.4 (M+H)⁺.

[0333] 단계 6: (S)-4-(2-브로모아세타미도)-5-(((S)-1-((3-(4-((6aR,6bS,7S,8aS,8bS,10R,11aR,12aS,12bS)-7-하이드록시-8b-(2-하이드록시아세틸)-6a,8a-디메틸-4-옥소-2,4,6a,6b,7,8,8a,8b,11a,12,12a,12b-도데카하이드로-1H-나프토[2',1':4,5]인데노[1,2-d][1,3]디옥솔-10-일)벤질)페닐)아미노)-1-옥소프로판-2-일)아미노)-1-옥소프로판-2-일)아미노)-5-옥소펜탄산의 합성. 디클로로메탄(3 mL) 중 tert-부틸 (S)-4-(2-브로모아세타미도)-5-(((S)-1-((3-(4-((6aR,6bS,7S,8aS,8bS,10R,11aR,12aS,12bS)-7-하이드록시-8b-(2-하이드록시아세틸)-6a,8a-디메틸-4-옥소-2,4,6a,6b,7,8,8a,8b,11a,12,12a,12b-도데카하이드로-1H-나프토[2',1':4,5]인데노[1,2-d][1,3]디옥솔-10-일)벤질)페닐)아미노)-1-옥소프로판-2-일)아미노)-1-옥소프로판-2-일)아미노)-5-옥소펜타노에이트(140 mg, 0.138 mmol)의 용액에 트리플루오로아세트산(1 mL)을 첨가하였다. 혼합물을 20°C에서 1시간 동안 교반하였다. 용매를 감압 하에 제거하고, 조 생성물을 Prep-HPLC(방법

AA5)에 의해 정제하여, 표제 화합물(36 mg, 26% 수율)을 수득하였다. LCMS (방법 AA4) Rt = 2.975분, m/z 961.9 ($M+H$)⁺. ¹H NMR (디메틸실록사이드-d6, 400 MHz). δ 0.84 (s, 3 H) 0.95 – 1.13 (m, 2 H) 1.18 – 1.28 (m, 6 H) 1.38 (s, 3 H) 1.56 – 1.82 (m, 6 H) 1.83 – 1.95 (m, 1 H) 2.00 (br d, J=12.13 Hz, 1 H) 2.06 – 2.16 (m, 1 H) 2.18 – 2.34 (m, 4 H) 2.52 – 2.72 (m, 1 H) 3.82 – 3.94 (m, 4 H) 4.09 – 4.39 (m, 5 H) 4.48 (d, J=19.40 Hz, 1 H) 4.78 (br s, 1 H) 4.90 (d, J=5.07 Hz, 1 H) 5.38 (s, 1 H) 5.92 (s, 1 H) 6.15 (dd, J=10.03, 1.65 Hz, 1 H) 6.89 (d, J=7.72 Hz, 1 H) 7.15 – 7.24 (m, 3 H) 7.30 (d, J=9.92 Hz, 1 H) 7.37 (d, J=7.94 Hz, 2 H) 7.39 – 7.49 (m, 2 H) 8.00 – 8.31 (m, 2 H) 8.47 (dd, J=7.50, 4.19 Hz, 1 H) 9.62 – 9.90 (m, 1 H).

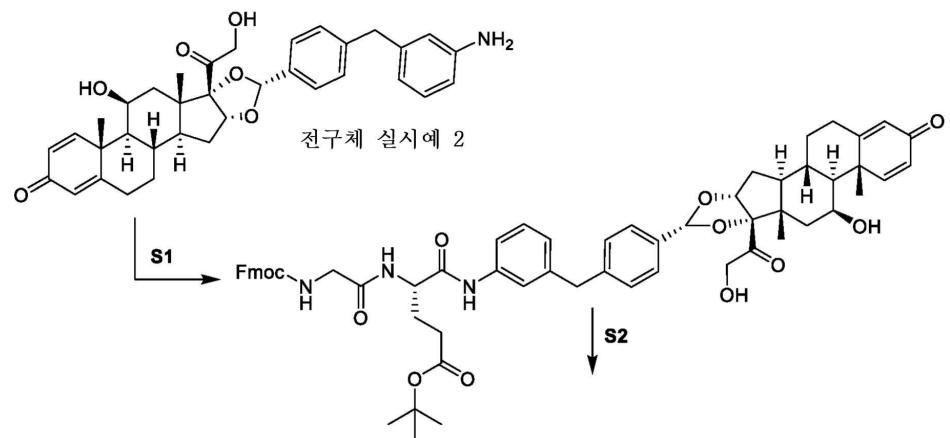
[0334] 전구체 실시예 23: (S)-4-(2-브로모아세타미도)-5-(((S)-1-((3-(4-((2S,6aS,6bR,7S,8aS,8bS,10R,11aR,12aS,12bS)-2,6b-디플루오로-7-하이드록시-8b-(2-하이드록시아세틸)-6a,8a-디메틸-4-옥소-2,4,6a,6b,7,8,8a,8b,11a,12,12a,12b-도데카하이드로-1H-나프토[2',1':4,5]인데노[1,2-d][1,3]디옥솔-10-일)벤질)페닐)아미노)-1-옥소프로판-2-일)아미노)-1-옥소프로판-2-일)아미노)-5-옥소펜탄산

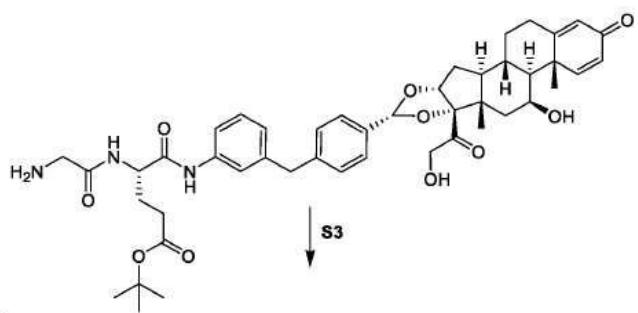


[0335] [0336] 전구체 실시예 42와 유사한 경로를 사용하여 (2S,6aS,6bR,7S,8aS,8bS,10R,11aR,12aS,12bS)-10-(4-(3-아미노벤질)페닐)-2,6b-디플루오로-7-하이드록시-8b-(2-하이드록시아세틸)-6a,8a-디메틸-1,2,6a,6b,7,8,8a,8b,11a,12,12a,12b-도데카하이드로-4H-나프토[2',1':4,5]인데노[1,2-d][1,3]디옥솔-4-온을 사용하여 제조하였다.

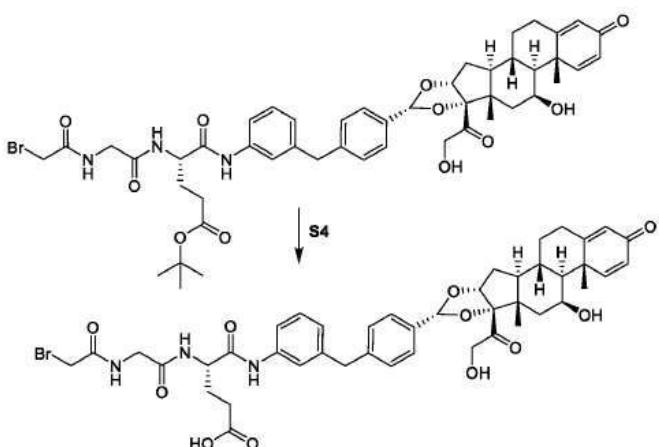
[0337] LCMS (방법 AA4) Rt = 2.668분, m/z 999.3 ($M+H$)⁺. ¹H NMR (디메틸실록사이드-d6) δ = 12.12 (br s, 1H), 9.89 – 9.72 (m, 1H), 8.50 – 8.45 (m, 1H), 8.40 – 8.24 (m, 1H), 8.18 (br d, J=7.1 Hz, 1H), 8.07 (d, J=7.2 Hz, 1H), 7.49 – 7.40 (m, 2H), 7.36 (d, J=7.8 Hz, 2H), 7.29 – 7.17 (m, 4H), 6.91 (br d, J=7.3 Hz, 1H), 6.30 (d, J=10.3 Hz, 1H), 6.13 (s, 1H), 5.75 – 5.56 (m, 1H), 5.53 (br d, J=3.1 Hz, 1H), 5.45 (s, 1H), 4.95 (d, J=4.8 Hz, 1H), 4.51 (d, J=19.6 Hz, 1H), 4.40 – 4.09 (m, 6H), 3.96 – 3.85 (m, 4H), 2.27 – 2.20 (m, 3H), 2.09 – 2.01 (m, 2H), 1.90 (br d, J=7.5 Hz, 2H), 1.78 – 1.65 (m, 4H), 1.63 – 1.63 (m, 1H), 1.50 (s, 4H), 1.30 – 1.19 (m, 6H), 0.86 (s, 3H).

[0338] 전구체 실시예 43: (S)-4-(2-브로모아세타미도)아세타미도)-5-((3-(4-((6aR,6bS,7S,8aS,8bS,10R,11aR,12aS,12bS)-7-하이드록시-8b-(2-하이드록시아세틸)-6a,8a-디메틸-4-옥소-2,4,6a,6b,7,8,8a,8b,11a,12,12a,12b-도데카하이드로-1H-나프토[2',1':4,5]인데노[1,2-d][1,3]디옥솔-10-일)벤질)페닐)아미노)-5-옥소펜탄산





[0340]



[0341]

[0342]

단계 1: *tert*-부틸 ((S)-4-(2-(((9H-플루오렌-9-일)메톡시)카르보닐)아미노)아세타미도)-5-((3-(4-((6aR,6bS,7S,8aS,8bS,10R,11aR,12aS,12bS)-7-하이드록시-8b-(2-하이드록시아세틸)-6a,8a-디메틸-4-옥소-2,4,6a,6b,7,8,8a,8b,11a,12,12a,12b-도데카하이드로-1H-나프토[2',1':4,5]인데노[1,2-d][1,3]디옥솔-10-일)벤질)아미노)-5-옥소펜타노에이트의 합성. 디메틸포름아미드(5 mL) 중 (S)-2-(2-(((9H-플루오렌-9-일)메톡시)카르보닐)아미노)아세타미도)-5-(*tert*-부톡시)-5-옥소펜탄산(508 mg, 1.053 mmol)의 용액에 2,4,6-트리프로필-1,3,5,2,4,6-트리옥사트리포스피난 2,4,6-트리옥사이드(1117 mg, 1.775 mmol) 및 트리에틸아민(0.367 mL, 2.63 mmol)을 0°C에서 첨가하였다. 반응을 25°C에서 30분 동안 교반하였다. 전구체 실시예 2((6aR,6bS,7S,8aS,8bS,10R,11aR,12aS,12bS)-10-(4-(3-아미노벤질)페닐)-7-하이드록시-8b-(2-하이드록시아세틸)-6a,8a-디메틸-1,2,6a,6b,7,8,8a,8b,11a,12,12a,12b-도데카하이드로-4H-나프토[2',1':4,5]인데노[1,2-d][1,3]디옥솔-4-온)(500 mg, 0.878 mmol)를 25°C에서 첨가하고, 반응을 25°C에서 2시간 동안 교반하였다. 6개의 부가적인 바이얼을 상기 기술된 바와 같이 설정하였다. 모든 7개의 반응 혼합물을 조합하고, Prep-HPLC(방법 AA7)에 의해 정제하여, 표제 화합물(2 g, 31% 수율)을 수득하였다. LCMS (방법 AA13) Rt = 1.370분, m/z 1016.5 (M+H-18)⁺. Fmoc = 플루오레닐메틸옥시카르보닐.

[0343]

단계 2: *tert*-부틸 (S)-4-(2-아미노아세타미도)-5-((3-(4-((6aR,6bS,7S,8aS,8bS,10R,11aR,12aS,12bS)-7-하이드록시-8b-(2-하이드록시아세틸)-6a,8a-디메틸-4-옥소-2,4,6a,6b,7,8,8a,8b,11a,12,12a,12b-도데카하이드로-1H-나프토[2',1':4,5]인데노[1,2-d][1,3]디옥솔-10-일)벤질)아미노)-5-옥소펜타노에이트의 합성. 아세토니트릴(4 mL) 중 *tert*-부틸 (S)-4-(2-(((9H-플루오렌-9-일)메톡시)카르보닐)아미노)아세타미도)-5-((3-(4-((6aR,6bS,7S,8aS,8bS,10R,11aR,12aS,12bS)-7-하이드록시-8b-(2-하이드록시아세틸)-6a,8a-디메틸-4-옥소-2,4,6a,6b,7,8,8a,8b,11a,12,12a,12b-도데카하이드로-1H-나프토[2',1':4,5]인데노[1,2-d][1,3]디옥솔-10-일)벤질)아미노)-5-옥소펜타노에이트(350 mg, 0.338 mmol)의 용액에 피페리딘(1 mL, 5.05 mmol)을 25°C에서 첨가하였다. 반응을 25°C에서 15분 교반한 다음, 트리플루오로아세트산을 pH = 5가 되도록 첨가하였다. 하나의 부가적인 바이얼을 상기 기술된 바와 같이 설정하였다. 두 반응 혼합물 모두를 조합하고, Prep-HPLC(방법 AA8)에 의해 정제하고, 이동상을 직접적으로 동결건조하여, 표제 화합물(200 mg, 13% 수율)을 수득하였다. LCMS (방법 AA13) Rt = 1.063분, m/z 812.4 (M+H)⁺.

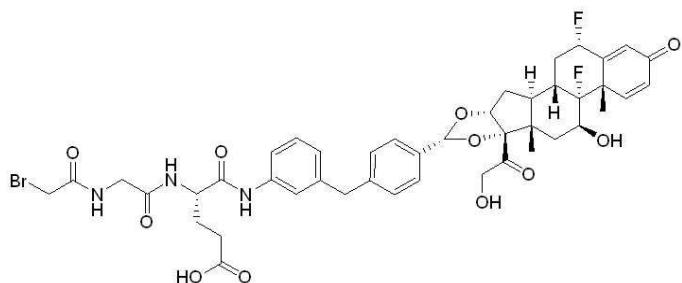
[0344]

단계 3: *tert*-부틸 ((S)-4-(2-(2-브로모아세타미도)아세타미도)-5-((3-(4-((6aR,6bS,7S,8aS,8bS,10R,11aR,12aS,12bS)-7-하이드록시-8b-(2-하이드록시아세틸)-6a,8a-디메틸-4-옥소-2,4,6a,6b,7,8,8a,8b,11a,12,12a,12b-도데카하이드로-1H-나프토[2',1':4,5]인데노[1,2-d][1,3]디옥솔-10-

일) 벤질)페닐)아미노)-5-옥소펜타노에이트의 합성. 디메틸포름아미드(2 mL) 중 2-브로모아세트산(68.5 mg, 0.493 mmol)의 용액에 2-에톡시-1-에톡시카르보닐-1,2-디하이드로퀴논(122 mg, 0.493 mmol)을 25°C에서 첨가하였다. 혼합물을 25°C에서 30분 동안 교반한 다음, tert-부틸 (S)-4-(2-아미노아세타미도)-5-((3-(4-((6aR,6bS,7S,8aS,8bS,10R,11aR,12aS,12bS)-7-하이드록시-8b-(2-하이드록시아세틸)-6a,8a-디메틸-4-옥소-2,4,6a,6b,7,8,8a,8b,11a,12,12a,12b-도데카하이드로-1H-나프토[2',1':4,5]인데노[1,2-d][1,3]디옥솔-10-일)벤질)페닐)아미노)-5-옥소펜타노에이트(200 mg, 0.246 mmol)를 첨가하였다. 반응을 25°C에서 1.5시간 동안 교반하였다. 반응을 에틸 아세테이트(100 mL)로 희석시키고, 수성 HBr(1 M, 2 X 150 mL), 수성 NaHCO₃(200 mL) 및 염수(200 mL)로 세척하였다. 유기층을 건조하고(Na₂SO₄), 여과하고, 농축시켜, 표제 화합물(200 mg, 87% 수율)을 수득하였다. LCMS (방법 AA13) Rt = 1.201분, m/z 934.3 (M+H)⁺.

단계 4: (S)-4-(2-(2-브로모아세타미도)아세타미도)-5-((3-(4-((6aR,6bS,7S,8aS,8bS,10R,11aR,12aS,12bS)-7-하이드록시-8b-(2-하이드록시아세틸)-6a,8a-디메틸-4-옥소-2,4,6a,6b,7,8,8a,8b,11a,12,12a,12b-도데카하이드로-1H-나프토[2',1':4,5]인데노[1,2-d][1,3]디옥솔-10-일)벤질)페닐)아미노)-5-옥소펜탄산의 합성. 디클로로메탄(2 mL) 중 tert-부틸 (S)-4-(2-(2-브로모아세타미도)아세타미도)-5-((3-(4-((6aR,6bS,7S,8aS,8bS,10R,11aR,12aS,12bS)-7-하이드록시-8b-(2-하이드록시아세틸)-6a,8a-디메틸-4-옥소-2,4,6a,6b,7,8,8a,8b,11a,12,12a,12b-도데카하이드로-1H-나프토[2',1':4,5]인데노[1,2-d][1,3]디옥솔-10-일)벤질)페닐)아미노)-5-옥소펜타노에이트(200 mg, 0.214 mmol)의 용액에 트리플루오로아세트산(0.7 mL, 9.09 mmol)을 25°C에서 첨가하였다. 반응을 25°C에서 1시간 동안 교반하였다. 용매를 감압 하에 제거하고, 생성된 잔여물을 Prep-HPLC(방법 AA2)에 의해 정제하였다. 이동상을 동결건조하여, 표제 화합물(44 mg, 23% 수율)을 수득하였다. LCMS (방법 AA4) Rt = 2.976분, m/z 876.1 ($M+H$)⁺. 1H NMR (디메틸실록사이드-d6, 400 MHz). δ 9.88 (br s, 1H), 8.52 (br s, 1H), 8.24 (br d, J=7.3 Hz, 1H), 7.51 - 7.14 (m, 9H), 6.92 (br d, J=7.1 Hz, 1H), 6.16 (br d, J=9.9 Hz, 1H), 5.93 (br s, 1H), 5.39 (s, 1H), 4.91 (br d, J=4.2 Hz, 1H), 4.77 (br s, 1H), 4.49 (br d, J=19.6 Hz, 1H), 4.38 (br d, J=5.7 Hz, 1H), 4.29 (br s, 1H), 4.17 (br d, J=19.4 Hz, 1H), 3.91 (br d, J=16.8 Hz, 3H), 3.79 (br s, 2H), 2.37 - 2.18 (m, 4H), 2.15 - 1.92 (m, 4H), 1.87 - 1.65 (m, 6H), 1.39 (br s, 3H), 1.13 - 0.96 (m, 2H), 0.86 (br s, 3H).

전구체 실시예 24: (S)-4-(2-(2-브로모아세타미도)아세타미도)-5-((3-(4-((2S,6aS,6bR,7S,8aS,8bS,10R,11aR,12aS,12bS)-2,6b-디플루오로-7-하이드록시-8b-(2-하이드록시아세틸)-6a,8a-디메틸-4-옥소-2,4,6a,6b,7,8,8a,8b,11a,12,12a,12b-도테카하이드로-1H-나프토[2',1':4,5]인페노[1,2-d][1,3]디옥솔-10-일)벤질)페닐)아미노)-5-옥소펜탄산

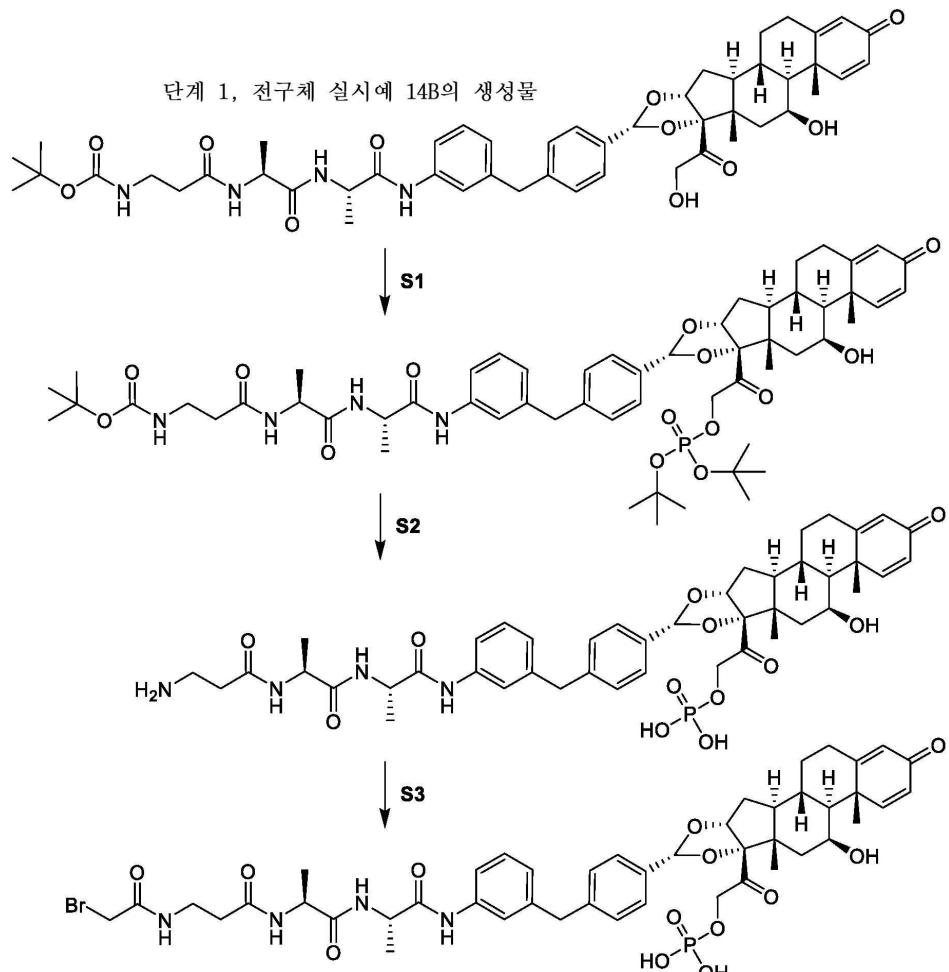


전구체 실시예 43과 유사한 경로를 사용하여 (2S, 6aS, 6bR, 7S, 8aS, 8bS, 10R, 11aR, 12aS, 12bS)-10-(4-(3-아미노벤질)페닐)-2, 6b-디플루오로-7-하이드록시-8b-(2-하이드록시아세틸)-6a, 8a-디메틸-1, 2, 6a, 6b, 7, 8, 8a, 8b, 11a, 12, 12a, 12b-도데카하이드로-4H-나프토[2', 1':4, 5]인데노[1, 2-d][1, 3]디옥솔-4-온을 사용하여 제조하였다.

LCMS (방법 AA4) Rt = 2.948분, m/z 914.2 ($M+H$)⁺. 1H NMR (디메틸실록사이드-d6, 400 MHz) δ = 9.89 (s, 1H), 8.53 (t, J=5.6 Hz, 1H), 8.25 (d, J=7.9 Hz, 1H), 7.47 (br d, J=8.4 Hz, 1H), 7.41 (s, 1H), 7.36 (d, J=8.2 Hz, 2H), 7.29 – 7.23 (m, 3H), 7.20 (t, J=7.8 Hz, 1H), 7.02 – 6.86 (m, 1H), 6.30 (dd, J=1.9, 10.3 Hz, 1H), 6.13 (s, 1H), 5.76 – 5.60 (m, 1H), 5.63 – 5.56 (m, 1H), 5.54 – 5.47 (m, 1H), 5.45 (s, 1H), 4.94 (d, J=5.1 Hz, 1H), 4.51 (d, J=19.6 Hz, 1H), 4.42 – 4.35 (m, 1H), 4.25 – 4.11 (m, 2H), 3.93 (s, 2H), 3.89 (s, 2H), 3.85 – 3.74 (m, 3H), 2.63 – 2.52 (m, 2H), 2.42 (br d, J=1.8 Hz, 1H), 2.30 – 2.16 (m, 4H), 2.07 – 1.90 (m, 2H), 1.87 – 1.61 (m, 4H), 1.55 (br s, 1H), 1.49 (s, 3H), 0.86 (s, 3H).

[0350]

전구체 실시예 44: 2-((6aR,6bS,7S,8aS,8bS,10R,11aR,12aS,12bS)-10-(4-(3-((S)-2-((S)-2-(3-(2-브로모아세타미도)프로판아미도)프로판아미도)벤질)페닐)-7-하이드록시-6a,8a-디메틸-4-옥소-1,2,4,6a,6b,7,8,8a,11a,12,12a,12b-도테카하이드로-8bH-나프토[2',1':4,5]인데노[1,2-d][1,3]디옥솔-8b-일)-2-옥소에틸 디하이드로겐 포스페이트



[0351]

[0352]

단계 1: tert-부틸 (3-(((S)-1-(((S)-1-((3-(4-((6aR,6bS,7S,8aS,8bS,10R,11aR,12aS,12bS)-8b-(2-((디-tert-부톡시포스포릴)옥시)아세틸)-7-하이드록시-6a,8a-디메틸-4-옥소-2,4,6a,6b,7,8,8a,8b,11a,12,12a,12b-도테카하이드로-1H-나프토[2',1':4,5]인데노[1,2-d][1,3]디옥솔-10-일)벤질)페닐)아미노)-1-옥소프로판-2-일)아미노)-1-옥소프로판-2-일)아미노)-3-옥소프로필)카르바메이트의 합성. 디클로로메탄(5 mL) 중 전구체 실시예 14B, 단계 1의 생성물(tert-부틸 (3-(((S)-1-(((S)-1-((3-(4-((6aR,6bS,7S,8aS,8bS,10R,11aR,12aS,12bS)-7-하이드록시-8b-(2-하이드록시아세틸)-6a,8a-디메틸-4-옥소-2,4,6a,6b,7,8,8a,8b,11a,12,12a,12b-도테카하이드로-1H-나프토[2',1':4,5]인데노[1,2-d][1,3]디옥솔-10-일)벤질)페닐)아미노)-1-옥소프로판-2-일)아미노)-1-옥소프로판-2-일)아미노)-3-옥소프로필)카르바메이트(500 mg, 0.566 mmol)의 용액에 1H-테트라졸(397 mg, 5.66 mmol) 및 디-tert-부틸 디에틸포스포라미다이트(1.694 g, 6.79 mmol)를 25°C에서 첨가하였다. 반응을 25°C에서 1시간 동안 교반한 다음, 하이드로겐 퍼옥사이드(353 mg, 3.11 mmol)를 첨가하였다. 반응을 2시간 동안 교반하였다. 하나의 부가적인 바이얼을 상기 기술된 바와 같이 설정하였다. 두 반응 혼합물 모두를 조합하고, Prep-HPLC(방법 AA7)에 의해 정제하여, 표지 화합물(1 g, 82% 수율)을 수득하였다. LCMS (방법 AA13) Rt = 1.300분, m/z 1075.8 ($M+H$)⁺.

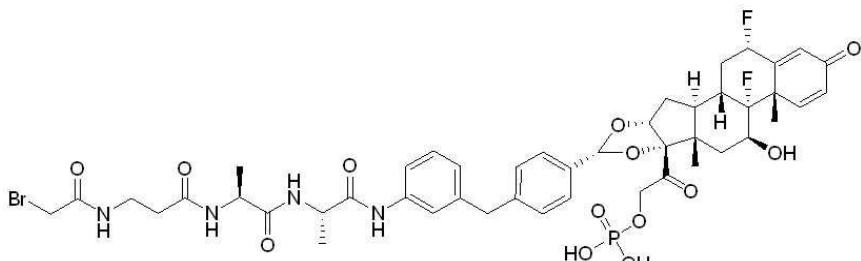
[0353]

단계 2: 2-((6aR,6bS,7S,8aS,8bS,10R,11aR,12aS,12bS)-10-(4-(3-((S)-2-((3-아미노프로판아미도)프로판아미도)프로판아미도)벤질)페닐)-7-하이드록시-6a,8a-디메틸-4-옥소-1,2,4,6a,6b,7,8,8a,11a,12,12a,12b-도테카하이드로-8bH-나프토[2',1':4,5]인데노[1,2-d][1,3]디옥솔-8b-일)-2-옥소에틸 디하이드로겐 포스페이트의 합성. 디클로로메탄(6 mL) 중 tert-부틸 (3-(((S)-1-(((S)-1-((3-(4-((6aR,6bS,7S,8aS,8bS,10R,11aR,12aS,12bS)-8b-(2-((디-tert-부톡시포스포릴)옥시)아세틸)-7-하이드록시-

6a,8a-디메틸-4-옥소-2,4,6a,6b,7,8,8a,8b,11a,12,12a,12b-도데카하이드로-1H-나프토[2',1':4,5]인데노[1,2-d][1,3]디옥솔-10(일)벤질)페닐)아미노)-1-옥소프로판-2(일)아미노)-1-옥소프로판-2(일)아미노)-3-옥소프로필)카르바메이트(600 mg, 0.558 mmol)의 용액에 트리플루오로아세트산(2 mL, 26.0 mmol)을 25°C에서 첨가하고, 반응을 25°C에서 1시간 동안 교반하였다. 용매를 감압 하에 제거하고, 생성된 잔여물을 Prep-HPLC(방법 AA6)에 의해 정제하였다. 이동상을 동결건조하여, 표제 화합물(350 mg, 73% 수율)을 수득하였다. LCMS (방법 AA13) Rt = 0.986분, m/z 863.3 (M+H)⁺.

[0354] 단계 3: 2-((6aR,6bS,7S,8aS,8bS,10R,11aR,12aS,12bS)-10-(4-(3-((S)-2-((S)-2-(3-(2-브로모아세타미도)프로판아미도)프로판아미도)프로판아미도)벤질)페닐)-7-하이드록시-6a,8a-디메틸-4-옥소-1,2,4,6a,6b,7,8,8a,11a,12,12a,12b-도데카하이드로-8bH-나프토[2',1':4,5]인데노[1,2-d][1,3]디옥솔-8b(일)-2-옥소에틸 디하이드로겐 포스페이트의 합성. 디메틸포름아미드(1 mL) 중 2-브로모아세트산(16.1 mg, 0.116 mmol)의 용액에 2-((6aR,6bS,7S,8aS,8bS,10R,11aR,12aS,12bS)-10-(4-(3-((S)-2-((S)-2-(3-아미노프로판아미도)프로판아미도)프로판아미도)벤질)페닐)-7-하이드록시-6a,8a-디메틸-4-옥소-1,2,4,6a,6b,7,8,8a,11a,12,12a,12b-도데카하이드로-8bH-나프토[2',1':4,5]인데노[1,2-d][1,3]디옥솔-8b(일)-2-옥소에틸 디하이드로겐 포스페이트(100 mg, 0.116 mmol), 2-브로모-1-에틸파리딘-1-이음 테트라플루오로보레이트(34.9 mg, 0.127 mmol) 및 N-에틸-N-이소프로필프로판-2-아민(30.0 mg, 0.232 mmol)을 25°C에서 첨가하고, 혼합물을 25°C에서 2시간 동안 교반하였다. 생성된 잔여물을 Prep-HPLC(방법 AA2)에 의해 정제하였다. 이동상을 동결건조하여, 표제 화합물(65 mg, 30% 수율)을 수득하였다. LCMS (방법 AA4) Rt = 2.932분, m/z 985.2 (M+H)⁺. ¹H NMR (디메틸실록사이드-d6, 400 MHz). δ 9.79 - 9.63 (m, 1H), 8.31 - 8.24 (m, 1H), 8.21 - 8.04 (m, 2H), 7.51 - 7.41 (m, 2H), 7.36 (d, J=7.9 Hz, 2H), 7.29 (d, J=10.1 Hz, 1H), 7.24 - 7.12 (m, 3H), 6.89 (br d, J=7.7 Hz, 1H), 6.14 (dd, J=1.5, 10.1 Hz, 1H), 5.91 (s, 1H), 5.46 (s, 1H), 4.95 - 4.78 (m, 3H), 4.54 (br dd, J=8.0, 18.2 Hz, 1H), 4.38 - 4.12 (m, 4H), 3.87 (s, 2H), 3.80 (d, J=3.3 Hz, 2H), 3.25 (br d, J=6.8 Hz, 2H), 2.60 - 2.50 (m, 2H), 2.13 - 1.96 (m, 2H), 1.84 - 1.58 (m, 6H), 1.37 (s, 3H), 1.25 (dd, J=2.1, 7.2 Hz, 3H), 1.19 (s, 3H), 1.06 - 0.98 (m, 2H), 0.85 (s, 3H).

[0355] 실시예 25B:
2-((2S,6aS,6bR,7S,8aS,8bS,10R,11aR,12aS,12bS)-10-(4-(3-((S)-2-((S)-2-(3-(2-브로모아세타미도)프로판아미도)프로판아미도)벤질)페닐)-2,6b-디플루오로-7-하이드록시-6a,8a-디메틸-4-옥소-1,2,4,6a,6b,7,8,8a,11a,12,12a,12b-도데카하이드로-8bH-나프토[2',1':4,5]인데노[1,2-d][1,3]디옥솔-8b(일)-2-옥소에틸 디하이드로겐 포스페이트



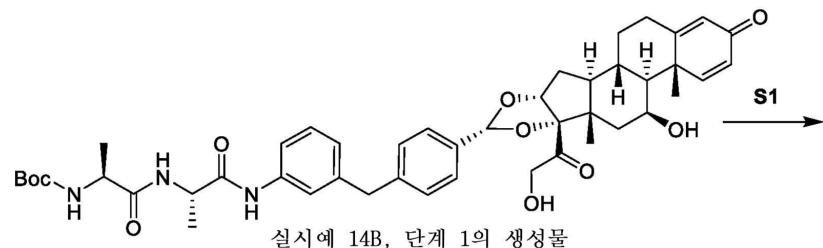
[0356]

[0357] 전구체 실시예 44와 유사한 경로를 사용하여 2-((2S,6aS,6bR,7S,8aS,8bS,10R,11aR,12aS,12bS)-10-(4-(3-아미노벤질)페닐)-2,6b-디플루오로-7-하이드록시-6a,8a-디메틸-4-옥소-1,2,4,6a,6b,7,8,8a,11a,12,12a,12b-도데카하이드로-8bH-나프토[2',1':4,5]인데노[1,2-d][1,3]디옥솔-8b(일)-2-옥소에틸 디하이드로겐 포스페이트를 사용하여 제조하였다.

[0358] LCMS (방법 AA4) Rt = 2.958분, m/z 1021.3 (M+H)⁺. ¹H NMR (디메틸실록사이드-d6, 400 MHz) δ = 9.83 - 9.70 (m, 1H), 8.34 - 8.16 (m, 2H), 8.15 - 8.06 (m, 1H), 7.56 - 7.40 (m, 2H), 7.36 (d, J=7.9 Hz, 2H), 7.30 - 7.16 (m, 4H), 6.91 (br d, J=7.3 Hz, 1H), 6.30 (dd, J=1.5, 10.1 Hz, 1H), 6.12 (s, 1H), 5.75 - 5.56 (m, 2H), 5.53 (s, 1H), 4.99 - 4.87 (m, 2H), 4.59 (dd, J=8.4, 18.1 Hz, 1H), 4.43 - 4.15 (m, 4H), 3.89 (s, 2H), 3.82 (d, J=3.5 Hz, 2H), 3.33 - 3.21 (m, 2H), 2.73 - 2.60 (m, 1H), 2.39 - 2.14 (m, 5H), 2.11 - 2.00 (m, 1H), 1.78 - 1.63 (m, 3H), 1.57 - 1.45 (m, 4H), 1.27 (dd, J=2.3, 6.9 Hz, 3H), 1.19 (d, J=7.1 Hz, 3H), 0.88 (s, 3H).

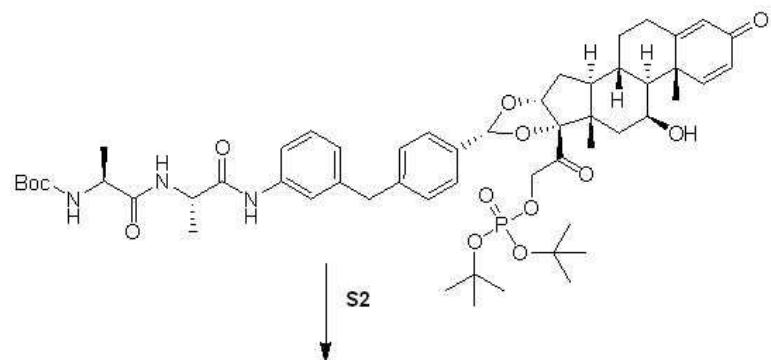
[0359] 전구체 실시예 45:

2-((6aR,6bS,7S,8aS,8bS,10R,11aR,12aS,12bS)-10-(4-(3-((S)-2-((S)-2-((2-브로모아세타미도)프로판아미도)프로판아미도)벤질)-7-하이드록시-6a,8a-디메틸-4-옥소-1,2,4,6a,6b,7,8,8a,11a,12,12a,12b-도데카하이드로-8bH-나프토[2',1':4,5]인페노[1,2-d][1,3]디옥솔-8b-일)-2-옥소에틸 디하이드로겐 포스페이트

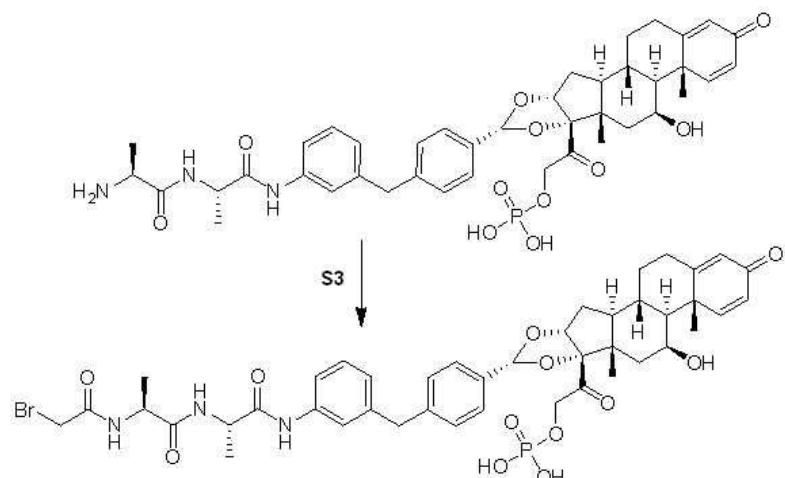


[0360]

실시예 14B, 단계 1의 생성물



[0361]



[0362]

단계 1: tert-부틸 ((S)-1-(((S)-1-((3-(4-((6aR,6bS,7S,8aS,8bS,10R,11aR,12aS,12bS)-8b-(2-((디-tert-부틸시포스포릴)옥시)아세틸)-7-하이드록시-6a,8a-디메틸-4-옥소-2,4,6a,6b,7,8,8a,8b,11a,12,12a,12b-도데카하이드로-1H-나프토[2',1':4,5]인페노[1,2-d][1,3]디옥솔-10-일)벤질)페닐)아미노)-1-옥소프로판-2-일)아미노)-1-옥소프로판-2-일)카르바메이트의 합성. 디메틸포름아미드(4 mL) 중 실시예 14B, 단계 1의 생성물(tert-부틸((S)-1-(((S)-1-((3-(4-((6aR,6bS,7S,8aS,8bS,10R,11aR,12aS,12bS)-7-하이드록시-8b-(2-하이드록시아세틸)-6a,8a-디메틸-4-옥소-2,4,6a,6b,7,8,8a,8b,11a,12,12a,12b-도데카하이드로-1H-나프토[2',1':4,5]인페노[1,2-d][1,3]디옥솔-10-일)벤질)페닐)아미노)-1-옥소프로판-2-일)아미노)-1-옥소프로판-2-일)카르바메이트)(400 mg, 0.493 mmol)의 용액에 1H-테트라졸(345 mg, 4.93 mmol) 및 디-tert-부틸 디에틸포스포라미다이트(1474 mg, 5.91 mmol)를 25°C에서 첨가하였다. 혼합물을 25°C에서 2시간 동안 교반한 다음, 하이드로겐 퍼옥사이드(307 mg, 2.71 mmol)를 상기 혼합물을 0°C에서 첨가하였다. 반응을 25°C에서 2시간 동안 교반하였다. 4개의 부가적인 바이얼을 상기 기술된 바와 같이 설정하였다. 모든 5개의 반응 혼합물을 조합하고, 얼음물(1 L)에 붓고, 여과하여, 표제 화합물(1.6 g, 65% 수율)을 수득하였다. LCMS (방법 AA13) Rt = 1.344분, m/z 1004.5 ($M+H$)⁺. Boc = tert-부톡시카르보닐.

[0364]

단계 2: 2-((6aR,6bS,7S,8aS,8bS,10R,11aR,12aS,12bS)-10-(4-(3-((S)-2-((S)-2-아미노프로판아미도)프로판아미도)벤질)-7-하이드록시-6a,8a-디메틸-4-옥소-1,2,4,6a,6b,7,8,8a,11a,12,12a,12b-도데카하이드로-8bH-나

프로[2',1':4,5]인데노[1,2-d][1,3]디옥솔-8b-일)-2-옥소에틸 디하이드로겐 포스페이트의 합성. 디클로로메탄 (10 mL) 중 tert-부틸 ((S)-1-(((S)-1-((3-(4-((6aR,6bS,7S,8aS,8bS,10R,11aR,12aS,12bS)-8b-2-((디-tert-부톡시포스포릴)옥시)아세틸)-7-하이드록시-6a,8a-디메틸-4-옥소-2,4,6a,6b,7,8,8a,8b,11a,12,12a,12b-도데카하이드로-1H-나프토[2',1':4,5]인데노[1,2-d][1,3]디옥솔-10-일)벤질)페닐)아미노)-1-옥소프로판-2-일)아미노)-1-옥소프로판-2-일)카르바메이트(1.5 g, 1.494 mmol)의 용액에 트리플루오로아세트산(3 mL, 38.9 mmol)을 25°C에서 첨가하였다. 반응을 25°C에서 2시간 동안 교반하였다. 혼합물을 Prep-HPLC(방법 AA10)에 의해 정제하여, 표제 화합물(400 mg, 34% 수율)을 수득하였다. LCMS (방법 AA13) Rt 1.602분, m/z 792.4 (M+H)⁺.

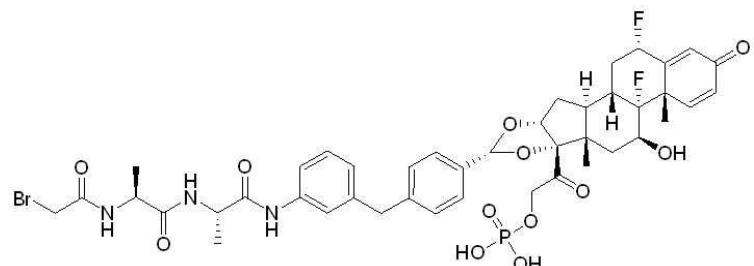
[0365]

단계 3: 2-((6aR,6bS,7S,8aS,8bS,10R,11aR,12aS,12bS)-10-(4-(3-((S)-2-((S)-2-((2-브로모아세타미도)프로판아미도)프로판아미도)벤질)페닐)-7-하이드록시-6a,8a-디메틸-4-옥소-1,2,4,6a,6b,7,8,8a,11a,12,12a,12b-도데카하이드로-8bH-나프토[2',1':4,5]인데노[1,2-d][1,3]디옥솔-8b-일)-2-옥소에틸 디하이드로겐 포스페이트의 합성. 디메틸포름아미드(1.5 mL) 중 2-브로모아세트산(63.2 mg, 0.455 mmol)의 용액에 2-브로모-1-에틸피리딘-1-이유테트라플루오로보레이트(125 mg, 0.455 mmol), N,N-디이소프로필에틸아민(0.159 mL, 0.909 mmol) 및 2-((6aR,6bS,7S,8aS,8bS,10R,11aR,12aS,12bS)-10-(4-(3-((S)-2-((S)-2-아미노프로판아미도)프로판아미도)벤질)페닐)-7-하이드록시-6a,8a-디메틸-4-옥소-1,2,4,6a,6b,7,8,8a,11a,12,12a,12b-도데카하이드로-8bH-나프토[2',1':4,5]인데노[1,2-d][1,3]디옥솔-8b-일)-2-옥소에틸 디하이드로겐 포스페이트(240 mg, 0.303 mmol)를 25°C에서 첨가하고, 혼합물을 25°C에서 2시간 동안 교반하였다. 생성된 혼합물을 Pre-HPLC(방법 AA9)에 의해 정제하여, 표제 화합물(100 mg, 수율 36.0% 수율)을 수득하였다. LCMS (방법 AA4) Rt = 2.890분, m/z 914.2 (M+H)⁺.

¹H NMR (디메틸실록사이드-d6, 400 MHz) δ 0.84-0.90 (m, 3H), 0.98-1.11 (m, 2H), 1.18-1.23 (m, 3H), 1.28 (d, J=7.09 Hz, 3H), 1.39 (s, 3H), 1.60-1.86 (m, 5H), 1.96-2.17 (m, 2H), 2.32 (br d, J=1.71 Hz, 1H), 2.52-2.59 (m, 2H), 3.86-3.94 (m, 4H), 4.26-4.40 (m, 3H), 4.56 (dd, J=18.22, 8.07 Hz, 1H), 4.82-4.96 (m, 3H), 5.48 (s, 1H), 5.93 (s, 1H), 6.16 (dd, J=10.15, 1.71 Hz, 1H), 6.91 (br d, J=7.58 Hz, 1H), 7.17-7.26 (m, 3H), 7.31 (d, J=10.03 Hz, 1H), 7.35-7.52 (m, 4H), 8.19-8.42 (m, 1H), 8.45-8.57 (m, 1H), 9.71-9.88 (m, 1H).

[0366]

전구체 실시예 26: 2-((2S,6aS,6bR,7S,8aS,8bS,10R,11aR,12aS,12bS)-10-(4-(3-((S)-2-((2-브로모아세타미도)프로판아미도)프로판아미도)벤질)페닐)-2,6b-디플루오로-7-하이드록시-6a,8a-디메틸-4-옥소-1,2,4,6a,6b,7,8,8a,11a,12,12a,12b-도데카하이드로-8bH-나프토[2',1':4,5]인데노[1,2-d][1,3]디옥솔-8b-일)-2-옥소에틸 디하이드로겐 포스페이트의 합성



[0367]

전구체 실시예 45와 유사한 경로를 사용하여 2-((2S,6aS,6bR,7S,8aS,8bS,10R,11aR,12aS,12bS)-10-(4-(3-아미노벤질)페닐)-2,6b-디플루오로-7-하이드록시-6a,8a-디메틸-4-옥소-1,2,4,6a,6b,7,8,8a,11a,12,12a,12b-도데카하이드로-8bH-나프토[2',1':4,5]인데노[1,2-d][1,3]디옥솔-8b-일)-2-옥소에틸 디하이드로겐 포스페이트를 사용하여 제조하였다.

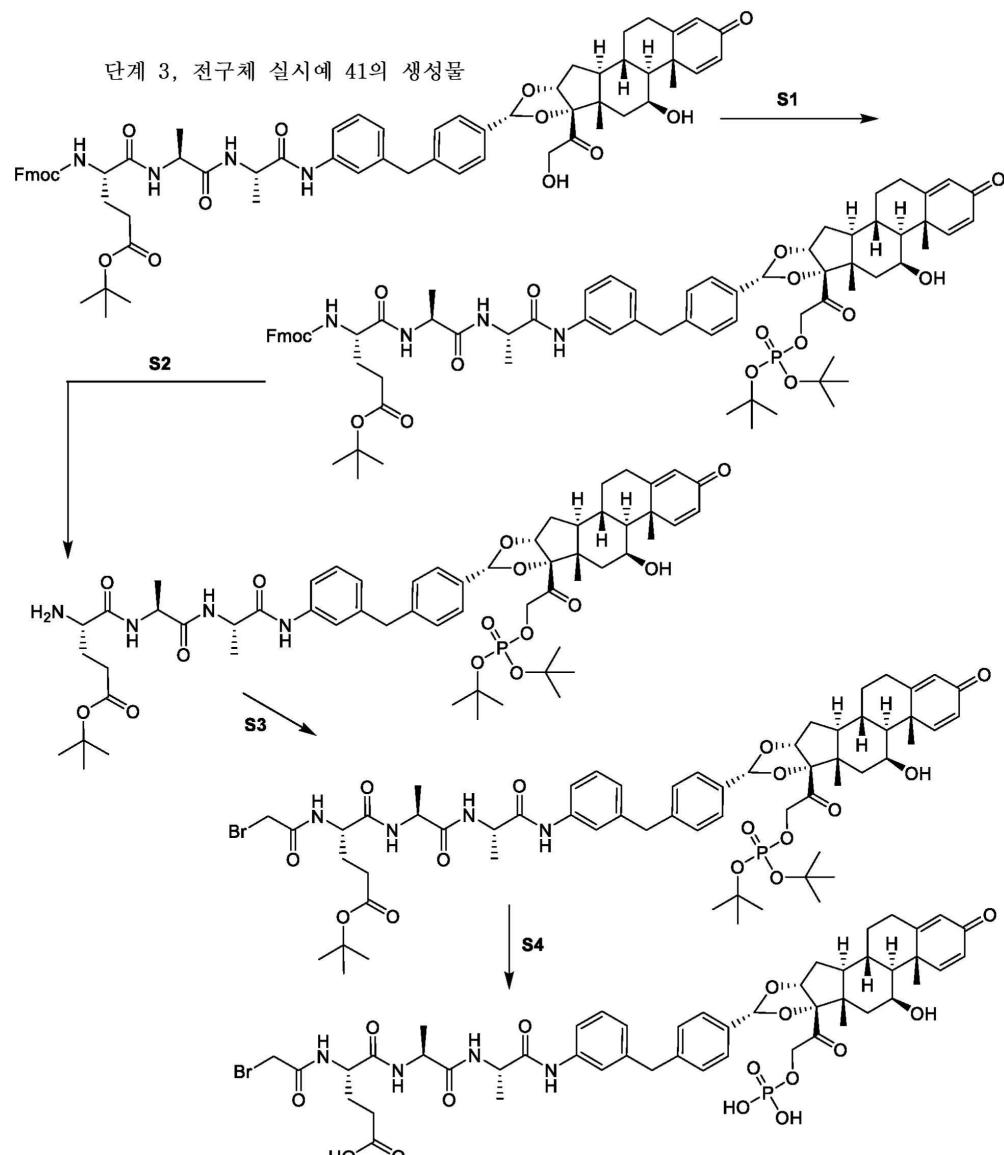
[0369]

LCMS (방법 AA4) Rt = 2.924분, m/z 950.3 (M+H)⁺. ¹H NMR (메탄올-d4, 400 MHz) δ = 7.44 - 7.38 (m, 1H), 7.36 - 7.31 (m, 4H), 7.23 - 7.17 (m, 3H), 6.93 (br d, J=7.6 Hz, 1H), 6.35 - 6.33 (m, 2H), 5.61 - 5.47 (m, 2H), 5.03 (s, 1H), 5.01-4.97 (m, 1H), 4.80 - 4.76 (m, 1H), 4.43 - 4.30 (m, 3H), 3.94 (s, 2H), 3.88 - 3.81 (m, 2H), 2.76 - 2.66 (m, 1H), 2.42 - 2.38 (m, 3H), 1.81 - 1.79 (m, 3H), 1.78 - 1.75 (m, 1H), 1.58 (s, 3H), 1.42 - 1.37 (m, 6H), 1.01 (s, 3H).

[0370]

전구체 실시예 46: (S)-4-(2-브로모아세타미도)-5-(((S)-1-((3-(4-((6aR,6bS,7S,8aS,8bS,10R,11aR,12aS,12bS)-7-하이드록시-6a,8a-디메틸-4-옥소-8b-2-(포스포노옥시)아세틸)-2,4,6a,6b,7,8,8a,8b,11a,12,12a,12b-도데카하이드로-1H-나프토[2',1':4,5]인데노[1,2-d][1,3]디옥솔-10-

일)벤질)페닐)아미노)-1-옥소프로판-2-일)아미노)-1-옥소프로판-2-일)아미노)-5-옥소펜탄산



[0371]

[0372]

단계 1: *tert*-부틸 (S)-4-((((9H-플루오렌-9-일)메톡시)카르보닐)아미노)-5-(((S)-1-(((3-(4-((6aR,6bS,7S,8aS,8bS,10R,11aR,12aS,12bS)-8b-(2-(디-*tert*-부톡시포스포릴)옥시)아세틸)-7-하이드록시-6a,8a-디메틸-4-옥소-2,4,6a,6b,7,8,8a,8b,11a,12,12a,12b-도데카하이드로-1H-나프토[2',1':4,5]인데노[1,2-d][1,3]디옥솔-10-일)벤질)페닐)아미노)-1-옥소프로판-2-일)아미노)-1-옥소프로판-2-일)아미노)-5-옥소펜타노에이트의 합성. 디메틸포름아미드(2 mL) 중 전구체 실시예 42, 단계 3의 생성물(*tert*-부틸 (S)-4-((((9H-플루오렌-9-일)메톡시)카르보닐)아미노)-5-(((S)-1-(((3-(4-((6aR,6bS,7S,8aS,8bS,10R,11aR,12aS,12bS)-7-하이드록시-8b-(2-하이드록시아세틸)-6a,8a-디메틸-4-옥소-2,4,6a,6b,7,8,8a,8b,11a,12,12a,12b-도데카하이드로-1H-나프토[2',1':4,5]인데노[1,2-d][1,3]디옥솔-10-일)벤질)페닐)아미노)-1-옥소프로판-2-일)아미노)-1-옥소프로판-2-일)아미노)-5-옥소펜타노에이트)(500 mg, 0.447 mmol)의 용액에 1H-테트라졸(313 mg, 4.47 mmol) 및 디-*tert*-부틸 디에틸포스포라미다이트(1.337 g, 5.36 mmol)를 20°C에서 첨가하였다. 반응을 20°C에서 1시간 동안 교반한 다음, 하이드로겐 퍼옥사이드(279 mg, 2.457 mmol)를 첨가하고, 반응을 부가적인 1시간 동안 교반하였다. 반응을 Prep-HPLC(방법 AA6)에 의해 정제하여, 표제 화합물(450 mg, 77% 수율)을 수득하였다. LCMS (방법 AA13) Rt = 1.524분, m/z 1311.6 ($M+H$)⁺.

[0373]

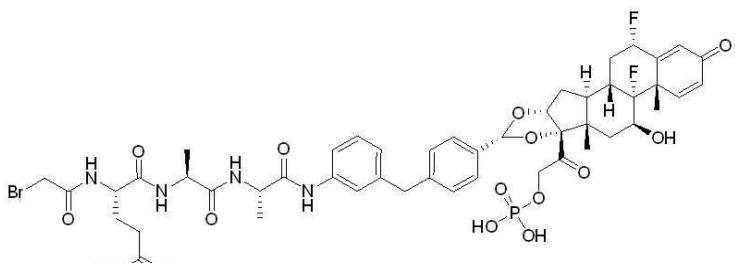
단계 2. *tert*-부틸 (S)-4-아미노-5-(((S)-1-(((3-(4-((6aR,6bS,7S,8aS,8bS,10R,11aR,12aS,12bS)-8b-(2-(디-*tert*-부톡시포스포릴)옥시)아세틸)-7-하이드록시-6a,8a-디메틸-4-옥소-2,4,6a,6b,7,8,8a,8b,11a,12,12a,12b-도데카하이드로-1H-나프토[2',1':4,5]인데노[1,2-d][1,3]디옥솔-10-일)벤질)페닐)아미노)-1-옥소프로판-2-일)아미노)-1-옥소프로판-2-일)아미노)-5-옥소펜타노에이트의 합성. 아세

토니트릴(2 mL) 중 *tert*-부틸 (S)-4-(((9H-플루오렌-9-일)메톡시)카르보닐)아미노)-5-(((S)-1-((3-(4-((6aR,6bS,7S,8aS,8bS,10R,11aR,12aS,12bS)-8b-(2-((디-*tert*-부톡시포스포릴)옥시)아세틸)-7-하이드록시-6a,8a-디메틸-4-옥소-2,4,6a,6b,7,8,8a,8b,11a,12,12a,12b-도데카하이드로-1H-나프토[2',1':4,5]인데노[1,2-d][1,3]디옥솔-10-일)벤질)페닐)아미노)-1-옥소프로판-2-일)아미노)-1-옥소프로판-2-일)아미노)-5-옥소펜타노에이트(450 mg, 0.343 mmol)의 용액에 피페리딘(0.4 mL)을 0°C에서 첨가하였다. 반응을 0°C에서 20분 동안 교반한 다음, 농축시켜, 조 생성물을 수득하고, 이를 석유 에테르(20 mL)에서 1시간 동안 교반하였다. 고체를 여과에 의해 수합하고, 감압 하에 건조하여, 표제 화합물(250 mg, 67% 수율)을 수득하였다. LCMS (방법 AA13) Rt = 1.244분, m/z 1089.5 ($M+H$)⁺.

[0374] 단계 3: *tert*-부틸 (S)-4-(2-브로모아세타미도)-5-(((S)-1-((3-(4-((6aR,6bS,7S,8aS,8bS,10R,11aR,12aS,12bS)-8b-(2-((디-*tert*-부톡시포스포릴)옥시)아세틸)-7-하이드록시-6a,8a-디메틸-4-옥소-2,4,6a,6b,7,8,8a,8b,11a,12,12a,12b-도데카하이드로-1H-나프토[2',1':4,5]인데노[1,2-d][1,3]디옥솔-10-일)벤질)페닐)아미노)-1-옥소프로판-2-일)아미노)-1-옥소프로판-2-일)아미노)-5-옥소펜타노에이트의 합성. 디메틸포름아미드(3 mL) 중 *tert*-부틸 (S)-4-아미노-5-(((S)-1-((3-(4-((6aR,6bS,7S,8aS,8bS,10R,11aR,12aS,12bS)-8b-(2-((디-*tert*-부톡시포스포릴)옥시)아세틸)-7-하이드록시-6a,8a-디메틸-4-옥소-2,4,6a,6b,7,8,8a,8b,11a,12,12a,12b-도데카하이드로-1H-나프토[2',1':4,5]인데노[1,2-d][1,3]디옥솔-10-일)벤질)페닐)아미노)-1-옥소프로판-2-일)아미노)-1-옥소프로판-2-일)아미노)-5-옥소펜타노에이트(250 mg, 0.23 mmol)의 용액에 2-브로모아세트산(47.8 mg, 0.344 mmol) 및 에틸 2-에톡시퀴논-1(2H)-카르복실레이트(68.1 mg, 0.275 mmol)를 첨가하였다. 혼합물을 25°C에서 2시간 동안 교반한 다음, Prep-HPLC(방법 AA11)에 의해 정제하여, 표제 화합물(120 mg, 43% 수율)을 수득하였다. LCMS (방법 AA13) Rt = 1.351분, m/z 1211.4 ($M+H$)⁺.

[0375] 단계 4: (S)-4-(2-브로모아세타미도)-5-(((S)-1-((3-(4-((6aR,6bS,7S,8aS,8bS,10R,11aR,12aS,12bS)-7-하이드록시-6a,8a-디메틸-4-옥소-8b-(2-(포스포노옥시)아세틸)-2,4,6a,6b,7,8,8a,8b,11a,12,12a,12b-도데카하이드로-1H-나프토[2',1':4,5]인데노[1,2-d][1,3]디옥솔-10-일)벤질)페닐)아미노)-1-옥소프로판-2-일)아미노)-1-옥소프로판-2-일)아미노)-5-옥소펜탄산의 합성. 디클로로메탄(3 mL) 중 *tert*-부틸 (S)-4-(2-브로모아세타미도)-5-(((S)-1-((3-(4-((6aR,6bS,7S,8aS,8bS,10R,11aR,12aS,12bS)-8b-(2-((디-*tert*-부톡시포스포릴)옥시)아세틸)-7-하이드록시-6a,8a-디메틸-4-옥소-2,4,6a,6b,7,8,8a,8b,11a,12,12a,12b-도데카하이드로-1H-나프토[2',1':4,5]인데노[1,2-d][1,3]디옥솔-10-일)벤질)페닐)아미노)-1-옥소프로판-2-일)아미노)-5-옥소펜타노에이트(120 mg, 0.099 mmol)의 용액에 트리플루오로아세트산(1 mL)을 첨가하고, 혼합물을 20°C에서 2시간 동안 교반하였다. 용매를 감압 하에 제거하고, 조 생성물을 Prep-HPLC(방법 AA12)에 의해 정제하여, 표제 화합물(32 mg, 30% 수율)을 수득하였다. LCMS (방법 AA4) Rt = 2.909분, m/z=1041.9 ($M+H$)⁺. ¹H NMR (디메틸실록사이드-*d*6, 400 MHz) δ 9.88 – 9.67 (m, 2H), 8.47 (dd, J=4.3, 7.6 Hz, 2H), 8.26 (d, J=7.1 Hz, 1H), 8.21 – 8.12 (m, 1H), 8.28 – 8.03 (m, 1H), 8.06 (d, J=7.1 Hz, 1H), 7.49 – 7.39 (m, 5H), 7.36 (d, J=8.2 Hz, 5H), 7.30 (d, J=10.1 Hz, 2H), 7.22 (br d, J=8.2 Hz, 1H), 7.24 – 7.15 (m, 1H), 7.19 – 7.14 (m, 1H), 6.88 (d, J=7.7 Hz, 2H), 6.15 (d, J=11.7 Hz, 2H), 5.91 (s, 2H), 5.46 (s, 2H), 4.95 – 4.80 (m, 7H), 4.55 (dd, J=8.0, 18.0 Hz, 2H), 4.38 – 4.31 (m, 1H), 4.31 – 4.19 (m, 3H), 3.93 – 3.85 (m, 4H), 2.66 (s, 2H), 2.31 (br s, 1H), 2.24 (br t, J=8.2 Hz, 2H), 2.33 – 2.18 (m, 1H), 2.17 – 1.94 (m, 5H), 1.87 (br s, 2H), 1.83 – 1.59 (m, 14H), 1.37 (s, 7H), 1.28 – 1.17 (m, 15H), 1.00 (br d, J=11.2 Hz, 5H), 0.86 (s, 7H).

[0376] 전구체 실시예 27: (S)-4-(2-브로모아세타미도)-5-(((S)-1-((3-(4-((2S,6aS,6bR,7S,8aS,8bS,10R,11aR,12aS,12bS)-2,6b-디플루오로-7-하이드록시-6a,8a-디메틸-4-옥소-8b-(2-(포스포노옥시)아세틸)-2,4,6a,6b,7,8,8a,8b,11a,12,12a,12b-도데카하이드로-1H-나프토[2',1':4,5]인데노[1,2-d][1,3]디옥솔-10-일)벤질)페닐)아미노)-1-옥소프로판-2-일)아미노)-1-옥소프로판-2-일)아미노)-5-옥소펜탄산



[0377]

전구체 실시예 46과 유사한 경로를 사용하여 (2S,6aS,6bR,7S,8aS,8bS,10R,11aR,12aS,12bS)-10-(4-(3-아미노벤질)페닐)-2,6b-디플루오로-7-하이드록시-8b-(2-하이드록시아세틸)-6a,8a-디메틸-

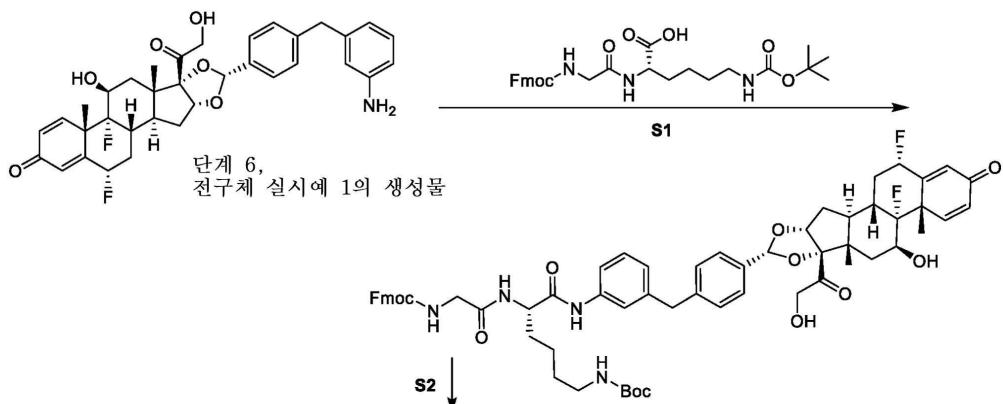
1,2,6a,6b,7,8,8a,8b,11a,12,12a,12b-도데카하이드로-4H-나프토[2',1':4,5]인데노[1,2-d][1,3]디옥솔-4-온을 사용하여 제조하였다.

[0379]

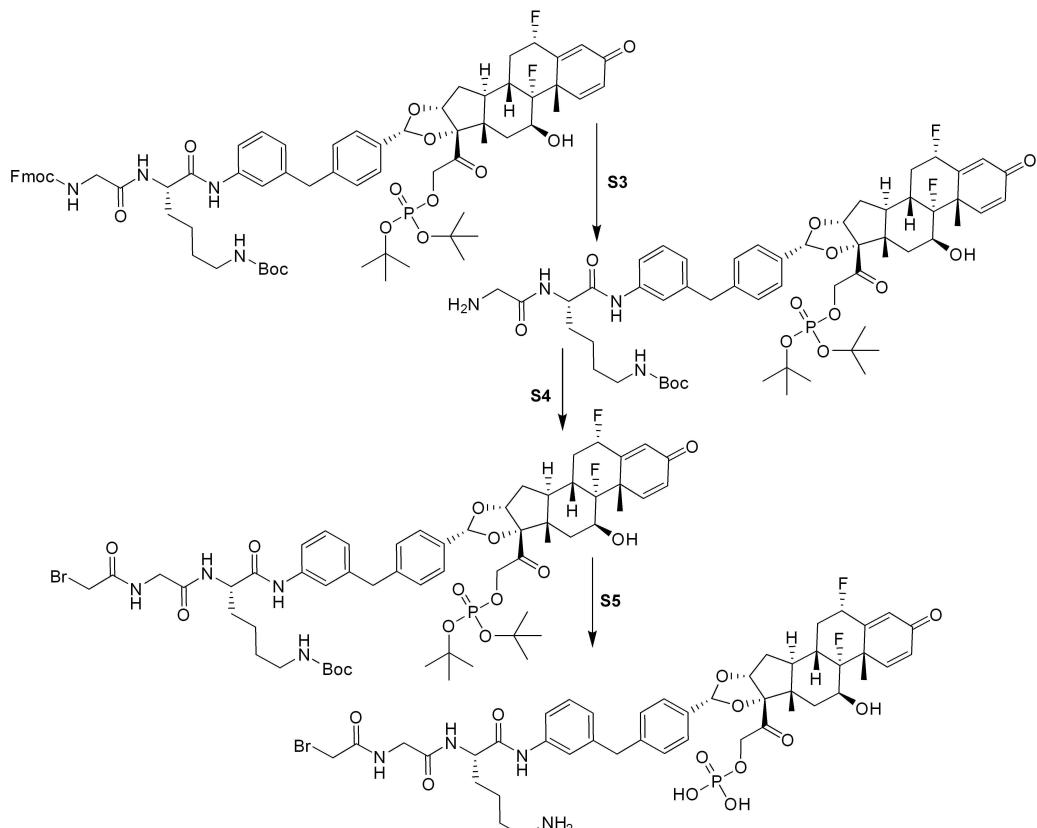
LCMS (방법 AA4) Rt = 2.905분, m/z 1079.1 ($M+H$)⁺. ¹H NMR (메탄올-d4, 400 MHz) δ = 7.48 – 7.44 (m, 1H), 7.40 – 7.30 (m, 4H), 7.25 – 7.16 (m, 3H), 6.93 (br d, J=7.6 Hz, 1H), 6.37 – 6.30 (m, 2H), 5.64 – 5.52 (m, 2H), 5.04 (br d, J=4.4 Hz, 1H), 5.01 – 4.95 (m, 1H), 4.81 – 4.72 (m, 1H), 4.43 – 4.25 (m, 4H), 4.13 – 3.99 (m, 1H), 3.97 – 3.91 (m, 2H), 3.91 – 3.77 (m, 2H), 2.79 – 2.61 (m, 1H), 2.45 – 2.33 (m, 4H), 2.27 (br d, J=13.7 Hz, 1H), 2.16 – 2.03 (m, 1H), 2.00 – 1.88 (m, 1H), 1.83 – 1.74 (m, 3H), 1.68 – 1.54 (m, 4H), 1.46 – 1.36 (m, 6H), 1.01 (s, 3H).

[0380]

전구체 실시예 39: 2-((2S,6aS,6bR,7S,8aS,8bS,10R,11aR,12aS,12bS)-10-(4-(3-((S)-6-아미노-2-(2-브로모아세타미도)아세타미도)헥산아미도)벤질)페닐)-2,6b-디플루오로-7-하이드록시-6a,8a-디메틸-4-옥소-1,2,4,6a,6b,7,8,8a,11a,12,12a,12b-도데카하이드로-8bH-나프토[2',1':4,5]인데노[1,2-d][1,3]디옥솔-8b-일)-2-옥소에틸 디하이드로겐 포스페이트



[0381]



[0382]

[0383]

단계 1: tert-부틸 ((S)-5-(2-(((9H-플루오렌-9-일)메톡시)카르보닐)아미노)아세타미도)-6-((3-(4-((2S,6aS,6bR,7S,8aS,8bS,10R,11aR,12aS,12bS)-2,6b-디플루오로-7-하이드록시-8b-(2-하이드록시아세틸)-6a,8a-디메틸-4-옥소-2,4,6a,6b,7,8,8a,8b,11a,12,12a,12b-도데카하이드로-1H-나프토[2',1':4,5]인데노[1,2-d][1,3]디옥솔-10-일)벤질)페닐)-6-옥소헥실)카르바메이트의 합성. 디메틸포름아미드(60 mL) 중 N²-(((9H-플루오렌-9-일)메톡시)카르보닐)글리실)-N-(tert-부톡시카르보닐)-L-라이신(5.58 g, 8.26 mmol)의 용액에 2,4,6-트리프로필-1,3,5,2,4,6-트리옥사트리포스피난 2,4,6-트리옥사이드(10.51 g, 16.51 mmol) 및 트리에틸아민(3.45 mL, 24.77 mmol)을 0°C에서 첨가하였다. 반응을 25°C에서 1시간 동안 교반한 다음, 전구체 실시예 1, 단계 6의 생성물 ((2S,6aS,6bR,7S,8aS,8bS,10R,11aR,12aS,12bS)-10-(4-(3-아미노벤질)페닐)-2,6b-디플루오로-7-하이드록시-8b-(2-하이드록시아세틸)-6a,8a-디메틸-1,2,6a,6b,7,8,8a,8b,11a,12,12a,12b-도데카하이드로-4H-나프토[2',1':4,5]인데노[1,2-d][1,3]디옥솔-4-온)(5 g, 8.26 mmol)을 상기 반응에 25°C에서 첨가하였다. 반응을 5시간 동안 25°C에서 교반하였다. 6개의 부가적인 바이얼을 상기 기술된 바와 같이 설정하였다. 모든 7개의 반응을 조합하고, Prep-HPLC(방법 AA14)에 의해 정제하여, 표제 화합물(24 g, 25% 수율)을 수득하였다. LCMS (방법 AA13) Rt = 1.295분, m/z 1095.6 (M+H-18)⁺.

[0384]

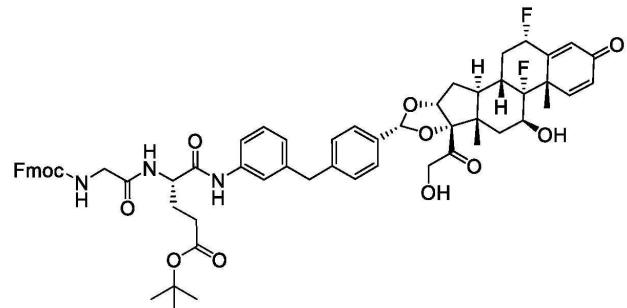
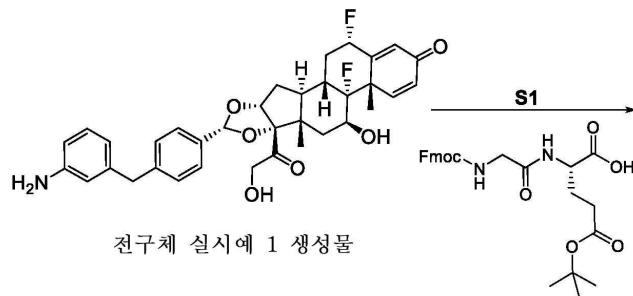
단계 2: tert-부틸 ((S)-5-(2-(((9H-플루오렌-9-일)메톡시)카르보닐)아미노)아세타미도)-6-((3-(4-((2S,6aS,6bR,7S,8aS,8bS,10R,11aR,12aS,12bS)-8b-(2-((디-tert-부톡시포스포릴)옥시)아세틸)-2,6b-디플루오로-7-하이드록시-6a,8a-디메틸-4-옥소-2,4,6a,6b,7,8,8a,8b,11a,12,12a,12b-도데카하이드로-1H-나프토[2',1':4,5]인데노[1,2-d][1,3]디옥솔-10-일)벤질)페닐)-6-옥소헥실)카르바메이트의 합성. 디메틸 포름아미드(30 mL) 중 tert-부틸 ((S)-5-(2-(((9H-플루오렌-9-일)메톡시)카르보닐)아미노)아세타미도)-6-((3-(4-((2S,6aS,6bR,7S,8aS,8bS,10R,11aR,12aS,12bS)-2,6b-디플루오로-7-하이드록시-8b-(2-하이드록시아세틸)-6a,8a-디메틸-4-옥소-2,4,6a,6b,7,8,8a,8b,11a,12,12a,12b-도데카하이드로-1H-나프토[2',1':4,5]인데노[1,2-d][1,3]디옥솔-10-일)벤질)페닐)-6-옥소헥실)카르바메이트(3 g, 2.69 mmol)의 용액에 1H-테트라졸(1.888 g, 26.9 mmol) 및 디-tert-부틸 디에틸포스포라미다이트(8.06 g, 32.3 mmol)를 25°C에서 첨가하였다. 반응을 25°C에서 3.5시간 동안 교반한 다음, 하이드로겐 페옥사이드(224 mg, 1.976 mmol)를 첨가하고, 혼합물을 30분 동안 교반하였다. 6개의 부가적인 바이얼을 상기 기술된 바와 같이 설정하였다. 모든 7개의 반응을 조합하고, Prep-HPLC(방법 AA7)에 의해 정제하여, 표제 화합물(10 g, 37% 수율)을 수득하였다. LCMS (방법 AA13) Rt

= 1.421분, m/z 1305.7 ($M+H$)⁺.

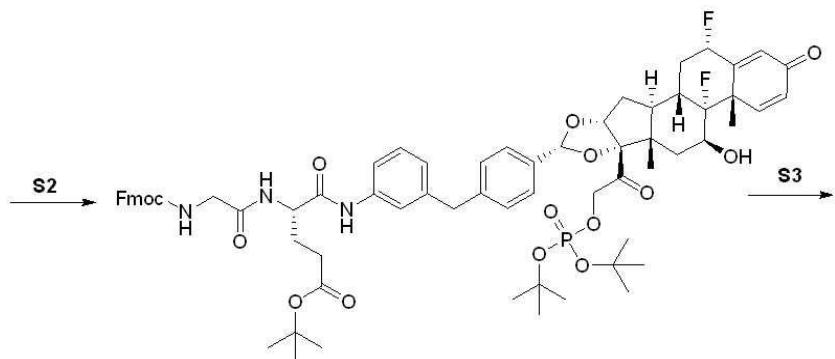
단계 3: tert-부틸 ((S)-5-(2-아미노아세타미도)-6-((3-(4-((2S,6aS,6bR,7S,8aS,8bS,10R,11aR,12aS,12bS)-8b-(2-((디-tert-부톡시포스포릴)옥시)아세틸)-2,6b-디플루오로-7-하이드록시-6a,8a-디메틸-4-옥소-2,4,6a,6b,7,8,8a,8b,11a,12,12a,12b-도데카하이드로-1H-나프토[2',1':4,5]인데노[1,2-d][1,3]디옥솔-10-일)벤질)페닐)아미노)-6-옥소헥실)카르바메이트의 합성. 아세토니트릴(10 mL) 중 tert-부틸 ((S)-5-(2-(((9H-플루오렌-9-일)메톡시)카르보닐)아미노)아세타미도)-6-((3-(4-((2S,6aS,6bR,7S,8aS,8bS,10R,11aR,12aS,12bS)-8b-(2-((디-tert-부톡시포스포릴)옥시)아세틸)-2,6b-디플루오로-7-하이드록시-6a,8a-디메틸-4-옥소-2,4,6a,6b,7,8,8a,8b,11a,12,12a,12b-도데카하이드로-1H-나프토[2',1':4,5]인데노[1,2-d][1,3]디옥솔-10-일)벤질)페닐)아미노)-6-옥소헥실)카르바메이트(2.5 g, 1.969 mmol)의 용액에 피페리딘(2 mL, 1.969 mmol)을 25°C에서 침가하였다. 반응을 25°C에서 1시간 동안 교반하였다. 3개의 부가적인 바이얼을 상기 기술된 바와 같이 설정하였다. 모든 4개의 반응을 조합하고, 농축시켜, 잔여물을 수득하였으며, 이를 석유 에테르(30 mL)에서 2시간 동안 교반하였다. 고체를 여과에 의해 수합하고, 감압 하에 건조하여, 표제화합물(7 g, 70% 수율)을 제공하였다. 반응에 대한 LCMS (ESI+): m/z 1083.5 ($M^{+}H$)⁺, Rt: 1.175분.

단계 4: tert-부틸 ((S)-5-(2-(2-브로모아세타미도)아세타미도)-6-((3-(4-((2S,6aS,6bR,7S,8aS,8bS,10R,11aR,12aS,12bS)-8b-(2-((디-tert-부톡시포스포릴)옥시)아세틸)-2,6b-디플루오로-7-하이드록시-6a,8a-디메틸-4-옥소-2,4,6a,6b,7,8,8a,8b,11a,12,12a,12b-도데카하이드로-1H-나프토[2',1':4,5]인데노[1,2-d][1,3]디옥솔-10-일)벤질)페닐)아미노)-6-옥소헥실)카르바메이트의 합성. 디메틸 포름아미드(35 mL) 중 2-브로모아세트산(0.929 g, 6.68 mmol)의 용액에 2-에톡시-1-에톡시카르보닐-1,2-디하이드로퀴논(1.653 g, 6.68 mmol)을 25°C에서 첨가하였다. 혼합물을 25°C에서 1시간 동안 교반하였다. 그 후에, tert-부틸 ((S)-5-(2-아미노아세타미도)-6-((3-(4-((2S,6aS,6bR,7S,8aS,8bS,10R,11aR,12aS,12bS)-8b-(2-((디-tert-부톡시포스포릴)옥시)아세틸)-2,6b-디플루오로-7-하이드록시-6a,8a-디메틸-4-옥소-2,4,6a,6b,7,8,8a,8b,11a,12,12a,12b-도데카하이드로-1H-나프토[2',1':4,5]인데노[1,2-d][1,3]디옥솔-10-일)벤질)페닐)아미노)-6-옥소헥실)카르바메이트(3.5 g, 3.34 mmol)를 반응에 첨가하였다. 반응을 25°C에서 2시간 동안 교반하였다. LCMS는 반응이 완료되었음을 나타내었다. 반응을 디클로로메탄(100 mL)으로 희석시키고, 수성 HBr(1 M, 2 X 80 mL), 수성 NaHCO₃(60 mL) 및 염수(60 mL)로 세척하였다. 유기층을 건조하고(Na₂SO₄), 농축시켜, 표제 화합물(2 g, 51% 수율)을 수득하였으며, 이를 다음 단계에 직접적으로 사용하였다. LCMS (방법 AA13) Rt = 1.318분, m/z 1205.5 (M+H)⁺.

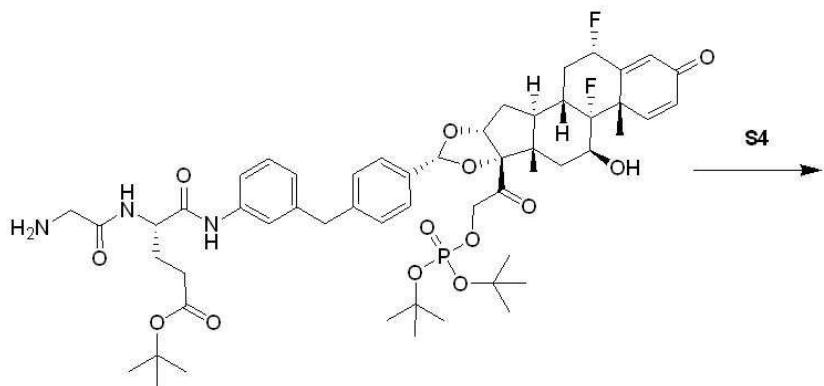
단계 5: 2-((2S,6aS,6bR,7S,8aS,8bS,10R,11aR,12aS,12bS)-10-(4-(3-((S)-6-아미노-2-(2-브로모아세타미도)아세타미도)헥산아미도)벤질)페닐)-2,6b-디플루오로-7-하이드록시-6a,8a-디메틸-4-옥소-1,2,4,6a,6b,7,8,8a,11a,12,12a,12b-도테카하이드로-8bH-나프토[2',1':4,5]인데노[1,2-d][1,3]디옥솔-8b-일)-2-옥소에틸 디하이드로겐 포스페이트의 합성. 디클로로메탄(10 mL) 중 tert-부틸 ((S)-5-(2-(2-브로모아세타미도)아세타미도)-6-((3-(4-((2S,6aS,6bR,7S,8aS,8bS,10R,11aR,12aS,12bS)-8b-(2-(디-tert-부톡시포스포릴)옥시)아세틸)-2,6b-디플루오로-7-하이드록시-6a,8a-디메틸-4-옥소-2,4,6a,6b,7,8,8a,8b,11a,12,12a,12b-도테카하이드로-1H-나프토[2',1':4,5]인데노[1,2-d][1,3]디옥솔-10-일)벤질)페닐)아미노)-6-옥소헥실)카르바메이트(2 g, 1.661 mmol)의 용액에 트리플루오로아세트산(5 mL, 64.9 mmol)을 25°C에서 첨가하였다. 반응을 25°C에서 40 분 동안 교반한 다음, 증발 건조하여, 잔여물을 수득하였으며, 이를 Prep-HPLC(방법 AA17)에 의해 정제하여, 표제 화합물(550 mg, 32% 수율)을 수득하였다. LCMS (방법 AA13) Rt = 2.313분, m/z 993.1 ($M+H$)⁺. ¹H NMR (디메틸설록사이드-*d*6, 400 MHz) δ ppm 0.90 (s, 3 H) 1.19 - 1.41 (m, 2 H) 1.43 - 1.62 (m, 7 H) 1.64 - 1.77 (m, 3 H) 1.84 (br d, J=14.55 Hz, 1 H) 1.95 - 2.07 (m, 1 H) 2.18 - 2.36 (m, 3 H) 2.65 - 2.78 (m, 3 H) 3.71 - 3.86 (m, 3 H) 3.89 (s, 2 H) 3.93 (s, 2 H) 4.20 (br d, J=9.48 Hz, 1 H) 4.33 - 4.41 (m, 1 H) 4.59 (br dd, J=18.41, 8.05 Hz, 1 H) 4.81 (br dd, J=18.52, 8.60 Hz, 1 H) 4.94 (d, J=4.63 Hz, 1 H) 5.50 (s, 1 H) 5.54 - 5.76 (m, 1 H) 6.13 (s, 1 H) 6.29 (dd, J=10.14, 1.32 Hz, 1 H) 6.95 (d, J=7.72 Hz, 1 H) 7.15 - 7.28 (m, 4 H) 7.30 - 7.41 (m, 3 H) 7.51 (br d, J=7.94 Hz, 1 H) 7.72 (br s, 3 H) 8.21 (br d, J=7.72 Hz, 1 H) 8.54 (t, J=5.62 Hz, 1 H) 9.93 (br d, J=2.65 Hz, 1 H).



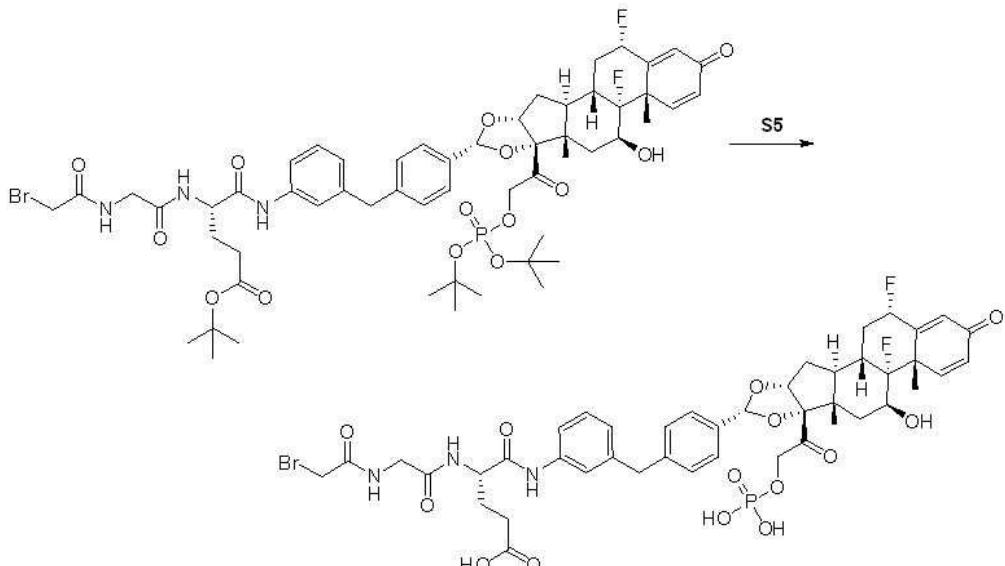
[0389]



[0390]



[0391]



[0392]

단계 1: *tert*-부틸 (S)-4-(2-(((9H-플루오렌-9-일)메톡시)카르보닐)아미노)아세타미도)-5-((3-(4-((2S,6aS,6bR,7S,8aS,8bS,10R,11aR,12aS,12bS)-2,6b-디플루오로-7-하이드록시-8b-(2-하이드록시아세틸)-6a,8a-디메틸-4-옥소-2,4,6a,6b,7,8,8a,8b,11a,12,12a,12b-도데카하이드로-1H-나프토[2',1':4,5]인데노[1,2-d][1,3]디옥솔-10-일)벤질)페닐)아미노)-5-옥소펜타노에이트의 합성. 디메틸포름아미드(10 mL) 중 전구체 실시 예 1의 생성물((2S,6aS,6bR,7S,8aS,8bS,10R,11aR,12aS,12bS)-10-(4-(3-아미노벤질)페닐)-2,6b-디플루오로-7-하이드록시-8b-(2-하이드록시아세틸)-6a,8a-디메틸-6a,6b,7,8,8a,8b,11a,12,12a,12b-deca하이드로-1H-나프토[2',1':4,5]인데노[1,2-d][1,3]디옥솔-4(2H)-온)(500 mg, 0.826 mmol)의 용액에 (S)-2-(2-(((9H-플루오렌-9-일)메톡시)카르보닐)아미노)아세타미도)-5-(*tert*-부통시)-5-옥소펜탄산(500 mg, 1.036 mmol), 2,4,6-트리프로필-1,3,5,2,4,6-트리옥사트리포스피난 2,4,6-트리옥사이드(1800 mg, 2.83 mmol) 및 트리에틸아민(0.689 mL, 4.94 mmol)을 0°C에서 첨가하였다. 반응 혼합물을 20°C에서 30분 동안 교반한 다음, 전구체 실시 예 1의 부가적인 생성물(500 mg, 0.826 mmol)을 첨가하였다. 반응을 25°C에서 12시간 동안 교반하였다. 16개의 동일한 반응을 수행하였으며, 반응을 조합하였다. 혼합물을 물(3 L)에 첨가하고, 에틸 아세테이트(3 X 500 mL)로 추출하였다. 층을 분리하고, 유기층을 (Na_2SO_4)에 걸쳐 건조하고, 여과하고, 감압 하에 농축시켜, 표제 화합물(12 g, 11.21 mmol, 48.0% 수율)을 황색 고체로서 수득하였다. TLC (에틸 아세테이트) R_f 0.48.

[0394]

단계 2: *tert*-부틸 (S)-4-(2-(((9H-플루오렌-9-일)메톡시)카르보닐)아미노)아세타미도)-5-((3-(4-((2S,6aS,6bR,7S,8aS,8bS,10R,11aR,12aS,12bS)-2,6b-디플루오로-7-하이드록시-8b-(2-하이드록시아세틸)-6a,8a-디메틸-4-옥소-2,4,6a,6b,7,8,8a,8b,11a,12,12a,12b-도데카하이드로-1H-나프토[2',1':4,5]인데노[1,2-d][1,3]디옥솔-10-일)벤질)페닐)아미노)-5-옥소펜타노에이트의 합성. 디메틸포름아미드(5 mL) 중 (S)-*tert*-부틸 4-(2-(((9H-플루오렌-9-일)메톡시)카르보닐)아미노)아세타미도)-5-((3-(4-((2S,6aS,6bR,7S,8aS,8bS,10R,11aR,12aS,12bS)-2,6b-디플루오로-7-하이드록시-8b-(2-하이드록시아세틸)-6a,8a-디메틸-4-옥소-2,4,6a,6b,7,8,8a,8b,11a,12,12a,12b-도데카하이드로-1H-나프토[2',1':4,5]인데노[1,2-d][1,3]디옥솔-10-일)벤질)페닐)아미노)-5-옥소펜타노에이트(1 g, 0.934 mmol)의 용액에 1H-테트라졸(0.655 g, 9.34 mmol) 및 디-*tert*-부틸 디에틸포스포라미다이트(1.864 g, 7.48 mmol)를 25°C에서 첨가하였다. 반응을 25°C에서 2.5시간 동안 교반한 다음, 하이드로겐 페옥사이드(0.583 g, 5.14 mmol)를 0°C에서 첨가하였다. 혼합물을 25°C에서 1시간 동안 교반하였다. 19개의 동일한 반응을 수행하고, 조합하였다. 혼합물을 물에 첨가하고, 고체를 여과에 의해 수합하고, prep-HPLC에 의해 정제하여, 표제 화합물(10 g, 85% 수율)을 수득하였다. LCMS (방법 AA18) R_t = 1.434분, m/z 1262.5 ($M+H$)⁺.

[0395]

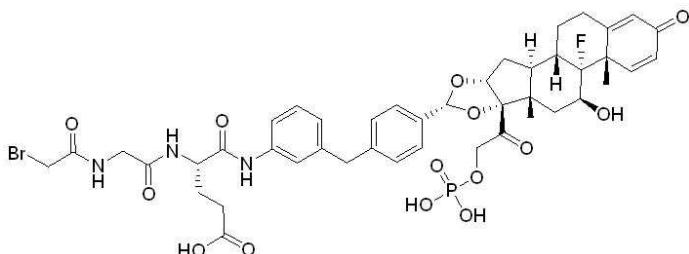
단계 3: *tert*-부틸 (S)-4-(2-아미노아세타미도)-5-((3-(4-((2S,6aS,6bR,7S,8aS,8bS,10R,11aR,12aS,12bS)-2,6b-디플루오로-7-하이드록시-8b-(2-하이드록시아세틸)-6a,8a-디메틸-4-옥소-2,4,6a,6b,7,8,8a,8b,11a,12,12a,12b-도데카하이드로-1H-나프토[2',1':4,5]인데노[1,2-d][1,3]디옥솔-10-일)벤질)페닐)아미노)아세타미도)-5-((3-(4-((2S,6aS,6bR,7S,8aS,8bS,10R,11aR,12aS,12bS)-2,6b-디플루오로-7-하이드록시-8b-(2-하이드록시아세틸)-6a,8a-디메틸-4-옥소-

2,4,6a,6b,7,8,8a,8b,11a,12,12a,12b-도데카하이드로-1H-나프토[2',1':4,5]인데노[1,2-d][1,3]디옥솔-10-(일)벤질)페닐)아미노)-5-옥소펜타노에이트(10g, 7.92 mmol)에 피페리딘(4 mL, 7.92 mmol)을 25°C에서 첨가하였다. 혼합물을 20분 동안 교반하고, 농축시키고, 석유 에테르(2 X 300 mL)로 세척하고, 감압 하에 건조하여, 표제 화합물(5 g, 61% 수율)을 수득하였다. LCMS(방법 AA19) Rt = 1.604분, m/z 1040.7 (M+H)⁺.

[0396] 단계 4: tert-부틸 (S)-4-(2-(2-브로모아세타미도)아세타미도)-5-((3-(4-((2S,6aS,6bR,7S,8aS,8bS,10R,11aR,12aS,12bS)-8b-(2-((디-tert-부톡시포스포릴)옥시)아세틸)-2,6b-디플루오로-7-하이드록시-6a,8a-디메틸-4-옥소-2,4,6a,6b,7,8,8a,8b,11a,12,12a,12b-도데카하이드로-1H-나프토[2',1':4,5]인데노[1,2-d][1,3]디옥솔-10-(일)벤질)페닐)아미노)-5-옥소펜타노에이트의 합성. 디메틸포름아미드(4 mL) 중 2-브로모아세트산(0.134 g, 0.961 mmol)의 용액에 N-에톡시카르보닐-2-에톡시-1,2-디하이드로퀴논(0.238 g, 0.961 mmol)을 25°C에서 첨가하였다. 혼합물을 25°C에서 1시간 동안 교반한 다음, (S)-tert-부틸 4-(2-아미노아세타미도)-5-((3-(4-((2S,6aS,6bR,7S,8aS,8bS,10R,11aR,12aS,12bS)-8b-(2-((디-tert-부톡시포스포릴)옥시)아세틸)-2,6b-디플루오로-7-하이드록시-6a,8a-디메틸-4-옥소-2,4,6a,6b,7,8,8a,8b,11a,12,12a,12b-도데카하이드로-1H-나프토[2',1':4,5]인데노[1,2-d][1,3]디옥솔-10-(일)벤질)페닐)아미노)-5-옥소펜타노에이트(0.5 g, 0.481 mmol)를 첨가하고, 혼합물을 25°C에서 2.5시간 동안 교반하였다. 9개의 동일한 반응을 수행하고, 조합하였다. 혼합물을 농축시키고, 수중 1 M HBr(200 mL), NaHCO₃의 수용액(200 mL)로 세척하고, 건조하고 (Na₂SO₄), 여과하고, 농축시켜, 표제 화합물(5 g, 90% 수율)을 수득하였다. LCMS (방법 AA18) Rt = 1.32분, m/z 1162 (M+H)⁺.

[0397] 단계 5: (S)-4-(2-(2-브로모아세타미도)아세타미도)-5-((3-(4-((2S,6aS,6bR,7S,8aS,8bS,10R,11aR,12aS,12bS)-2,6b-디플루오로-7-하이드록시-6a,8a-디메틸-4-옥소-8b-(2-(포스포노옥시)아세틸)-2,4,6a,6b,7,8,8a,8b,11a,12,12a,12b-도데카하이드로-1H-나프토[2',1':4,5]인데노[1,2-d][1,3]디옥솔-10-(일)벤질)페닐)아미노)-5-옥소펜탄산의 합성. 디클로로메탄(20 mL) 중 (S)-tert-부틸 4-(2-(2-브로모아세타미도)아세타미도)-5-((3-(4-((2S,6aS,6bR,7S,8aS,8bS,10R,11aR,12aS,12bS)-8b-(2-((디-tert-부톡시포스포릴)옥시)아세틸)-2,6b-디플루오로-7-하이드록시-6a,8a-디메틸-4-옥소-2,4,6a,6b,7,8,8a,8b,11a,12,12a,12b-도데카하이드로-1H-나프토[2',1':4,5]인데노[1,2-d][1,3]디옥솔-10-(일)벤질)페닐)아미노)-5-옥소펜타노에이트(3 g, 2.58 mmol)에 트리플루오로아세트산(10 mL)을 25°C에서 첨가하고, 혼합물을 2시간 동안 교반하였다. 반응 혼합물을 농축시키고, prep-HPLC(방법 AA20)에 의해 정제하여, 표제 화합물(1.09 g, 42% 수율)을 수득하였다. LCMS (방법 AA4) Rt = 2.919분, m/z 994.2 (M+H)⁺. ¹H NMR (메탄올-d4, 400 MHz) δ = 7.45 (br d, J=7.9 Hz, 1H), 7.40 - 7.29 (m, 4H), 7.25 - 7.16 (m, 3H), 6.95 (br d, J=7.5 Hz, 1H), 6.38 - 6.30 (m, 2H), 5.66 - 5.57 (m, 1H), 5.55 - 5.44 (m, 1H), 5.08 - 4.94 (m, 2H), 4.81 - 4.72 (m, 1H), 4.49 (br dd, J=5.0, 9.0 Hz, 1H), 4.32 (br d, J=8.6 Hz, 1H), 3.96 - 3.90 (m, 5H), 2.79 - 2.60 (m, 1H), 2.48 - 2.32 (m, 4H), 2.28 (br d, J=13.3 Hz, 1H), 2.17 (dt, J=7.6, 13.4 Hz, 1H), 2.04 - 1.92 (m, 1H), 1.85 - 1.72 (m, 3H), 1.70 - 1.53 (m, 4H), 1.01 (s, 3H).

[0398] 전구체 실시예 36: (S)-4-(2-(2-브로모아세타미도)아세타미도)-5-((3-(4-((6aS,6bR,7S,8aS,8bS,10R,11aR,12aS,12bS)-6b-플루오로-7-하이드록시-6a,8a-디메틸-4-옥소-8b-(2-(포스포노옥시)아세틸)-2,4,6a,6b,7,8,8a,8b,11a,12,12a,12b-도데카하이드로-1H-나프토[2',1':4,5]인데노[1,2-d][1,3]디옥솔-10-(일)벤질)페닐)아미노)-5-옥소펜탄산

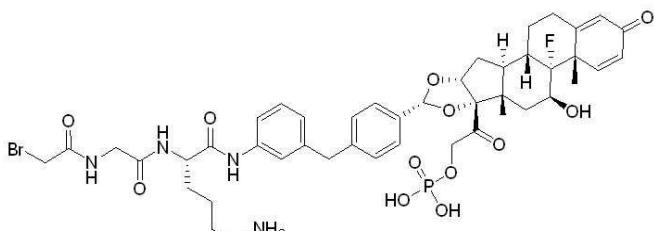


[0399]

[0400] 전구체 실시예 4와 유사한 경로를 사용하여 2-((6aS,6bR,7S,8aS,8bS,10R,11aR,12aS,12bS)-10-(4-(3-아미노벤질)페닐)-6b-플루오로-7-하이드록시-6a,8a-디메틸-4-옥소-1,2,4,6a,6b,7,8,8a,11a,12,12a,12b-도데카하이드로-8bH-나프토[2',1':4,5]인데노[1,2-d][1,3]디옥솔-8b-일)-2-옥소에틸 디하이드로겐 포스페이트를 사용하여 제조하였다.

[0401] LCMS (방법 AA15) Rt = 1.690분, m/z 976.1 ($M+H$)⁺. 1H NMR (메탄올-*d*4, 400 MHz) δ = 7.47 (br d, J=8.6 Hz, 1H), 7.44 – 7.36 (m, 4H), 7.28 – 7.19 (m, 3H), 6.97 (d, J=7.6 Hz, 1H), 6.33 (dd, J=1.7, 10.1 Hz, 1H), 6.14 (s, 1H), 5.53 (s, 1H), 5.07 – 4.96 (m, 2H), 4.83 – 4.73 (m, 1H), 4.50 (dd, J=4.8, 9.0 Hz, 1H), 4.34 (br d, J=8.7 Hz, 1H), 4.00 – 3.91 (m, 6H), 2.83 – 2.71 (m, 1H), 2.68 – 2.54 (m, 1H), 2.45 (br t, J=7.6 Hz, 3H), 2.40 – 2.26 (m, 2H), 2.25 – 2.13 (m, 1H), 2.06 – 1.91 (m, 2H), 1.84 – 1.72 (m, 3H), 1.65 – 1.50 (m, 4H), 1.04 (s, 3H).

[0402] 전구체 실시예 37: 2-((6aS,6bR,7S,8aS,8bS,10R,11aR,12aS,12bS)-10-(4-(3-((S)-6-아미노-2-(2-브로모아세타미도)아세타미도)헥산아미도)벤질)-6b-플루오로-7-하이드록시-6a,8a-디메틸-4-옥소-1,2,4,6a,6b,7,8,8a,11a,12,12a,12b-도데카하이드로-8bH-나프토[2',1':4,5]인테노[1,2-d][1,3]디옥솔-8b-일)-2-옥소에틸 디하이드로겐 포스페이트

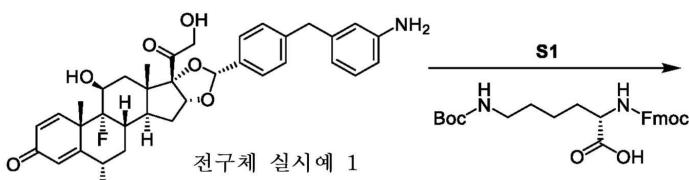


[0403]

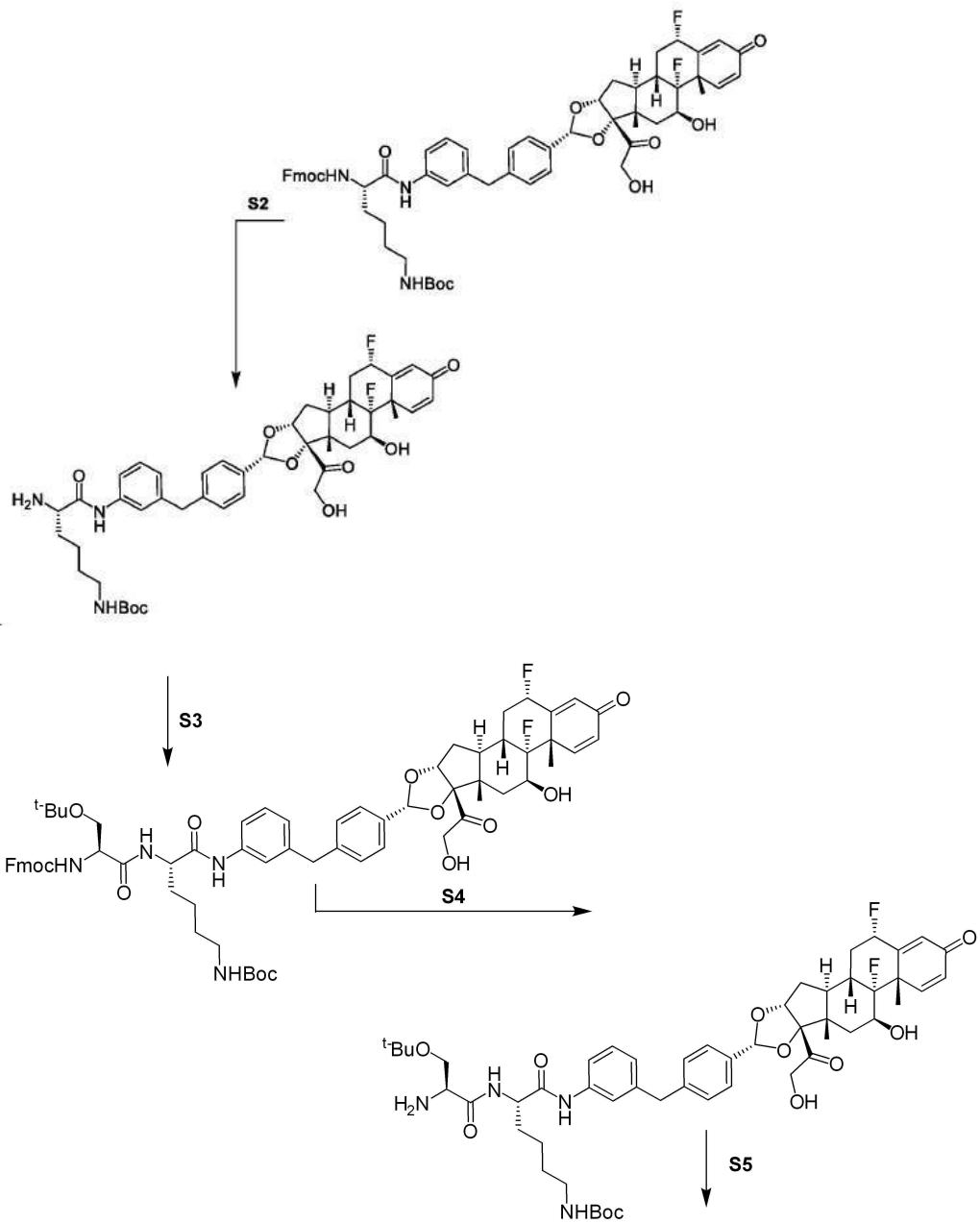
[0404] 전구체 실시예 5와 유사한 경로를 사용하여
2-((6aS,6bR,7S,8aS,8bS,10R,11aR,12aS,12bS)-10-(4-(3-아미노벤질)페닐)-6b-플루오로-7-하이드록시)-6a,8a-디
메틸-4-옥소-1,2,4,6a,6b,7,8,8a,11a,12,12a,12b-도데카하이드로-8bH-나프토[2',1':4,5]인데노[1,2-d][1,3]디
옥솔-8b-일)-2-옥소에틸 디하이드로겐 포스페이트를 사용하여 제조하였다.

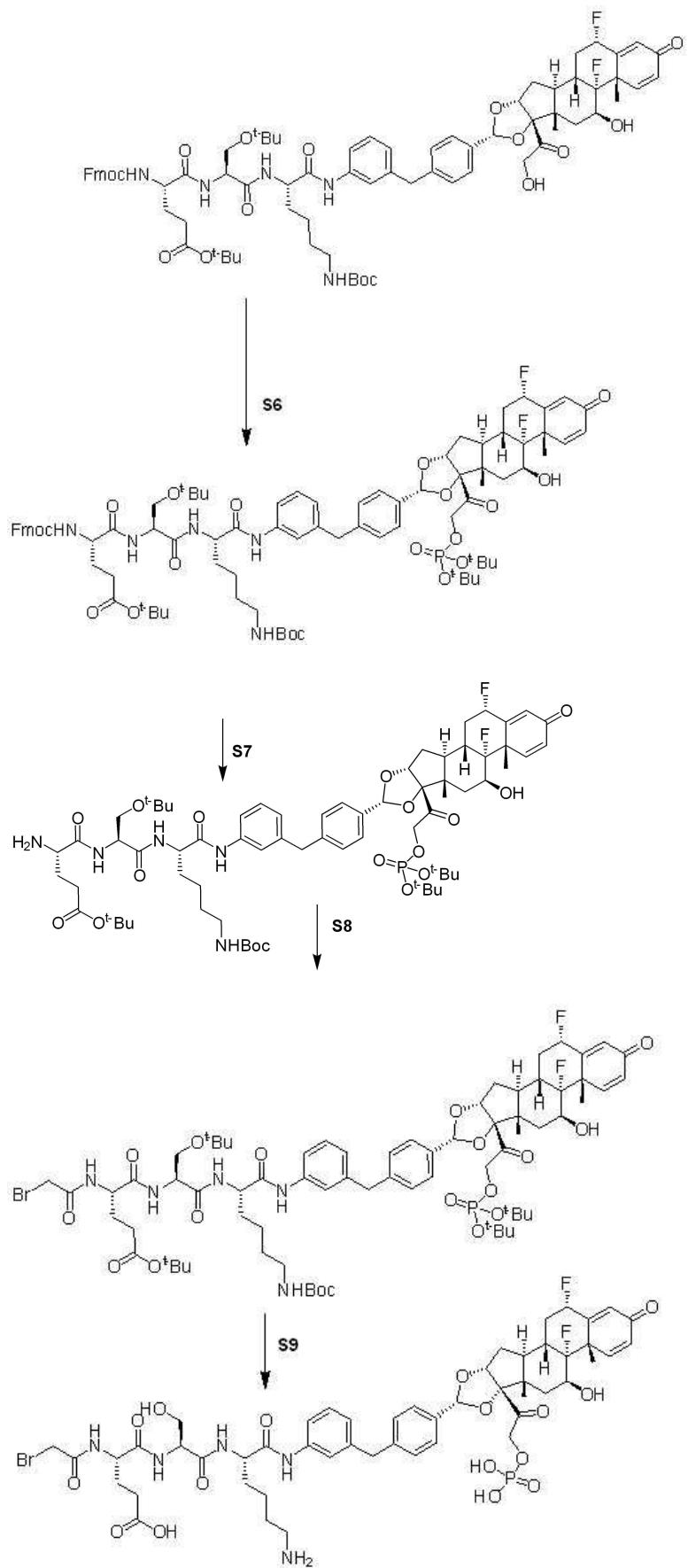
[0405] LCMS (방법 AA16) Rt = 2.437분, m/z 975.2 ($M+H$)⁺. 1H NMR (디메틸실록사이드- d_6 , 400 MHz) δ = 9.94 (br s, 1H), 8.54 (br t, J=5.4 Hz, 1H), 8.21 (br d, J=7.9 Hz, 1H), 7.75 (br s, 3H), 7.51 (br d, J=7.3 Hz, 1H), 7.39 - 7.30 (m, 3H), 7.30 - 7.17 (m, 4H), 6.95 (br d, J=7.5 Hz, 1H), 6.22 (br d, J=10.1 Hz, 1H), 6.03 (s, 1H), 5.49 (s, 1H), 4.92 (br s, 1H), 4.79 (br dd, J=8.3, 18.2 Hz, 1H), 4.58 (br dd, J=8.0, 18.4 Hz, 1H), 4.42 - 4.32 (m, 1H), 4.19 (br d, J=9.0 Hz, 1H), 3.94 (s, 2H), 3.89 (br s, 2H), 3.86 - 3.71 (m, 3H), 2.74 (br s, 2H), 2.33 (br s, 1H), 2.23 - 1.96 (m, 2H), 1.83 (br d, J=10.6 Hz, 2H), 1.76 - 1.46 (m, 10H), 1.45 - 1.22 (m, 3H), 0.90 (s, 3H).

[0406] 전구체 실시예 47: (S)-5-(((S)-1-(((S)-6-아미노-1-((3-(4-((2S,6aS,6bR,7S,8aS,8bS,10R,11aR,12aS,12bS)-2,6b-디플루오로-7-하이드록시-6a,8a-디메틸-4-옥소-8b-(2-(포스포노옥시)아세틸)-2,4,6a,6b,7,8,8a,8b,11a,12,12a,12b-도테카하이드로-1H-나프토[2',1':4,5]인데노[1,2-d][1,3]디옥솔-10-일)벤질)페닐)아미노)-1-옥소헥산-2-일)아미노)-3-하이드록시-1-옥소프로판-2-일)아미노)-4-(2-브로모아세타미도)-5-옥소펜탄산



[0407]





단계 1: (9H-플루오렌-9-일)메틸 tert-부틸 ((S)-6-((3-(4-((2S,6aS,6bR,7S,8aS,8bS,10R,11aR,12aS,12bS)-2,6b-디플루오로-7-하이드록시-8b-(2-하이드록시아세틸)-6a,8a-디메틸-4-옥소-2,4,6a,6b,7,8,8a,8b,11a,12,12a,12b-도데카하이드로-1H-나프토[2',1':4,5]인페노[1,2-d][1,3]디옥솔-10-

일) 벤질)페닐)아미노)-6-옥소헥산-1,5-디일)디카르바메이트의 합성. 디메틸포름아미드(4 mL) 중 (S)-2-(((9H-플루오렌-9-일)메톡시)카르보닐)아미노)-6-((*tert*-부톡시카르보닐)아미노)헥산산(0.390 g, 0.832 mmol), 전구체 실시예 1의 생성물((2S,6aS,6bR,7S,8aS,8bS,10R,11aR,12aS,12bS)-10-(4-(3-아미노벤질)페닐)-2,6b-디플루오로-7-하이드록시-8b-(2-하이드록시아세틸)-6a,8a-디메틸-6a,6b,7,8,8a,8b,11a,12,12a,12b-deca하이드로-1H-나프토[2',1':4,5]인데노[1,2-d][1,3]디옥솔-4(2H)-온)(0.504 g, 0.832 mmol), 1-[비스(디메틸아미노)메틸렌]-1H-1,2,3-트리아졸로[4,5-b]파리디늄 3-옥시드 혼합물을 주위 온도에서 30시간 동안 교반하였다. 반응 혼합물을 에틸 아세테이트(100 mL)로 희석시키고, HCl의 1 N 수용액(50 mL), NaHCO₃의 포화된 수용액(50 mL) 및 포화된 염수 용액(50 mL)으로 세척하였다. 유기상을 건조하고(Na₂SO₄), 여과하고, 용매를 감압 하에 제거하였다. 생성된 잔여물을 0-70% 에틸 아세테이트/헵탄의 구배로 용출하는 크로마토그래피(실리카)에 의해 정제하여, 표제 화합물(0.780 g, 89% 수율)을 수득하였다. LCMS (방법 AA17): Rt = 1.10분, m/z 1056.9 (M+H)⁺. ¹H NMR (디메틸설폴사이드-*d*₆, 400 MHz) δ 9.87 (s, 1H), 7.85 (d, J = 7.5 Hz, 2H), 7.69 (dd, J = 7.6, 4.8 Hz, 2H), 7.52 (d, J = 7.9 Hz, 1H), 7.44 (d, J = 8.2 Hz, 1H), 7.41 - 7.24 (m, 7H), 7.24 - 7.12 (m, 4H), 6.88 (d, J = 7.6 Hz, 1H), 6.71 (s, 1H), 6.24 (dd, J = 10.1, 1.9 Hz, 1H), 6.09 (s, 1H), 5.61 (ddd, J = 48.9, 11.0, 6.6 Hz, 1H), 5.48 (d, J = 3.6 Hz, 1H), 5.41 (s, 1H), 5.06 (t, J = 5.9 Hz, 1H), 4.91 (d, J = 4.8 Hz, 1H), 4.47 (dd, J = 19.4, 6.3 Hz, 1H), 4.27 - 4.11 (m, 4H), 4.07 - 3.95 (m, 1H), 3.85 (s, 2H), 2.89 - 2.83 (m, 2H), 2.66 - 2.51 (m, 1H), 2.28 - 2.23 (m, 2H), 2.20 (dt, J = 12.2, 6.3 Hz, 1H), 2.01 (d, J = 13.9 Hz, 1H), 1.74 - 1.62 (m, 2H), 1.66 - 1.49 (m, 4H), 1.46 (s, 3H), 1.31 (s, 9H), 1.22 (d, J = 9.3 Hz, 1H), 0.83 (s, 3H).

[0414]

단계 2: *tert*-부틸 ((S)-5-아미노-6-((3-(4-((2S,6aS,6bR,7S,8aS,8bS,10R,11aR,12aS,12bS)-2,6b-디플루오로-7-하이드록시-8b-(2-하이드록시아세틸)-6a,8a-디메틸-4-옥소-2,4,6a,6b,7,8,8a,8b,11a,12,12a,12b-도데카하이드로-1H-나프토[2',1':4,5]인데노[1,2-d][1,3]디옥솔-10-일)벤질)페닐)아미노)-6-옥소헥실)카르바메이트의 합성. 디에틸아민(0.540 g, 7.39 mmol)를 테트라하이드로푸란(10 mL) 중 (9H-플루오렌-9-일)메틸 *tert*-부틸 ((S)-6-((3-(4-((2S,6aS,6bR,7S,8aS,8bS,10R,11aR,12aS,12bS)-2,6b-디플루오로-7-하이드록시-8b-(2-하이드록시아세틸)-6a,8a-디메틸-4-옥소-2,4,6a,6b,7,8,8a,8b,11a,12,12a,12b-도데카하이드로-1H-나프토[2',1':4,5]인데노[1,2-d][1,3]디옥솔-10-일)벤질)페닐)아미노)-6-옥소헥산-1,5-디일)디카르바메이트(0.780 g, 0.739 mmol)의 탈기된 용액에 첨가하였다. 반응 혼합물을 주위 온도에서 2시간 동안 교반하였으며, 이때, 용매를 감압 하에 제거하였다. 생성된 잔여물을 툴루엔(3 x 50 mL)으로 처리하고, 이를 감압 하에 제거하여, 가능한 한 많은 디에틸아민을 제거하였다(drive off). 조 표제 화합물을 추가의 정제 없이 즉시 사용하였다. LCMS (방법 AA17): Rt = 0.86분, m/z 834.0 (M+H)⁺.

[0415]

단계 3: *tert*-부틸 ((S)-5-((S)-2-(((9H-플루오렌-9-일)메톡시)카르보닐)아미노)-3-(<i>tert</i>-부톡시)프로판아미노)-6-((3-(4-((2S,6aS,6bR,7S,8aS,8bS,10R,11aR,12aS,12bS)-2,6b-디플루오로-7-하이드록시-8b-(2-하이드록시아세틸)-6a,8a-디메틸-4-옥소-2,4,6a,6b,7,8,8a,8b,11a,12,12a,12b-도데카하이드로-1H-나프토[2',1':4,5]인데노[1,2-d][1,3]디옥솔-10-일)벤질)페닐)아미노)-6-옥소헥실)카르바메이트의 합성. 디메틸포름아미드(4 mL) 중 (S)-2-(((9H-플루오렌-9-일)메톡시)카르보닐)아미노)-3-(<i>tert</i>-부톡시)프로판산(0.283 g, 0.739 mmol), *tert*-부틸 ((S)-5-아미노-6-((3-(4-((2S,6aS,6bR,7S,8aS,8bS,10R,11aR,12aS,12bS)-2,6b-디플루오로-7-하이드록시-8b-(2-하이드록시아세틸)-6a,8a-디메틸-4-옥소-2,4,6a,6b,7,8,8a,8b,11a,12,12a,12b-도데카하이드로-1H-나프토[2',1':4,5]인데노[1,2-d][1,3]디옥솔-10-일)벤질)페닐)아미노)-6-옥소헥실)카르바메이트(0.616 g, 0.739 mmol), 1-[비스(디메틸아미노)메틸렌]-1H-1,2,3-트리아졸로[4,5-b]파리디늄 3-옥시드 혼합물을 0°C에서 0.5시간 동안 교반하였다. 반응 혼합물을 에틸 아세테이트(100 mL)로 희석시키고, HCl의 1 N 수용액(50 mL), NaHCO₃의 포화된 수용액(50 mL) 및 포화된 염수 용액(50 mL)으로 세척하였다. 유기상을 건조하고(Na₂SO₄), 여과하고, 용매를 감압 하에 제거하였다. 생성된 잔여물을 0-70% 에틸 아세테이트/헵탄의 구배로 용출하는 크로마토그래피(실리카)에 의해 정제하여, 표제 화합물(0.500 g, 56% 수율)을 수득하였다. LCMS (방법 AA17): Rt = 1.18분, m/z 1199.2 (M+H)⁺. ¹H NMR (디메틸설폴사이드-*d*₆, 500 MHz) δ 9.84 (s, 1H), 7.95 (d, J = 8.0 Hz, 1H), 7.86 (d, J = 7.5 Hz, 2H), 7.70 (t, J = 7.1 Hz, 2H), 7.46 - 7.26 (m, 7H), 7.26 - 7.13 (m, 5H), 6.89 (d, J = 7.6 Hz, 1H), 6.67 (s, 1H), 6.27 (dd, J = 10.2, 1.9 Hz, 1H), 6.11 (s, 1H), 5.62 (dt, J =

48.6, 9.1 Hz, 1H), 5.50 (s, 1H), 5.41 (s, 1H), 5.08 (t, J = 5.9 Hz, 1H), 4.92 (d, J = 4.9 Hz, 1H), 4.48 (dd, J = 19.4, 5.8 Hz, 1H), 4.36 (d, J = 6.9 Hz, 1H), 4.33 – 4.07 (m, 5H), 3.84 (s, 2H), 3.44 (d, J = 6.1 Hz, 2H), 2.85 (q, J = 6.5 Hz, 2H), 2.68 – 2.53 (m, 1H), 2.32 – 2.16 (m, 2H), 2.02 (d, J = 13.7 Hz, 1H), 1.67 (d, J = 13.5 Hz, 3H), 1.60 – 1.48 (m, 1H), 1.47 (s, 3H), 1.31 (s, 10H), 1.25 – 1.16 (m, 1H), 1.05 (s, 9H), 0.84 (s, 3H).

[0416] 단계 4: tert-부틸 ((S)-5-((S)-2-아미노-3-(tert-부톡시)프로판아미도)-6-((3-(4-((2S,6aS,6bR,7S,8aS,8bS,10R,11aR,12aS,12bS)-2,6b-디플루오로-7-하이드록시-8b-(2-하이드록시아세틸)-6a,8a-디메틸-4-옥소-2,4,6a,6b,7,8,8a,8b,11a,12,12a,12b-도데카하이드로-1H-나프토[2',1':4,5]인데노[1,2-d][1,3]디옥솔-10-일)벤질)페닐)아미노)-6-옥소헥실)카르바메이트의 합성. 디에틸아민(0.305 g, 4.17 mmol)를 테트라하이드로푸란(10 mL) 중 tert-부틸 ((S)-5-((S)-2-(((9H-플루오렌-9-일)메톡시)카르보닐)아미노)-3-(tert-부톡시)프로판아미도)-6-((3-(4-((2S,6aS,6bR,7S,8aS,8bS,10R,11aR,12aS,12bS)-2,6b-디플루오로-7-하이드록시-8b-(2-하이드록시아세틸)-6a,8a-디메틸-4-옥소-2,4,6a,6b,7,8,8a,8b,11a,12,12a,12b-도데카하이드로-1H-나프토[2',1':4,5]인데노[1,2-d][1,3]디옥솔-10-일)벤질)페닐)아미노)-6-옥소헥실)카르바메이트(0.500 g, 0.417 mmol)의 틸기된 용액에 첨가하였다. 반응 혼합물을 주위 온도에서 2시간 동안 교반하였으며, 이때, 용매를 감압 하에 제거하였다. 생성된 잔여물을 톤휴엔(3 x 50 mL)으로 처리하고, 이를 감압 하에 제거하여 가능한 많은 디에틸아민을 제거하였다. 조 표제 화합물을 추가의 정제 없이 즉시 사용하였다. LCMS (방법 AA17): Rt = 0.92분, m/z 976.9 ($M+H$)⁺.

[0417] 단계 5: (10S,13S,16S)-tert-부틸 16-(((9H-플루오렌-9-일)메톡시)카르보닐)아미노)-13-(tert-부톡시메틸)-10-((3-(4-((2S,6aS,6bR,7S,8aS,8bS,10R,11aR,12aS,12bS)-2,6b-디플루오로-7-하이드록시-8b-(2-하이드록시아세틸)-6a,8a-디메틸-4-옥소-2,4,6a,6b,7,8,8a,8b,11a,12,12a,12b-도데카하이드로-1H-나프토[2',1':4,5]인데노[1,2-d][1,3]디옥솔-10-일)벤질)페닐)카르바모일)-2,2-디메틸-4,12,15-트리옥소-3-옥사-5,11,14-트리아자노나데칸-19-오에이트의 합성. 디메틸포름아미드(4 mL) 중 (S)-2-(((9H-플루오렌-9-일)메톡시)카르보닐)아미노)-5-(tert-부톡시)-5-옥소펜탄산(0.177 g, 0.417 mmol), tert-부틸 ((S)-5-((S)-2-아미노-3-(tert-부톡시)프로판아미도)-6-((3-(4-((2S,6aS,6bR,7S,8aS,8bS,10R,11aR,12aS,12bS)-2,6b-디플루오로-7-하이드록시-8b-(2-하이드록시아세틸)-6a,8a-디메틸-4-옥소-2,4,6a,6b,7,8,8a,8b,11a,12,12a,12b-도데카하이드로-1H-나프토[2',1':4,5]인데노[1,2-d][1,3]디옥솔-10-일)벤질)페닐)아미노)-6-옥소헥실)카르바메이트(0.407 g, 0.417 mmol), (1-[비스(디메틸아미노)메틸렌]-1H-1,2,3-트리아졸로[4,5-b]파리디늄 3-옥시드 혼합물(0.190 g, 0.500 mmol) 및 2,6-디메틸파리딘(0.146 mL, 1.251 mmol)의 혼합물을 0°C에서 0.5시간 동안 교반하였다. 반응 혼합물을 에틸 아세테이트(100 mL)로 회색시키고, HCl의 1 M 수용액(50 mL), NaHCO₃의 포화된 수용액(50 mL) 및 포화된 염수 용액(50 mL)으로 세척하였다. 유기상을 건조하고(Na₂SO₄), 여과하고, 용매를 감압 하에 제거하였다. 생성된 잔여물을 0-70% 에틸 아세테이트/헵탄의 구배로 용출하는 크로마토그래피(실리카)에 의해 정제하여, 표제 화합물(0.455 g, 79% 수율)을 수득하였다. LCMS (방법 AA17): Rt = 1.03분, m/z 관찰되지 않음. ¹H NMR (디메틸실록사이드-d₆, 500 MHz) δ 9.77 (s, 1H), 7.91 (s, 1H), 7.85 (d, J = 7.6 Hz, 3H), 7.77 (d, J = 7.7 Hz, 1H), 7.68 (t, J = 6.7 Hz, 2H), 7.58 (d, J = 8.0 Hz, 1H), 7.44 – 7.34 (m, 4H), 7.34 – 7.22 (m, 4H), 7.16 (dd, J = 22.5, 8.0 Hz, 3H), 6.87 (d, J = 7.6 Hz, 1H), 6.65 (s, 1H), 6.25 (dd, J = 10.1, 1.9 Hz, 1H), 6.09 (s, 1H), 5.70 – 5.50 (m, 1H), 5.48 (d, J = 3.8 Hz, 1H), 5.40 (s, 1H), 5.06 (t, J = 6.0 Hz, 1H), 4.90 (d, J = 4.7 Hz, 1H), 4.47 (dd, J = 19.4, 6.2 Hz, 1H), 4.29 (dt, J = 19.5, 6.5 Hz, 3H), 4.23 – 4.10 (m, 3H), 4.03 (d, J = 6.3 Hz, 1H), 3.84 (s, 2H), 3.53 (s, 0H), 3.52 – 3.36 (m, 1H), 2.84 – 2.78 (m, 2H), 2.67 – 2.50 (m, 1H), 2.22 (t, J = 8.4 Hz, 3H), 2.01 (d, J = 13.6 Hz, 1H), 1.88 (s, 1H), 1.80 – 1.58 (m, 6H), 1.56 – 1.48 (m, 1H), 1.46 (s, 3H), 1.34 (s, 9H), 1.29 (s, 9H), 1.20 (s, 1H), 1.00 (s, 9H), 0.93 (s, 1H), 0.82 (s, 3H).

[0418] 단계 6: (10S,13S,16S)-tert-부틸 16-(((9H-플루오렌-9-일)메톡시)카르보닐)아미노)-13-(tert-부톡시메틸)-10-((3-(4-((2S,6aS,6bR,7S,8aS,8bS,10R,11aR,12aS,12bS)-2,6b-디플루오로-7-하이드록시-8b-(2-((디-tert-부톡시포스포릴)옥시)아세틸)-2,6b-디플루오로-7-하이드록시-6a,8a-디메틸-4-옥소-2,4,6a,6b,7,8,8a,8b,11a,12,12a,12b-도데카하이드로-1H-나프토[2',1':4,5]인데노[1,2-d][1,3]디옥솔-10-일)벤질)페닐)카르바모일)-2,2-디메틸-4,12,15-트리옥소-3-옥사-5,11,14-트리아자노나데칸-19-오에이트의 합성. 디메틸포름아미드(1.5 mL) 중 (10S,13S,16S)-tert-부틸 16-(((9H-플루오렌-9-일)메톡시)카르보닐)아미노)-13-(tert-부톡시메틸)-10-((3-(4-((2S,6aS,6bR,7S,8aS,8bS,10R,11aR,12aS,12bS)-2,6b-디플루오로-7-하이드록시-8b-(2-하이드록시아세틸)-

6a,8a-디메틸-4-옥소-2,4,6a,6b,7,8,8a,8b,11a,12,12a,12b-도데카하이드로-1H-나프토[2',1':4,5]인데노[1,2-d][1,3]디옥솔-10-일(벤질)페닐)카르바모일)-2,2-디메틸-4,12,15-트리옥소-3-옥사-5,11,14-트리아자노나데칸-19-오에이트(0.452 g, 0.326 mmol) 및 1H-테트라졸(0.105 g, 1.502 mmol)의 혼합물을 디-*tert*-부틸 디에틸포스포라미다이트(0.291 mL, 1.045 mmol)로 처리하였다. 반응 혼합물을 주위 온도에서 4시간 동안 교반하였으며, 이 때, H₂O₂의 수용액(50 wt%, 0.3 mL)을 첨가하고, 1시간 동안 계속 교반하였다. 아세토니트릴 및 10 mM 수성 암모늄 아세테이트의 구배로 용출하는 prep-HPLC에 의한 정제는 표제 화합물(0.455 g, 79% 수율)을 수득하였다.

LCMS (방법 AA17): Rt = 1.35분, m/z 1575.8 (M+H)⁺. ¹H NMR (디메틸실록사이드-*d*6, 400 MHz) δ 9.76 (s, 1H), 7.85 (d, J = 7.7 Hz, 3H), 7.77 (d, J = 7.7 Hz, 1H), 7.67 (t, J = 6.7 Hz, 2H), 7.58 (d, J = 8.0 Hz, 1H), 7.44 – 7.18 (m, 10H), 7.14 (t, J = 7.8 Hz, 1H), 6.88 (d, J = 7.5 Hz, 1H), 6.65 (s, 1H), 6.25 (dd, J = 10.1, 1.9 Hz, 1H), 6.09 (s, 1H), 5.70 – 5.48 (m, 3H), 4.98 – 4.87 (m, 2H), 4.61 (dd, J = 17.9, 9.3 Hz, 1H), 4.29 (dt, J = 19.4, 6.8 Hz, 2H), 4.19 (d, J = 7.0 Hz, 2H), 4.03 (d, J = 7.0 Hz, 1H), 3.84 (s, 2H), 3.54 – 3.32 (m, 1H), 2.82 (d, J = 6.5 Hz, 2H), 2.74 – 2.50 (m, 1H), 2.22 (t, J = 7.9 Hz, 3H), 2.03 (d, J = 13.1 Hz, 1H), 1.94 – 1.80 (m, 1H), 1.76 – 1.60 (m, 5H), 1.55 – 1.41 (m, 2H), 1.45 (s, 3H), 1.39 (s, 9H), 1.38 (s, 9H), 1.34 (s, 9H), 1.29 (s, 9H), 1.25 – 1.12 (m, 1H), 0.99 (s, 9H), 0.91 (s, 1H), 0.85 (s, 3H).

[0419]

단계 7: (10S,13S,16S)-*tert*-부틸 16-아미노-13-(*tert*-부톡시메틸)-10-((3-(4-((2S,6aS,6bR,7S,8aS,8bS,10R,11aR,12aS,12bS)-8b-(2-((디-*tert*-부톡시포스포릴)옥시)아세틸)-2,6b-디플루오로-7-하이드록시-6a,8a-디메틸-4-옥소-2,4,6a,6b,7,8,8a,8b,11a,12,12a,12b-도데카하이드로-1H-나프토[2',1':4,5]인데노[1,2-d][1,3]디옥솔-10-일(벤질)페닐)카르바모일)-2,2-디메틸-4,12,15-트리옥소-3-옥사-5,11,14-트리아자노나데칸-19-오에이트의 합성. 디에틸아민(0.100 g, 1.364 mmol)을 THF(8 mL) 중 (10S,13S,16S)-*tert*-부틸 16-(((9H-플루오렌-9-일)메톡시)카르보닐)아미노)-13-(*tert*-부톡시메틸)-10-((3-(4-((2S,6aS,6bR,7S,8aS,8bS,10R,11aR,12aS,12bS)-8b-(2-((디-*tert*-부톡시포스포릴)옥시)아세틸)-2,6b-디플루오로-7-하이드록시-6a,8a-디메틸-4-옥소-2,4,6a,6b,7,8,8a,8b,11a,12,12a,12b-도데카하이드로-1H-나프토[2',1':4,5]인데노[1,2-d][1,3]디옥솔-10-일(벤질)페닐)카르바모일)-2,2-디메틸-4,12,15-트리옥소-3-옥사-5,11,14-트리아자노나데칸-19-오에이트(0.215 g, 0.136 mmol)의 탈기된 용액에 첨가하였다. 반응 혼합물을 주위 온도에서 2시간 동안 교반하였으며, 이 때, 용매를 감압 하에 제거하였다. 생성된 잔여물을 톨루엔(3 x 50 mL)으로 처리하고, 이를 감압 하에 제거하여 가능한 한 많은 디에틸아민을 제거하였다. 조 표제 화합물을 추가의 정제 없이 즉시 사용하였다. LCMS (방법 AA17): Rt = 1.11분, m/z 1354.8 (M+H)⁺.

[0420]

단계 8: (10S,13S,16S)-*tert*-부틸 16-(2-브로모아세타미도)-13-(*tert*-부톡시메틸)-10-((3-(4-((2S,6aS,6bR,7S,8aS,8bS,10R,11aR,12aS,12bS)-8b-(2-((디-*tert*-부톡시포스포릴)옥시)아세틸)-2,6b-디플루오로-7-하이드록시-6a,8a-디메틸-4-옥소-2,4,6a,6b,7,8,8a,8b,11a,12,12a,12b-도데카하이드로-1H-나프토[2',1':4,5]인데노[1,2-d][1,3]디옥솔-10-일(벤질)페닐)카르바모일)-2,2-디메틸-4,12,15-트리옥소-3-옥사-5,11,14-트리아자노나데칸-19-오에이트의 합성. 디메틸포름아미드(0.2 mL) 중 브로모아세트산(0.0347 g, 0.250 mmol) 및 에틸 2-에톡시퀴논-1(2H)-카르복실레이트(0.07736 g, 0.298 mmol)의 혼합물을 주위 온도에서 30분 동안 교반하였으며, 이 때, 디메틸포름아미드(0.3 mL) 중 (10S,13S,16S)-*tert*-부틸 16-아미노-13-(*tert*-부톡시메틸)-10-((3-(4-((2S,6aS,6bR,7S,8aS,8bS,10R,11aR,12aS,12bS)-8b-(2-((디-*tert*-부톡시포스포릴)옥시)아세틸)-2,6b-디플루오로-7-하이드록시-6a,8a-디메틸-4-옥소-2,4,6a,6b,7,8,8a,8b,11a,12,12a,12b-도데카하이드로-1H-나프토[2',1':4,5]인데노[1,2-d][1,3]디옥솔-10-일(벤질)페닐)카르바모일)-2,2-디메틸-4,12,15-트리옥소-3-옥사-5,11,14-트리아자노나데칸-19-오에이트(0.130 g, 0.096 mmol)의 용액을 브로모아세트산의 용액에 첨가하였다. 반응을 주위 온도에서 20분 동안 교반하였다. 아세토니트릴 및 수중 0.1% (v/v) 트리플루오로아세트산의 구배로 용출하는 분취 HPLC에 의한 정제는 표제 화합물(0.103 g, 73% 수율)을 수득하였다. LCMS (방법 AA17): Rt = 1.20분, m/z 1474.4, 1476.5 (M+H)⁺. ¹H NMR (디메틸실록사이드-*d*6, 400 MHz) δ 9.77 (s, 1H), 8.46 (d, J = 7.8 Hz, 1H), 7.94 (d, J = 7.8 Hz, 1H), 7.85 (d, J = 8.0 Hz, 1H), 7.41 (d, J = 8.3 Hz, 1H), 7.35 (s, 1H), 7.31 (d, J = 8.0 Hz, 2H), 7.22 (dd, J = 14.0, 9.0 Hz, 3H), 7.15 (t, J = 7.9 Hz, 1H), 6.88 (d, J = 7.5 Hz, 1H), 6.66 (s, 1H), 6.26 (dd, J = 10.2, 1.9 Hz, 1H), 6.09 (s, 1H), 5.58 (d, J = 51.4 Hz, 3H), 4.98 – 4.87 (m, 2H), 4.61 (dd, J = 18.0, 9.2 Hz, 1H), 4.33 (s, 1H), 4.17 (s, 1H), 3.93 – 3.86 (m, 2H), 3.85 (s, 2H), 3.63 (s, 10H), 2.87 – 2.79 (m, 2H), 2.28 – 2.16 (m, 4H), 2.04 (d, J = 13.2 Hz, 1H), 1.87 (s, 1H), 1.69 (s, 3H), 1.63 (d, J = 13.6 Hz, 2H), 1.46 (s, 3H), 1.39 (s, 9H), 1.38 (s, 9H), 1.33 (s,

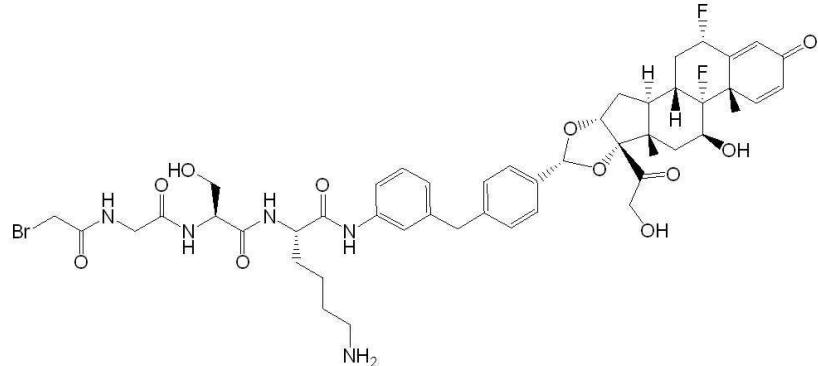
9H), 1.30 (s, 9H), 1.19 (d, J = 9.7 Hz, 1H), 1.02 (s, 9H), 0.85 (s, 3H).

[0421]

단계 9: (S)-5-(((S)-1-(((S)-6-아미노-1-((3-(4-((2S,6aS,6bR,7S,8aS,8bS,10R,11aR,12aS,12bS)-2,6b-디플루오로-7-하이드록시-6a,8a-디메틸-4-옥소-8b-(2-(포스포노옥시)아세틸)-2,4,6a,6b,7,8,8a,8b,11a,12,12a,12b-도데카하이드로-1H-나프토[2',1':4,5]인데노[1,2-d][1,3]디옥솔-10-일)벤질)페닐)아미노)-1-옥소헥산-2-일)아미노)-3-하이드록시-1-옥소프로판-2-일)아미노)-4-(2-브로모아세타미도)-5-옥소펜탄산의 합성. 트리플루오로아세트산(2 mL, 0.068 mmol)을 디클로로메탄(2 mL) 중 (10S,13S,16S)-*tert*-부틸 16-(2-브로모아세타미도)-13-(*tert*-부톡시메틸)-10-((3-(4-((2S,6aS,6bR,7S,8aS,8bS,10R,11aR,12aS,12bS)-8b-(2-(디-*tert*-부톡시포스포릴)옥시)아세틸)-2,6b-디플루오로-7-하이드록시-6a,8a-디메틸-4-옥소-2,4,6a,6b,7,8,8a,8b,11a,12,12a,12b-도데카하이드로-1H-나프토[2',1':4,5]인데노[1,2-d][1,3]디옥솔-10-일)벤질)카르바모일)-2,2-디메틸-4,12,15-트리옥소-3-옥사-5,11,14-트리아자노나데칸-19-오에이트(0.100 g, 0.068 mmol)의 0°C 용액에 첨가하였다. 반응을 0°C에서 10분 동안 교반하였으며, 이때, 얼음 배쓰를 얼음 배쓰를 제거하고, 교반을 주위 온도에서 부가적인 90분 동안 계속하였다. 아세토니트릴 및 수중 0.1% (v/v) 트리플루오로아세트산의 구배로 용출하는 분류 HPLC에 의한 정제는 표제 화합물(0.056 g, 72% 수율)을 수득하였다. LCMS (방법 AA17) 주 아세탈 이성질체: R_t = 0.75분, m/z 1149.7, 1151.8 ($M+H$)⁺; 부 아세탈 이성질체 R_t = 0.78분, m/z 1149.7, 1151.7 ($M+H$)⁺. 1H NMR (디메틸설폭사이드-*d*6, 500 MHz) δ 9.70 (s, 1H), 8.61 (d, J = 7.7 Hz, 1H), 8.13 (d, J = 7.2 Hz, 1H), 8.06 (d, J = 7.7 Hz, 1H), 7.81 (s, 3H), 7.51 (d, J = 8.3 Hz, 1H), 7.35 (d, J = 7.9 Hz, 2H), 7.23 (t, J = 8.7 Hz, 3H), 7.18 (t, J = 7.8 Hz, 1H), 7.13 (s, 1H), 6.97 (d, J = 7.6 Hz, 1H), 6.27 (dd, J = 10.1, 1.9 Hz, 1H), 6.11 (s, 1H), 5.77 - 5.53 (m, 1H), 5.43 (s, 1H), 4.92 (d, J = 4.7 Hz, 1H), 4.70 (dd, J = 19.0, 8.1 Hz, 1H), 4.53 (dd, J = 19.0, 7.9 Hz, 1H), 4.27 (q, J = 6.6 Hz, 3H), 4.19 (d, J = 9.6 Hz, 1H), 3.96 - 3.86 (m, 4H), 3.58 (qd, J = 10.9, 5.9 Hz, 2H), 2.77 - 2.52 (m, 3H), 2.68 - 2.54 (m, 0H), 2.49 (s, 2H), 2.23 (q, J = 8.3 Hz, 3H), 2.00 (d, J = 13.2 Hz, 1H), 1.93 - 1.85 (m, 2H), 1.77 - 1.69 (m, 1H), 1.72 - 1.65 (m, 3H), 1.57 (s, 1H), 1.49 (s, 4H), 1.54 - 1.44 (m, 2H), 1.30 (s, 2H), 0.88 (s, 3H).

[0422]

전구체 실시예 48: (S)-6-아미노-2-((S)-2-(2-(2-브로모아세타미도)아세타미도)-3-하이드록시프로판아미도)-N-(3-(4-((2S,6aS,6bR,7S,8aS,8bS,10R,11aR,12aS,12bS)-2,6b-디플루오로-7-하이드록시-8b-(2-하이드록시아세틸)-6a,8a-디메틸-4-옥소-2,4,6a,6b,7,8,8a,8b,11a,12,12a,12b-도데카하이드로-1H-나프토[2',1':4,5]인데노[1,2-d][1,3]디옥솔-10-일)벤질)페닐)헥산아미드



[0423]

[0424]

전구체 실시예 47과 유사한 경로를 사용하여 2-((2S,6aS,6bR,7S,8aS,8bS,10R,11aR,12aS,12bS)-10-(4-(3-아미노벤질)페닐)-2,6b-디플루오로-7-하이드록시-6a,8a-디메틸-4-옥소-1,2,4,6a,6b,7,8,8a,11a,12,12a,12b-도데카하이드로-8bH-나프토[2',1':4,5]인데노[1,2-d][1,3]디옥솔-8b-일)-2-옥소에틸 디하이드로겐 포스페이트를 사용하여 제조하였다.

[0425]

LCMS (방법 AA17) R_t = 0.79분, m/z 998.7, 1000.9 ($M+H$)⁺. 1H NMR (디메틸설폭사이드-*d*6, 500 MHz) δ 9.66 (s, 1H), 8.55 (t, J = 5.7 Hz, 1H), 8.16 (dd, J = 12.8, 7.7 Hz, 2H), 7.62 (s, 3H), 7.48 - 7.40 (m, 2H), 7.40 - 7.32 (m, 2H), 7.31 - 7.23 (m, 3H), 7.23 - 7.17 (m, 2H), 6.92 (d, J = 7.6 Hz, 1H), 6.54 (s, 1H), 6.30 (dd, J = 10.2, 1.9 Hz, 1H), 6.13 (s, 1H), 5.66 (dt, J = 48.7, 10.2 Hz, 1H), 5.54 (dd, J = 4.5, 1.7 Hz, 1H), 5.45 (s, 1H), 5.21 (s, 1H), 5.13 (s, 1H), 4.95 (d, J = 4.8 Hz, 1H), 4.51 (d, J = 19.4 Hz, 1H), 4.36 (td, J = 12.8, 7.2 Hz, 2H), 4.20 (d, J = 19.2 Hz, 1H), 3.92 (d, J = 1.7 Hz, 2H), 3.89 (d, J = 2.4 Hz, 2H), 3.82 (qd, J = 16.7, 5.7 Hz, 2H), 3.65 (t, J = 8.2 Hz, 1H), 3.58 (dd, J = 10.5, 5.9 Hz,

1H), 2.78 (q, J = 6.7 Hz, 2H), 2.73 – 2.58 (m, 1H), 2.35 – 2.28 (m, 1H), 2.24 (td, J = 12.3, 6.8 Hz, 1H), 2.04 (d, J = 13.3 Hz, 1H), 1.85 – 1.50 (m, 4H), 1.50 (s, 3H), 1.36 (dq, J = 16.0, 8.3 Hz, 2H), 0.87 (s, 3H).

[0426] ADC 실시예 1. 말레이미드-유래 생성물과의 공액(일반적인 방법)

1. 말레이미드와의 시스테인 공액 프로토콜

대략 10 mg/mL 항체 용액을 포스페이트 완충제 식염수(PBS), pH 7.4, 뿐만 아니라 PBS(Pierce Bond-Breaker, cat. 77720) 중 10 mM TCEP(트리스(2-카르복시에틸)포스핀) 용액에서 제조하였다. 그 후에, 항-CD40 항체(표 3)를, 대략 2 몰 당량(eq)의 10 mM TCEP를 첨가하고, 간략하게 혼합하고, 37°C에서 60분 동안 인큐베이션함으로써 부분적으로 환원시켰다. 그 후에, 디메틸 셀록사이드(DMSO)를 부분적으로 환원된 항체에 15% 총 DMSO까지의 충분한 양으로 첨가하였다. 그 후에, 공액을 위해, 8 몰 당량(eq)의 실시예 6 내지 13의 말레이미드 생성물(PBS 중 10 mM)을 첨가하고, 부분적으로 환원된 항체와 함께 실온에서 30분 동안 인큐베이션하였다. 그 후에, 과량의 말레이미드 생성물 및 DMSO를, 이전에 포스페이트 완충제 식염수 완충제, pH 7.4로 평형화된 NAP-5 탈염 컬럼(GE Healthcare, cat. 17-0853-02)을 사용하여 제거하였다. 그 후에, 탈염된 시료를 크기 배제 크로마토그래피(SEC), 소수성 상호작용 크로마토그래피(HIC), 및 환원 질량 분광광도법에 의해 분석하였다.

2. 티오숙신이미드 가수분해

ADC를 상승된 pH에서 인큐베이션함으로써, ADC의 티오숙신이미드 고리의 가수분해를 달성하였다. 간략하게는, 0.7 M 아르기닌, pH 9.0 용액을 제조하고, 포스페이트 완충제 식염수(PBS) 완충제 중 각각의 ADC에 첨가하여, 총 아르기닌 농도를 50 mM(pH 약 8.9)까지 되게 하였다. 그 후에, 물질을 25°C에서 72시간 동안 인큐베이션하였다. 그 후에, 숙신이미드 고리의 가수분해를 환원 질량 분광광도법에 의해 확증하였으며, 이후에, 0.1 M 아세트산 용액을 12.5 mM 총 아세트산(pH 약 7.1)까지 첨가하여 가수분해를 켄치하였다.

표 11은 이러한 일반적인 방법(예시적인 수의 ADC 공액체에 대해 제공된 응집 데이터)에 따라 합성된 ADC 공액체를 제공한다. 표 12는 이러한 일반적인 방법에 따라 합성될 수 있는 ADC 공액체를 제공한다. 변수 (A)는 항-CD40 항체에 상응한다; n = 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 또는 10이다. 인간 항-CD40 항체는 Ab102에 상응한다(표 3). 마우스 항-CD40 항체는 참조에 의해 본 명세서에 포함된 US 20160347850호에 기술된 항체 138에 상응한다. P = 전구체 실시예. 항체 138은 Ab102와 유사한 특징을 가지며, 예를 들어, 항체 138은 Ab102와 같은 실질적인 효능제 활성을 갖지 않는 길항체 항체이다. 따라서, 항체 138은 마우스 모델에서 Ab102 활성을 대표한다.

[0432]

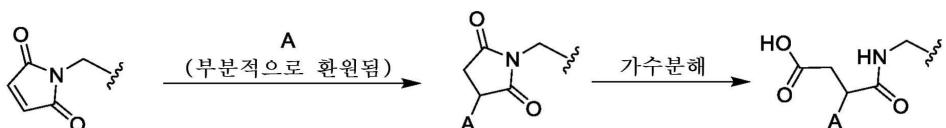
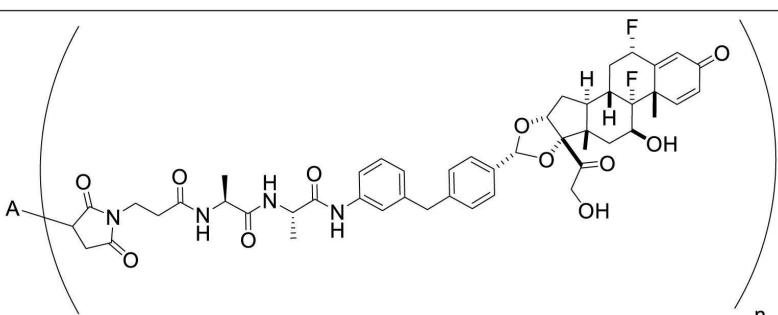
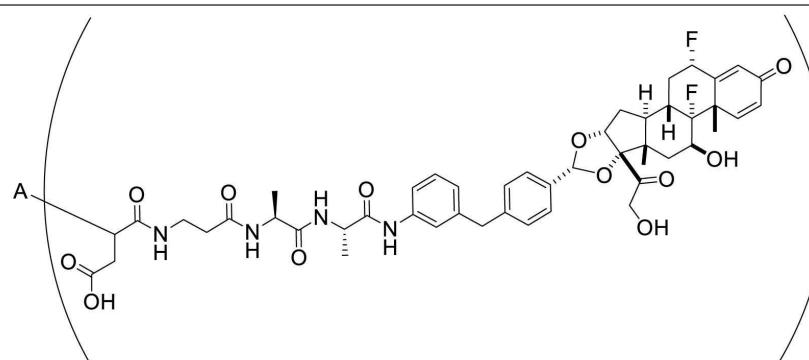
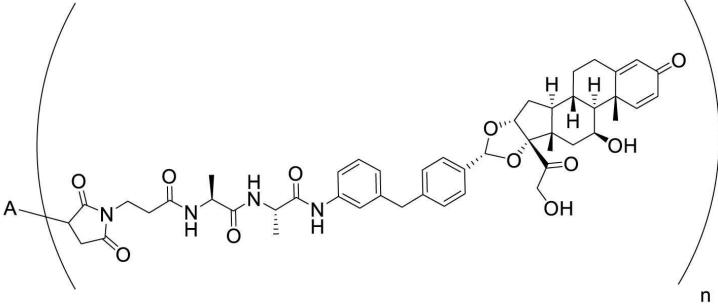
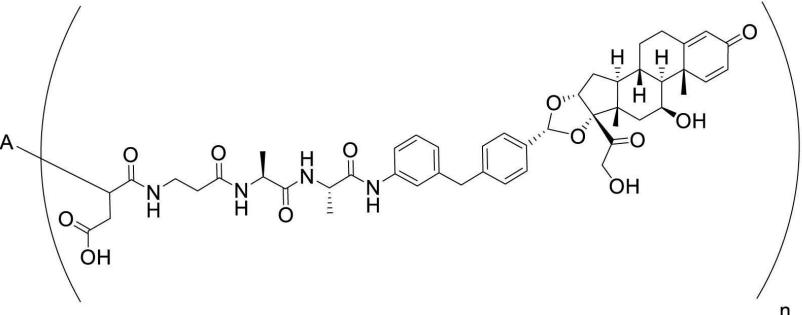
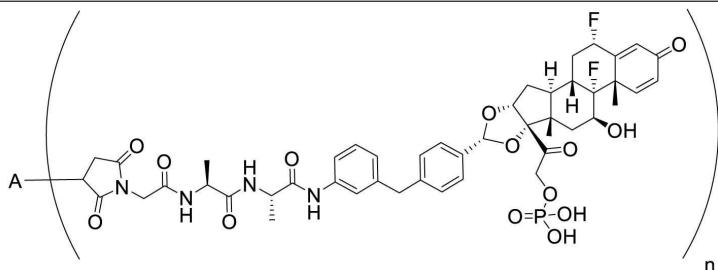


표 11. 합성된 말레이미드-유래 ADC

P	ADC 생성물	n
6	 <p>실시 예 6 - 공액 (마우스)</p>	4
6	 <p>실시 예 6 - 가수분해 (마우스)</p> <p>-응집 (%) = 0.6</p>	4

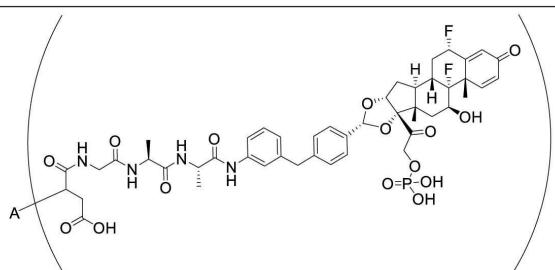
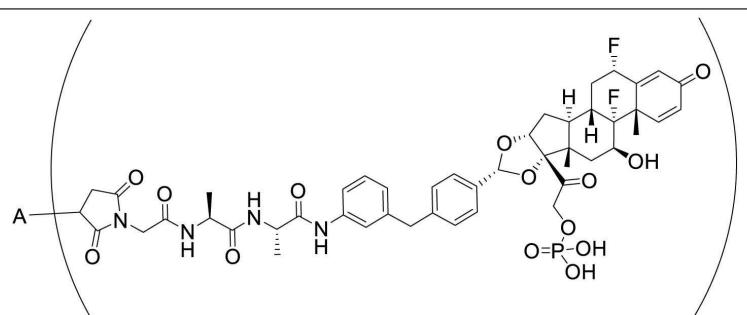
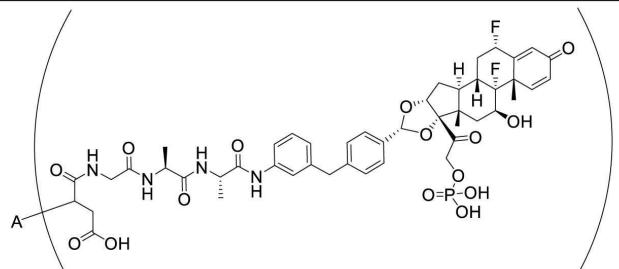
[0433]

표 11. 합성된 말레이미드-유래 ADC

P	ADC 생성물	n
7	 <p>실시 예 7 - 공액(마우스)</p>	4
7	 <p>실시 예 7 - 가수분해(마우스) 응집(%) = 0</p>	4
12	 <p>실시 예 12 - 공액(마우스)</p>	2

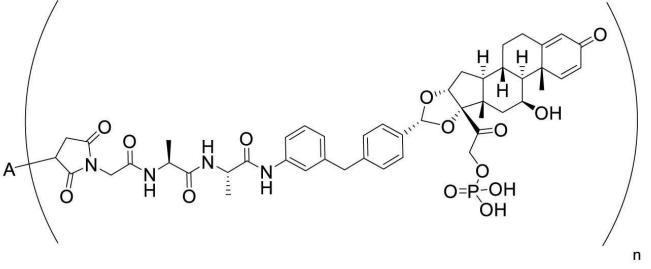
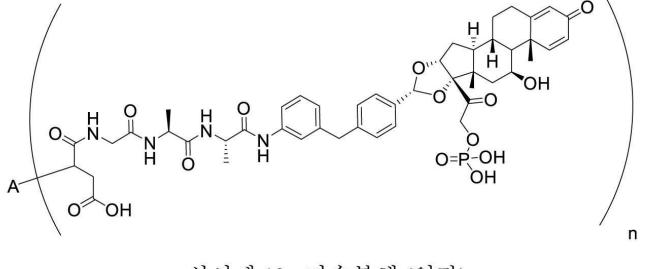
[0434]

표 11. 합성된 말레이미드-유래 ADC

P	ADC 생성물	n
12	 <p>실시예 12 - 가수분해 (마우스) $n = 2, \frac{\text{총}}{\text{단백}} (\%) = 1.5; n = 4, \frac{\text{총}}{\text{단백}} (\%) = 0$</p>	2 4
12	 <p>실시예 12 - 공액 (인간)</p>	4
12	 <p>실시예 12 - 가수분해 (인간)</p>	4

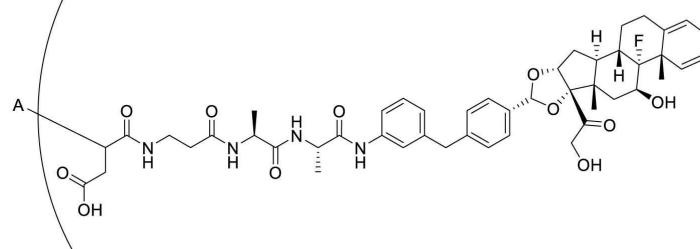
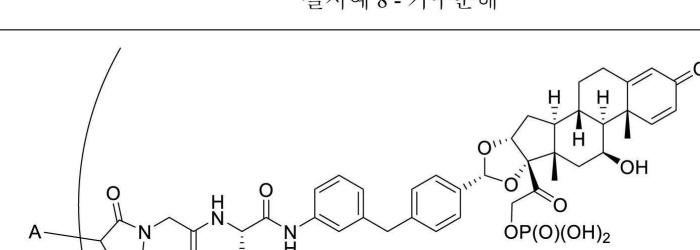
[0435]

표 11. 합성된 말레이미드-유래 ADC

P	ADC 생성물	n
13	 <p style="text-align: center;">실시 예 13 - 공액 (인간)</p>	4
13	 <p style="text-align: center;">실시 예 13 - 가수분해 (인간)</p>	4

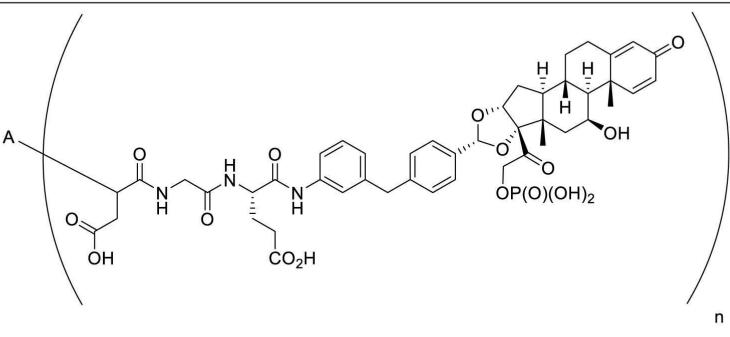
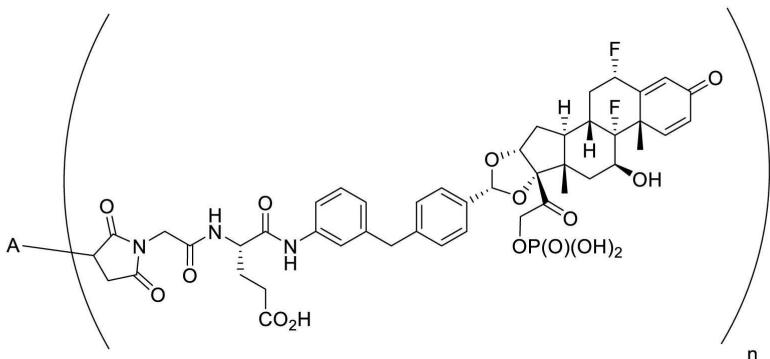
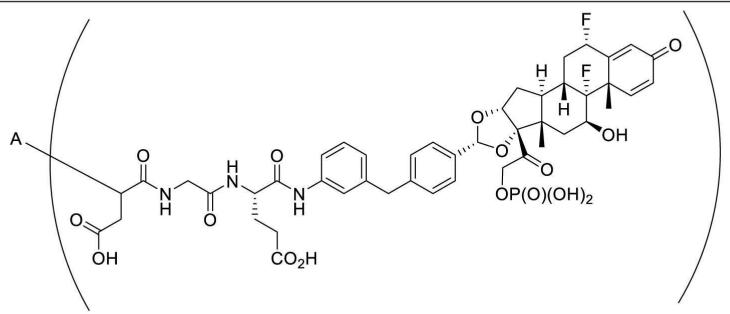
[0436]

표 12. 부가적인 말레이미드-유래 ADC

P	ADC 생성물
8	 <p style="text-align: center;">실시 예 8 - 콩액</p>
8	 <p style="text-align: center;">실시 예 8 - 가수분해</p>
9	 <p style="text-align: center;">실시 예 9 - 콩액</p>

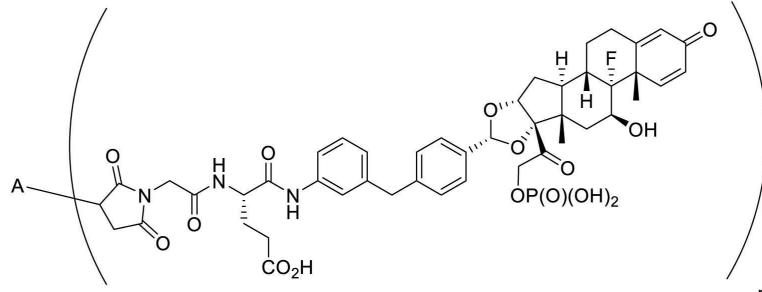
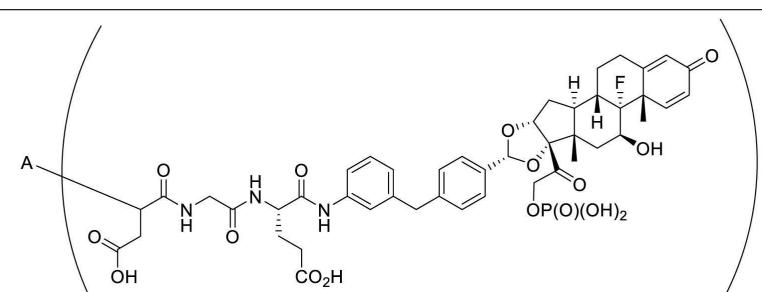
[0437]

표 12. 부가적인 말레이미드-유래 ADC

P	ADC 생성물
9	 <p>실시 예 9 - 가수분해</p>
10	 <p>실시 예 10 - 공액</p>
10	 <p>실시 예 10 - 가수분해</p>

[0438]

표 12. 부가적인 말레이이미드-유래 ADC

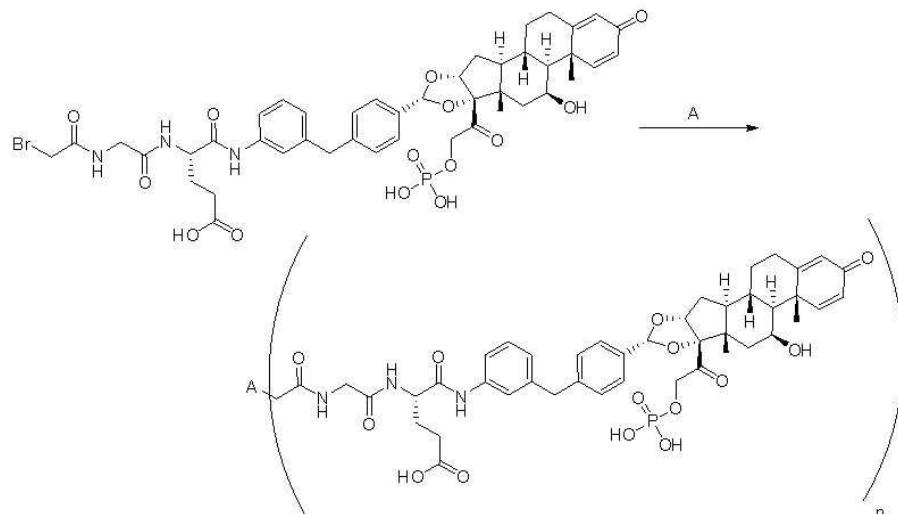
P	ADC 생성물
11	 <p style="text-align: center;">실시 예 11 - 공액</p>
11 [0439]	 <p style="text-align: center;">실시 예 11 - 가수분해</p>

[0440] ADC 실시예 2. 전구체 브로모 아세타미드 생성물과의 공액(일반적인 방법)

[0441] 1. 일반적인 절차

대략 5-20 mg/mL의 요망되는 항체 용액을 포스페이트 완충제 식염수(PBS), pH 6 ~ 7.4에서 제조하였다. 선택 환원제, 예컨대 TCEP(트리스(2-카르복시에틸)포스핀)를 H₂O, 디메틸 셀록사이드(DMSO), 디메틸 아세타미드(DMA) 또는 디메틸 포름아미드(DMF)와 같은 용매에 희석시키거나 용해시켜, 1 내지 25 mM의 농도 범위를 갖는 용액을 제공하였다. 그 후에, 2-3.5 eq의 환원제를 첨가하고, 간략하게 혼합하고, 0 내지 4°C에서 밤새 인큐베이션함으로써 항-CD40 항체를 부분적으로 환원시켰다. 그 후에, Tris 완충제, pH 8-8.5(20-50 mM) 및 뒤이어 디메틸 셀록사이드(DMSO) 또는 디메틸 아세타미드(DMA)(총 15% 미만) 중 실시예 4 내지 5의 브로모 아세타미드 생성물을 첨가하고, 혼합물을 실온에서 2 내지 3시간 동안 인큐ベ이션하였다. 그 후에, 과량의 브로모 아세타미드 생성물 및 유기 용매를 정제에 의해 제거하였다. 그 후에, 정제된 ADC 시료를 크기 배제 크로마토그래피(SEC), 소수성 상호작용 크로마토그래피(HIC) 및 환원 질량 분광광도법에 의해 분석하였다.

[0443] 2. 전구체 실시예 4의 인간 ADC의 제조



[0444]

[0445]

20 mg/mL 농도의 100 mg의 인간 항-CD40 항체(Ab102, 표 3)를 디페닐포스피노아세트산(2.9 내지 3.0 당량(eq))으로 0°C에서 밤새 환원시켰다. 그 후에, 부분적으로-환원된 CD40 Ab를 실온에서 3시간 동안 디메틸 셀록사이드(DMSO) 중 실시예 4 브로모 아세타미드 생성물(10 당량(eq))에 공액시켰다. 공액 혼합물을 우선, 다수의 NAP 25 탈염 컬럼을 사용하여 20 mM Tris 완충제, 50 mM NaCl, pH 7.8 내로 완충제 교환하였다. 탈염된 ADC 용액을 AEC에 의해 정제하여, ADC의 DAR2($n = 2$) 및 DAR4($n = 4$) 구성성분을 수득하였다(약물 연결된 분자의 수는 환원된 사슬간 이황화 결합의 수에 따라 다름).

[0446]

AEC 조건

[0447]

사용된 AEC 조건은 하기와 같았다: 컬럼은 PropacTM WAX-10, 4 X 250 mm(Thermo Fisher Scientific, cat. 054999)이었고, 컬럼 온도는 37°C였다. 파장은 280 nm였으며, 진행 시간은 18분이었으며, 주입량은 20 μg이었고, 유속은 1.0 mL/분이었다. 이동상 A: 20 mM MES, pH 6.7, 이동상 B: 20 mM MES, 500 mM NaCl, pH 6.7. DAR2 ADC는 0% 응집과 더불어 7.70분의 체류 시간을 가졌고, DAR4는 0%의 응집과 더불어 10.88분의 체류 시간을 가졌다.

표 13a. 구배 프로파일

시간(분)	이동상 A (%)	이동상 B (%)
0	100	0
16	0	100
18	0	100
18.1	0	10

[0448]

질량 분광법

[0449]

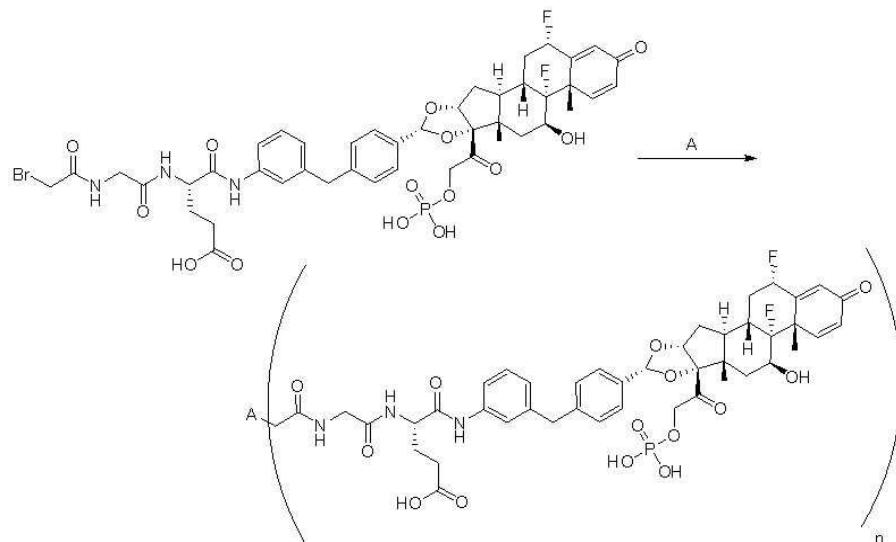
ADC 시료를 MS 분석 전에 완전히 환원시켰다. 사용된 질량 분광광도법 조건은 하기와 같다: HPLC 컬럼 = Water BEH300 C4, 2.1x50 mm, 3.5 미크론 입자 크기; 이동상 A: 수중 0.1% 포름산; 이동상 B: 아세토니트릴 중 0.1% 포름산; 유속: 450 μL/분; 구배: 0~0.6분, 5% B, 0.6 내지 1.1분 5~90% B, 1.1 내지 2.2분 90% B, 2.2 내지 2.4분, 90~5% B, 2.4 내지 3.5분 5% B; 컬럼 온도: 40°C; MS 이온화 공급원(ionization source): ESI

[0450]

실시예 4-공액(인간)의 디콘볼루션된 질량 분광법 데이터는 도 1a에 도시되어 있다($n = 4$). 25140.73 피크는 하나의 약물 링커 분자가 공액된 경쇄(SEQ ID NO: 2)에 상응한다. 50917.59 피크는 하나의 약물 링커 분자가 공액된 중쇄(SEQ ID NO: 1)에 상응한다.

[0452]

3. 전구체 실시예 28의 마우스 ADC 및 인간 ADC의 제조



[0453]

[0454]

마우스 ADC

[0455]

실시예 28 - 공액(마우스) ADC를 실시예 4 ADC에 따라 마우스 항-CD40 항체(항체 138)를 사용하여 합성하였다. DAR2 ADC는 0% 응집과 더불어 7.17분의 체류 시간을 가졌고, DAR4는 0%의 응집과 더불어 10.50분의 체류 시간을 가졌다.

[0456]

인간 ADC

[0457]

약 20 mg/mL 농도의 410 mg의 인간 항-CD40 항체(Ab102, 표 3)를 약 4°C에서 밤새 디페닐포스피노아세트산(2.7 eq)으로 환원시켰다. 2% (v/v)의 2 M Tris 완충제(pH 8.5)를 부분적으로-환원된 항체에 첨가하고, 디메틸셀록사이드 중 10 eq의 전구체 실시예 28 생성물을 첨가하였다. 실온에서 3시간 동안 공액 후, 혼합물을 NAP25 탈염 컬럼을 사용하여 20 mM Tris, 50 mM NaCl, pH 8.0 내로 완충제 교환하고, AEC에 의해 추가로 정제하여, ADC의 DAR2(n = 2) 및 DAR4(n = 4) 구성성분을 수득하였다(약물 연결된 분자의 수는 환원된 사슬간 이황화 결합의 수에 따라 다름). 장비: AKTA 순수; 컬럼: 4X Hitrap Q HP 5 mL; 이동상: 20 mM Tris 완충제, pH 8.0에 대해 A; 20 mM Tris 완충제, 500 mM NaCl, pH 8.0에 대해 B; 구배: 45 CV에 걸쳐 10%로부터 40%까지 B; 유속: 5 mL/분; 과장: 280 & 260 nm.

[0458]

AEC 조건

[0459]

ProPacTM SAX-10, 4 x 250 mm, 10 μm (Thermo Fisher Scientific, Cat # 054997), 실온에서; 과장 = 280 nm; 진행 시간 = 20분; 주입량 = 약 20 μg; 유속 = 1.0 mL/분; 이동상 A: 20 mM Tris, pH 8.0; 이동상 B: 20 mM Tris, 1 M NaCl, pH 8.0.

표 13b. 구배 프로파일

시간(분)	이동상 A (%)	이동상 B (%)
0	100	0
16.0	50	50
16.1	0	100
18.0	0	100
18.1	100	0
20.0	100	0

[0460]

실시예 28-공액(인간)의 AEC 데이터는 도 1b(n = 2) 및 도 1d(n = 4)에 도시되고, 이때, 각각 0% 응집과 더불어 약 7.5분 및 0% 응집과 더불어 약 13분의 체류 시간을 가졌다.

[0461]

질량 분광법

[0463]

ADC 시료를 MS 분석 전에 완전히 환원시켰다. 사용된 질량 분광광도법 조건은 하기와 같다: HPLC 컬럼 = Water

BEH300 C4, 2.1x50 mm, 3.5 미크론 입자 크기; 이동상 A: 수중 0.1% 포름산; 이동상 B: 아세토니트릴 중 0.1% 포름산; 유속: 450 $\mu\text{L}/\text{분}$; 구배: 0~0.6분, 5% B, 0.6 내지 1.1분 5~90% B, 1.1 내지 2.2분 90% B, 2.2 내지 2.4분, 90~5% B, 2.4 내지 3.5분 5% B; 컬럼 온도: 40°C; MS 이온화 공급원: ESI.

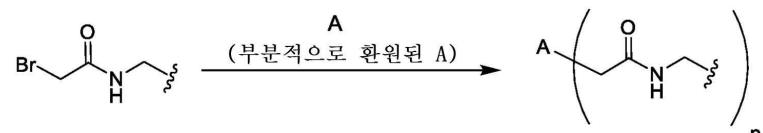
[0464] 실시예 28-공액(인간)의 디콘볼루션된 질량 분광법 데이터는 도 1c($n = 2$) 및 도 1e($n = 4$)에 도시되어 있다.

[0465] 도 1c($n = 2$)에 대해, 25176.72 피크는 하나의 약물 링커 분자가 공액된 경쇄(SEQ ID NO: 2)에 상응한다. 50954.63 피크는 하나의 약물 링커 분자가 공액된 중쇄(SEQ ID NO: 1)에 상응한다.

[0466] 도 1e($n = 4$)에 대해, 25176.88 피크는 하나의 약물 링커 분자가 공액된 경쇄(SEQ ID NO: 2)에 상응한다. 50954.80 피크는 하나의 약물 링커 분자가 공액된 중쇄(SEQ ID NO: 1)에 상응한다.

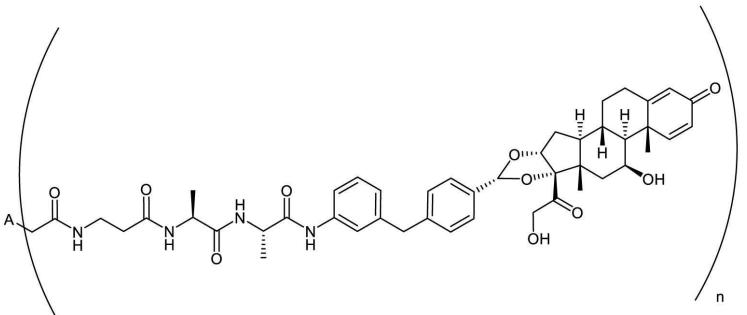
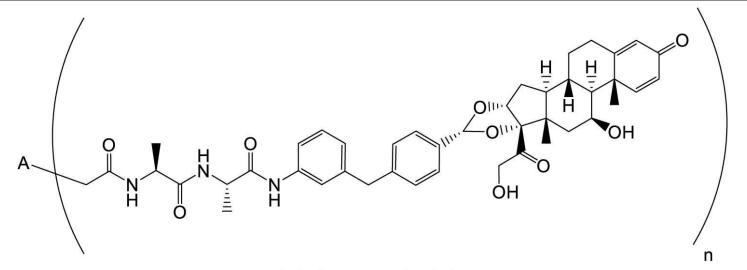
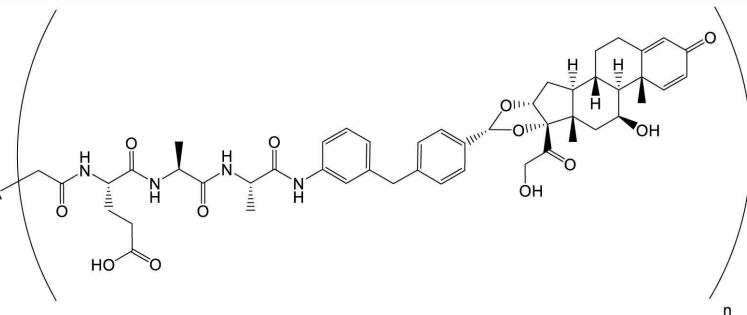
4. 일반적인 절차 실시예 4 및 28 ADC에 따른 ADC의 제조

표 14a는 ADC 공액체 집단의 분획으로부터 시험된 이러한 일반적인 방법에 따라 합성된 ADC 공액체를 제공한다 (제공된 DAR 값; ADC의 혼합물, 예를 들어, $n = 2, 4$, 및/또는 6의 혼합물을 포함하는 집단; 응집 데이터가 또한 제공됨). 표 14b는 상기 일반적인 방법에 따라 전구체 실시예 14A의 브로모 아세타미드 생성물 및 표 10에 열거된 다양한 전구체로부터 합성될 수 있는 ADC 공액체를 제공한다. 변수 (A)는 항-CD40 항체(인간 또는 마우스)에 상응하며; $n = 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9$ 또는 10이다. 인간 항-CD40 항체는 Ab102에 상응한다(표 3). 마우스 항-CD40 항체는 참조에 의해 본 명세서에 포함된 US 20160347850호에 기술된 항체 138에 상응한다. P = 전구체 실시예. 항체 138은 Ab102와 유사한 특징을 가지며, 예를 들어, 항체 138은 Ab102와 같은 실질적인 효능 제 활성을 갖지 않는 길항제 항체이다. 따라서, 항체 138은 마우스 모델에서 Ab102 활성을 대표한다.



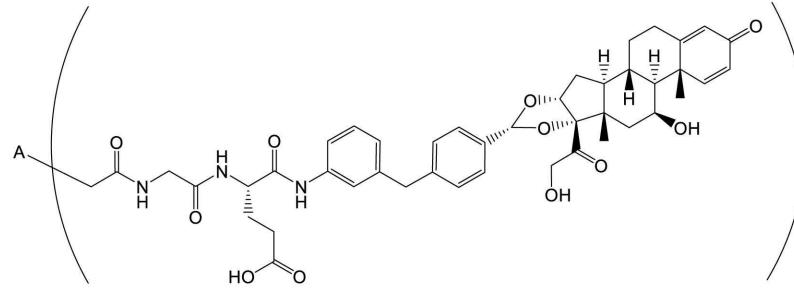
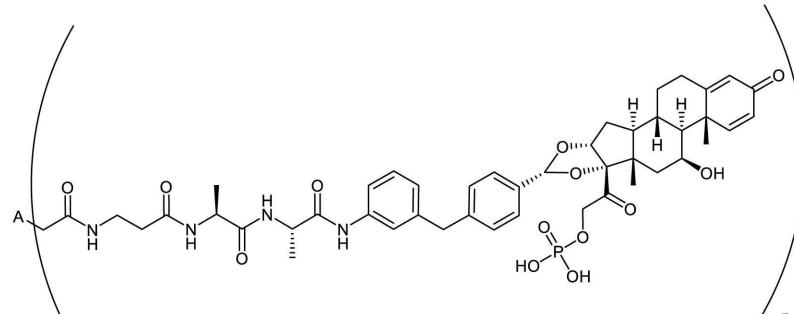
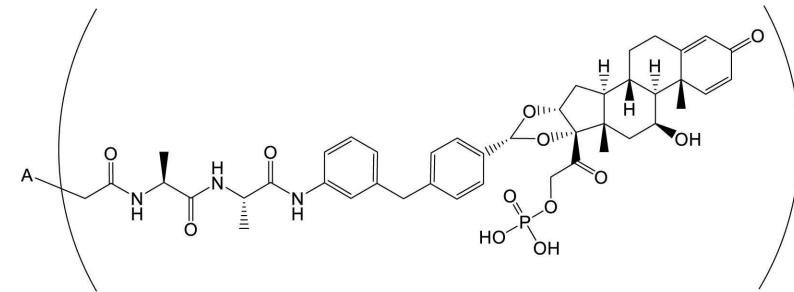
[0469]

표 14a. 합성된 브로모아세타미드 ADC

		DAR
14B	 <p>실시 예 14B - 공액 (마우스) 응집 (%) = < 1</p>	3.35
15	 <p>실시 예 15 - 공액 (마우스) 응집 (%) = < 1</p>	3.72
16	 <p>실시 예 16 - 공액 (마우스) 응집 (%) = < 1</p>	3.39

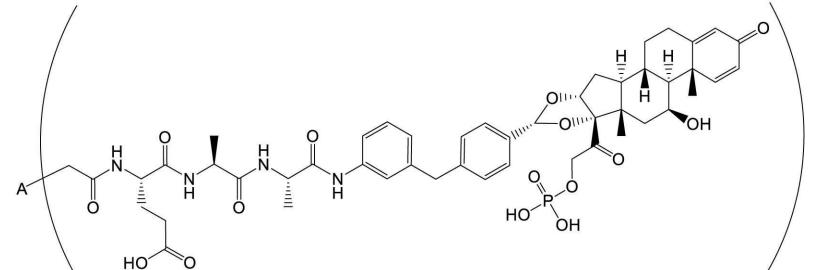
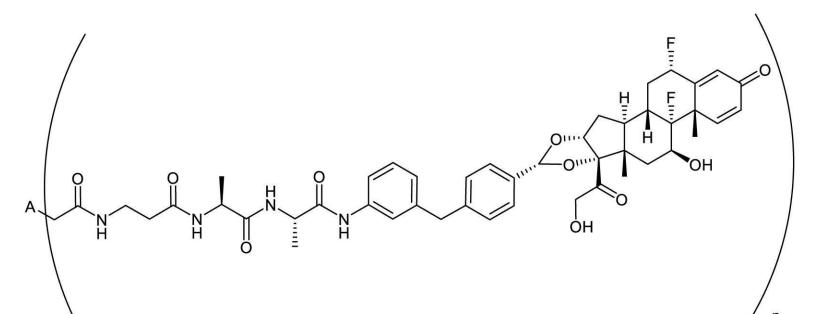
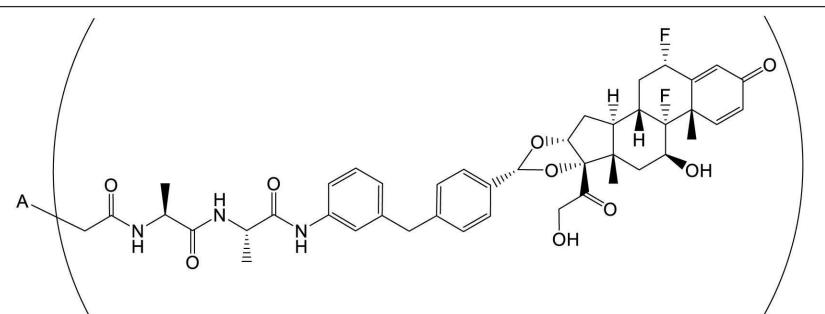
[0470]

표 14a. 합성된 브로모아세타미드 ADC

	DAR
17	3.19
 <p>실시 예 17 - 공액 (마우스) 응집 (%) = < 1</p>	
18B	3.65
 <p>실시 예 18B - 공액 (마우스) 응집 (%) = < 1</p>	
19	3.44
 <p>실시 예 19 - 공액 (마우스) 응집 (%) = < 1</p>	

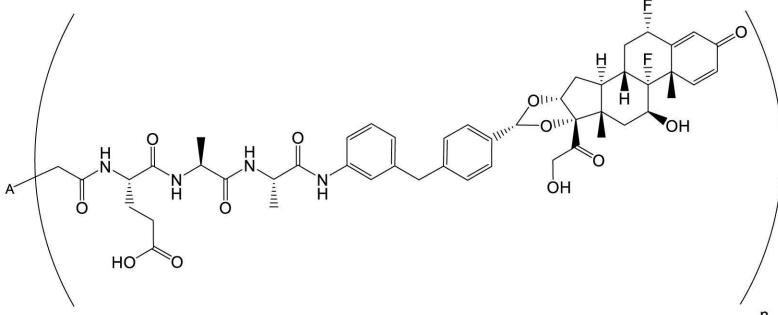
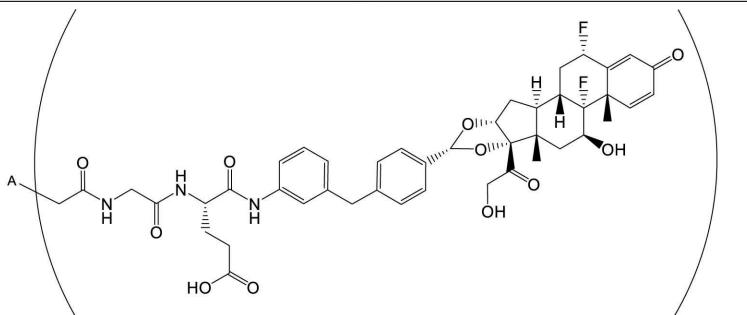
[0471]

표 14a. 합성된 브로모아세타미드 ADC

	DAR	
20	 <p>실시예 20 - 공액 (마우스) 응집 (%) = < 1</p>	3.23
21B	 <p>실시예 21B - 공액 (마우스) 응집 (%) = < 1</p>	3.59
22	 <p>실시예 22 - 공액 (마우스) 응집 (%) = < 1</p>	3.50

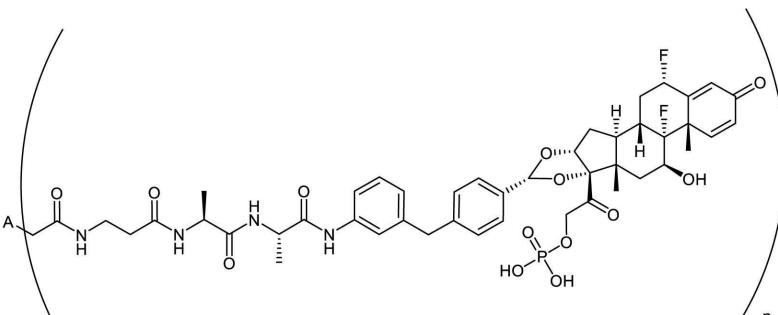
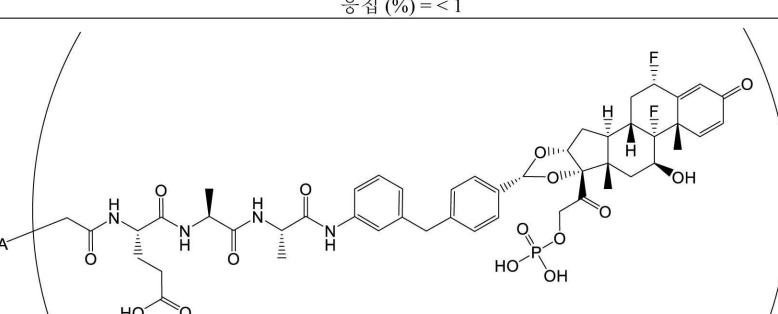
[0472]

표 14a. 합성된 브로모아세타미드 ADC

		DAR
23	 <p>실시 예 23 - 공액 (마우스) 용·집 (%) = < 1</p>	3.56
24	 <p>실시 예 24 - 공액 (마우스) 용·집 (%) = < 1</p>	3.59

[0473]

표 14a. 합성된 브로모아세타미드 ADC

		DAR
25B	 <p>실시 예 25B - 공액 (마우스) 용·집 (%) = < 1</p>	3.31
27	 <p>실시 예 27 - 공액 (마우스) 용·집 (%) = < 1</p>	3.10

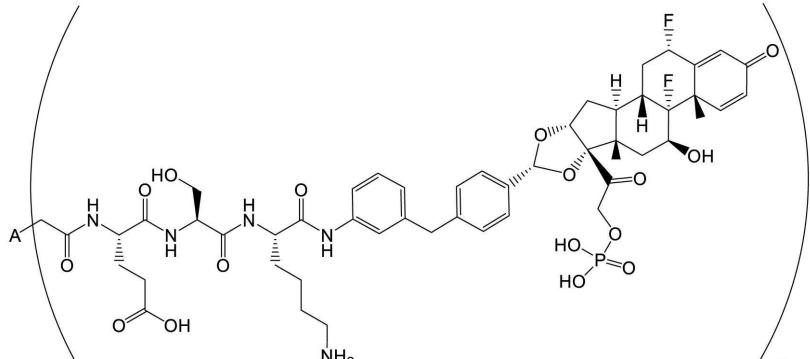
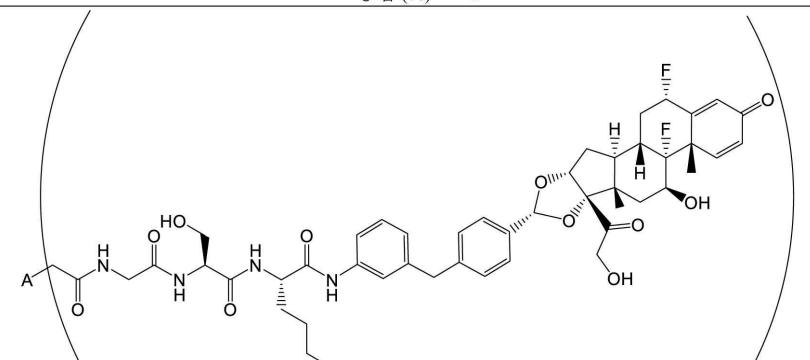
[0474]

표 14a. 합성된 브로모아세타미드 ADC

		DAR
36	<p>실시 예 36 - 공액 (마우스) 옹집 (%) = < 1</p>	3.62
37	<p>실시 예 37 - 공액 (마우스) 옹집 (%) = < 1</p>	3.44
38	<p>실시 예 38 - 공액 (마우스) 옹집 (%) = < 1</p>	3.45

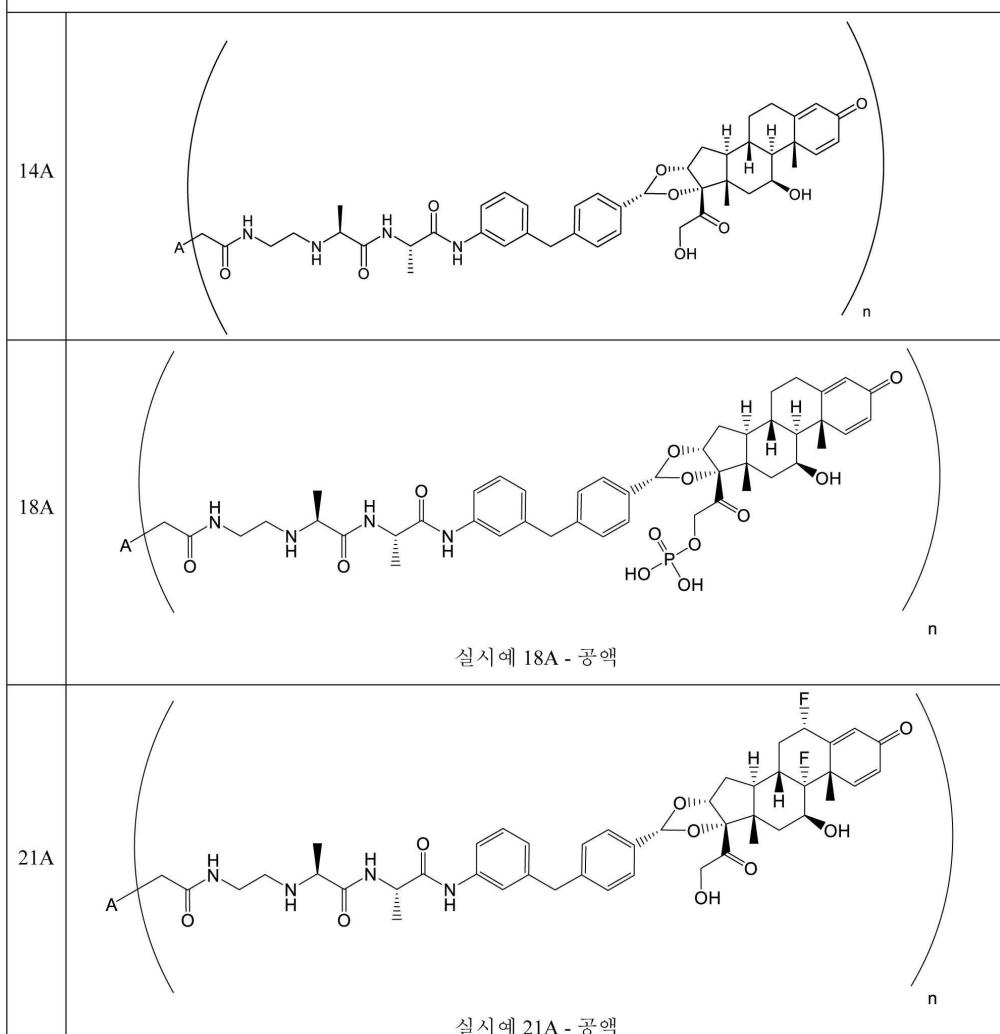
[0475]

표 14a. 합성된 브로모아세타미드 ADC

	DAR
47	3.47
 <p>실시 예 47 - 공액 (마우스) 용-집 (%) = < 1</p>	
48	2.12
 <p>실시 예 48 - 공액 (마우스) 용-집 (%) = 1.7</p>	

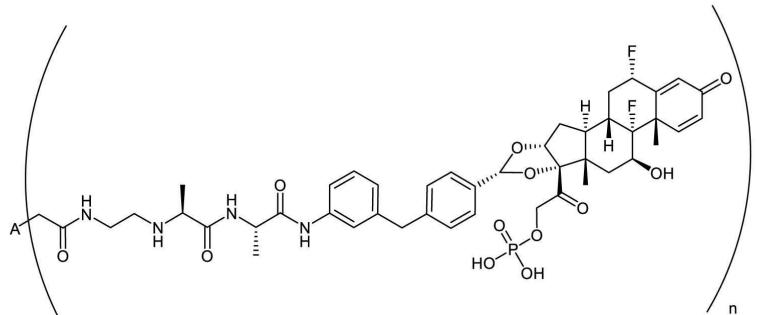
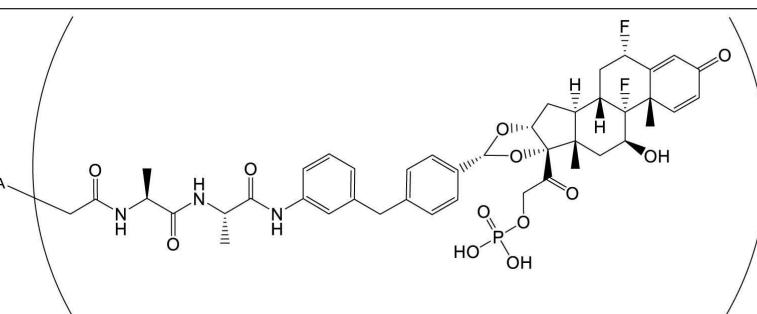
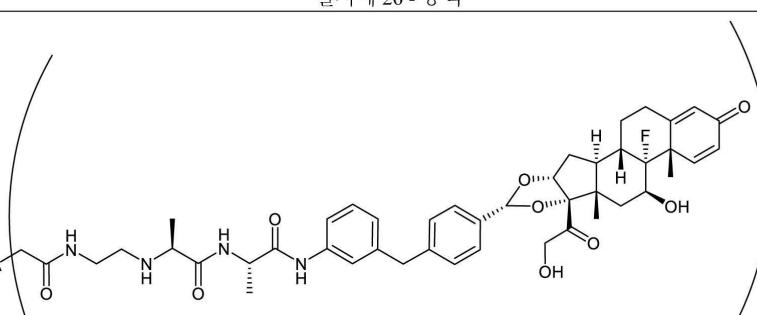
[0476]

표 14b. 부가적인 브로모아세타미드 ADC



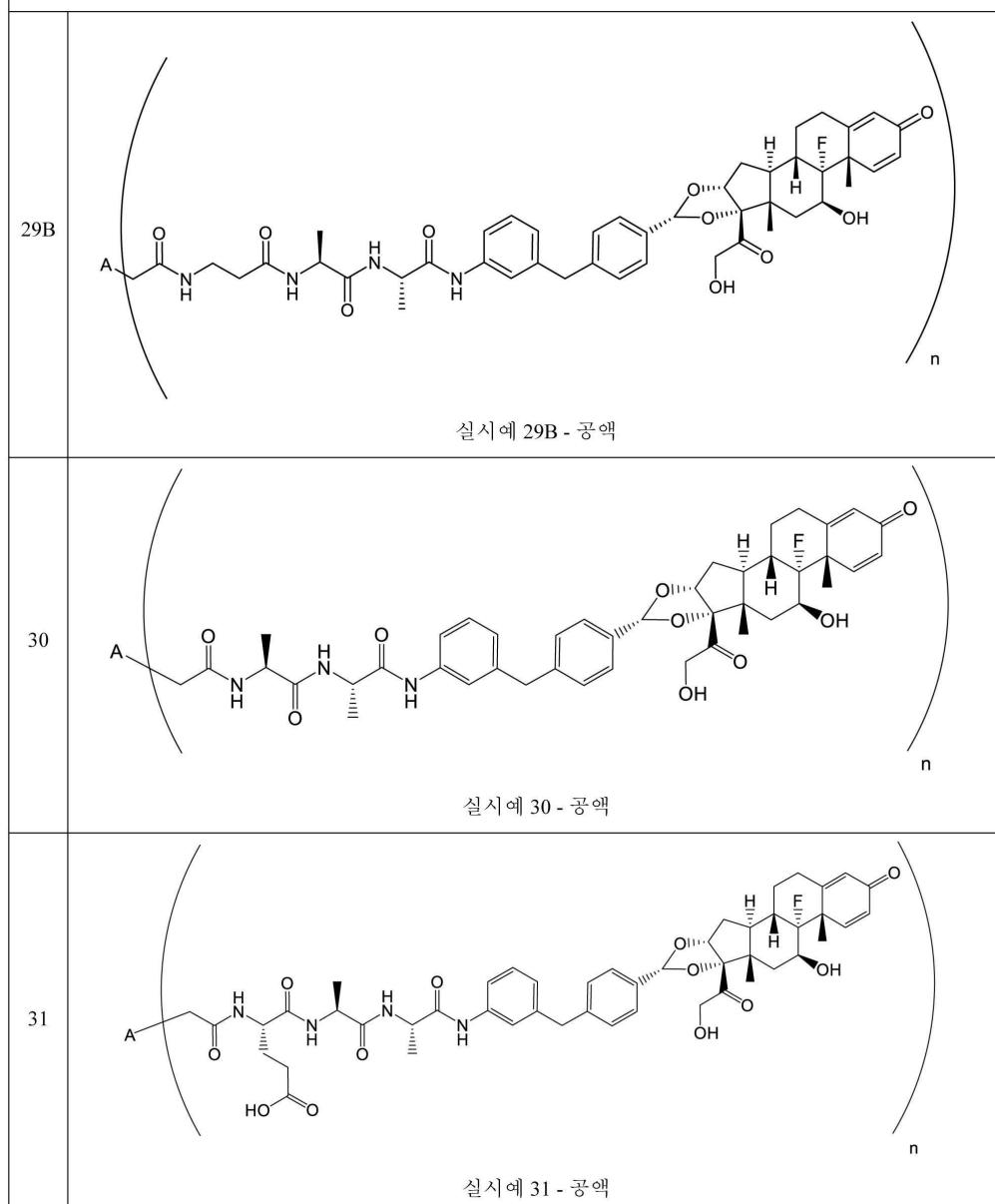
[0477]

표 14b. 부가적인 브로모아세타미드 ADC

25A		실시예 25A - 공액
26		실시예 26 - 공액
29A		실시예 29A - 공액

[0478]

표 14b. 부가적인 브로모아세타미드 ADC



[0479]

표 14b. 부가적인 브로모아세타미드 ADC

32	<p style="text-align: center;">실시 예 32 - 공액</p>
33A	<p style="text-align: center;">실시 예 33A - 공액</p>
33B	<p style="text-align: center;">실시 예 33B - 공액</p>

[0480]

표 14b. 부가적인 브로모아세타미드 ADC

34	<p>설시예 34 - 공액</p>
35	<p>설시예 35 - 공액</p>
39	<p>설시예 39 - 공액</p>

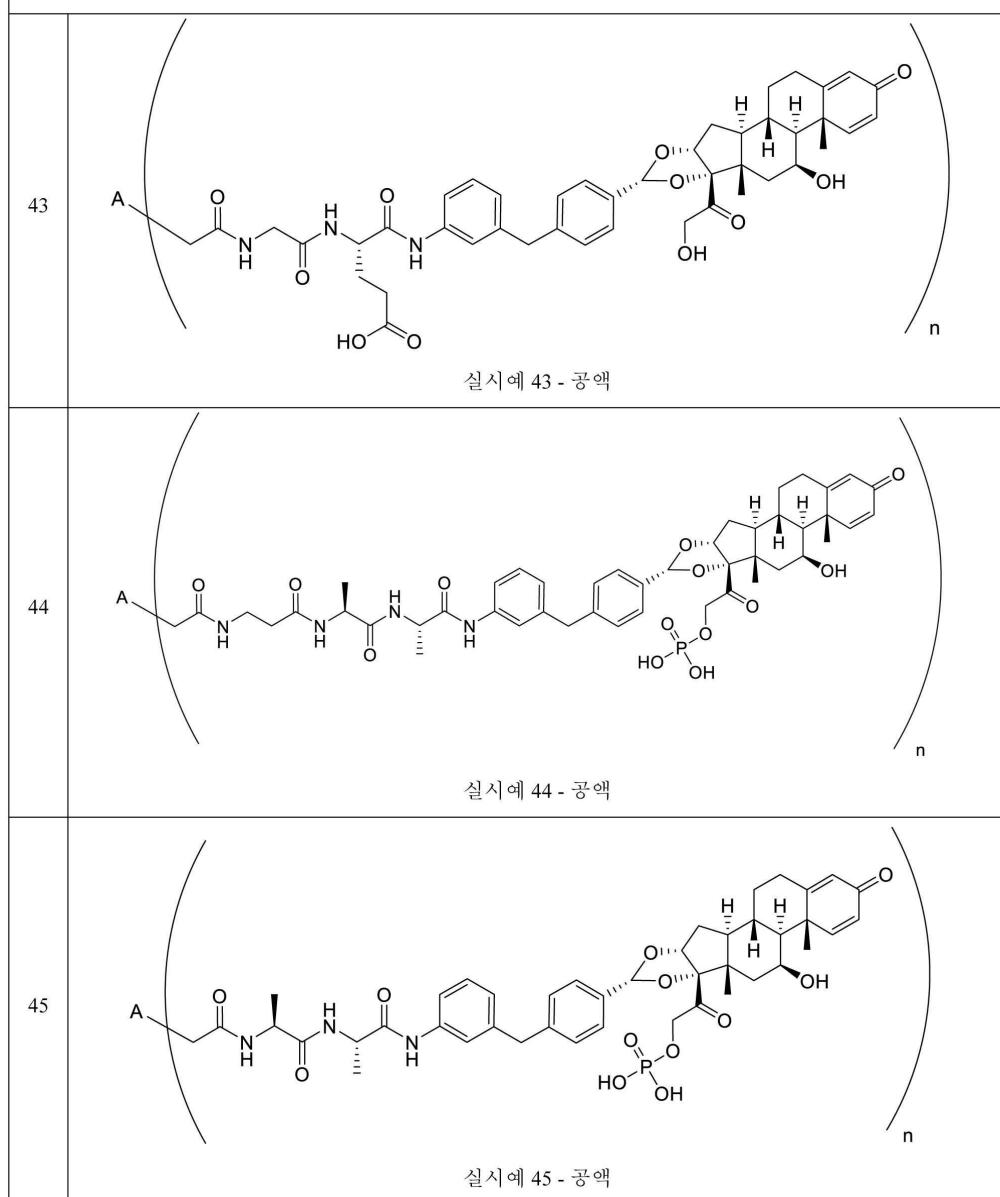
[0481]

표 14b. 부가적인 브로모아세타미드 ADC

40	<p>실시 예 40 - 공액</p>
41	<p>실시 예 41 - 공액</p>
42	<p>실시 예 42 - 공액</p>

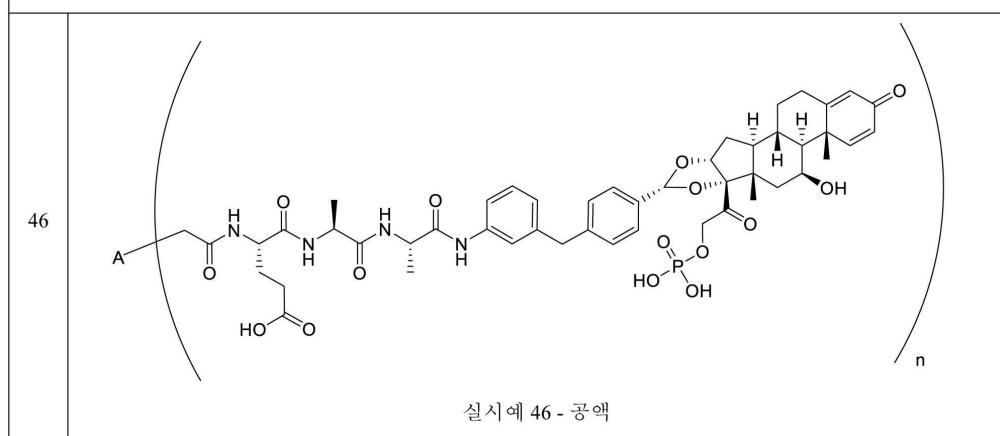
[0482]

표 14b. 부가적인 브로모아세타미드 ADC



[0483]

표 14b. 부가적인 브로모아세타미드 ADC



[0484]

[0485]

생물학적 검정법

표 15. 약어

MEM	최소 필수 배지	CS FBS	챠콜 스트리핑된 소 태아 혈청
NEAA	비-필수 아미노산	FBS	소 태아 혈청
RPMI	Roswell Park Memorial Institute	DBP	디부틸 프탈레이트
DTT	디티오트레이톨	HEPES	4-(2-하이드록시에틸)-1-피페라진에탄설푼산
GM-CSF	과립구-대식세포 콜로니-자극 인자	CFA	완전 프로인트 보조제(Complete Freund's Adjuvant)
P1NP	프로콜라겐 유형 1 아미노-말단 프로펩타이드	ACTH	부신피질자극 호르몬
DBP	디부틸 프탈레이트	DTT	디티오트레이톨

[0486]

실시예 A. 인간 및 마우스 CD40 GRE 리포터 세포주의 발생

[0488]

부모 세포주를 생성하기 위해, HEK293 세포를 6웰 디쉬(Costar: 3516) 상으로 2 mL의 완전 성장 배지(RPMI, 10% FBS, 1% L-글루타민, 1% Na 피루베이트 및 1% MEM NEAA)와 함께 1개 웰 당 250,000개 세포로 37°C, 5% CO₂에서 24시간 동안 접종하였다. 다음날, 3 µg의 pGL4.36[Luc2P/MMTV/Hygro](Promega: E316) 및 3 µl의 PLUS 시약(Invitrogen: 10964-021)을 244 µL Opti-MEM(Gibco: 31985-070) 내로 희석시키고, 실온에서 15분 동안 인큐베이션하였다. pGL4.36[Luc2P/MMTV/Hygro] 벡터는, 몇몇 핵 수용체, 예컨대 글루코코티코이드 수용체 및 안드로겐 수용체의 활성화에 대한 반응에서 루시퍼라제 리포터 유전자 luc2P의 전사를 유도하는 MMTV LTR(뮤린 유선 종양 바이러스 긴(Long) 말단 반복부)을 함유한다. 인큐베이션 후, 희석된 DNA 용액을 1:1 리포펙타민 LTX 용액(Invitrogen: 94756)(13.2 µl + 256.8 µl Opti-MEM)과 함께 사전-인큐베이션하고, 실온에서 25분 동안 인큐베이션하여, DNA-리포펙타민 LTX 복합체를 형성하였다. 인큐베이션 후, 500 µl의 DNA-리포펙타민 복합체를, 세포를 함유하는 웰에 직접적으로 첨가하였다. HEK293 세포를 37°C, 5% CO₂에서 24시간 동안 형질감염시켰다. 인큐베이션 후, 세포를 3 mL의 포스페이트 완충제 식염수(PBS)로 세척하고, 100 µg/mL의 하이그로마이신 B(Invitrogen: 10687-010)를 함유하는 완전 성장 배지로 2주 동안 선별하였다. "HEK293 GRE pGL4.36[Luc2P/MMTV/Hygro]" 세포가 생성되었다.

[0489]

뮤린 CD40 형질감염된 세포를 생성하기 위해, HEK293 세포를 6웰 디쉬(Costar: 3516) 상으로 2 mL의 완전 성장 배지(RPMI, 10% FBS, 1% L-글루타민, 1% Na 피루베이트 및 1% MEM NEAA)와 함께 1개 웰 당 250,000개 세포로 37°C, 5% CO₂에서 24시간 동안 접종하였다. 다음날, 3 µl의 FuGENE 6 형질감염 시약(Promega: E2311)을 96 µl의 비보충된(unsupplemented) RPMI 배지 내로 희석시키고, 실온에서 5분 동안 인큐베이션하였다. 인큐베이션 후, 1 µg의 NEF39 muCD40 HA ICD4(PDL/FACET Biopharma)를 형질감염 혼합물에 첨가하고, 실온에서 30분 동안 인큐베이션하였다. 인큐베이션 후, 희석된 DNA 용액을 세포를 함유하는 웰에 1개 웰 당 100 µL에서 적가하였다. HEK293 세포를 37°C, 5% CO₂에서 24시간 동안 형질감염시켰다. 인큐베이션 후, 세포를 3 mL의 PBS로 세척하고, 500 µg/mL G418(Gibco: 10131-027)을 함유하는 완전 성장 배지로 2주 동안 선별하였다. 생성된 세포주는 "mCD40_HEK293"로 지정되었다.

[0490]

뮤린 CD40 GRE 리포터 세포주를 생성하기 위해, mCD40으로 안정하게 형질감염된 HEK293 세포를 6웰 디쉬(Costar: 3516) 상으로 2 mL의 완전 성장 배지(RPMI, 10% FBS, 1% L-글루타민, 1% Na 피루베이트 및 1% MEM NEAA)와 함께 1개 웰 당 250,000개 세포로 37°C, 5% CO₂에서 24시간 동안 접종하였다. 다음날, 3 µg의 pGL4.36[Luc2P/MMTV/Hygro](Promega: E316) 및 3 µL의 PLUS 시약(Invitrogen: 10964-021)을 244 µL Opti-MEM(Gibco: 31985-070) 내로 희석시키고, 실온에서 15분 동안 인큐베이션하였다. 인큐베이션 후, 희석된 DNA 용액을 1:1 리포펙타민 LTX 용액(Invitrogen: 94756)(13.2 µl + 256.8 µl Opti-MEM)과 함께 사전-인큐베이션하고, 실온에서 25분 동안 인큐베이션하여, DNA-리포펙타민 LTX 복합체를 형성하였다. 인큐베이션 후, 500 µl의 DNA-리포펙타민 복합체를, 세포를 함유하는 웰에 직접적으로 첨가하였다. HEK293 세포를 37°C, 5% CO₂에서 24시간 동안 형질감염시켰다. 인큐베이션 후, 세포를 3 mL의 포스페이트 완충제 식염수(PBS)로 세척하고, 100 µg/mL의 하이그로마이신 B(Invitrogen: 10687-010)를 함유하는 완전 성장 배지로 2주 동안 선별하였다. 생성된 세포주는 "mCD40_GRE"로 지정되었다.

간 동안 형질감염시켰다. 인큐베이션 후, 세포를 3 mL의 PBS로 세척하고, 100 µg/mL의 하이그로마이신 B(Invitrogen: 10687-010) 및 500 µg/mL G418(Gibco: 10131-027)을 함유하는 완전 성장 배지로 2주 동안 선별하였다. 생성된 세포주는 "mCD40_HEK293 GRE pGL4.36[Luc2P/MMTV/Hygro]"로 지정되었다.

[0491] 인간 CD40 GRE 리포터 세포주를 생성하기 위해, HEK293 pGL4.36[Luc2P/MMTV/Hygro] 세포를 6웰 디쉬(Costar: 3516) 상으로 1 mL의 완전 성장 배지(RPMI, 10% FBS, 1% L-글루타민, 1% Na 피루베이트 및 1% MEM NEAA)와 함께 1개 웰 당 250,000개 세포로 접종하였다. 그 후에, 3 µg의 인간 CD40 전사체 1(Myc-DDK-태깅됨) DNA(Origene Cat# RC201977) 및 3 µl의 PLUS 시약(Invitrogen: 10964-021)을 500 µL Opti-MEM(Gibco: 31985-070) 내로 희석시켰다. DNA 용액을 1:1 리포펙타민 LTX 용액(Invitrogen: 94756)(11 µL + 500 µL Opti-MEM)과 함께 사전-인큐베이션하고, 실온에서 15분 동안 인큐베이션하여, DNA-리포펙타민 LTX 복합체를 형성하였다. 인큐베이션 후, 1,000 µl의 DNA-리포펙타민 복합체를, 세포를 함유하는 웰에 직접적으로 첨가하였다. HEK293 pGL4.36[Luc2P/MMTV/Hygro] 세포를 37°C, 5% CO₂에서 24시간 동안 형질감염시켰다. 인큐베이션 후, 세포를 3 mL의 PBS로 세척하고, 100 µg/mL의 하이그로마이신 B(Invitrogen: 10687-010) 및 500 µg/mL G418(Gibco: 10131-027)을 함유하는 완전 성장 배지로 2주 동안 선별하였다. 생성된 세포주는 "hCD40 전사체 1_HEK293 GRE pGL4.36[Luc2P/MMTV/Hygro]"로 지정되었다.

실시예 B. GRE 리포터 검정법에서 항-CD40 ADC의 활성

[0492] HEK293 부모 GRE(pGL4.36[1uc2P/MMTV/Hygro]) 세포 및 HEK293 mCD40 또는 hCD40 GRE(pGL4.36[1uc2P/MMTV/Hygro]) 세포를 96웰 조직 배양 처리 백색 플레이트(Costar: 3917) 상으로 75 µl의 검정법 배지(RPMI, 1% CSFBS, 1% L-글루타민, 1% Na 피루베이트 및 1% MEAA)에서 1개 웰 당 20,000개 세포로 평판배양하고, 37°C, 5% CO₂에서 24시간 동안 인큐베이션하였다. 다음날, 세포를 검정법 배지 중 25 µl의 4x 일련의 희석된 뮤린 또는 인간 항-CD40 항체 약물 공액체, 스테로이드 화합물, 또는 배지 단독으로 처리하고, 37°C, 5% CO₂에서 72시간 동안 인큐베이션하였다. 72시간의 인큐베이션 후, 세포를 100 µl의 Dual-Glo 루시퍼라제 검정법 시스템(Promega-E2920)으로 10분 동안 처리하고, Microbeta(PerkinElmer)를 사용하여 발광에 대해 분석하였다. 4개의 매개변수 곡선 적합도(fit)를 사용하여 데이터를 분석하여, EC₅₀ 값을 발생시켰다. 최대 활성화 퍼센트(%)를 100 nM 텍사메타손으로 정규화하였으며, 이는 최대 활성화로 여겨졌다. 항-마우스 CD40 ADC 및 항-인간 CD40 ADC 둘 모두 각각에 대한 EC₅₀ 값은 각각 표 16 및 표 17에 제공되어 있다.

표 16. 인간 CD40 GRE 리포터 검정법에서 항-마우스 CD40 ADC의 시험판내 활성

ADC	n	% 단량체 (SEC)	mCD40 GRE EC ₅₀ (µg/ml)	mCD40 GRE (% 최대)	HEK293 GRE EC ₅₀ (µg/ml)	HEK293 GRE (% 최대)
실시예 6- 가수분해 (마우스)	4	99.4	0.11	84.2	5.7	100
실시예 7- 가수분해 (마우스)	4	100	0.42	82.2	>50	52.3
실시예 12- 가수분해 (마우스)	2	100	0.15	104	9.79	93
실시예 12- 가수분해 (마우스)	4	100	0.14	108	6.6	96
실시예 28 (마우스)	4	99.8	0.23	118	19.15	83

표 17. 인간 CD40 GRE 리포터 검정법에서 항-인간 CD40 ADC의 시험관내 활성						
ADC	n	% 단량체	hCD40 GRE EC ₅₀ (μ g/ml)	hCD40 GRE (% 최대)	HEK293 GRE EC ₅₀ (μ g/ml)	HEK293 GRE (% 최대)
실시예 12- 가수분해(인간)	4	98.2	0.19	163	>17	117
실시예 13- 가수분해 (인간)	4	99.8	0.29	67	>50	27
실시예 28(인간)	2	100	16.5	90	>50	82
실시예 28(인간)	4	100	0.53	77	>50	64
실시예 4 (인간)	4	100	6.57	88	>50	21

[0495] SEC = 크기 배제 크로마토그래피에 의해 측정된 바와 같다.

[0496] 실시예 C. 리포다당류 및 가용성 CD40 리간드-자극된 인간 단핵구-유래 DC 사이토카인 방출 검정법에서 항-CD40 ADC의 활성

[0497] 1차 인간 말초 혈액 단핵 세포(PBMC)를 Sanguine Biosciences로부터 구매하였으며, 50 mL 포스페이트 완충제 식염수(PBS)(pH 7.2)에서 세척하고, 5% DMSO와 함께 100% FBS에 재현탁시키고, 분취한 다음, 사용할 때까지 액체 질소에서 동결보존하였다. PBMC를 해동시키고, 0.5% FBS 및 2 mM EDTA를 함유하는 PBS(pH 7.2)에서 세척하였다. PBMC로부터의 단핵구를, Miltenyi Whole Blood CD14 MicroBeads 키트(Cat# 130-090-879) 및 Miltenyi autoMACS Pro Separator를 제조업체의 프로토콜에 따라 사용한 CD14+ 세포의 양성 선별에 의해 농화시켰다. 정제된 단핵구를 세척하고, 10% FBS, L-글루타민(Gibco Cat# 25030081), 소듐 피루베이트(Gibco Cat# 11360070), MEM 비-필수 아미노산 용액(Gibco Cat# 11140050), 페니실린-스트렙토마이신(Gibco Cat# 15140122), HEPES 완충제(Gibco Cat# 15630080), 2-мер캅토에탄올(Gibco Cat# 21985023)이 보충된 RPMI에 재현탁시켰다. 세포를 6-웰 플레이트(Corning Cat# 3506)에 1 mL 당 1.00E+06개 세포 및 1개 웰 당 3 mL로 옮기고, 100 ng/mL rhGM-CSF(R&D Systems, Cat# 215-GM-010/CF) 및 100 ng/mL rhIL-4(R&D Systems, Cat# 204-IL-010/CF)와 함께 37°C 및 5% CO₂에서 5일 동안 인큐베이션하여, 수지상 세포(DC)로의 단핵구의 분화를 유도하였다. 제5일에, 반-부착성 단핵구-유래 DC(MoDC)를 풀링(pool)하고, 이들의 분화의 효율을 유세포분석을 사용하여 CD1a-양성 CD14-음성 세포(Biolegend Cat# 300106, Cat# 325628)에 대한 표현형 결정(phenotyping)에 의해 확증하였다. MoDC를 세척하고, 보충된 RPMI 배지에 재현탁시키고, 세포 검정법 플레이트(Costar Cat# 3799) 내로 1개 웰 당 1.0E+05개 세포로 평판배양하였다. 세포를 리포다당류(LPS)(Sigma Cat#L4391-1MG)로 0.1 ng/mL에서 2시간 동안 자극시켜, MoDC 상에서의 세포-표면 CD40 발현의 상향조절을 유도하였다. 자극 후, 배양 상층액을 세척하고, 세포를 다양한 농도의 항-인간 CD40 항체 또는 항-인간 CD40 ADC와 함께 37°C 및 5% CO₂에서 2시간 동안 인큐베이션하였다. 그 후에, 세포를 0.2 ng/mL LPS 및 0.5 μ g/mL 가용성 CD40-리간드(CD40L)(Adipogen Cat#AG-40B-0010)로 20시간 동안 자극시켰다. 인큐베이션 후, 플레이트를 1200 rpm에서 5분 동안 회전시키고, 150 μ l의 상층액 배지를 부가적인 96-웰 플레이트로 직접적으로 옮기고, IL-6(MSD, #K151AKB) 농도에 대해 분석하였다. 용량 반응 데이터를 비선형 회귀를 사용하여 S자형 곡선으로 적합화시키고, IC₅₀ 값을 GraphPad Prism 6(GraphPad Software, Inc.)의 도움으로 계산하였다. 표 18에 제시된 결과는, 항-인간 CD40 ADC가, 활성화된 1차 면역 세포로부터의 전-염증성 사이토카인 IL-6의 방출을 저해하는 데 있어서 강력한 활성을 가지고, 실시예 13-가수분해(인간)와 실시예 12-가수분해(인간) ADC 사이에서의 약효 차이가 2개의 페이로드 화합물 사이에서의 약효 차이에 상응함을 실증하고, 여기서, n은 4이다. 표 18은 또한, n이 2인 실시예 28-공액(인간) ADC 및 n이 4인 실시예 28-공액(인간) ADC에 대해 유사한 결과를 제공한다. 도 2에 제시된 결과의 대표적인 예는, 실시예 13-가수분해(인간) 및 실시예 12-가수분해(인간)에 의한 면역 세포 활성화를 저해하는 최대 능력이 부모 길항체 항체에 의해 제공되는 저해를 초과하며, 여기서, n이 4임을 실증한다.

표 18. LPS 및 CD40L-자극된 인간 MoDC 사이토카인 방출 검정법(N=3)에서 항-인간 CD40 ADC의 시험관내 활성				
대조군 또는 ADC	% 단량체 (SEC)	IL-6 방출 IC ₅₀ (μg/ml)	최대 저해율 (%)	n
대조군 1 hCD40 mAb	100	0.18	44.5	NA
대조군 2* 실시 예 12 - 가수분해 아이소타입 (Ab = 항-파상풍 변성독소, 인간 아이소타입)*	97.7	3.3	18.2	4
실시 예 13- 가수분해 (인간)	99.8	0.14	83.3	4
실시 예 12- 가수분해 (인간)	98.2	0.04	99.5	4
실시 예 28-공액 (인간)	100	0.03	81.8	2
실시 예 28-공액 (인간)	100	0.05	87.6	4

* 아이소타입 항체는, 파상풍 변성독소를 표적화하고, 이종이식 모델에 존재하는 항원을 인지하지 않는 IgG 를 투여하는 효과에 대한 대조군으로서 사용되는 항체이다. 예를 들어, US 20170182179 호를 참조한다. 상기 기술된 인간 아이소타입 ADC는 파상풍 변성독소 백신을 인지하는 인간 항체의 클로닝된 가변 도메인으로부터 유래되었다. 이는, 시험관내 또는 생체내에서 인간 세포에 의해 발현되는 것으로 예상되지 않는 항원이다.

SEC = 크기 배제 크로마토그래피에 의해 측정된 바와 같다.

[0498]

실시 예 D. 골수 유래 DC 활성화 검정법에서 항-마우스 CD40 ADC의 활성

[0500]

뮤린 골수(BM) 세포를 C57BL/6 마우스의 대퇴부 및 경골로부터 압출(extrude)하고, 보충된 RPMI 배지에 재현탁시켰다. 세포를 6-웰 플레이트(Corning Cat# 3506)에 1 mL 당 1.00E+06개 세포 및 1개 웰 당 5 mL로 옮기고, 10 ng/mL 뮤린 GM-CSF(R&D Systems Cat# 415-ML-010)와 함께 37°C 및 5% CO₂에서 8일 동안 인큐베이션하였다. 배양의 제3일 및 제5일에, 배양 배지 중 2/3을 20 ng/mL IL-4가 보충된 신선한 GM-CSF 함유 배지로 대체하여, 수지상 세포(DC)로의 BM 세포의 분화를 유도하였다. 인큐베이션 후, 이를 BM-유래 DC(BMDC)를 세척하고, 보충된 RPMI 배지에 재현탁시키고, 세포 검정법 플레이트(Costar Cat# 3799) 내로 평판배양하였다. 세포를 리포타당류(LPS)(Sigma Cat#L4391-1MG)로 0.1 ng/mL에서 2시간 동안 자극시켜, BMDC 상에서의 세포-표면 CD40 발현의 상향조절을 유도하였다. 자극 후, 배양 상층액을 세척하고, 세포를 다양한 농도의 항-마우스 CD40 항체 또는 실시 예 6-가수분해(마우스)와 함께 37°C 및 5% CO₂에서 2시간 동안 인큐베이션하였다. 그 후에, 세포를 0.1 ng/mL LPS 및 0.5 μg/mL 가용성 CD40-리간드(CD40L)(Enzo Life Sciences, Inc. Cat# ALX-522-120-C010)로 20시간 동안 자극시켰다. 일부 실험에서, LPC 처리를 다양한 농도(0.1, 1.0, 10 ng/mL)에서 시험한 한편, 가용성 CD40L은 0.5 μg/mL에서 유지되었다. 인큐베이션 후, 플레이트를 1200 rpm에서 5분 동안 회전시키고, 150 μl의 상층액 배지를 부가적인 96-웰 플레이트로 직접적으로 옮기고, IL-6(MSD, Cat# K152TXK) 농도에 대해 분석하였다. DC 활성화 마커의 상향조절을 정량화하기 위해, 검정법 플레이트에 잔존하는 배양된 세포를 세척하고, 항-마우스 CD86 항체(GL-1, Biolegend Cat# 105018)로 염색하고, 유세포분석에 의해 평가하였다. 용량 반응 데이터를 비선형 회귀를 사용하여 S자형 곡선으로 적합화시키고, IC₅₀ 값을 GraphPad Prism 6(GraphPad Software, Inc.)의 도움으로 계산하였다. 부가적인 실험을 실시 예 12-가수분해(마우스) 및 실시 예 28(마우스)로 수행하였다. 표 19에 제시된 결과는, 항-마우스 CD40 ADC가, 활성화된 1차 면역 세포 상에서의 공동-자극성 분자 발현의 상향조절을 억제하는 데 있어서 강력한 활성을 나타내고, ADC 사이에서의 약효 차이가 약물-링크 폐이로드 사이에서의 약효 차이에 상응함을 실증한다. 도 3에 도시된 결과는, 실시 예 6-가수분해(마우스)에 의한 면역 세포 활성화를 저해하는 최대 능력이 부모 길항체 항체에 의해 제공되는 저해를 초과함을 실증한다.

표 19. LPS 및 CD40L-자극된 마우스 BMDC 활성화 검정법(N=3)에서 항-마우스 CD40 ADC의 시험관내 활성				
대조군 또는 ADC	% 단량체 (SEC)	CD86 발현 IC ₅₀ ($\mu\text{g}/\text{ml}$)	최대 저해율 (%)	n
대조군 1 mCD40 mAb	100	0.13	35.6	NA
대조군 2* 실시 예 6- 가수분해 아이소타입 (Ab = 항-파상풍 변성독소, 마우스 아이소타입)	100	1.06	37.5	4
실시 예 6-가수분해 (마우스)	100	0.15	118.4	4
실시 예 12-가수분해 (마우스)	100	0.06	94.2	4
실시 예 28(마우스)	99.8	0.10	90.8	4

* 아이소타입 항체는, 파상풍 변성독소를 표적화하고, 이종이식 모델에 존재하는 항원을 인지하지 않는 IgG 를 투여하는 효과에 대한 대조군으로서 사용되는 항체이다. 예를 들어, US 20170182179 호를 참조한다. 상기 기재된 마우스 아이소타입 ADC는, 파상풍 변성독소 백신을 인지하는 마우스 항체의 클로닝된 가변 도메인으로부터 유래되었다. 이는 시험관내 또는 생체내에서 마우스 세포에 의해 발현되는 것으로 예상되지 않는 항원이다.

[0501] SEC = 크기 배제 크로마토그래피에 의해 측정된 바와 같다.

실시 예 E. 생체내 LPS-유도 급성 염증 모델에서 항-마우스 CD40 ADC의 활성

C57BL/6 암컷 마우스(n=3)에게 1 μg 의 LPS 및 (1) 대조군 1로서 부모 길항체 항체(mCD40 mAb), (2) 실시 예 6-가수분해 아이소타입(Ab = 항-파상풍 변성독소, 마우스 아이소타입)(n = 4), 또는 (3) ADC로서 실시 예 6-가수분해(마우스)(10 mg/kg)(n = 4)를 함유하는 100 μl 의 포스페이트 완충제 식염수(PBS)(pH7.2)를 복강내 투약하였다. 주사 후 24시간째에, 처리된 마우스로부터 비장을 수합하고, 가공하여, 각각의 개별적인 마우스로부터 단일-세포 혼탁액을 수득하였다. 세포를 하기 형광단-표지 항체로 염색하여, 특이적인 항원-제시 세포 집단을 유세포분석을 사용하여 표현형 결정하였다: 항-마우스 CD4 PE(Biolegend Cat# 100408), 항-마우스 CD8 BUV395(BD Cat# 563786), 항-마우스 CD19 PE-Cy7, 항-마우스 CD11c PerCp-Cy5.5, 항-마우스 CD11b BV510, 항-마우스 IAIE Pacific Blue, 항-마우스 CD40 APC, 항-마우스 CD86 Alexa-488. 세포를 1% FBS 및 FcR-블라킹(blocking) 시약(BD, Cat# 553142)을 함유하는 PBS(pH7.2)에서 1 mL 당 1.0E+07 세포로 염색하였다. 1개 비장 당 활성화된 수지상 세포(DC)의 총 빈도를 계산하고, GraphPad Prism 6(GraphPad Software, Inc.)의 도움으로 도표화하였다. 도 4에 도시된 결과는, CD40 ADC이 생체내에서 부모 길항체 항체 또는 아이소타입 ADC보다 DC 활성화를 억제시키는 데 있어서 더 큰 효력을 나타냄을 실증한다.

실시 예 F. 지연 유형 IV 과민성 모델에서 항-마우스 CD40 ADC의 활성

항-마우스 CD40 ADC를 급성 지연 유형-IV 과민성(DTH) 모델에서 평가하였다. 피부의 T 세포-유도 급성 염증 반응은 감작된 단백질 항원(BSA)에의 재노출에 의해 촉발되었다. 항-마우스 CD40 ADC의 효력을, 발 부기를 저해하는 능력에 의해 측정하였다.

C57BL/6 암컷 마우스에게 -1일째에 (1) 대조군 1로서 mCD40 mAb, (2) 대조군 2로서 실시 예 12-가수분해 아이소타입(Ab = 항-파상풍 변성독소, 마우스 아이소타입)(n = 4), 또는 (3) ADC로서 실시 예 12-가수분해(마우스)(n = 4)를 복강내 투약하였다. 제0일에, 마우스를 CFA H37Ra(Becton Dickinson, Cat#231131)에서 유화된 200 μg 의 메틸화된 BSA(Sigma-Aldrich, Cat#1009)를 사용한 면역화를 통해 감작시켰다. 제7일에, 두 뒷다리 모두의 기준선 두께를 측정하였다. 우측 발바닥을 포스페이트 완충제 식염수(PBS) 중 100 μg mBSA로 챠린지한 한편, 좌측 발바닥은 PBS 단독으로 처리하였다. 챠린지 후 24시간째에, 뒷발을 Dyer 스프링 캘리퍼스(Dyer 310-115)를 사용

하여 발 부기에 대해 평가하였고, 기준선에 비한 두께 변화를 도 5a에 도표화한다. 발 부기 측정 후, 마우스에게 ACTH를 1 mpk IP로 주사하고, ACTH 후 30분째에 말단에서 채혈하였다. 혈장을 수합하고, P1NP, 코티코스테론, 유리(free) 스테로이드 및 고분자(large molecule) 수준에 대해 분석하였다. 도 5a의 데이터는, 생체내에서 T-세포 매개 염증을 부모 길항제 항체 또는 비-표적화된 ADC 단독보다 더 강력하게 저해하는 CD40 ADC의 증강된 효력을 실증한다.

[0507] 항-마우스 CD40 또는 아이소타입(Ab = 항-오브알부민, 마우스 아이소타입)에 대한 실시예 28-공액(마우스)으로 구성된 항-마우스 CD40 ADC의 활성을 또한, 상기 설정된 절차에 따라 DTH 검정법에서 평가하였다. 도 5b는 생체내에서 부모 길항제 항체 또는 비-표적화된 ADC 단독보다 T-세포 매개 염증을 저해하는 CD40 ADC의 증강된 효력을 실증한다.

[0508] 실시예 G. 염증의 DTH 모델에서 스테로이드 바이오마커

[0509] 1. 혈장 P1NP

[0510] 혈장 P1NP의 정량화를 LC/MS 플랫폼 상에서 단백질 트립신 분해에 기초하여 수행하였다.

[0511] 혈장 시료를 부분적으로 침전시키고, MeCN/0.1M 암모늄 비카르보네이트/DTT 혼합물을 첨가함으로써 완전히 환원시켰다. 상층액을 수합하고, 요오도아세트산을 첨가함으로써 알킬화시켰다. 알킬화된 단백질을 트립신에 의해 분해하고, 생성된 트립신성(tryptic) 펩타이드를 LC/MS에 의해 분석하였다.

[0512] 말 혈청(비)간섭 대리(noninterfering surrogate) 내로 스파이킹된(spiked) 합성 트립신성 펩타이드를 사용함으로써 보정 곡선을 발생시켰다. 안정한 동위원소 표지된 측부 펩타이드(트립신성 펩타이드의 2개 말단 모두 상에서 3 내지 6개 아미노산 연장부)를 MeCN/DTT 단백질 침전 혼합물에 첨가된 내부 표준으로서 사용하여, 분해 효율과 LC/MS 주입 둘 모두를 정규화시켰다. 컬럼은 Chromenta BB-C18, 2.1x150 mm, 5 μm 컬럼을 크로마토그래피 분리에 사용하였다. 이동상 A는 Milli Q HPLC 수(water) 중 0.1% 포름산이었고, 이동상 B는 MeCN 중 0.1% 포름산이었다. 2%의 이동상 B로부터 65% 이동상 B까지의 선형 구배를 0.6 내지 3분에서 적용하였다. 총 진행 시간은 0.45 mL/분의 유속에서 8분이었다. AB Sciex 4000Qtrap 질량 분광광도계를 양성 MRM 모드에서 사용하여, 700°C의 공급원 온도에서 P1NP 펩타이드를 정량화하였다.

[0513] 2. 방출된 유리 스테로이드 및 내인성 코티코스테론

[0514] 스테로이드의 보정 곡선을 마우스 혈장에서 8개의 상이한 농도 수준에서 0.03 nM 내지 0.1 μM의 최종 농도로 제조하였다.

[0515] 0.3 nM 내지 1 μM 최종 코티코스테론 농도 범위의 코티코스테론 보정 곡선을 포스페이트 완충제 식염수(PBS) 중 70 mg/mL 소 혈청 알부민 용액에서 제조하였다.

[0516] 0.1% 포름산과 함께 160 μL MeCN의 용액을 40 μL 연구 혈장 시료 또는 보정 표준에 첨가하였다. 상층액을 중류수로 회색시키고, 30 μL 최종 시료 용액을 LC/MS 분석을 위해 주입하였다.

[0517] 방출된 유리 스테로이드 및 코티코스테론의 정량화를, 양성 모드에서 작동하는 전기분무 이온화 공급원과 접속된(interfaced) Shimadzu AC20 HPLC 시스템에 연결된 AB Sciex 5500 트리플 쿼드러플 질량 분광광도계 상에서 수행하였다.

[0518] Waters XBridge BEH C18, 2.1x30 mm, 3.5 μm 컬럼을 크로마토그래피 분리에 사용하였다.

[0519] 이동상 A는 Milli Q HPLC 수 중 0.1% 포름산이었고, 이동상 B는 MeCN 중 0.1% 포름산이었다.

[0520] 2%의 이동상 B로부터 98% 이동상 B까지의 선형 구배를 0.6 내지 1.2분에서 적용하였다.

[0521] 총 진행 시간은 0.8 mL/분의 유속에서 2.6분이었다.

[0522] 질량 분광광도계를 양성 MRM 모드에서 700°C의 공급원 온도에서 작동시켰다.

[0523] 표 20의 데이터는, DTH 모델에서 ADC 치료가 스테로이드 바이오마커, P1NP 및 코티코스테론의 혈청 수준에 유의하게 영향을 주지 않음을 실증한다.

표 20. 스테로이드 바이오마커에 대한 항-마우스 CD40 ADC 활성의 효과

대조군/ADC	n	P1NP (ng/ml ± SD)	코티코스테론 (ng/ml ± SD)
비 히클	4	1294±183	292.832±40
실시예 12-가수분해(마우스), 10 mpk	4	1096.4±306	312.526±46
실시예 12-가수분해(마우스), 3 mpk	4	1486.6±313	332.304±27
실시예 12-가수분해(마우스), 1 mpk	4	1255.4±318	303.742±40
실시예 12-가수분해(마우스), 0.3 mpk	4	1736±197	271.182±83
실시예 12-가수분해(마우스), 0.1 mpk	4	1311.2±418	282.856±43

[0524]

실시예 H. 콜라겐-유도 관절염(CIA)에서 항-마우스 CD40 면역공액체의 활성

[0525]

실시예 6-가수분해(마우스) ADC가 질환에 영향을 주는 능력을 관절염의 콜라겐-유도 관절염(CIA) 모델에서 평가하였다.

[0526]

이들 실험에서, 수컷 DBA/1J 마우스를 Jackson Labs(Bar Harbor, ME)로부터 입수하였다. 마우스를 6주령 내지 12주령에서 사용하였다. 모든 마우스를 일정한 온도 및 습도에서 12시간 명/암 주기에서 유지시키고, 설치류 사료(Lab Diet 5010 PharmaServ, Framingham, MA) 및 물을 자유자재로 먹게 공급하였다. AbbVie는 공인된 AAALAC=(Association for Assessment and Accreditation of Laboratory Animal Care)이고, 모든 절차는 기관 동물 관리 및 사용 위원회(IACUC; Institutional Animal Care and Use Committee)에 의해 승인을 받았고, 참여 수의학자에 의해 모니터링되었다. 체중 및 상태를 모니터링하였으며, 체중 손실이 20% 초과를 나타내는 경우 동물을 안락사시켰다.

[0527]

수컷 DBA/J 마우스를, 0.1 N 아세트산에 용해된 100 µg의 유형 II 소 콜라겐(MD Biosciences) 및 200 µg의 열-불활성화된 결핵균(Mycobacterium tuberculosis) H37Ra(Complete Freund's Adjuvant, Difco, Laurence, KS)를 함유하는 100 µl의 에멀젼으로 꼬리의 기부(base)에서 피내(i.d.) 면역화하였다. 콜라겐으로의 면역화 후 21일째에, 마우스를 포스페이트 완충제 식염수(PBS) 중 1 mg의 Zymosan A(Sigma, St. Louis, MO)로 IP 부스트(boost)하였다. 부스트 후, 마우스를 1주 당 3 내지 5회 관절염에 대해 모니터링하였다. 뒷발을 Dyer 스프링 캘리퍼스(Dyer 310-115)를 사용하여 발 부기에 대해 평가하였다.

[0528]

마우스를 제24일 내지 제28일 사이에 질환의 최초의 임상 징후에서 등록하고, 동등한 관절염 종종도 그룹으로 나누었다. 초기 치료적 치료를 등록 시에 시작하였다.

[0529]

동물에게 10 mg/kg에서 항-마우스 CD40 길항체 항체 또는 0.9% 식염수 중 실시예 6-가수분해(마우스) ADC(n = 4)를 복강내 투약하였다. 투약 후 24시간 및 72시간째에 꼬리 낙(nick)에 의해 혈액을 항체 노출에 대해 수합하였다. 조직병리학을 위해 종료 시점에서 발을 수합하였다. 완전한 혈액 카운트(Sysmex XT-2000iV)를 위해 종료 시점에서 혈액을 심장 천자에 의해 수합하였다. 통계학적 유의성을 ANOVA에 의해 결정하였다. 실시예 6- 가수분해 아이소타입(Ab = 항-파상풍 변성독소, 마우스 아이소타입)(n = 4) 및 부모 항-mCD40 mAb를 대조군 1 및 2로서 사용하였다. 도 6에 도시된 결과는, 단일 용량의 항-마우스 CD40 스테로이드 ADC가 대조군 1 및 2와 비교하여 약 6주 동안 연장된 작용 기간을 발 부기의 개선을 통해 나타낼 수 있음을 실증한다.

[0530]

참조에 의한 포함

[0531]

상세한 설명 및 실시예를 참조로 하는 특허 및 공보 출원을 포함한 모든 공보는 그 전문이 참조에 의해 본 명세서에 포함된다.

[0532]

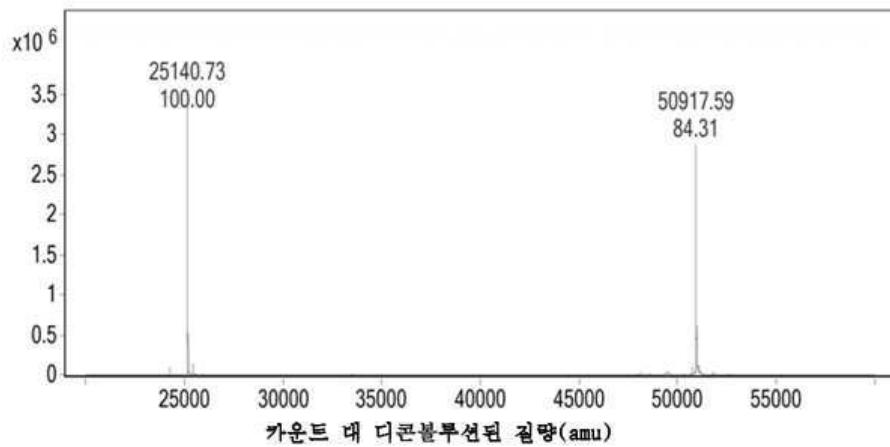
다른 구현예

[0533]

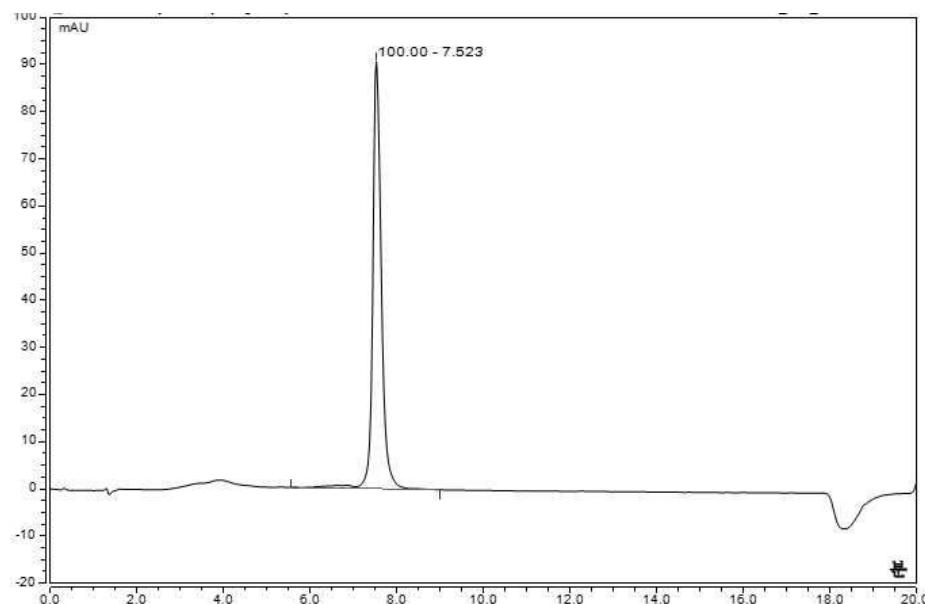
상기의 내용은 본 개시내용의 소정의 비제한적인 구현예를 기술하였다. 당업자는, 본 상세한 설명에 대한 다양한 변화 및 변형이 하기 청구항에서 정의된 바와 같이 본 개시내용의 사상 또는 범위로부터 벗어나지 않으면서 이루어질 수 있음을 이해할 것이다.

도면

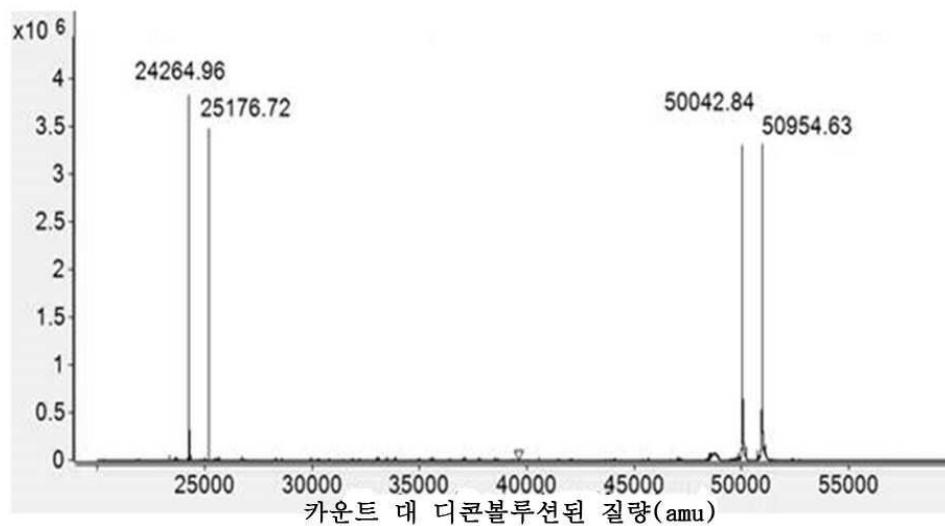
도면 1a



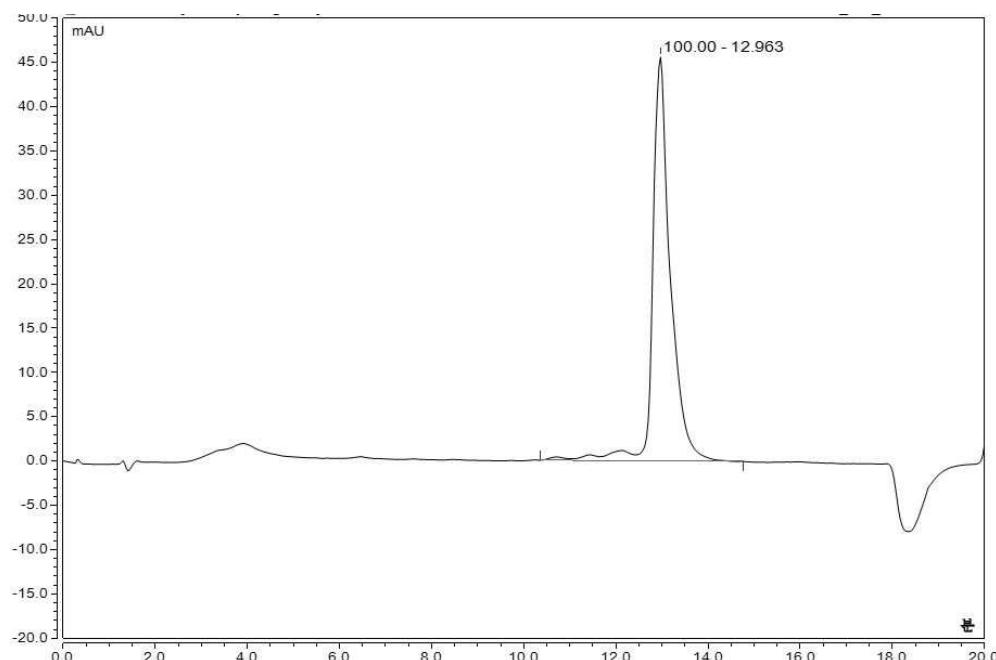
도면 1b

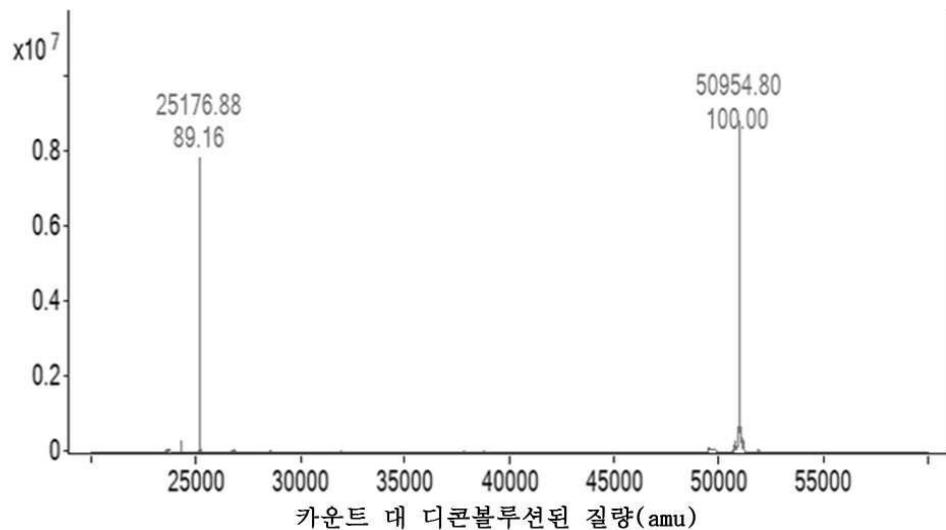
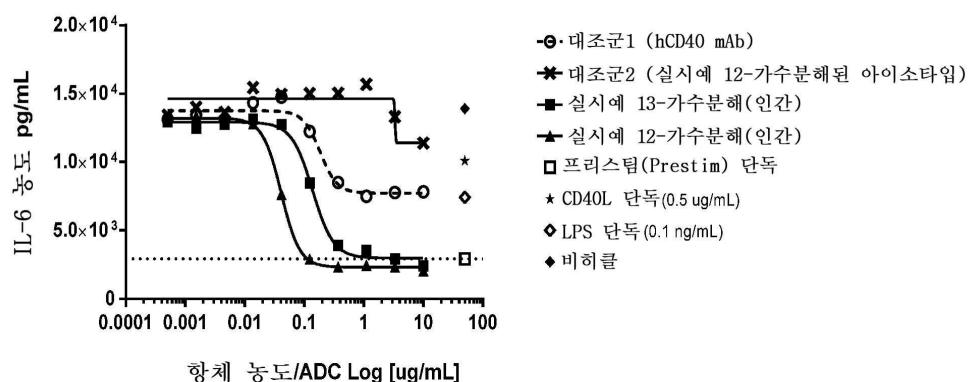
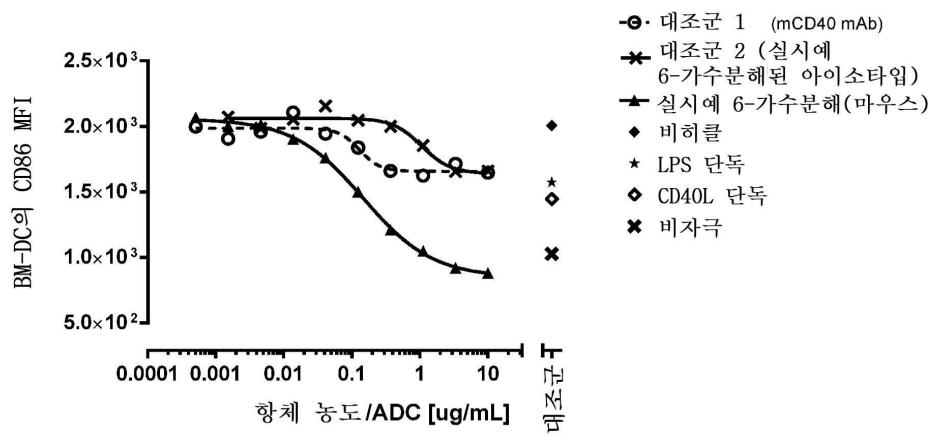


도면1c

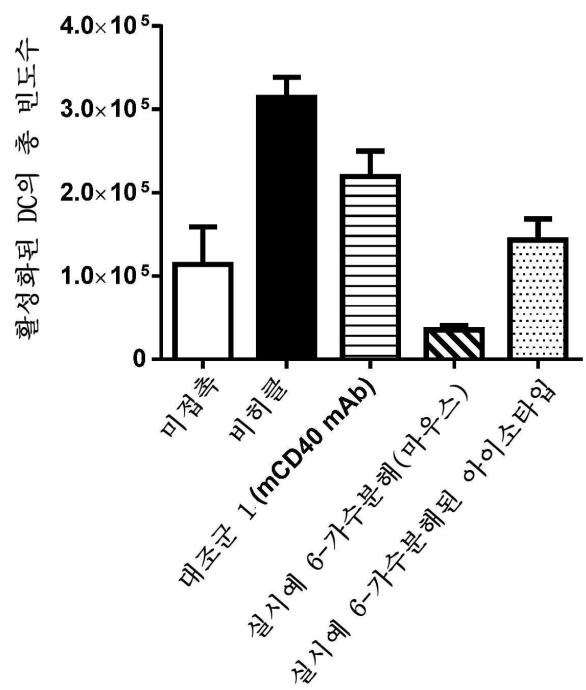


도면1d

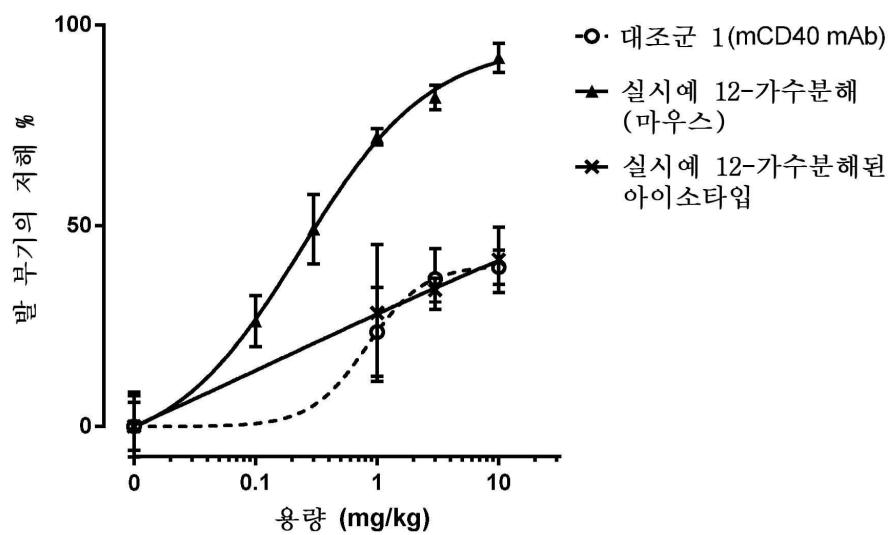


도면1e**도면2****도면3**

도면4

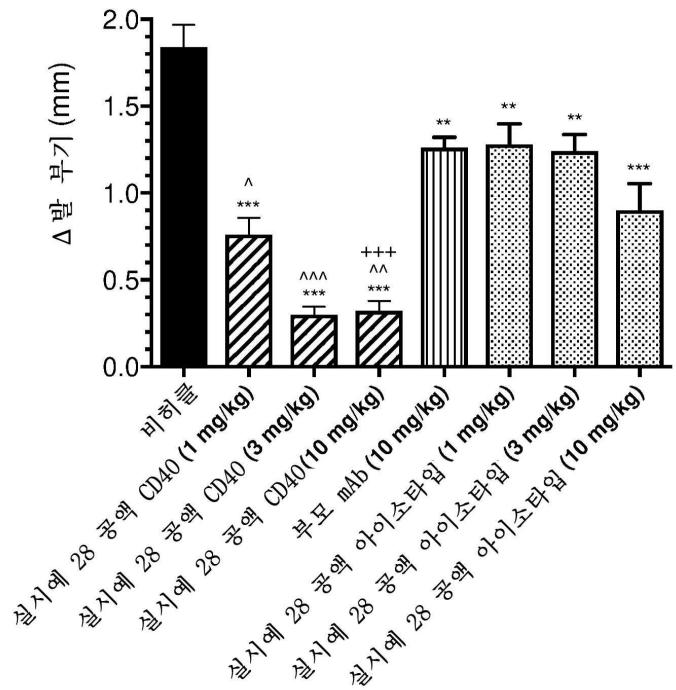


도면5a

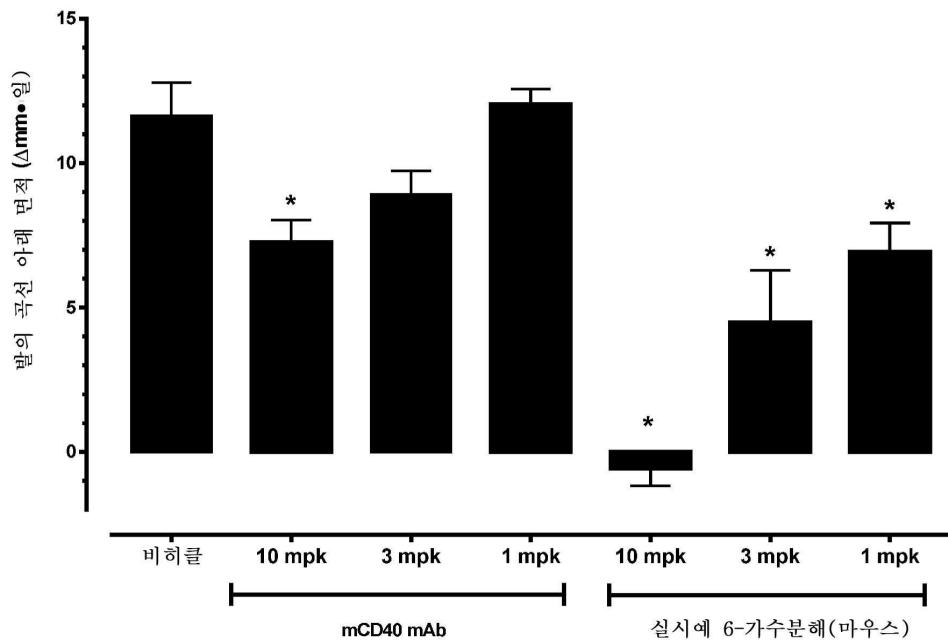


도면5b

** $p<0.01$, *** $p<0.001$ 대 비히클, Tukey 포스트 검정과 함께 1원 ANOVA에 의한 것임
 ^ $p<0.05$, ^^ $p<0.01$, ^^^ $p<0.001$ 실시예 28 공액 CD40 ADC 대 아이소타입 ADC,
 Tukey 포스트 검정과 함께 1원 ANOVA에 의한 것임
 +†† $p<0.001$ 실시예 28 공액 CD40 ADC 대 부모 mAb, Tukey 포스트 검정과 함께 1원 ANOVA에 의한 것임



도면6



서열 목록

SEQUENCE LISTING

<110> ABBVIE INC.

<120> ANTI-CD40 ANTIBODY DRUG CONJUGATES

<130> A103017 1480W0

<150> 62/595,045

<151> 2017-12-05

<150> 62/593,807

<151> 2017-12-01

<160> 13

<170> KoPatentIn 3.0

<210> 1

<211> 277

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 1

Met Val Arg Leu Pro Leu Gln Cys Val Leu Trp Gly Cys Leu Leu Thr

1	5	10	15
---	---	----	----

Ala Val His Pro Glu Pro Pro Thr Ala Cys Arg Glu Lys Gln Tyr Leu

20	25	30
----	----	----

Ile Asn Ser Gln Cys Cys Ser Leu Cys Gln Pro Gly Gln Lys Leu Val

35	40	45
----	----	----

Ser Asp Cys Thr Glu Phe Thr Glu Thr Glu Cys Leu Pro Cys Gly Glu

50	55	60
----	----	----

Ser Glu Phe Leu Asp Thr Trp Asn Arg Glu Thr His Cys His Gln His

65	70	75	80
----	----	----	----

Lys Tyr Cys Asp Pro Asn Leu Gly Leu Arg Val Gln Gln Lys Gly Thr

85	90	95
----	----	----

Ser Glu Thr Asp Thr Ile Cys Thr Cys Glu Glu Gly Trp His Cys Thr

100	105	110
-----	-----	-----

Ser Glu Ala Cys Glu Ser Cys Val Leu His Arg Ser Cys Ser Pro Gly

115	120	125
-----	-----	-----

Phe Gly Val Lys Gln Ile Ala Thr Gly Val Ser Asp Thr Ile Cys Glu

130	135	140
-----	-----	-----

Pro Cys Pro Val Gly Phe Phe Ser Asn Val Ser Ser Ala Phe Glu Lys

145 150 155 160

Cys His Pro Trp Thr Ser Cys Glu Thr Lys Asp Leu Val Val Gln Gln

165 170 175

Ala Gly Thr Asn Lys Thr Asp Val Val Cys Gly Pro Gln Asp Arg Leu

180 185 190

Arg Ala Leu Val Val Ile Pro Ile Ile Phe Gly Ile Leu Phe Ala Ile

195 200 205

Leu Leu Val Leu Val Phe Ile Lys Lys Val Ala Lys Lys Pro Thr Asn

210 215 220

Lys Ala Pro His Pro Lys Gln Glu Pro Gln Glu Ile Asn Phe Pro Asp

225 230 235 240

Asp Leu Pro Gly Ser Asn Thr Ala Ala Pro Val Gln Glu Thr Leu His

245 250 255

Gly Cys Gln Pro Val Thr Gln Glu Asp Gly Lys Glu Ser Arg Ile Ser

260 265 270

Val Gln Glu Arg Gln

275

<210

> 2

<211> 100

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 2

Glu Pro Pro Thr Ala Cys Arg Glu Lys Gln Tyr Leu Ile Asn Ser Gln

1 5 10 15

Cys Cys Ser Leu Cys Gln Pro Gly Gln Lys Leu Val Ser Asp Cys Thr

20 25 30

Glu Phe Thr Glu Thr Glu Cys Leu Pro Cys Gly Glu Ser Glu Phe Leu

35 40 45

Asp Thr Trp Asn Arg Glu Thr His Cys His Gln His Lys Tyr Cys Asp

50 55 60

Pro Asn Leu Gly Leu Arg Val Gln Gln Lys Gly Thr Ser Glu Thr Asp
 65 70 75 80
 Thr Ile Cys Thr Cys Glu Glu Gly Trp His Cys Thr Ser Glu Ala Cys
 85 90 95
 Glu Ser Cys Val
 100

<210> 3

<211> 446

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
polypeptide

<400>

> 3

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Lys Pro Gly Gly
 1 5 10 15
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asp Tyr
 20 25 30
 Gly Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile
 35 40 45
 Ala Tyr Ile Ser Ser Gly Arg Gly Asn Ile Tyr Tyr Ala Asp Thr Val
 50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser Leu Tyr
 65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95

Ala Arg Ser Trp Gly Tyr Phe Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val
 100 105 110

Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala
 115 120 125

Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu
 130 135 140

Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly

145	150	155	160
Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser			
165	170	175	
Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu			
180	185	190	
Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr			
195	200	205	
Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr			
210	215	220	
Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Ala Ala Gly Gly Pro Ser Val Phe			
225	230	235	240
Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Gln Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro			
245	250	255	
Glu Val Thr Cys Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val			
260	265	270	
Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr			
275	280	285	
Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val			
290	295	300	
Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys			
305	310	315	320
Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser			
325	330	335	
Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro			
340	345	350	
Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val			
355	360	365	
Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly			
370	375	380	
Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp			
385	390	395	400

Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp
 405 410 415
 Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Leu His Glu Ala Leu His
 420 425 430
 Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 435 440 445

<210> 4

<211> 220

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
polypeptide

<400> 4

Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Asp Ser Leu Ala Val Ser Leu Gly
 1 5 10 15
 Glu Arg Ala Thr Ile Asn Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Asn Arg
 20 25 30
 Gly Asn Gln Lys Asn Tyr Leu Thr Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Gln
 35 40 45

Pro Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Trp Ala Ser Thr Arg Glu Ser Gly Val
 50 55 60
 Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr
 65 70 75 80
 Ile Ser Ser Leu Gln Ala Glu Asp Val Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Asn
 85 90 95
 Asp Tyr Thr Tyr Pro Leu Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile
 100 105 110

Lys Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp
 115 120 125
 Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn
 130 135 140
 Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu

145 150 155 160

Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp

165 170 175

Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr

180 185 190

Glu Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser

195 200 205

Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys

210 215 220

<210> 5

<211> 116

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

polypeptide

<400> 5

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Lys Pro Gly Gly

1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asp Tyr

20 25 30

Gly Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile

35 40 45

Ala Tyr Ile Ser Ser Gly Arg Gly Asn Ile Tyr Tyr Ala Asp Thr Val

50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser Leu Tyr

65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys

85 90 95

Ala Arg Ser Trp Gly Tyr Phe Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val

100 105 110

Thr Val Ser Ser

115

<210> 6

<211> 113

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

polypeptide

<400> 6

Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Asp Ser Leu Ala Val Ser Leu Gly

1 5 10 15

Glu Arg Ala Thr Ile Asn Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Asn Arg

20 25 30

Gly Asn Gln Lys Asn Tyr Leu Thr Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Gln

35 40 45

Pro Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Trp Ala Ser Thr Arg Glu Ser Gly Val

50 55 60

Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr

65 70 75 80

Ile Ser Ser Leu Gln Ala Glu Asp Val Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Asn

85 90 95

Asp Tyr Thr Tyr Pro Leu Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile

100 105 110

Lys

<210> 7

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

peptide

<400> 7

Gly Phe Thr Phe Ser Asp Tyr Gly Met Asn

1 5 10

<210> 8

<211> 17

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
peptide

<400> 8

Tyr Ile Ser Ser Gly Arg Gly Asn Ile Tyr Tyr Ala Asp Thr Val Lys

1 5 10 15

Gly

<210> 9

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

peptide

<400> 9

Ser Trp Gly Tyr Phe Asp Val

1 5

<210> 10

<211> 17

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

peptide

<400> 10

Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Asn Arg Gly Asn Gln Lys Asn Tyr Leu

1 5 10 15

Thr

<210> 11

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide

<400> 11

Trp Ala Ser Thr Arg Glu Ser

1 5

<210> 12

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide

<400> 12

Gln Asn Asp Tyr Thr Tyr Pro Leu Thr

1 5

<210> 13

<211> 6

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

6xHis tag

<400> 13

His His His His His

1 5