(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2025-0044188
(43) 공개일자 2025년03월31일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 47/68 (2017.01) *A61P 35/00* (2006.01)
C07D 491/22 (2006.01) *C07K 16/28* (2006.01)
(52) CPC특허분류
A61K 47/68037 (2023.08)
A61K 47/6835 (2017.08)
(21) 출원번호 10-2024-7041224
(22) 출원일자(국제) 2023년05월11일
심사청구일자 없음
(85) 번역문제출일자 2024년12월11일
(86) 국제출원번호 PCT/CN2023/093503
(87) 국제공개번호 WO 2023/217227
국제공개일자 2023년11월16일
(30) 우선권주장
202210515898.0 2022년05월12일 중국(CN)
(뒷면에 계속)

(71) 출원인
하이난 심시어 자이밍 파마슈티컬 컴퍼니 리미티드
중국, 하이난 570311, 슈잉 디스트릭트 하이커우, 야오구 이헝 로드, 넘버 20
(72) 발명자
푸, 야위안
중국, 상하이 201318, 푸동 뉴 디스트릭트, 푸롱화 로드, 레인 118
리, 젠
중국, 상하이 201318, 푸동 뉴 디스트릭트, 푸롱화 로드, 레인 118
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
특허법인씨엔에스(유)

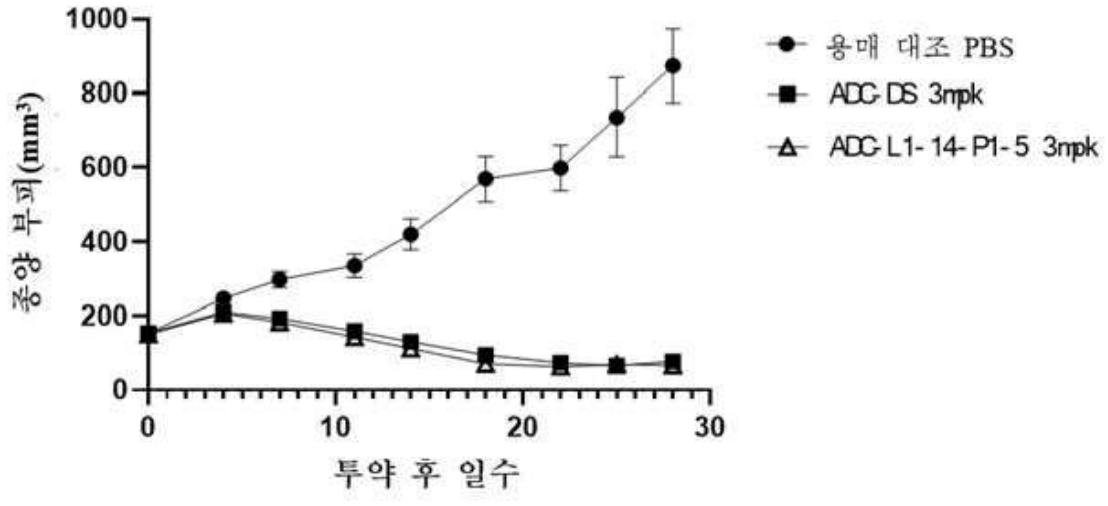
전체 청구항 수 : 총 33 항

(54) 발명의 명칭 **캄프토테신계 유도체 및 리간드-약물 접합체**

(57) 요 약

본 개시는 새로운 구조의 리간드-약물 접합체 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염에 관한 것이며, 구체적으로, 본 개시는 일반 구조식이 Pc-(L-D)n인 리간드-약물 결합체 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염, 이의 제조 방법, 상기 접합체를 함유하는 약학 조성물 및 이의 종양 치료에 있어서의 용도를 제공한다.

대 표 도 - 도2



(52) CPC특허분류
A61K 47/6851 (2017.08)
A61K 47/6889 (2017.08)
A61P 35/00 (2018.01)
C07D 491/22 (2013.01)
C07K 16/28 (2013.01)

(72) 발명자
첸, 창얀
중국, 상하이 201318, 푸동 뉴 디스트릭트, 푸롱화 로드, 레인 118
차이, 샤오쥐안
중국, 상하이 201318, 푸동 뉴 디스트릭트, 푸롱화 로드, 레인 118
위, 지용
중국, 상하이 201318, 푸동 뉴 디스트릭트, 푸롱화 로드, 레인 118
탕, 펑
중국, 상하이 201318, 푸동 뉴 디스트릭트, 푸롱화 로드, 레인 118
차오, 주어샤오
중국, 상하이 201318, 푸동 뉴 디스트릭트, 푸롱화 로드, 레인 118
탕, 런홍
중국, 상하이 201318, 푸동 뉴 디스트릭트, 푸롱화 로드, 레인 118

(30) 우선권주장
202210999585.7 2022년08월19일 중국(CN)
202310406469.4 2023년04월14일 중국(CN)

명 세 서

청구범위

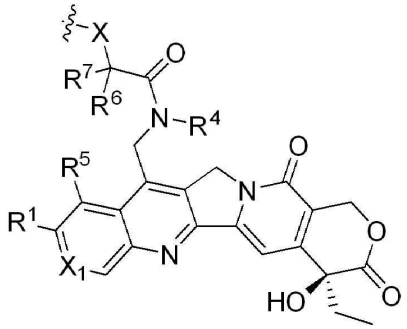
청구항 1

일반 구조식이 Pc-(L-D)$_n$인 리간드-약물 접합체 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염으로서, 여기서:

Pc는 리간드 유닛이고;

L은 링커 유닛이며;

D는 하기 식 (D-I)로 표시되는 약물 유닛이고:



(D-I)

여기서,

X는 NH 또는 O로부터 선택되며;

R^1은 할로겐, CN, C_1-C_6 알킬, C_3-C_6 사이클로알킬 또는 C_2-C_6 알키닐로부터 선택되고, 상기 C_1-C_6 알킬, C_3-C_6 사이클로알킬 또는 C_2-C_6 알키닐은 선택적으로 하나 이상의 R^{a1}에 의해 치환되며;

X_1은 CR^2 또는 N으로부터 선택되고;

R^2는 H, 할로겐, CN으로부터 선택되거나, 또는 R^1, R^2는 이들이 연결된 원자와 함께 5-6원 헤테로사이클릴을 형성하고, 상기 5-6원 헤테로사이클릴은 선택적으로 하나 이상의 R^{a2}에 의해 치환되고;

R^4는 H, C_1-C_3 알킬, C_3-C_6 사이클로알킬 또는 4-7원 헤테로사이클릴로부터 선택되며, 상기 C_1-C_3 알킬, C_3-C_6 사이클로알킬 또는 4-7원 헤테로사이클릴은 선택적으로 하나 이상의 R^{a4}에 의해 치환되고;

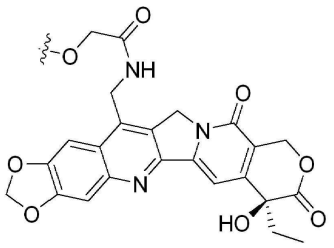
R^5는 H, 할로겐, CN, NH_2 또는 NO_2로부터 선택되거나, 또는 R^1, R^5는 이들이 연결된 원자와 함께 5-6원 헤테로사이클릴, 5-6원 헤테로아릴 또는 C_5-C_7 사이클로알케닐을 형성하며, 상기 5-6원 헤테로사이클릴, 5-6원 헤테로아릴 또는 C_5-C_7 사이클로알케닐은 선택적으로 하나 이상의 R^{a5}에 의해 치환되고;

R^6은 H 또는 C_1-C_3 알킬로부터 선택되고;

R^7은 H, C_1-C_3 알킬 또는 C_3-C_6 사이클로알킬로부터 선택되거나, 또는 R^6, R^7은 이들이 연결된 C 원자와 함께 C_3-C_6 사이클로알킬을 형성하며, 상기 C_3-C_6 사이클로알킬은 선택적으로 하나 이상의 R^{a7}에 의해 치환되고;

각 R^{a1}, R^{a2}, R^{a4}, R^{a5} 및 R^{a7}은 독립적으로 D, 할로겐, CN, =O, OH, NH_2, C_1-C_3 알킬, C_3-C_6 사이클로알킬 또는 4-7원 헤테로사이클릴로부터 선택되며, 상기 OH, NH_2, C_1-C_3 알킬, C_3-C_6 사이클로알킬 또는 4-7원 헤테로사이클릴은 선택적으로 하나 이상의 R^b에 의해 치환되고;

각 R^b는 독립적으로 할로겐, CN, =O, C_1-C_3 알킬, OH, O(C_1-C_3 알킬), NH_2, NH(C_1-C_3 알킬) 또는 N(C_1-C_3 알킬)$_2$로부터 선택되며;

조건은: i) R^1이 메틸로부터 선택되고, R^2가 F로부터 선택되는 경우, R^6, R^7은 이들이 연결된 C 원자와 함께 사이클로프로필을 형성하고; ii) X가 NH로부터 선택되는 경우, R^5는 H로부터 선택되지 않고; iii) 식 (D-I)로 표시되는 화합물은  를 포함하지 않는 것이고;

또한, n은 1~16의 실수인, 리간드-약물 접합체 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염.

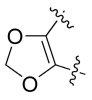
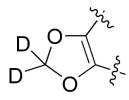
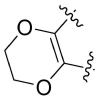
청구항 2

제1항에 있어서, 여기서 R^1은 할로겐, C_1-C_3 알킬, C_3-C_6 사이클로알킬 또는 C_2-C_3 알키닐로부터 선택되는, 리간드-약물 접합체 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염.

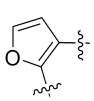
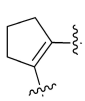
청구항 3

제1항 또는 제2항에 있어서, 여기서 R^2는 H, 할로겐, CN으로부터 선택되거나, 또는 R^1, R^2는 이들이 연결된 원자와 함께 5-6원 헤테로사이클릴을 형성하고, 상기 5-6원 헤테로사이클릴은 고리 원자로서 1 또는 2개의 산소 원자를 함유하고, 상기 5-6원 헤테로사이클릴은 선택적으로 하나 이상의 D 원자에 의해 치환되는, 리간드-약물 접합체 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염.

청구항 4

제1항 또는 제2항에 있어서, 여기서 R^2는 H, F 또는 Cl로부터 선택되거나, 또는 R^1, R^2는 이들이 연결된 원자와 함께  ,  또는  를 형성하는, 리간드-약물 접합체 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염.

청구항 5

제1항 내지 제4항 중 어느 한 항에 있어서, 여기서 R^5는 H, Cl, F, NH_2 또는 NO_2로부터 선택되거나, 또는 R^1, R^5는 이들이 연결된 원자와 함께  또는  를 형성하는, 리간드-약물 접합체 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염.

청구항 6

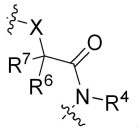
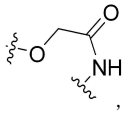
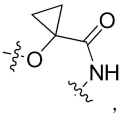
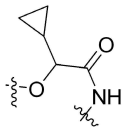
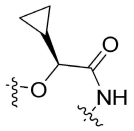
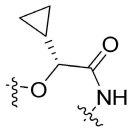
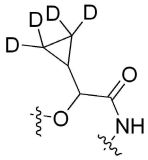
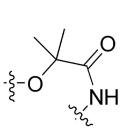
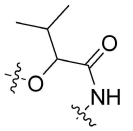
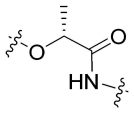
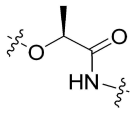
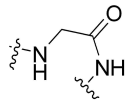
제1항 내지 제5항 중 어느 한 항에 있어서, 여기서 R^4는 H 또는 C_1-C_3 알킬로부터 선택되는, 리간드-약물 접합체

또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염.

청구항 7

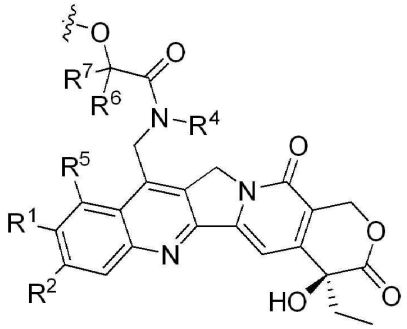
제1항 내지 제6항 중 어느 한 항에 있어서, 여기서 R^7은 H, C_1-C_3 알킬 또는 선택적으로 하나 이상의 D에 의해 치환된 C_3-C_6 사이클로알킬로부터 선택되거나, 또는 R^6, R^7은 이들이 연결된 C 원자와 함께 C_3-C_6 사이클로알킬을 형성하는, 리간드-약물 접합체 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염.

청구항 8

제1항 내지 제7항 중 어느 한 항에 있어서, 여기서 구조 유닛  는  ,  ,  ,  ,  ,  ,  ,  ,  ,  , 또는  로부터 선택되는, 리간드-약물 접합체 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염.

청구항 9

제1항 내지 제8항 중 어느 한 항에 있어서, 여기서 식 (D-I)로 표시되는 약물 유닛은 식 (D-Ia)로 표시되는 약물 유닛으로부터 선택되고:

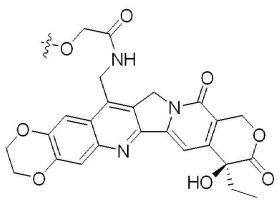


(D-Ia)

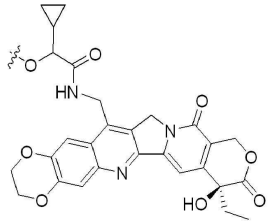
여기서, R^1, R^2, R^4, R^5, R^6, R^7은 제1항 내지 제8항 중 어느 한 항에 정의된 바와 같은, 리간드-약물 접합체 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염.

청구항 10

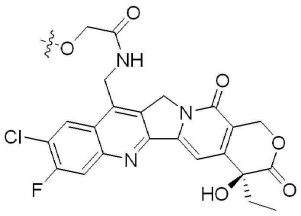
제1항 내지 제9항 중 어느 한 항에 있어서, 여기서 식 (D-I)로 표시되는 화합물은 하기로부터 선택되는, 리간드-약물 접합체 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염:



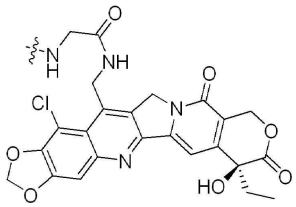
1'



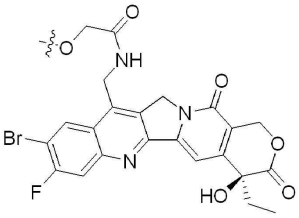
2'



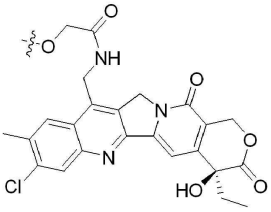
3'



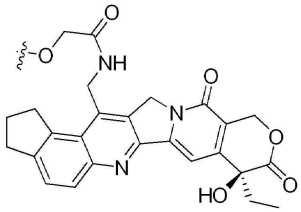
4'



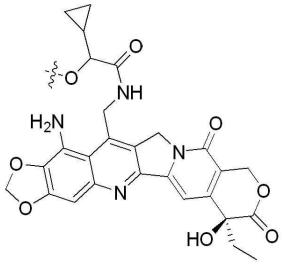
5'



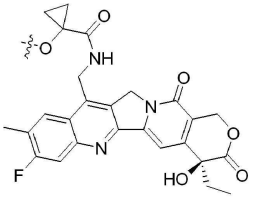
6'



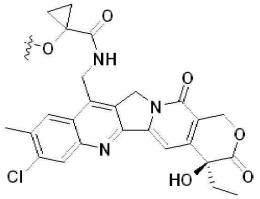
7'



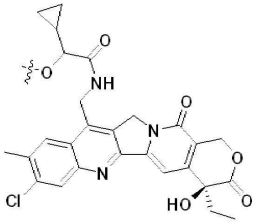
8'



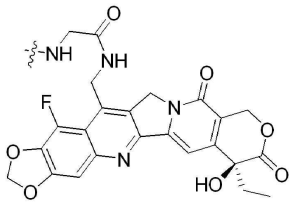
9'



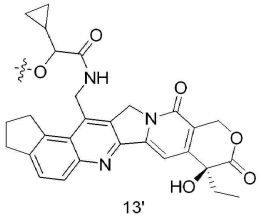
10'



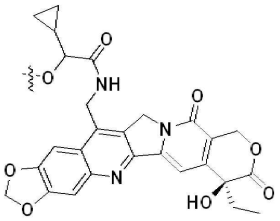
11'



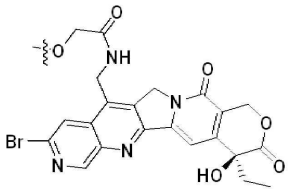
12'



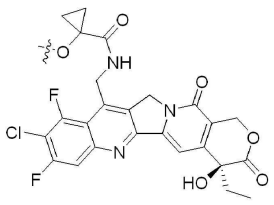
13'



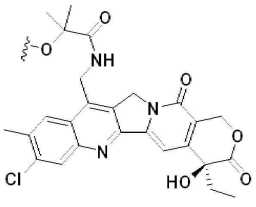
14'



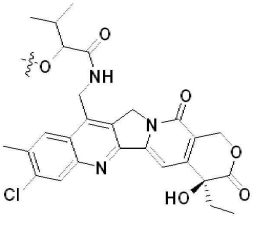
15'



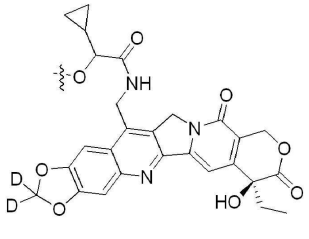
16'



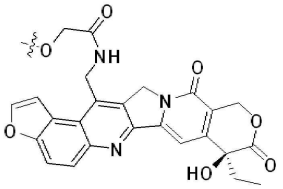
17'



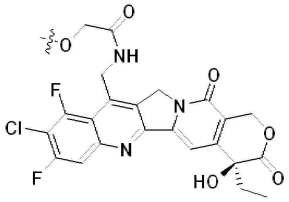
18'



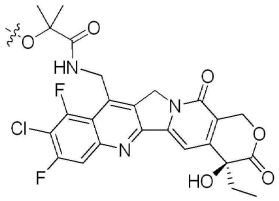
19'



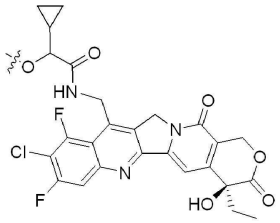
20'



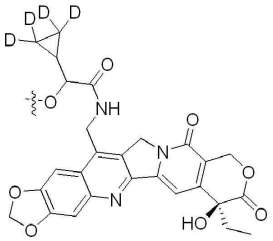
21'



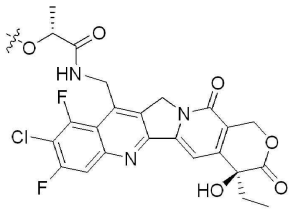
22'



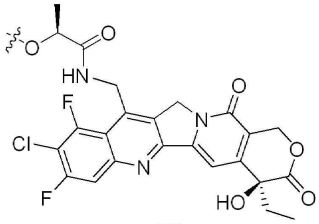
23'



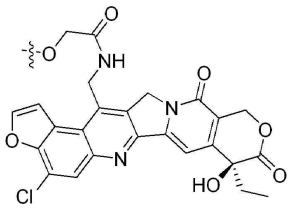
24'



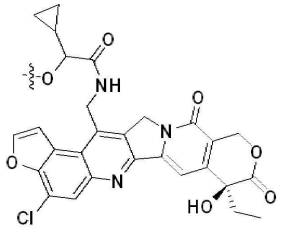
25'



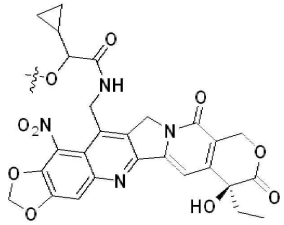
26'



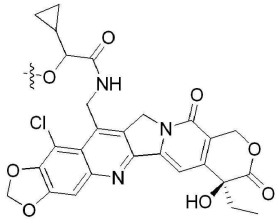
27'



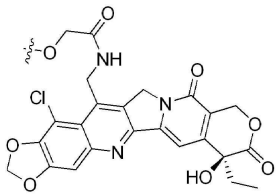
28'



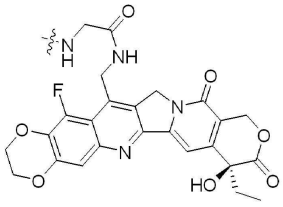
29'



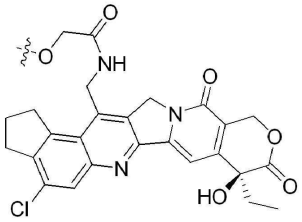
30'



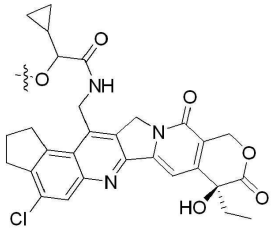
31'



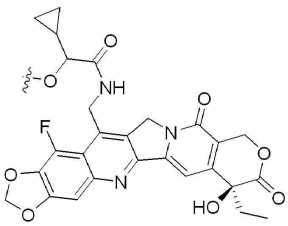
32'



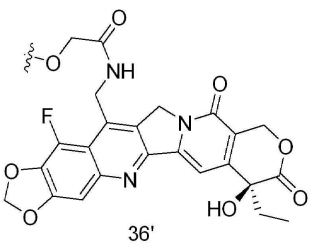
33'



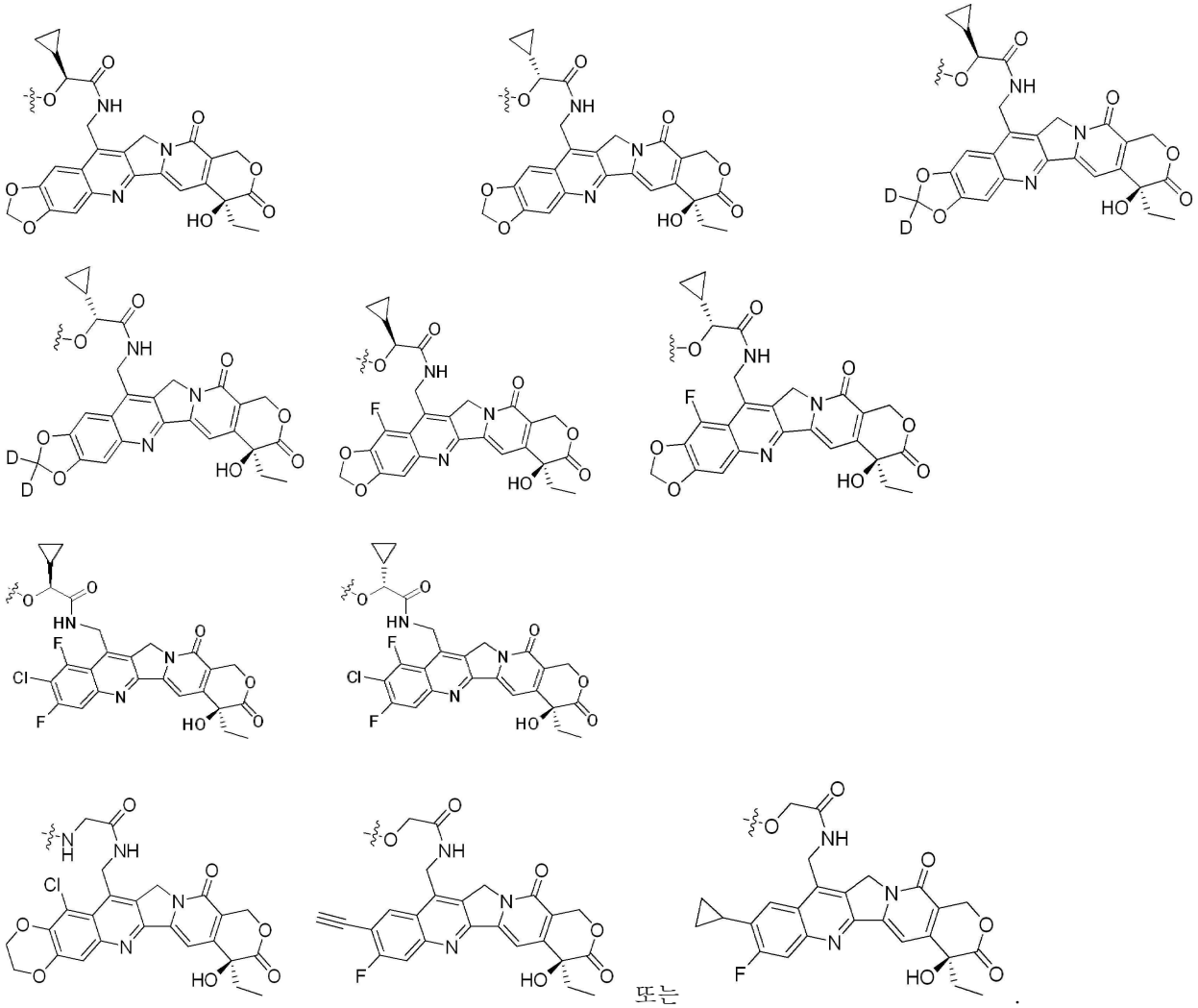
34'



35'



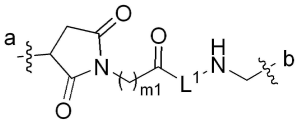
36'

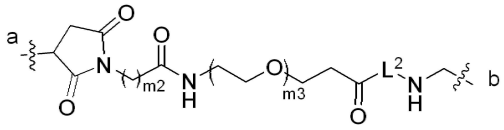


또는

.

청구항 11

제1항 내지 제10항 중 어느 한 항에 있어서, 여기서 링커 유닛 L은  또는



로부터 선택되고, 이의 a 단은 리간드 유닛 Pc에 공유적으로 연결되고, b 단은 약물 유닛 D에 공유적으로 연결되며, 여기서, m1, m2는 각각 독립적으로 정수 2~8로부터 선택되고, m3은 정수 1~16으로부터 선택되며, L^1, L^2는 각각 독립적으로 1 내지 8개의 아미노산으로 구성된 펩티드 잔기로부터 선택되고, 상기 펩티드 잔기는 선택적으로 할로겐, CN, =O, C_1-C_6 알킬, OH, O(C_1-C_6 알킬), NH_2, NH(C_1-C_6 알킬), N(C_1-C_6 알킬)$_2$, C_3-C_6 사이클로알킬 및 4-7원 헤테로사이클릴 중 하나 이상의 치환기에 의해 추가로 치환되는, 리간드-약물 접합체 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염.

청구항 12

제11항에 있어서, 상기 L^1, L^2는 각각 독립적으로 2, 3 또는 4개의 아미노산으로 구성된 펩티드 잔기로부터 선택되고, 상기 펩티드 잔기는 선택적으로 할로겐, CN, =O, C_1-C_6 알킬, OH, O(C_1-C_6 알킬), NH_2, NH(C_1-C_6 알킬), N(C_1-C_6 알킬)$_2$, C_3-C_6 사이클로알킬 및 4-7원 헤테로사이클릴 중 하나 이상의 치환기에 의해 추가로 치환되는,

리간드-약물 접합체 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염.

청구항 13

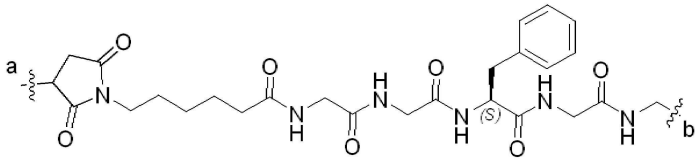
제11항 또는 제12항에 있어서, 상기 L^1은 Gly-Gly-Phe-Gly 테트라펩티드 잔기 또는 Ala-Ala-Ala 트리펩티드 잔기이고, 상기 L^2는 Gly-Gly-Phe-Gly 테트라펩티드 잔기 또는 Val-Lys 디펩티드 잔기인, 리간드-약물 접합체 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염.

청구항 14

제11항 내지 제13항 중 어느 한 항에 있어서, 여기서 m1은 5로부터 선택되고, m2는 2로부터 선택되며, m3은 8로부터 선택되는, 리간드-약물 접합체 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염.

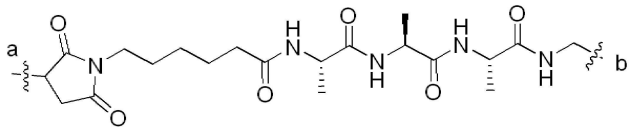
청구항 15

제11항 내지 제14항 중 어느 한 항에 있어서, 여기서 링커 유닛 L은



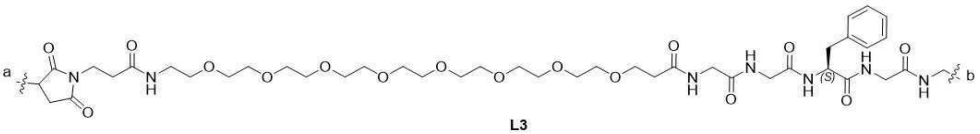
L1

,

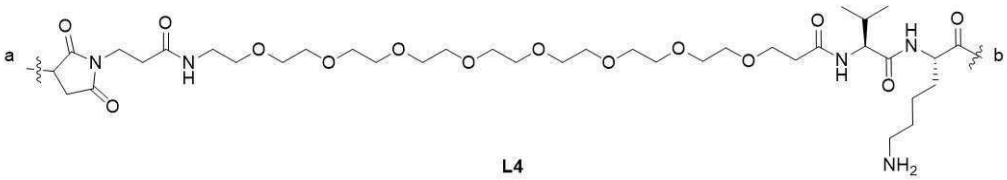


L2

,



L3

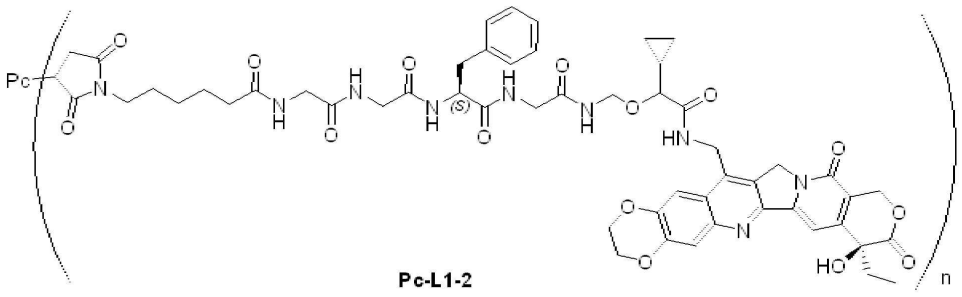


L4

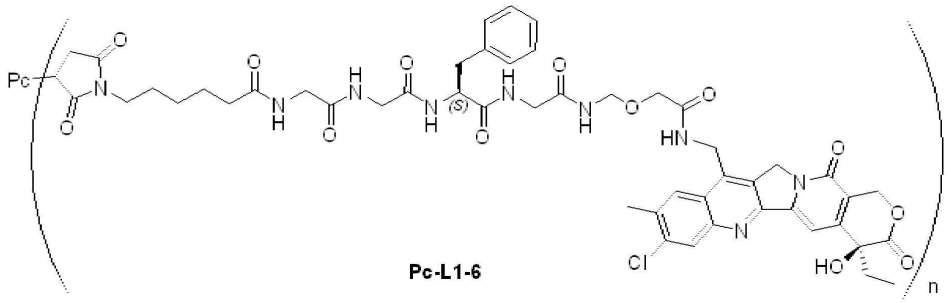
또는 로부터 선택되고, 이의 a 단은 리간드 유닛 Pc에 공유적으로 연결되고, b 단은 약물 유닛 D에 공유적으로 연결되는, 리간드-약물 접합체 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염.

청구항 16

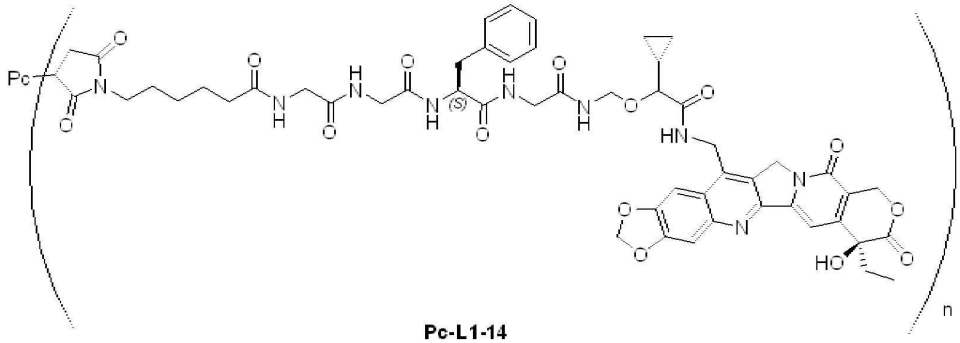
제1항 내지 제15항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 리간드-약물 접합체 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염은 하기 리간드-약물 접합체 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염으로부터 선택되고:



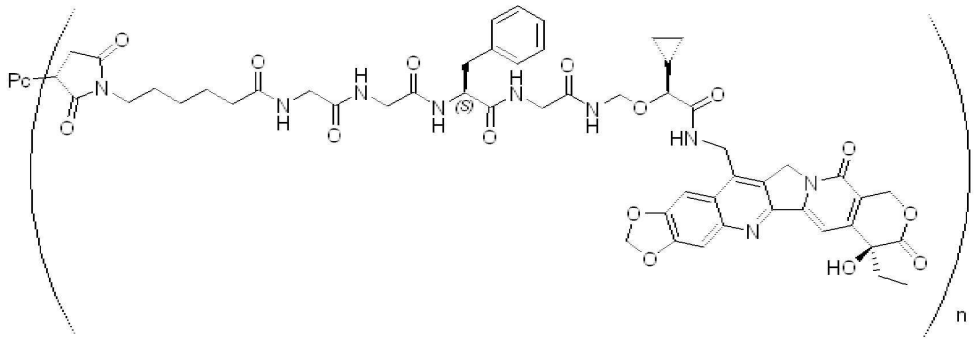
Pc-L1-2

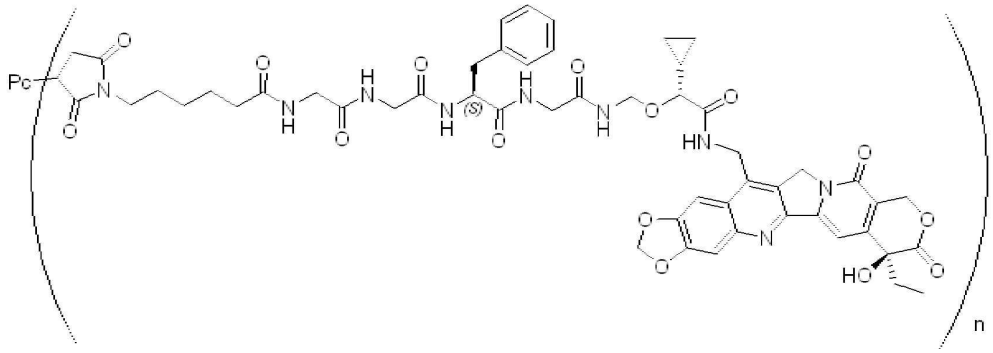


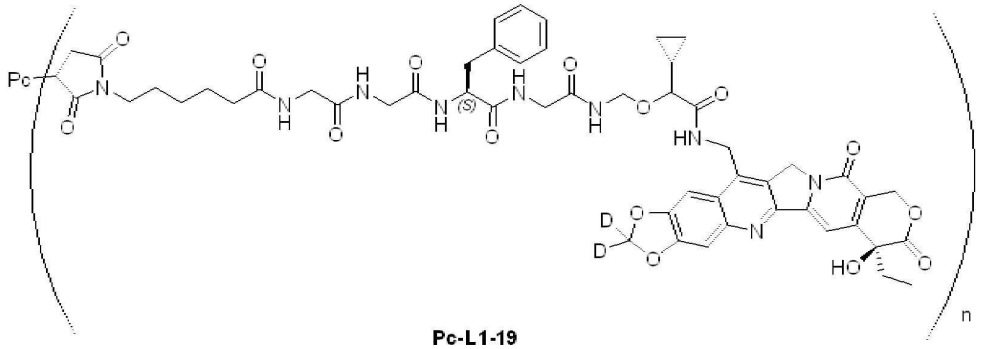
Pc-L1-6



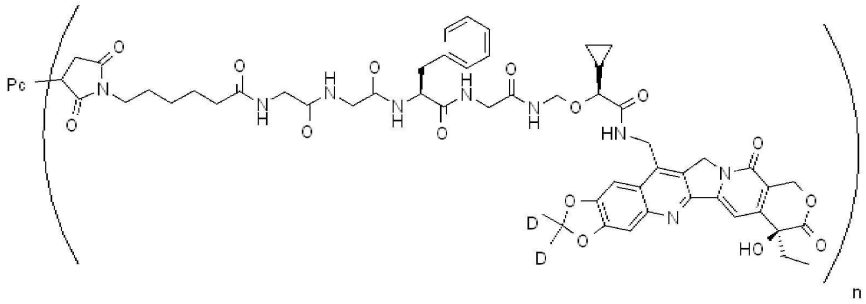
Pc-L1-14



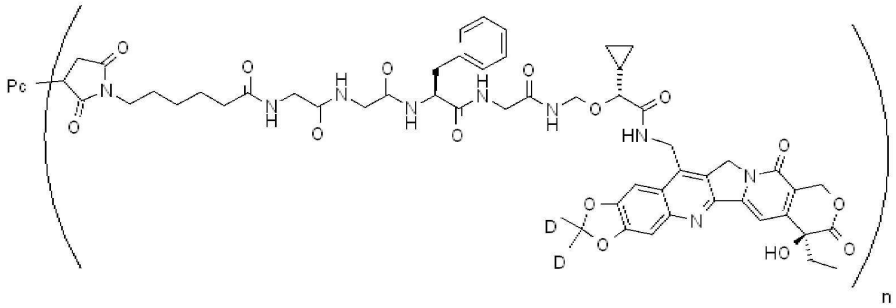




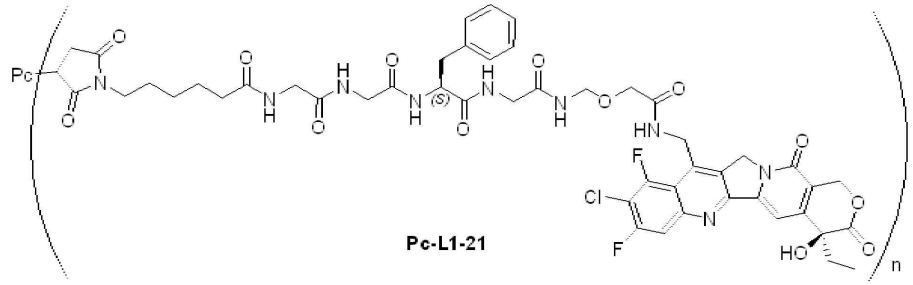
Pc-L1-19



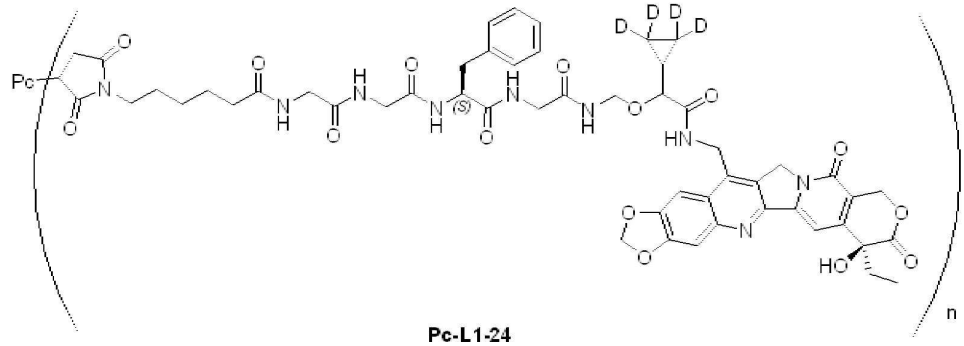
Pc-L1-19-P1



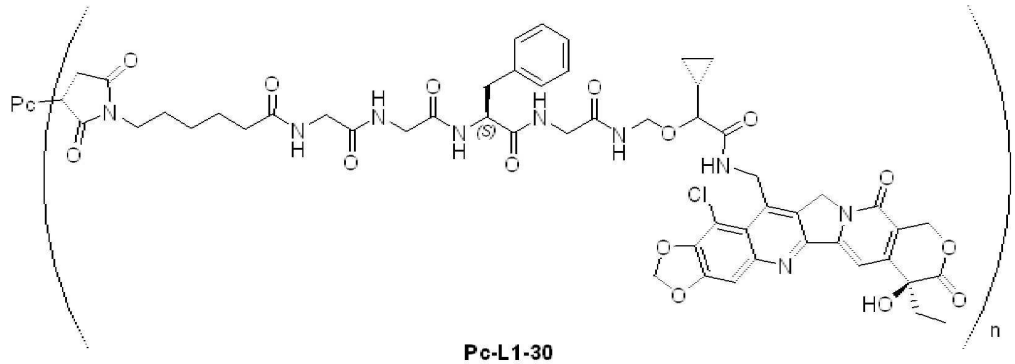
Pc-L1-19-P2



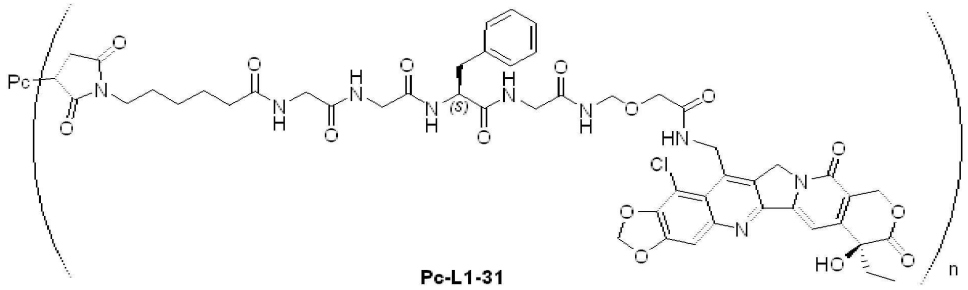
Pc-L1-21



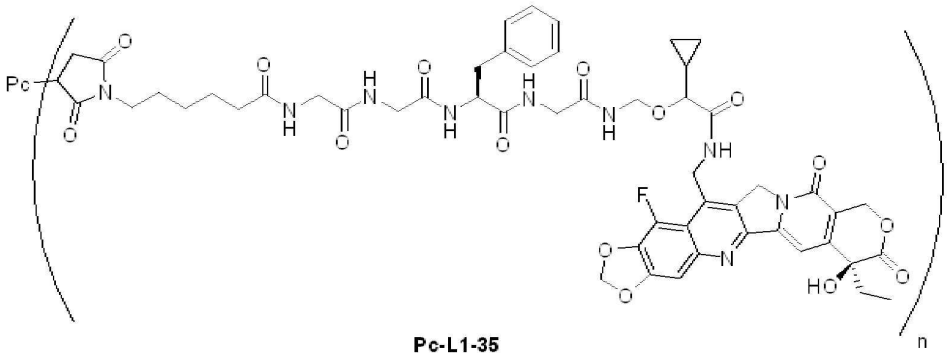
Pc-L1-24



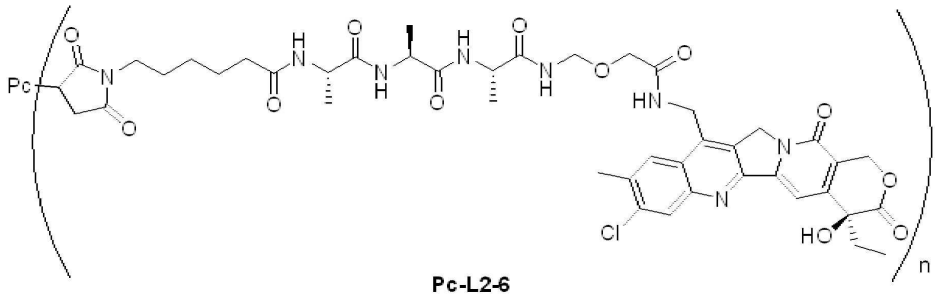
Pc-L1-30



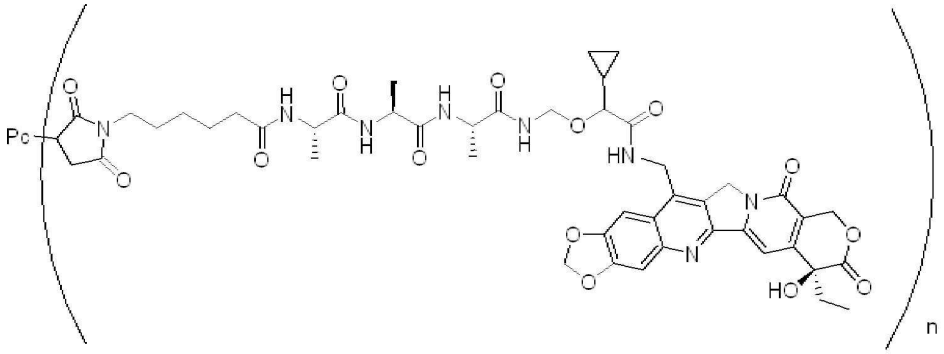
Pc-L1-31



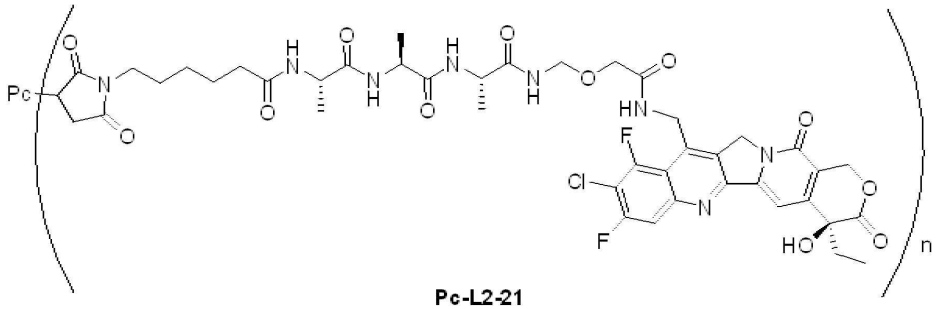
Pc-L1-35



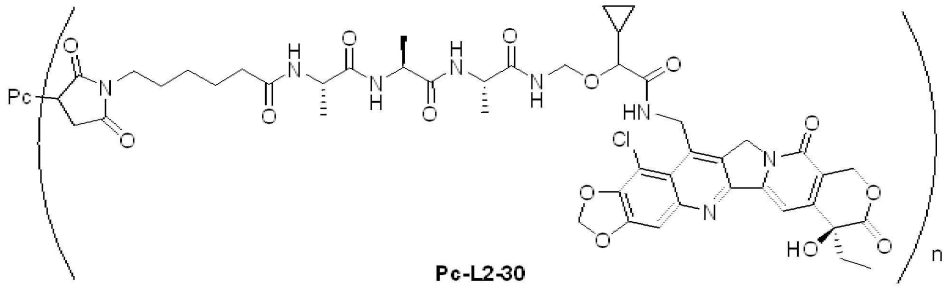
Pc-L2-6



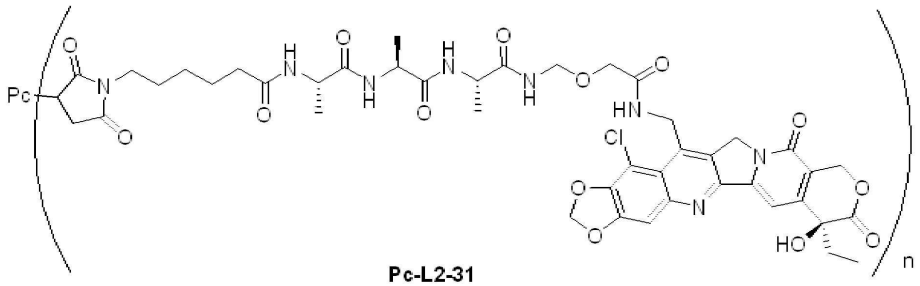
Pc-L2-14



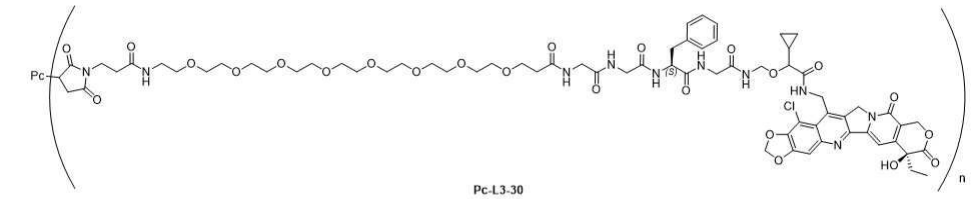
Pc-L2-21



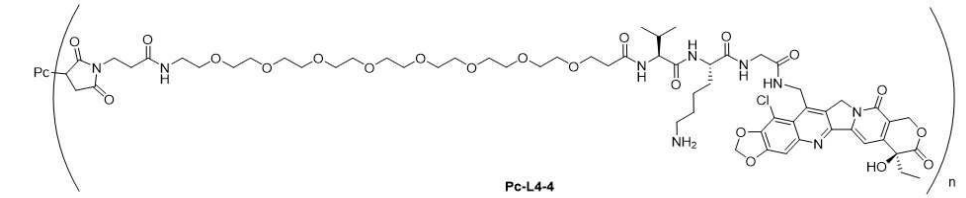
Pc-L2-30



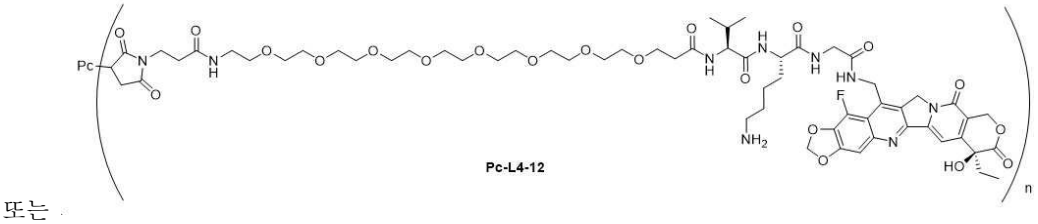
Pc-L2-31



Pc-L3-30



Pc-L4-4



Pc-L4-12

또는

여기서 Pc 및 n은 제1항에 정의된 바와 같은, 리간드-약물 접합체 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염.

청구항 17

제1항 내지 제16항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 리간드 유닛 Pc는 폴리펩티드, 항체 또는 이의 항원 결합 단편으로부터 선택되는, 리간드-약물 접합체 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염.

청구항 18

제1항 내지 제17항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 리간드 유닛 Pc는 HER2, p95HER2, HER3, CD3, CD16, ROR1, DLL3, CDH6, CD70, CD5, CD20, BCMA, EGFR, VEGF 및 LIV-1로 이루어진 군으로부터 선택되는 하나 이상의 항원에 특이적으로 결합할 수 있는, 리간드-약물 접합체 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염.

청구항 19

제17항 또는 제18항에 있어서, 상기 Pc는 HER2, p95HER2, CDH6, ROR1 또는 LIV-1에 특이적으로 결합하는 항체 또는 이의 항원 결합 단편이고; 상기 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 중쇄 가변 영역(VH) 또는/및 경쇄 가변 영역(VL)을 포함하고, 선택적으로, 여기서: (1) 상기 중쇄 가변 영역은 SEQ ID NO: 1, 3, 19, 21, 37, 46, 54, 56, 71, 80, 82 또는 84에 제시된 VH에 함유된 HCDR1, HCDR2 및 HCDR3을 포함하고; 또는/및 상기 경쇄 가변 영역은 서열이 SEQ ID NO: 2, 4, 20, 22, 38, 47, 55, 57, 72, 81, 83 또는 85에 제시된 VL에 함유된 LCDR1, LCDR2 및 LCDR3을 포함하거나; 또는 (2) 상기 중쇄 가변 영역 또는/및 상기 경쇄 가변 영역은 그룹 (1)의 상기 HCDR1-3 또는/및 LCDR1-3의 각 CDR에 비해, 적어도 80%의 동일성을 갖는 아미노산, 또는 최대 3개의 삽입, 결실 또는 대체 돌연변이를 갖는 아미노산 서열을 포함하는, 리간드-약물 접합체 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염.

청구항 20

제19항에 있어서, 상기 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 중쇄 가변 영역(VH) 또는/및 경쇄 가변 영역(VL)을 포함하고, 상기 중쇄 가변 영역은 HCDR1, HCDR2 및 HCDR3을 포함하고, 또는/및 상기 경쇄 가변 영역은 LCDR1, LCDR2 및 LCDR3을 포함하며, 상기 HCDR1-3 또는/및 상기 LCDR1-3은 하기로부터 선택되고;

(1) 상기 HCDR1-3은 SEQ ID NO: 7-9이며; 또는/및 상기 LCDR1-3은 SEQ ID NO: 10-12이며;

(2) 상기 HCDR1-3은 SEQ ID NO: 13-15이며; 또는/및 상기 LCDR1-3은 SEQ ID NO: 16-18이며;

(3) 상기 HCDR1-3은 SEQ ID NO: 23-25이며; 또는/및 상기 LCDR1-3은 SEQ ID NO: 26-28이며;

(4) 상기 HCDR1-3은 SEQ ID NO: 29-31이며; 또는/및 상기 LCDR1-3은 SEQ ID NO: 32-34이며;

(5) 상기 HCDR1-3은 SEQ ID NO: 40-42이며; 또는/및 상기 LCDR1-3은 SEQ ID NO: 43-45이며;

(6) 상기 HCDR1-3은 SEQ ID NO: 48-50이며; 또는/및 상기 LCDR1-3은 SEQ ID NO: 51-53이며;

(7) 상기 HCDR1-3은 SEQ ID NO: 58-60이며; 또는/및 상기 LCDR1-3은 SEQ ID NO: 61-63이며;

(8) 상기 HCDR1-3은 SEQ ID NO: 64-66이며; 또는/및 상기 LCDR1-3은 SEQ ID NO: 67-69이며;

(9) 상기 HCDR1-3은 SEQ ID NO: 74-76이며; 또는/및 상기 LCDR1-3은 SEQ ID NO: 77-79이며;

(10) 상기 HCDR1-3은 SEQ ID NO: 86-88이며; 또는/및 상기 LCDR1-3은 SEQ ID NO: 89-91이며;

(11) 상기 HCDR1-3은 SEQ ID NO: 92-94이며; 또는/및 상기 LCDR1-3은 SEQ ID NO: 95-97이며;

(12) 상기 HCDR1-3은 SEQ ID NO: 98-100이며; 또는/및 상기 LCDR1-3은 SEQ ID NO: 101-103이거나; 또는

(13) 상기 HCDR1-3 또는/및 상기 LCDR1-3은 그룹 (1)~(12) 중 어느 한 그룹에 기재된 HCDR1-3 또는/및 LCDR1-3의 각 CDR에 비해, 적어도 80%의 동일성을 갖거나 최대 3개의 삽입, 결실 또는 대체 돌연변이를 갖는 아미노산 서열을 가지는, 리간드-약물 접합체 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염.

청구항 21

제17항 또는 제18항에 있어서, 상기 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 중쇄 가변 영역(VH) 또는/및 경쇄 가변 영역(VL)을 포함하고, 상기 중쇄 가변 영역은 SEQ ID NO: 1, 3, 19, 21, 37, 46, 54, 56, 71, 80, 82 또는 84에 제시된 아미노산 서열을 포함하고, 또는/및 상기 경쇄 가변 영역은 SEQ ID NO: 2, 4, 20, 22, 38, 47, 55, 57, 72, 81, 83 또는 85에 제시된 아미노산 서열을 포함하거나; 또는 상기 중쇄 가변 영역 및 상기 경쇄 가변 영역은 상술한 임의의 중쇄 가변 영역 및 경쇄 가변 영역에 비해, 적어도 80%의 동일성을 갖는 아미노산 서열을 각각 포함하는, 리간드-약물 접합체 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염.

청구항 22

제17항 내지 제21항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 항체 또는 항원 결합 단편은 중쇄 불변 영역 서열 및/또는 경쇄 불변 영역 서열을 포함하고, 선택적으로, 상기 중쇄 불변 영역 및/또는 경쇄 불변 영역은 온전한 불변 영역 서열 또는 이의 단편으로부터 선택되며, 상기 불변 영역 단편은 CH1, 힌지 영역, CH2, CH3 또는 Fc를 포함하고; 선택적으로, 상기 중쇄 불변 영역은 인간 또는 마우스 IgG1, IgG2, IgG3 또는 IgG4 불변 영역으로부터 선택되고, 상기 경쇄 불변 영역은 인간 또는 마우스 kappa 불변 영역 또는 lamda 불변 영역으로부터 선택되며; 선택적으로, 상기 항체 또는 항원 결합 단편은 온전한 중쇄 및 경쇄를 포함하고, 상기 중쇄는 상기 VH 및 중쇄 불변

영역으로 구성되며, 상기 중쇄 불변 영역은 SEQ ID NO: 5, 39 또는 73에 제시된 바와 같은 아미노산 서열을 갖고, 상기 경쇄는 상기 VL 및 경쇄 불변 영역으로 구성되며, 상기 경쇄 불변 영역은 SEQ ID NO: 6에 제시된 바와 같은 아미노산 서열을 갖는, 리간드-약물 접합체 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염.

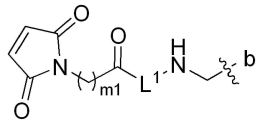
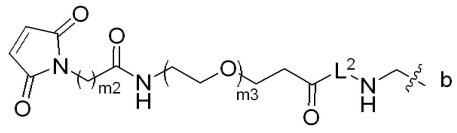
청구항 23

제17항 내지 제22항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 항체는 Trastuzumab, Pertuzumab 또는 Rituximab으로부터 선택되는, 리간드-약물 접합체 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염.

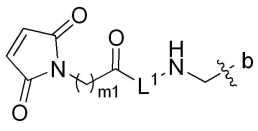
청구항 24

일반 구조식이 L'-D인 약물-링커 화합물 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염으로서, 여기서:

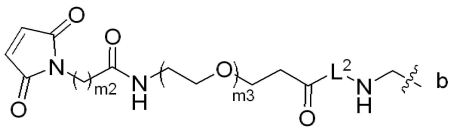
약물 유닛 D는 제1항 내지 제10항 중 어느 한 항에 정의된 바와 같고;

링커 유닛 L'는  또는  로부터 선택되고, 이의 b 단은 약물 유닛 D에 공유적으로 연결되고, L^1, L^2, m1, m2 및 m3은 제11항 내지 제15항 중 어느 한 항에 정의된 바와 같은, 약물-링커 화합물 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염.

청구항 25

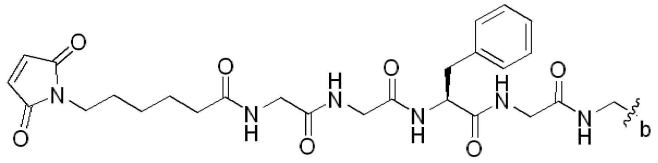
제24항에 있어서, 여기서 L'는  로부터 선택되고, 이의 b 단은 약물 유닛 D에 공유적으로 연결되며, m1은 5로부터 선택되고, L^1은 Gly-Gly-Phe-Gly 테트라펩티드 잔기 또는 Ala-Ala-Ala 트리펩티드 잔기로부터 선택되는, 약물-링커 화합물 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염.

청구항 26

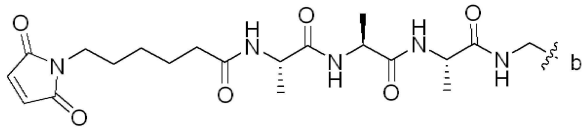
제24항에 있어서, 여기서 L'는  로부터 선택되고, 이의 b 단은 약물 유닛 D에 공유적으로 연결되고, m2는 2로부터 선택되고, m3은 8로부터 선택되며, L^2는 Gly-Gly-Phe-Gly 테트라펩티드 잔기 또는 Val-Lys 디펩티드 잔기로부터 선택되는, 약물-링커 화합물 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염.

청구항 27

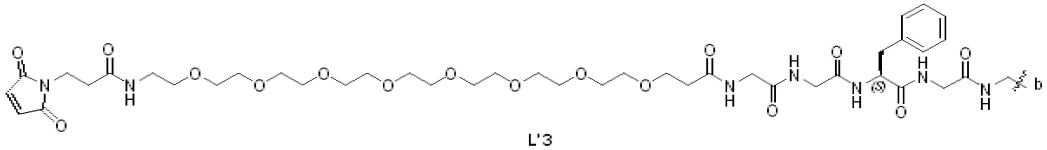
제24항 내지 제26항 중 어느 한 항에 있어서, 여기서 L'는 하기 화학 구조로부터 선택되고:



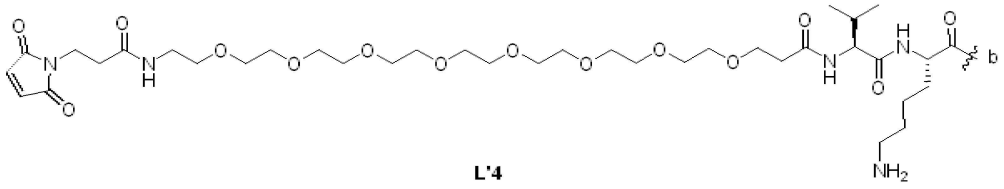
L'1



L'2



L'3

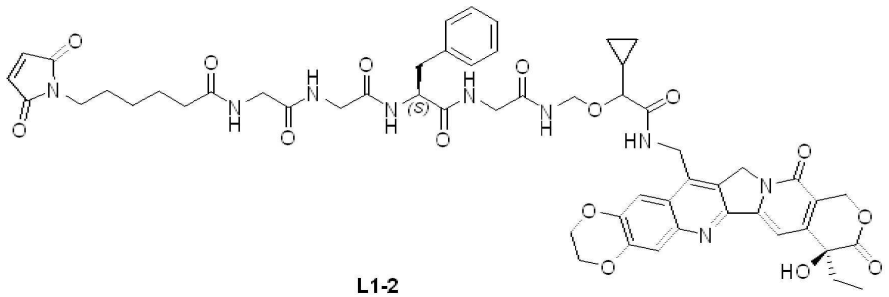


L'4

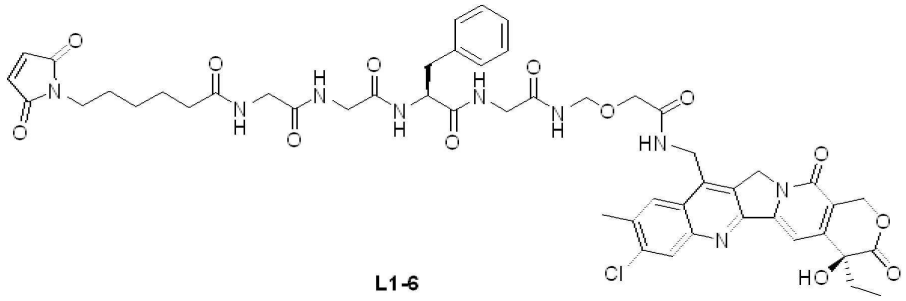
또는 , 이의 b 단은 약물 유닛 D에 공유적으로 연결되는, 약물-링커 화합물 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염.

청구항 28

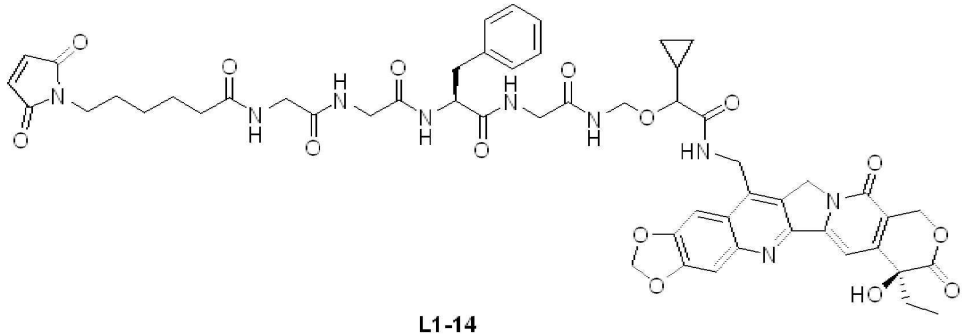
제24항 내지 제27항 중 어느 한 항에 있어서, 하기 화합물 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염으로부터 선택되는, 약물-링커 화합물 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염:



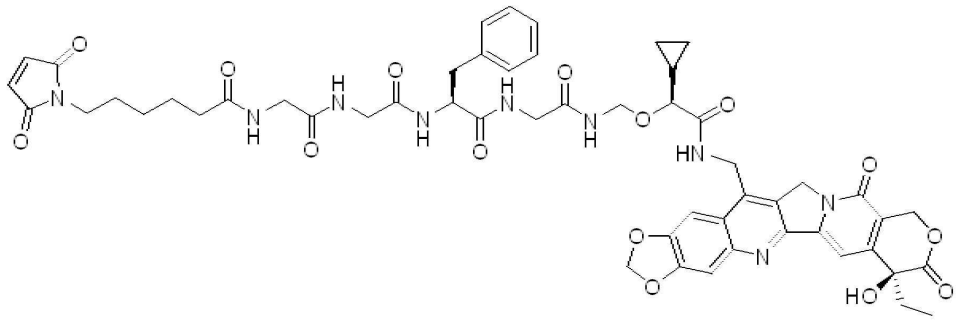
L1-2

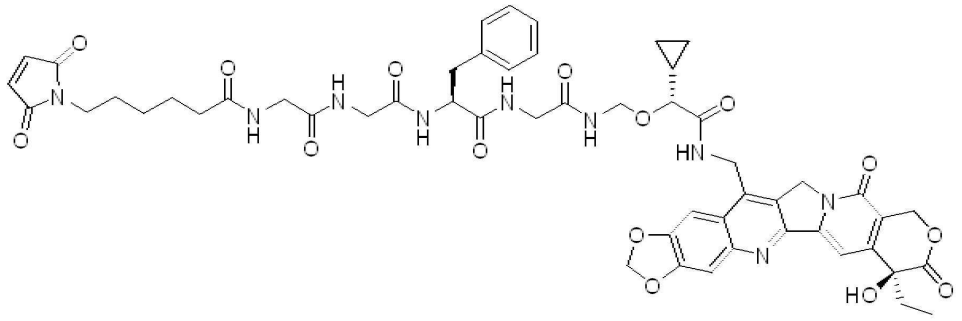


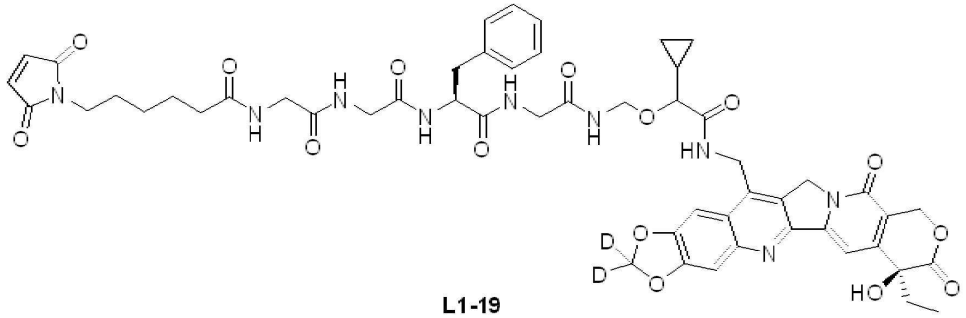
L1-6



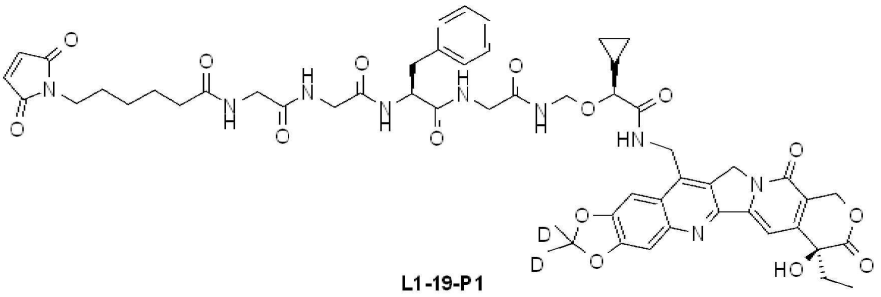
L1-14



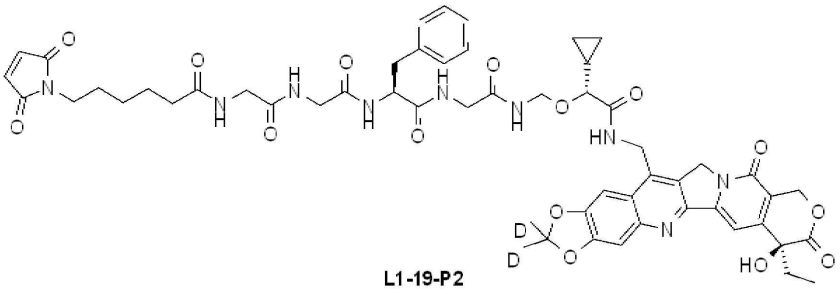




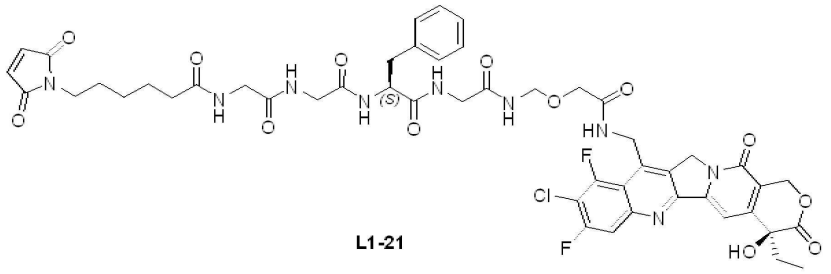
L1-19



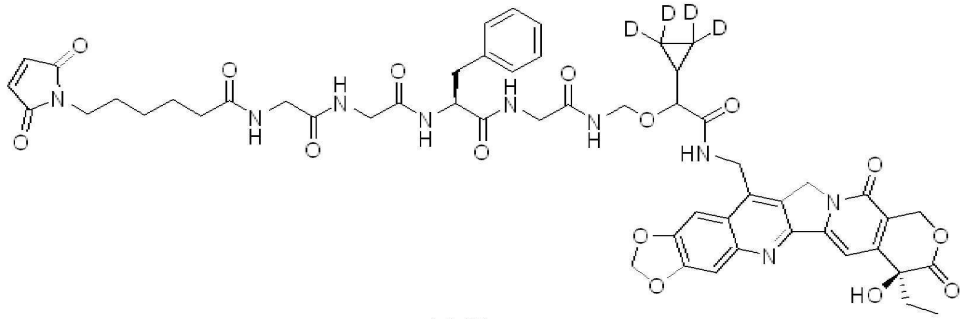
L1-19-P1



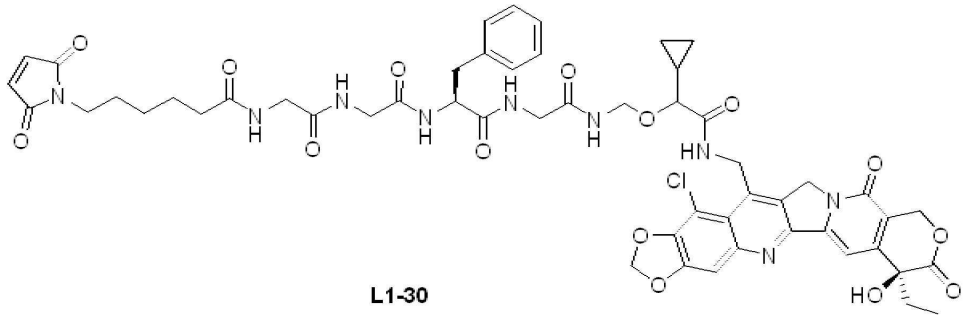
L1-19-P2



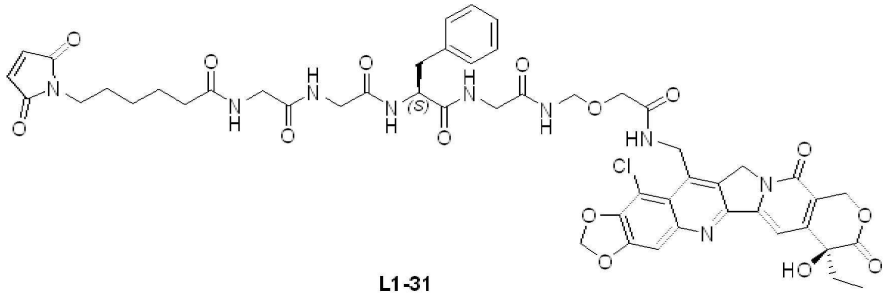
L1-21



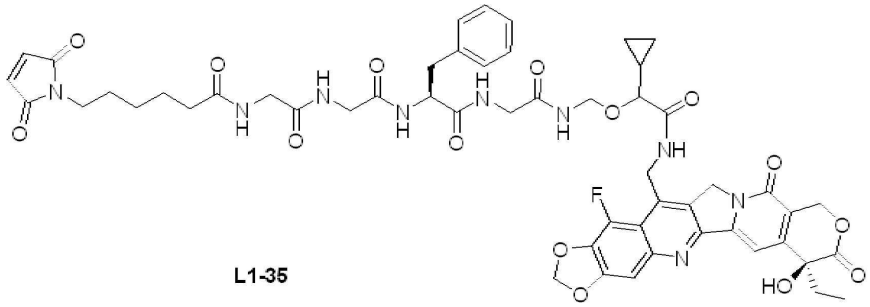
L1-24



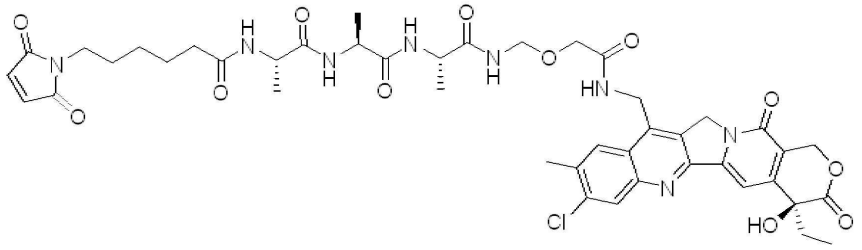
L1-30



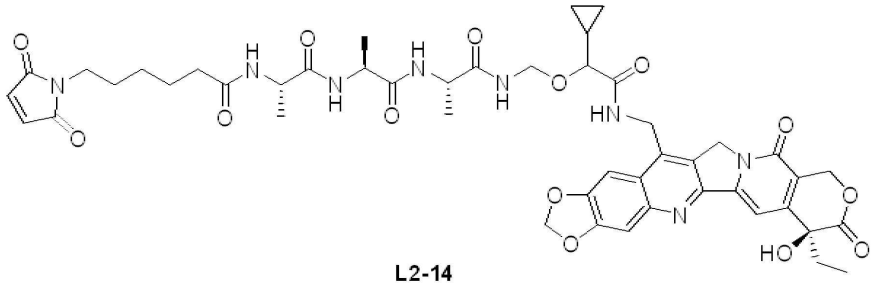
L1-31



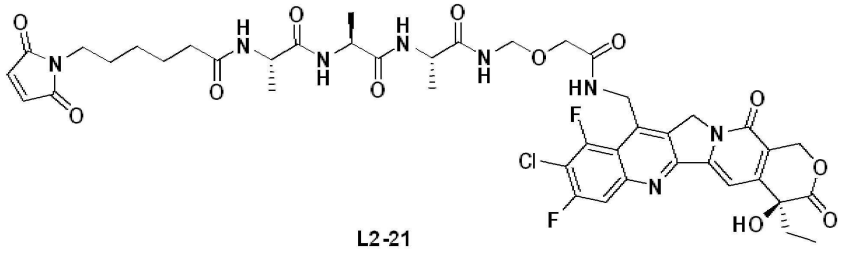
L1-35



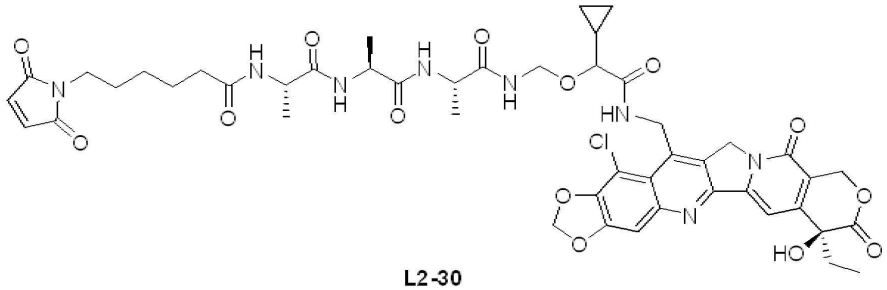
L2-6



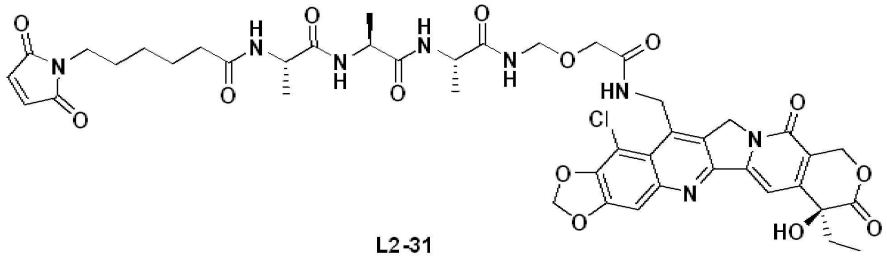
L2-14



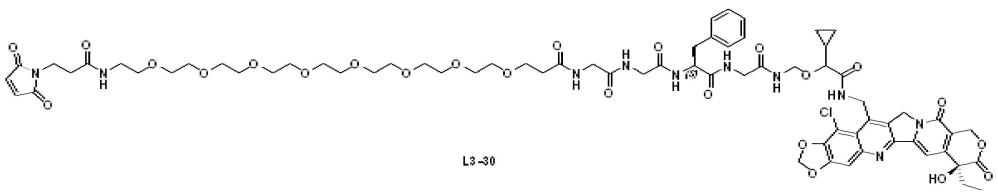
L2-21



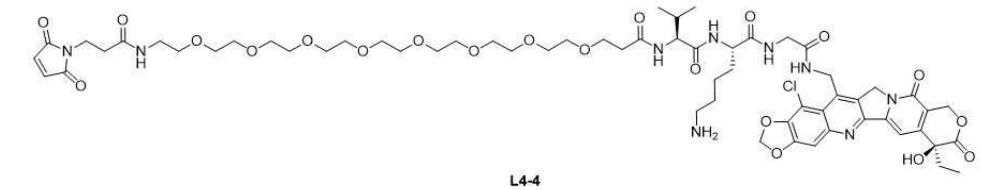
L2-30



L2-31

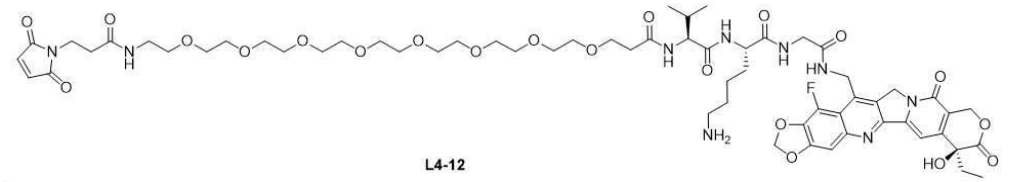


L3-30



L4-4

또는



L4-12

.

청구항 29

제1항 내지 제23항 중 어느 한 항에 따른 리간드-약물 접합체 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염, 및 약학적으로 허용 가능한 부형제를 포함하는, 약학 조성물.

청구항 30

종양을 치료하는 약물의 제조에 있어서, 제1항 내지 제23항 중 어느 한 항에 따른 리간드-약물 접합체 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염, 또는 제29항에 따른 약학 조성물의 용도.

청구항 31

제24항 내지 제28항 중 어느 한 항에 따른 약물-링커 화합물을 리간드와 커플링하는 단계를 포함하고, 선택적으로, 상기 리간드는 항체 또는 이의 항원 결합 단편인, 제1항 내지 제23항 중 어느 한 항에 따른 리간드-약물 접합체 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염을 제조하는 방법.

청구항 32

필요가 있는 피험자의 종양을 치료하는 방법으로서, 제1항 내지 제23항 중 어느 한 항에 따른 리간드-약물 접합체 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염, 또는 제29항에 따른 약학 조성물을 상기 피험자에게 투여하는 단계를 포함하는, 방법.

청구항 33

피험자의 종양을 치료하기 위한, 제1항 내지 제23항 중 어느 한 항에 따른 리간드-약물 접합체 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염, 또는 제29항에 따른 약학 조성물의 용도.

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] **관련 출원에 대한 교차 참조**

[0002] 본 출원은 2022년 5월 12일에 제출된 출원 번호가 202210515898.0인 중국 특허 출원, 2022년 8월 19일에 제출된 출원 번호가 202210999585.7인 중국 특허 출원 및 2023년 4월 14일에 제출된 출원 번호가 202310406469.4인 중국 특허 출원의 우선권을 청구하며, 이러한 특허 출원의 전체 내용은 모든 목적을 위해 인용의 방식을 통해 본 원에 포함된다.

[0003] **기술분야**

[0004] 본 개시는 생물의약적 분야에 속하며, 새로운 구조의 리간드-약물 접합체, 이의 제조 방법, 해당 접합체를 함유하는 약학 조성물 및 항종양 약물로서의 용도에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0005] 항체-약물 접합체(antibody-drug conjugate, ADC)는 새로운 유형의 표적 약물로서, 종양 세포 표면의 항원에 특이적으로 결합하는 단클론 항체를 생물학적 활성을 갖는 독소 분자에 연결함으로써, 항체의 종양 표적 특성과 독소 분자의 고효율적인 살상 작용을 결합하는 동시에, 전자의 작은 치료 효과와 후자의 과한 독성 부작용, 낮은 약물가능성 등의 단점을 피할 수 있다. ADC 약물은 종래의 전통적인 화학요법 약물에 비해 종양 세포를 정확하게 표적화하고 정상 세포에 대한 영향을 줄여 보다 안전하고 효과적인 항종양 효과를 달성할 수 있다.

[0006] 2000년에 성인 급성 골수성 백혈병(AML)의 치료를 위한 최초의 항체-약물 접합체인 Mylotarg(gemtuzumab ozogamicin)는 미국 FDA의 시판 승인을 받았다. 2011년에 미국 FDA는 호지킨 림프종 및 전신 역형성 대세포 림프종의 치료를 위한 새로운 유형의 표적 ADC 약물인 Adcetris(bretuximab vedotin)의 시판을 승인하였다. Mylotarg와 Adcetris는 모두 혈액 종양에 대한 치료 약물이다. 2013년에 Kadcyla(ado-trastuzumab emtansine, T-DM1)는 트라스투주맙(Trastuzumab)과 파클리탁셀에 대해 모두 내약성이 있는 HER2 양성 말기 또는 전이성 유방암의 치료에 사용되는 것으로 미국 FDA로부터 승인을 받았으며, 고형 종양을 치료하는 최초로 승인 받은 ADC 약물이다.

[0007] ADC는 일반적으로 항체, 링커 및 독소의 세 부분으로 구성된다. 캄프토테신계 유도체는 ADC 개발에 응용되는 독소의 한 유형으로 토포이소머라제 I를 억제함으로써 항종양 효과를 달성하게 된다. 다이이치산쿄 회사(Daiichi Sankyo)는 캄프토테신계 유도체인 엑사테칸을 HER2를 표적으로 하는 독소로 채택하여 2019년에 미국 FDA로부터 시판 승인을 받은 ADC 약물 Enhertu(Trastuzumab deruxtecan, DS-8201)를 개발한다. 임상 연구에 따르면 Enhertu는 HER2 양성 유방암, 위암 및 비소세포폐암 등에 대해 비교적 우수한 치료 효과가 있는 것으로 나타난다.

[0008] 현재 여러 가지 ADC 약물이 시판되고 있지만, 여전히 안전성 문제와 내약성 문제가 존재하며 수많은 임상적 수요에 아직 충족하지 못한다. 따라서 당업계는 보다 효과적이고 안전한 ADC 약물을 추가로 개발하는 것이 시급히 필요하다.

발명의 내용

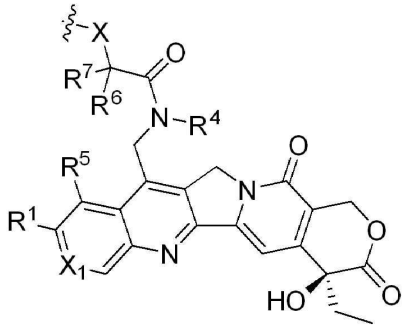
[0009] 본 개시는 일반 구조식이 $Pc-(L-D)_n$인 리간드-약물 접합체 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염을 제공하며,

[0010] 여기서,

[0011] Pc는 리간드 유닛이고;

[0012] L은 링커 유닛이며;

[0013] D는 하기 식 (D-I)로 표시되는 약물 유닛이고:

[0014] 

[0015] (D-I)

[0016] 여기서,

[0017] X는 NH 또는 O로부터 선택되며;

[0018] R^1은 할로겐, CN, C_1-C_6 알킬, C_3-C_6 사이클로알킬 또는 C_2-C_6 알키닐로부터 선택되고, 상기 C_1-C_6 알킬, C_3-C_6 사이클로알킬 또는 C_2-C_6 알키닐은 선택적으로 하나 이상의 R^{a1}에 의해 치환되며;

[0019] X_1은 CR^2 또는 N으로부터 선택되고;

[0020] R^2는 H, 할로겐, CN으로부터 선택되거나, 또는 R^1, R^2는 이들이 연결된 원자와 함께 5-6원 헤테로사이클릴을 형성하고, 상기 5-6원 헤테로사이클릴은 선택적으로 하나 이상의 R^{a2}에 의해 치환되고;

[0021] R^4는 H, C_1-C_3 알킬, C_3-C_6 사이클로알킬 또는 4-7원 헤테로사이클릴로부터 선택되며, 상기 C_1-C_3 알킬, C_3-C_6 사이클로알킬 또는 4-7원 헤테로사이클릴은 선택적으로 하나 이상의 R^{a4}에 의해 치환되고;

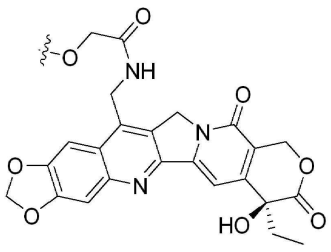
[0022] R^5는 H, 할로겐, CN, NH_2 또는 NO_2로부터 선택되거나, 또는 R^1, R^5는 이들이 연결된 원자와 함께 5-6원 헤테로사이클릴, 5-6원 헤테로아릴 또는 C_5-C_7 사이클로알케닐을 형성하며, 상기 5-6원 헤테로사이클릴, 5-6원 헤테로아릴 또는 C_5-C_7 사이클로알케닐은 선택적으로 하나 이상의 R^{a5}에 의해 치환되고;

[0023] R^6은 H 또는 C_1-C_3 알킬로부터 선택되고;

[0024] R^7은 H, C_1-C_3 알킬 또는 C_3-C_6 사이클로알킬로부터 선택되거나, 또는 R^6, R^7은 이들이 연결된 C 원자와 함께 C_3-C_6 사이클로알킬을 형성하며, 상기 C_3-C_6 사이클로알킬은 선택적으로 하나 이상의 R^{a7}에 의해 치환되고;

[0025] 각 R^{a1}, R^{a2}, R^{a4}, R^{a5} 및 R^{a7}은 독립적으로 D, 할로겐, CN, =O, OH, NH_2, C_1-C_3 알킬, C_3-C_6 사이클로알킬 또는 4-7원 헤테로사이클릴로부터 선택되며, 상기 OH, NH_2, C_1-C_3 알킬, C_3-C_6 사이클로알킬 또는 4-7원 헤테로사이클릴은 선택적으로 하나 이상의 R^b에 의해 치환되고;

[0026] 각 R^b는 독립적으로 할로겐, CN, =O, C_1-C_3 알킬, OH, O(C_1-C_3 알킬), NH_2, NH(C_1-C_3 알킬) 또는 N(C_1-C_3 알킬)$_2$로부터 선택되며;

[0027] 조건은: i) R^1이 메틸로부터 선택되고, R^2가 F로부터 선택되는 경우, R^6, R^7은 이들이 연결된 C 원자와 함께 사이클로프로필을 형성하고; ii) X가 NH로부터 선택되는 경우, R^5는 H로부터 선택되지 않고; iii) 식 (D-I)로 표시되는 화합물은  를 포함하지 않는 것이고;

[0028] 또한, n은 1~16의 실수이다.

[0029] 일부 실시양태에서, 각 R^{a1}, R^{a2}, R^{a4}, R^{a5} 및 R^{a7}은 독립적으로 D, 할로겐, CN, =O, OH, NH_2, C_1-C_3 알킬, C_3-C_6 사이클로알킬 또는 4-7원 헤테로사이클릴로부터 선택된다.

[0030] 일부 실시양태에서, 각 R^{a2} 및 R^{a7}은 독립적으로 D로부터 선택된다.

[0031] 일부 실시양태에서, R^1은 할로겐, C_1-C_3 알킬, C_3-C_6 사이클로알킬 또는 C_2-C_3 알키닐로부터 선택된다.

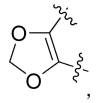
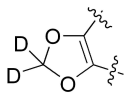
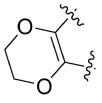
[0032] 일부 실시양태에서, R^1은 Cl, Br, 메틸, 사이클로프로필 또는 에티닐로부터 선택된다.

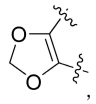
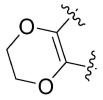
[0033] 일부 실시양태에서, R^1은 Cl, Br 또는 메틸로부터 선택된다.

[0034] 일부 실시양태에서, R^2는 H, 할로겐, CN으로부터 선택되거나, 또는 R^1, R^2는 이들이 연결된 원자와 함께 5-6원

헤테로사이클릴을 형성하며, 상기 5-6원 헤테로사이클릴은 고리 원자로서 1 또는 2개의 산소 원자를 함유하고, 상기 5-6원 헤테로사이클릴은 선택적으로 하나 이상의 D 원자에 의해 치환된다.

[0035] 일부 실시양태에서, R^2는 H, 할로겐, CN으로부터 선택되거나, 또는 R^1, R^2는 이들이 연결된 원자와 함께 5-6원 헤테로사이클릴을 형성하며, 상기 5-6원 헤테로사이클릴은 고리 원자로서 1 또는 2개의 산소 원자를 함유한다.

[0036] 일부 실시양태에서, R^2는 H, F, 또는 Cl로부터 선택되거나, 또는 R^1, R^2는 이들이 연결된 원자와 함께  ,  또는  를 형성한다.

[0037] 일부 실시양태에서, R^2 는 H, F 또는 Cl로부터 선택되거나, 또는 R^1, R^2는 이들이 연결된 원자와 함께  ,  를 형성한다.

[0038] 일부 실시양태에서, R^5는 H, 할로겐, NH_2 또는 NO_2로부터 선택되거나, 또는 R^1, R^5는 이들이 연결된 원자와 함께 5-6원 헤테로아릴 또는 C_5-C_6 사이클로알케닐을 형성하고, 상기 5-6원 헤테로아릴 또는 C_5-C_6 사이클로알케닐은 선택적으로 하나 이상의 R^{a5}에 의해 치환된다.

[0039] 일부 실시양태에서, R^5는 H, Cl, F, NH_2 또는 NO_2로부터 선택되거나, 또는 R^1, R^5는 이들이 연결된 원자와 함께 또는 를 형성한다.

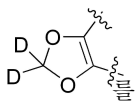
[0040] 일부 실시양태에서, R^4는 H 또는 C_1-C_3 알킬로부터 선택된다.

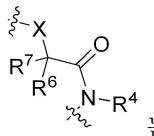
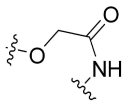
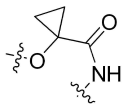
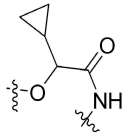
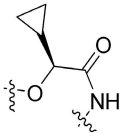
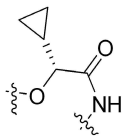
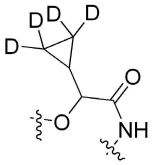
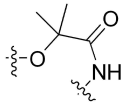
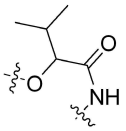
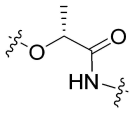
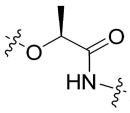
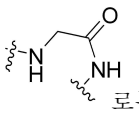
[0041] 일부 실시양태에서, R^4는 H로부터 선택된다.

[0042] 일부 실시양태에서, R^6은 H 또는 메틸로부터 선택된다.

[0043] 일부 실시양태에서, R^7은 H, C_1-C_3 알킬 또는 선택적으로 하나 이상의 D에 의해 치환된 C_3-C_6 사이클로알킬로부터 선택되거나, 또는 R^6, R^7은 이들이 연결된 C 원자와 함께 C_3-C_6 사이클로알킬을 형성한다.

[0044] 일부 실시양태에서, R^7은 H, 메틸, 이소프로필 또는 선택적으로 하나 이상의 D에 의해 치환된 사이클로프로필로부터 선택되거나, 또는 R^6, R^7은 이들이 연결된 C 원자와 함께 사이클로프로필을 형성한다.

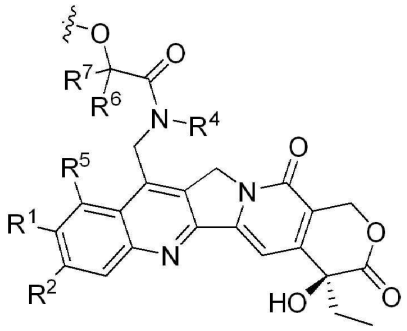
[0045] 일부 실시양태에서, R^1, R^2는 이들이 각각 연결된 원자와 함께 또는  를 형성하고, R^6은 H 또는 메틸로부터 선택되며, R^7은 H, 메틸, 이소프로필 또는 선택적으로 하나 이상의 D에 의해 치환된 사이클로프로필로부터 선택되거나, 또는 R^6, R^7은 이들이 연결된 C 원자와 함께 사이클로프로필을 형성한다.

[0046] 일부 실시양태에서, 구조 유닛  는  ,  ,  ,  ,  ,  ,  ,  ,  ,  , 또는  로부터 선택된다.

[0047] 일부 실시양태에서, R^1은 메틸로부터 선택되고, R^2는 F로부터 선택되며, R^6, R^7은 이들이 연결된 C 원자와 함께 사이클로프로필을 형성한다.

[0048] 일부 실시양태에서, X는 NH로부터 선택되고, R^5는 Cl, F, NH_2 또는 NO_2로부터 선택된다.

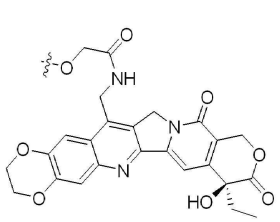
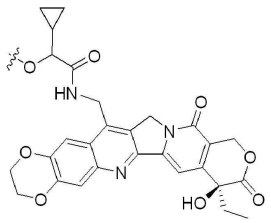
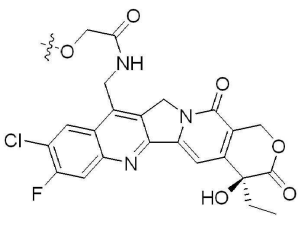
[0049] 일부 실시양태에서, 식 (D-I)로 표시되는 약물 유닛은 식 (D-Ia)로 표시되는 약물 유닛으로부터 선택되며:

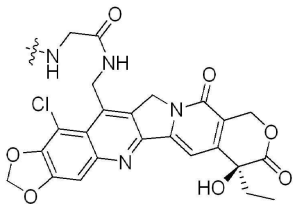
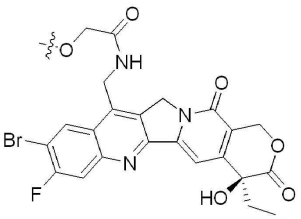
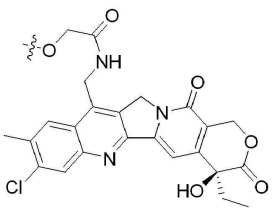
[0050] 

[0051] (D-Ia)

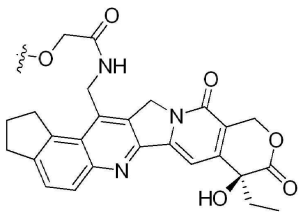
[0052] 여기서, R^1, R^2, R^4, R^5, R^6, R^7은 위에 정의된 바와 같다.

[0053] 일부 실시양태에서, 식 (D-I)로 표시되는 화합물은 하기로 표시되는 화합물로부터 선택된다:

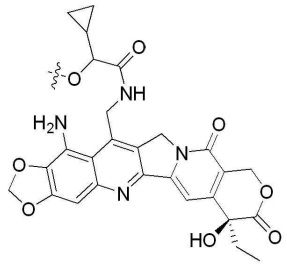
[0054] 
1'

2'

3'

[0055] 
4'

5'

6'

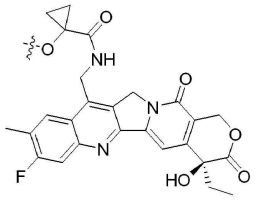
[0056]



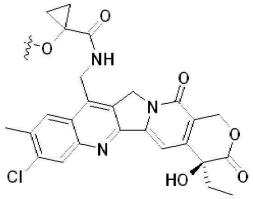
7'



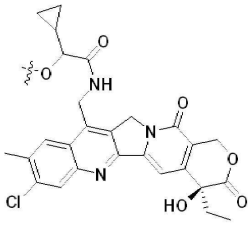
8'



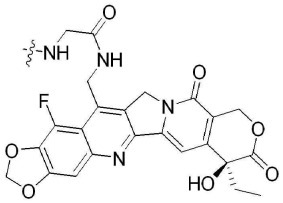
9'



10'

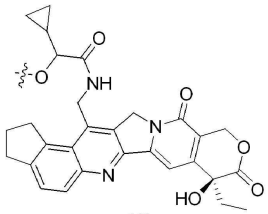


11'

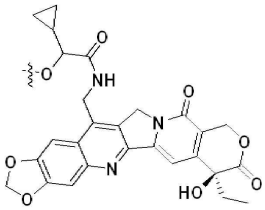


12'

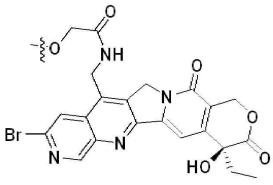
[0057]



13'

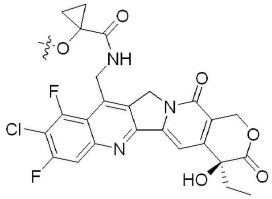


14'

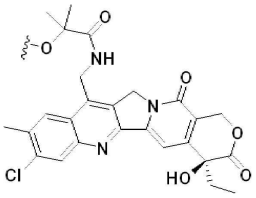


15'

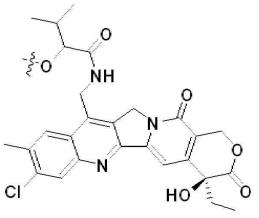
[0058]



16'

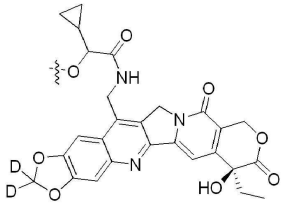


17'

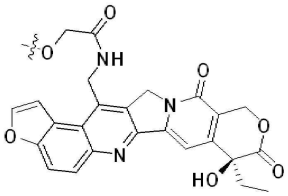


18'

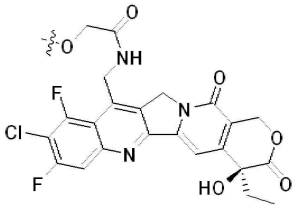
[0059]



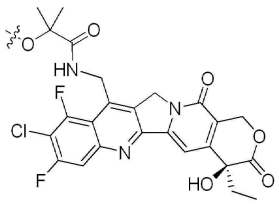
19'



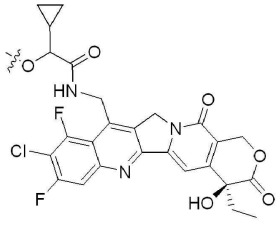
20'



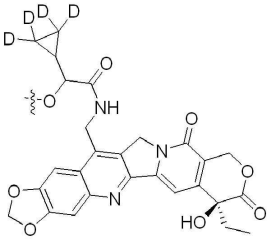
21'



22'

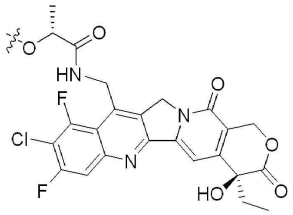


23'

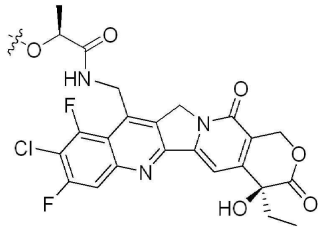


24'

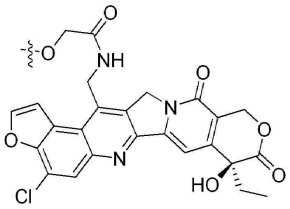
[0060]



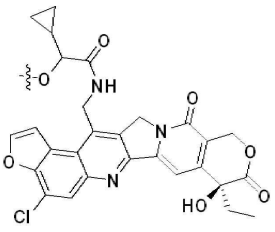
25'



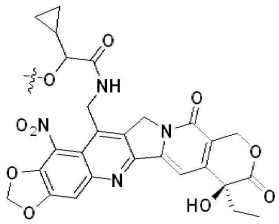
26'



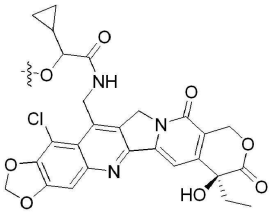
27'



28'

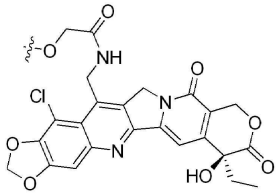


29'

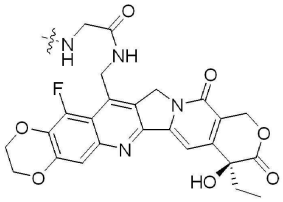


30'

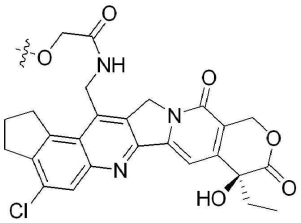
[0061]



31'

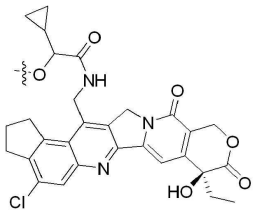


32'

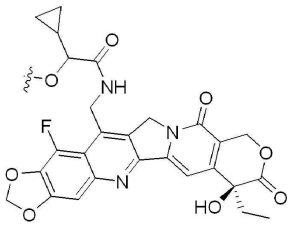


33'

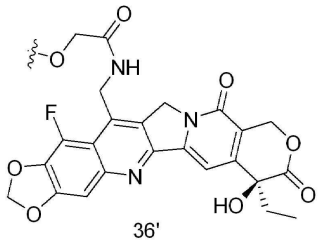
[0062]



34'

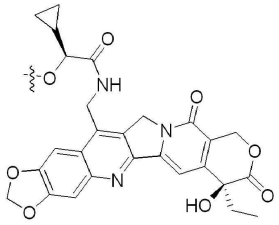


35'

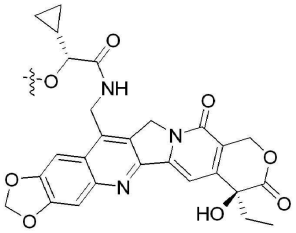


36'

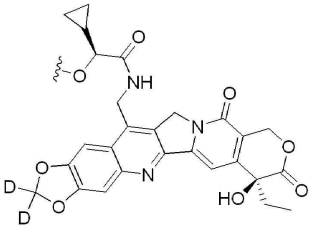
[0063]



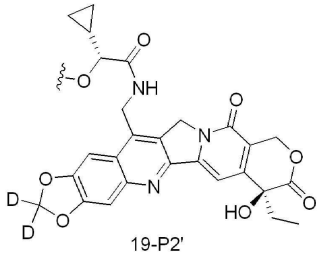
14-P1'



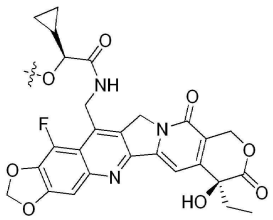
14-P2'

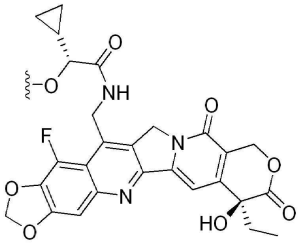


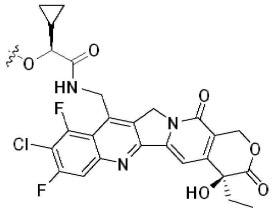
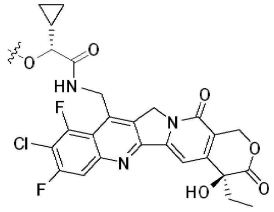
19-P1'

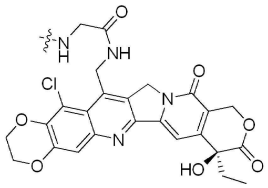
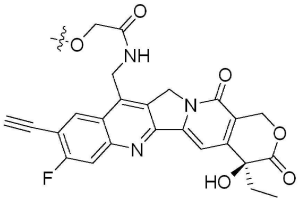
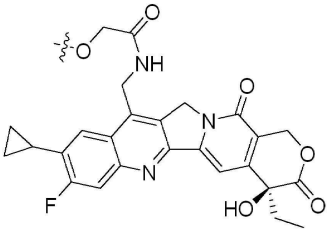


19-P2'





[0064]  

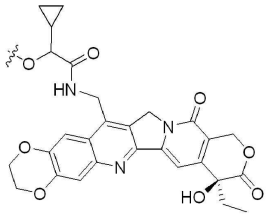
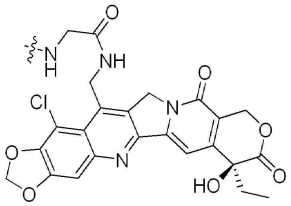
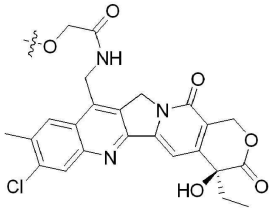
[0065]   또는  .

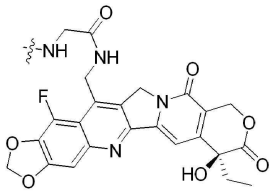
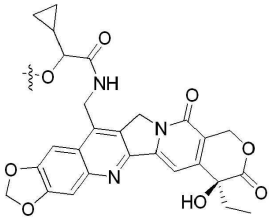
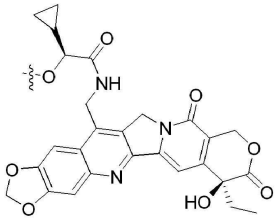
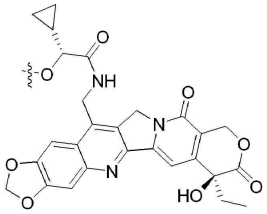
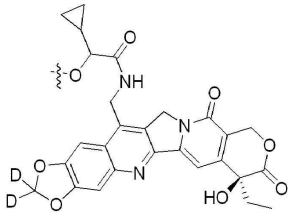
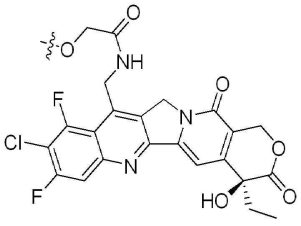
[0066] 일부 실시양태에서, 본 개시는 일반 구조식이 Pc-(L-D)$_n$인 리간드-약물 접합체 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염을 제공하며,

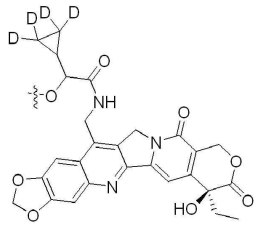
[0067] 여기서,

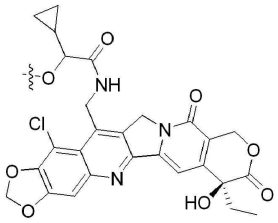
[0068] Pc, L 및 n은 위에 정의된 바와 같고;

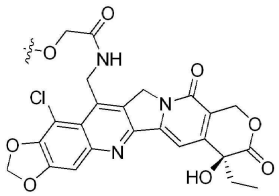
[0069] D는 하기 화합물 중 하나로부터 선택된다:

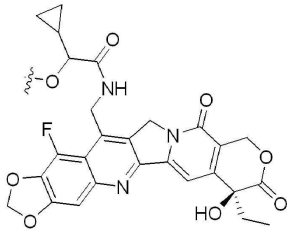
[0070] 
2'

4'

6'

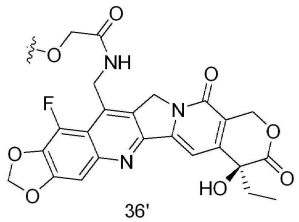
[0071] 
12'

14'

14-P1'

14-P2'

19'

21'

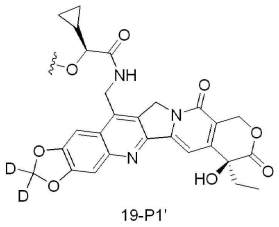
[0072] 
24'

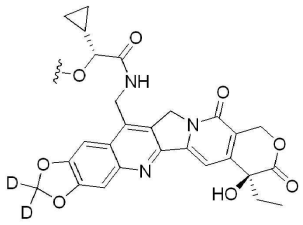

30'


31'

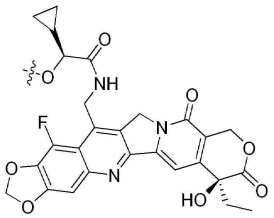
[0073] 
35'

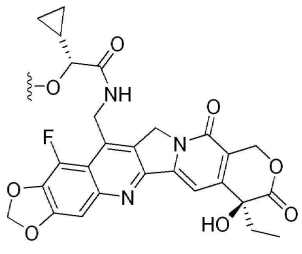

36'


19-P1'

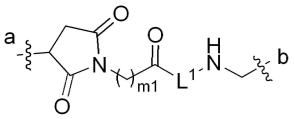

19-P2'

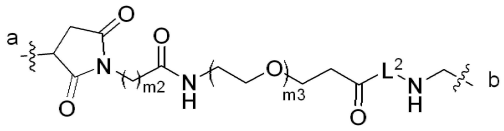
또는




.

[0074] 일부 실시양태에서, 링커 유닛 L은


또는


로부터 선택되고, 이의 a 단은 리간드 유닛 Pc에 공유적으로 연결되고, b 단은 약물 유닛 D에 공유적으로 연결되며, 여기서, m1, m2는 각각 독립적으로 정수 2~8로부터 선택되고, m3은 정수 1~16으로부터 선택되며, L^1, L^2는 각각 독립적으로 1 내지 8개의 아미노산으로 구성된 펩티드 잔기로부터 선택되며, 상기 펩티드 잔기는 선택적으로 할로겐, CN, =O, C_1-C_6 알킬, OH, O(C_1-C_6 알킬), NH_2, NH(C_1-C_6 알킬), N(C_1-C_6 알킬)$_2$, C_3-C_6 사이클로알킬 및 4-7원 헤테로사이클릴 중 하나 이상의 치환기에 의해 추가로 치환된다.

[0075] 일부 실시양태에서, 상기 L^1, L^2는 각각 독립적으로 2, 3 또는 4개의 아미노산으로 구성된 펩티드 잔기로부터 선택되고, 상기 펩티드 잔기는 선택적으로 할로겐, CN, =O, C_1-C_6 알킬, OH, O(C_1-C_6 알킬), NH_2, NH(C_1-C_6 알킬), N(C_1-C_6 알킬)$_2$, C_3-C_6 사이클로알킬 및 4-7원 헤테로사이클릴 중 하나 이상의 치환기에 의해 추가로 치환된다.

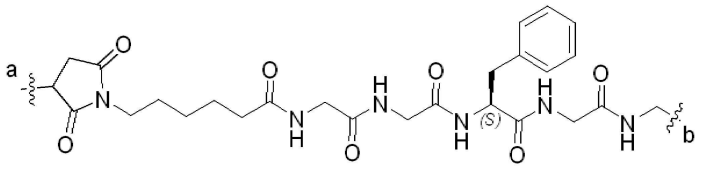
[0076] 일부 실시양태에서, 상기 L^1은 Gly-Gly-Phe-Gly 테트라펩티드 잔기 또는 Ala-Ala-Ala 트리펩티드 잔기이다.

[0077] 일부 실시양태에서, 상기 L^2는 Gly-Gly-Phe-Gly 테트라펩티드 잔기 또는 Val-Lys 디펩티드 잔기이다.

[0078] 일부 실시양태에서, m1은 5로부터 선택된다.

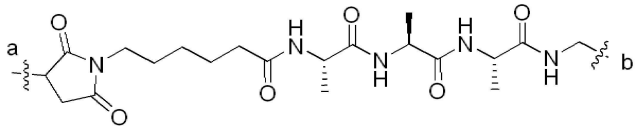
[0079] 일부 실시양태에서, m2는 2로부터 선택되고, m3은 8로부터 선택된다.

[0080] 일부 실시양태에서, 링커 유닛 L은 하기 화학 구조로부터 선택된다:



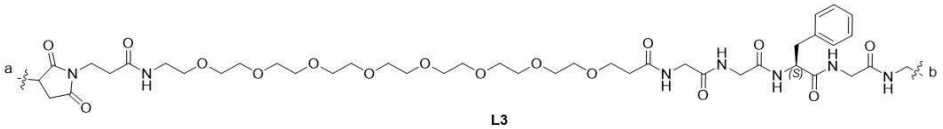
L1

[0081]

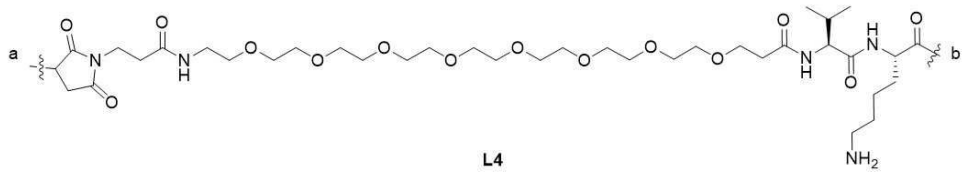


L2

[0082]



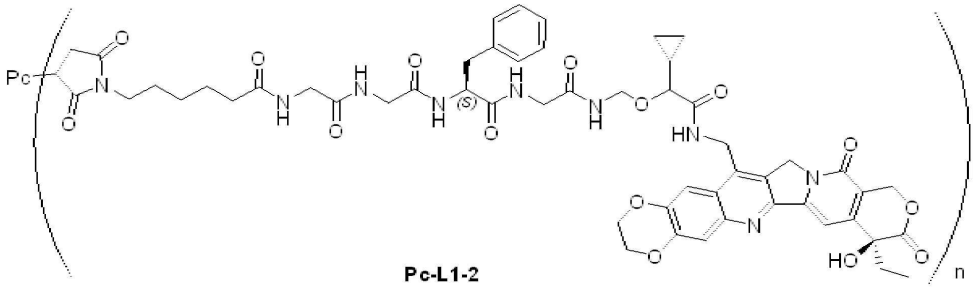
L3



L4

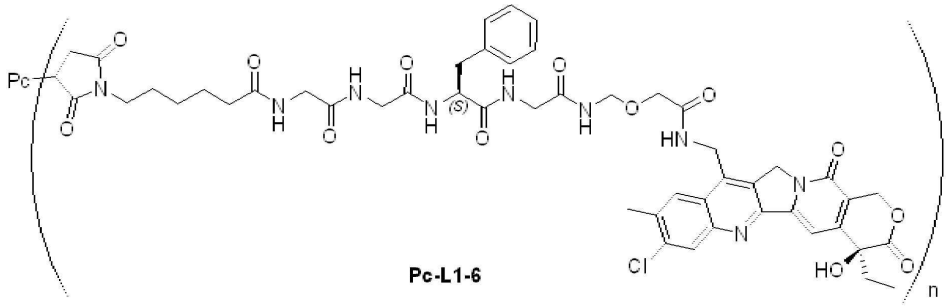
[0083] 또는 , 이의 a 단은 리간드 유닛 Pc에 공유적으로 연결되고, b 단은 약물 유닛 D에 공유적으로 연결된다.

[0084] 일부 실시양태에서, 본 개시의 일반식이 $Pc-(L-D)_n$인 리간드-약물 접합체 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염은 하기 화합물 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염으로부터 선택된다:



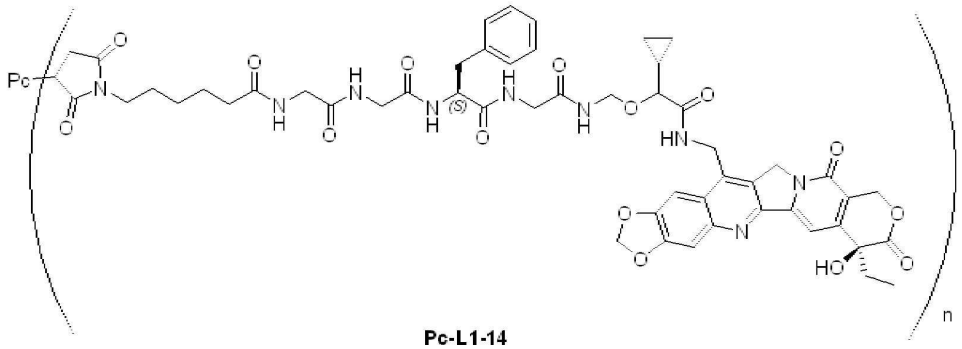
Pc-L1-2

[0085]

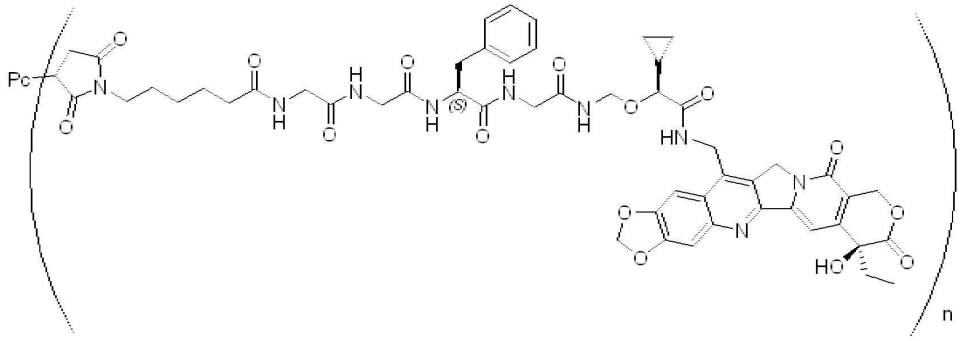


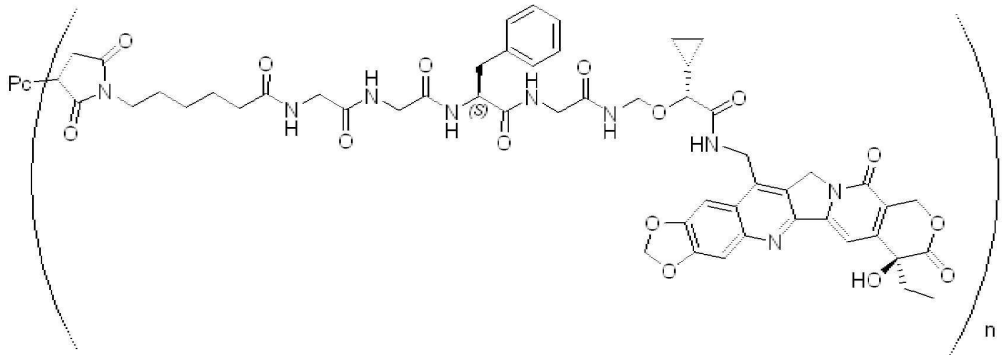
Pc-L1-6

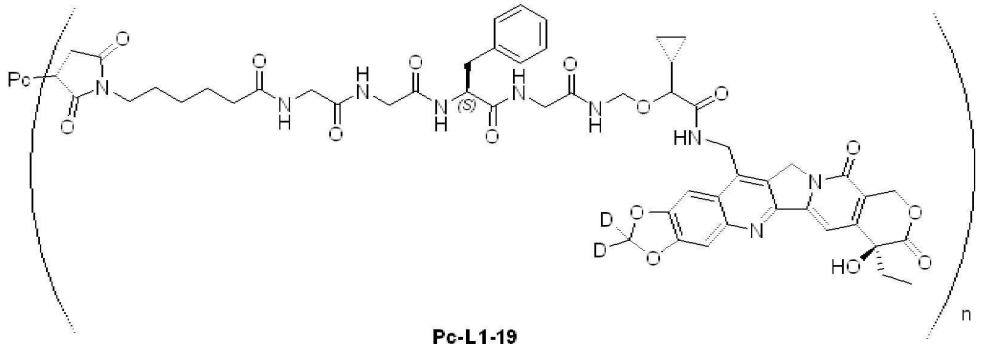
[0086]

[0087] 

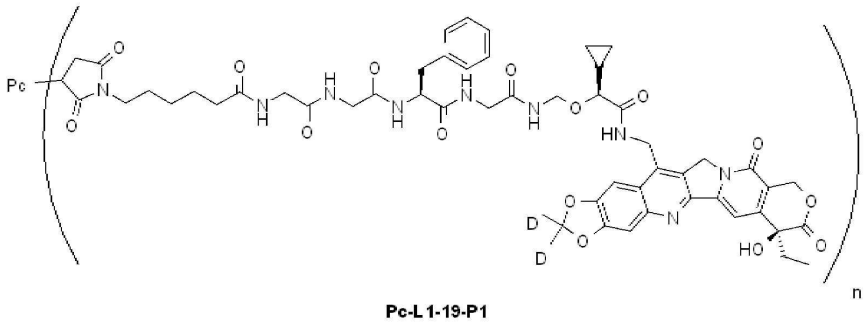
Pc-L1-14

[0088] 

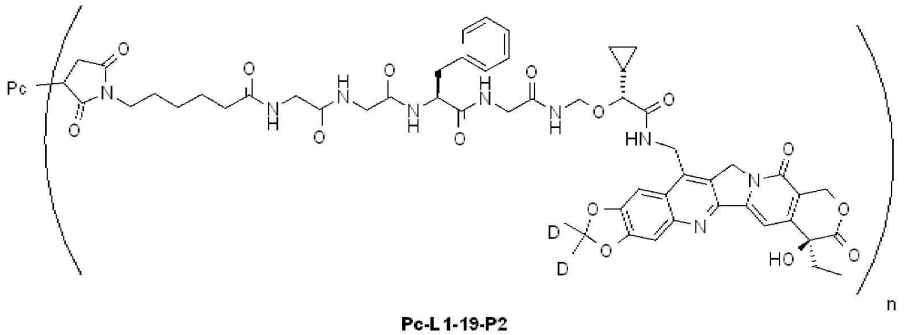
[0089] 

[0090] 

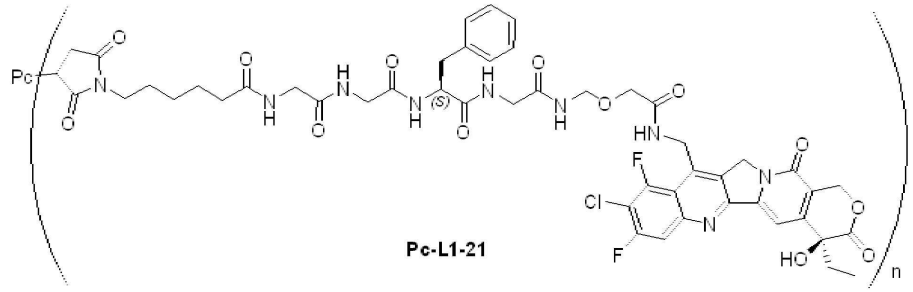
Pc-L1-19

[0091] 

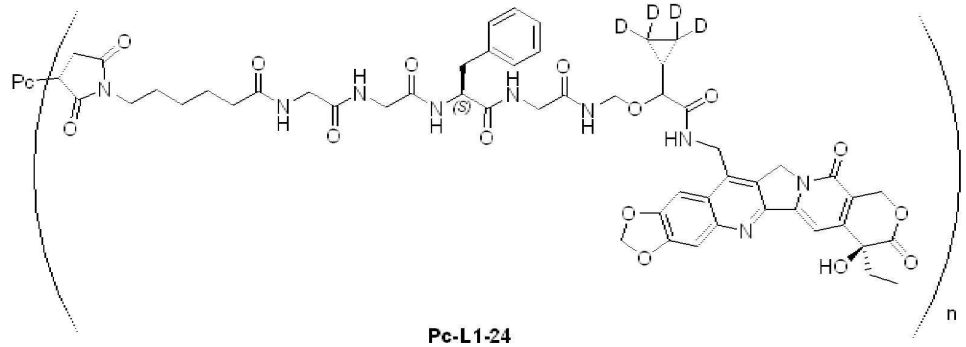
Pc-L1-19-P1

[0092] 

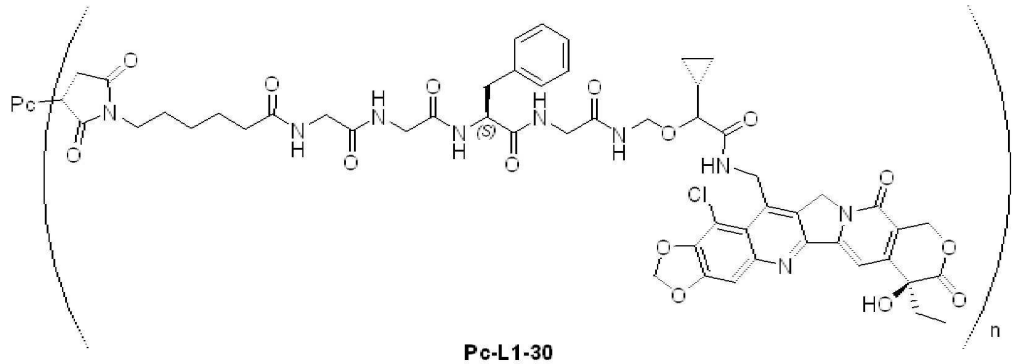
Pc-L1-19-P2

[0093] 

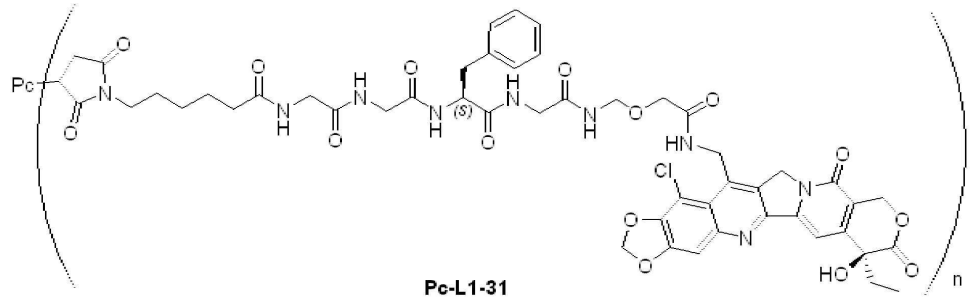
Pc-L1-21

[0094] 

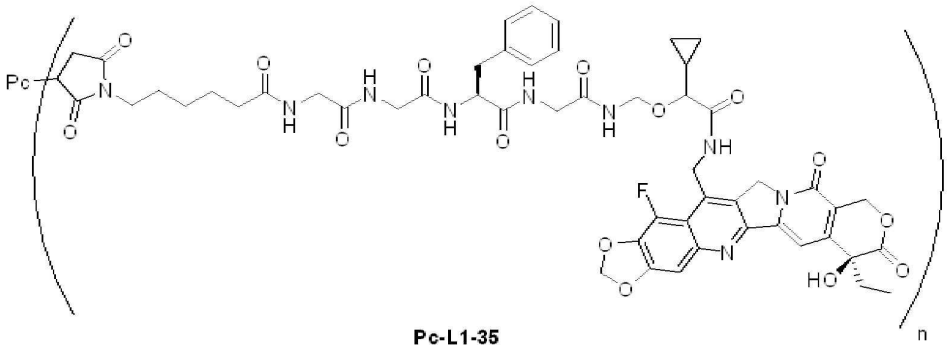
Pc-L1-24

[0095] 

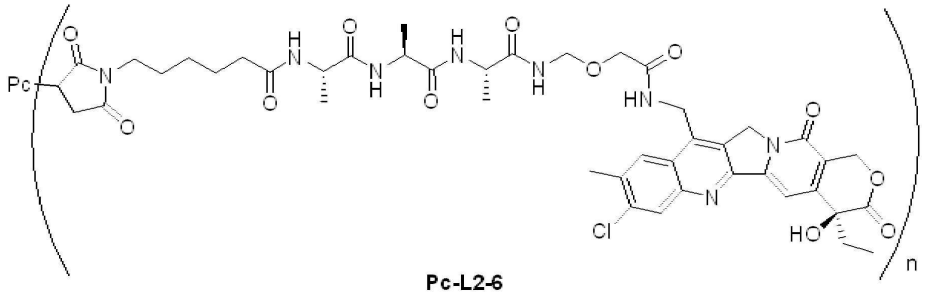
Pc-L1-30

[0096] 

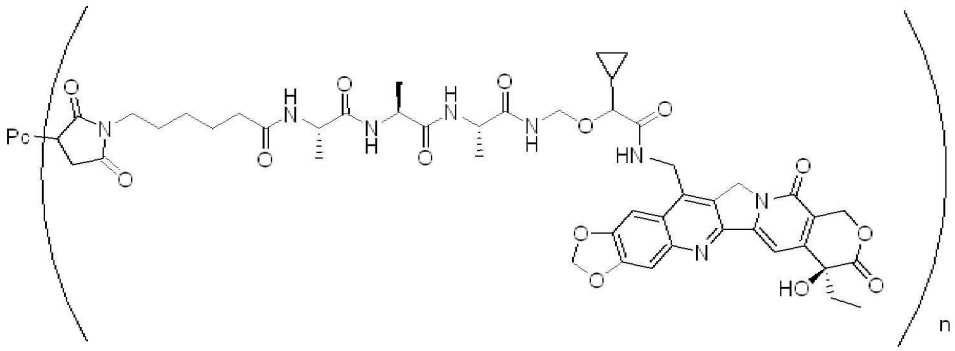
Pc-L1-31

[0097] 

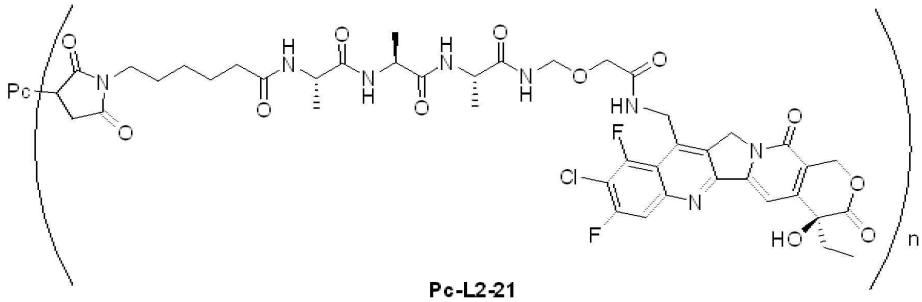
Pc-L1-35

[0098] 

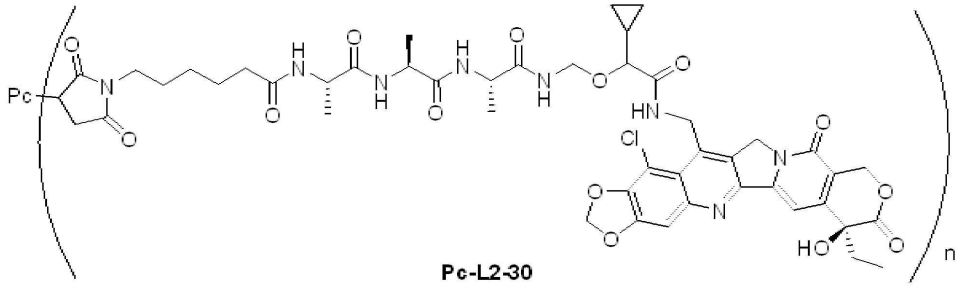
Pc-L2-6

[0099] 

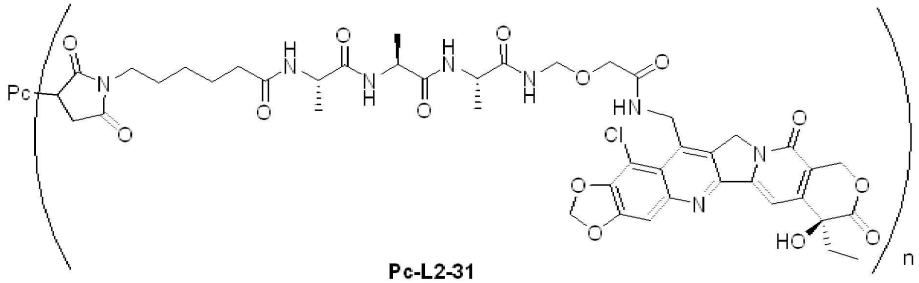
Pc-L2-14

[0100] 

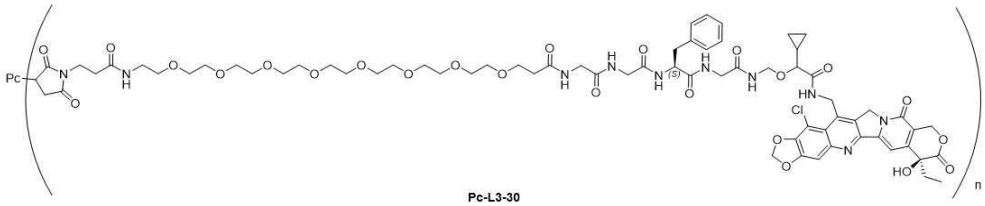
Pc-L2-21

[0101] 

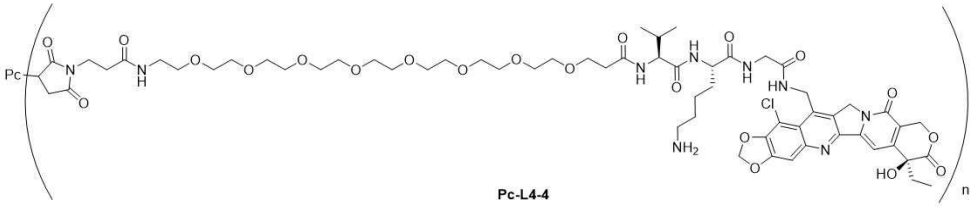
Pc-L2-30

[0102] 

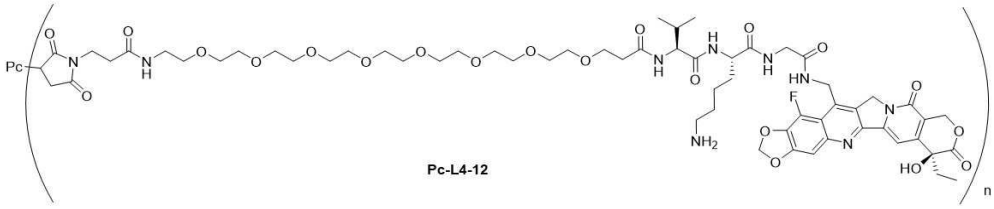
Pc-L2-31

[0103] 

Pc-L3-30

[0104] 

Pc-L4-4

[0105] 또는 

Pc-L4-12 .

[0106] 여기서 Pc 및 n은 위에 정의된 바와 같다.

[0107] 일부 실시양태에서, 전술한 일반식이 Pc-(L-D)$_n$인 리간드-약물 접합체 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염에 있어서, 상기 리간드 유닛 Pc는 폴리펩티드, 항체 또는 이의 항원 결합 단편으로부터 선택될 수 있다.

[0108] 일부 실시양태에서, 리간드 유닛 Pc는 HER2, p95HER2, HER3, CD3, CD16, ROR1, DLL3, CDH6, CD70, CD5, CD20, BCMA, EGFR, VEGF 및 LIV-1로 이루어진 군으로부터 선택되는 하나 이상의 항원에 특이적으로 결합할 수 있다.

[0109] 일부 실시양태에서, 상기 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 단일 특이적, 이중 특이적, 삼중 특이적 또는 사중 특이적이다.

[0110] 일부 실시양태에서, 상기 항체는 Trastuzumab, Pertuzumab 또는 Rituximab으로부터 선택된다.

[0111] 일부 실시양태에서, 상기 Pc는 HER2, p95HER2, CDH6, ROR1 또는 LIV-1에 특이적으로 결합하는 항체 또는 이의 항원 결합 단편이고; 상기 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 중쇄 가변 영역(VH) 또는/및 경쇄 가변 영역(VL)을 포함하며;

[0112] 일부 실시양태에서, (1) 상기 중쇄 가변 영역은 SEQ ID NO: 1, 3, 19, 21, 37, 46, 54, 56, 71, 80, 82 또는 84에 제시된 VH에 함유된 HCDR1, HCDR2 및 HCDR3을 포함하며; 또는/및 상기 경쇄 가변 영역은 SEQ ID NO: 2, 4, 20, 22, 38, 47, 55, 57, 72, 81, 83 또는 85에 제시된 VL에 함유된 LCDR1, LCDR2 및 LCDR3을 포함하거나; 또는 (2) 상기 중쇄 가변 영역 또는/및 상기 경쇄 가변 영역은 그룹 (1)의 상기 HCDR1-3 또는/및 LCDR1-3의 각 CDR에 비해, 적어도 80%의 동일성을 갖는 아미노산 서열, 또는 최대 3개의 삽입, 결실 또는 대체 돌연변이를 갖는 아미노산 서열을 포함하고; 추가로 상기 적어도 80%의 동일성은 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 100%의 동일성이다. 선택적으로, 상기 HCDR1-3 또는/및 상기 LCDR1-3은 Kabat 넘버링 시스템, Chothia 넘버링 시스템 또는 IMGT 넘버링 시스템에 따라 결정된다.

[0113] 일부 실시양태에서, 상기 중쇄 가변 영역은 HCDR1, HCDR2 및 HCDR3을 포함하고, 또는/및 상기 경쇄 가변 영역은 LCDR1, LCDR2 및 LCDR3을 포함하며, 여기서, 상기 HCDR1-3 또는/및 상기 LCDR1-3은 하기로부터 선택되며:

[0114] (1) 상기 HCDR1-3은 SEQ ID NO: 7-9이며; 또는/및 상기 LCDR1-3은 SEQ ID NO: 10-12이며;

[0115] (2) 상기 HCDR1-3은 SEQ ID NO: 13-15이며; 또는/및 상기 LCDR1-3은 SEQ ID NO: 16-18이며;

[0116] (3) 상기 HCDR1-3은 SEQ ID NO: 23-25이며; 또는/및 상기 LCDR1-3은 SEQ ID NO: 26-28이며;

[0117] (4) 상기 HCDR1-3은 SEQ ID NO: 29-31이며; 또는/및 상기 LCDR1-3은 SEQ ID NO: 32-34이며;

[0118] (5) 상기 HCDR1-3은 SEQ ID NO: 40-42이며; 또는/및 상기 LCDR1-3은 SEQ ID NO: 43-45이며;

[0119] (6) 상기 HCDR1-3은 SEQ ID NO: 48-50이며; 또는/및 상기 LCDR1-3은 SEQ ID NO: 51-53이며;

[0120] (7) 상기 HCDR1-3은 SEQ ID NO: 58-60이며; 또는/및 상기 LCDR1-3은 SEQ ID NO: 61-63이며;

[0121] (8) 상기 HCDR1-3은 SEQ ID NO: 64-66이며; 또는/및 상기 LCDR1-3은 SEQ ID NO: 67-69이며;

[0122] (9) 상기 HCDR1-3은 SEQ ID NO: 74-76이며; 또는/및 상기 LCDR1-3은 SEQ ID NO: 77-79이며;

[0123] (10) 상기 HCDR1-3은 SEQ ID NO: 86-88이며; 또는/및 상기 LCDR1-3은 SEQ ID NO: 89-91이며;

[0124] (11) 상기 HCDR1-3은 SEQ ID NO: 92-94이며; 또는/및 상기 LCDR1-3은 SEQ ID NO: 95-97이며;

[0125] (12) 상기 HCDR1-3은 SEQ ID NO: 98-100이며; 또는/및, 상기 LCDR1-3은 SEQ ID NO: 101-103이거나; 또는,

[0126] (13) 상기 HCDR1-3 또는/및 상기 LCDR1-3은 그룹 (1)~(12) 중 어느 한 그룹에 기재된 HCDR1-3 또는/및 LCDR1-3의 각 CDR에 비해, 적어도 80%의 동일성을 갖거나 최대 3개의 삽입, 결실 또는 대체 돌연변이를 갖는 아미노산 서열을 가지며; 바람직하게는, 상기 HCDR1-3 또는/및 상기 LCDR1-3은 그룹 (1)~(12) 중 어느 한 그룹에 기재된 HCDR1-3 또는/및 LCDR1-3의 각 CDR에 비해, 적어도 80%의 동일성을 갖는 아미노산 서열을 가지며; 추가적으로, 상기 적어도 80%의 동일성은 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 100%의 동일성이다.

[0127] 일부 실시양태에서, 상기 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 중쇄 가변 영역(VH) 또는/및 경쇄 가변 영역(VL)을 포함하며, 상기 중쇄 가변 영역은 SEQ ID NO: 1, 3, 19, 21, 37, 46, 54, 56, 71, 80, 82 또는 84에 제시된 아미노산 서열을 포함하고, 또는/및 상기 경쇄 가변 영역은 SEQ ID NO: 2, 4, 20, 22, 38, 47, 55, 57, 72, 81, 83 또는 85에 제시된 아미노산 서열을 포함하거나; 또는 상기 중쇄 가변 영역 또는/및 상기 경쇄 가변 영역은 상술한 임의의 중쇄 가변 영역 또는/및 경쇄 가변 영역에 비해, 적어도 80%의 동일성을 갖는 아미노산 서열을 각각 포함하고; 추가적으로, 상기 적어도 80%의 동일성은 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 100%의 동일성이다.

[0128] 일부 실시양태에서, 상기 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 중쇄 불변 영역 서열 및/또는 경쇄 불변 영역 서열을 포함하고, 상기 중쇄 불변 영역 및/또는 경쇄 불변 영역은 온전한 불변 영역 서열 또는 이의 단편으로부터 선택되며, 상기 불변 영역 단편은 CH1, 힌지 영역, CH2, CH3 또는 Fc를 포함하고; 선택적으로, 상기 중쇄 불변 영역은 인간 또는 마우스 IgG1, IgG2, IgG3 또는 IgG4 불변 영역으로부터 선택되고, 상기 경쇄 불변 영역은 인간 또는 마우스 kappa 불변 영역 또는 lamda 불변 영역으로부터 선택되며; 선택적으로, 상기 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 온전한 중쇄 및 경쇄를 포함하고, 상기 중쇄는 상기 VH 및 중쇄 불변 영역으로 구성되며, 상기 중쇄 불변 영역은 SEQ ID NO: 5, 39 또는 73에 제시된 바와 같은 아미노산 서열을 갖고, 상기 경쇄는 상기 VL과 경쇄 불변 영역으로 구성되며, 상기 경쇄 불변 영역은 SEQ ID NO: 6에 제시된 바와 같은 아미노산 서열을 갖는다.

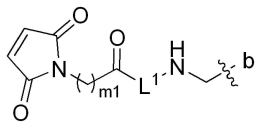
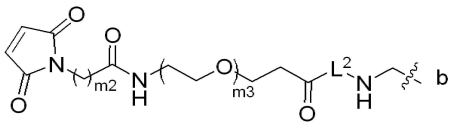
[0129] 일부 실시양태에서, 전술한 일반식이 $Pc-(L-D)_n$인 리간드-약물 접합체 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염에 있어서, n은 1~16의 실수로부터 선택되고, 예를 들어 n은 2~12의 실수로부터 선택되며, 예를 들어 n은 4~10의 실수로부터 선택되며, 예를 들어 n은 5~9의 실수로부터 선택되며, 예를 들어 n은 6~8의 실수로부터 선택된다.

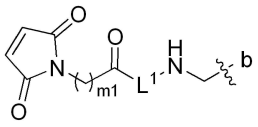
[0130] 일부 실시양태에서, n은 5~9의 실수로부터 선택되며, 예를 들어, n은 5.0, 5.1, 5.2, 5.3, 5.4, 5.5, 5.6, 5.7, 5.8, 5.9, 6.0, 6.1, 6.2, 6.3, 6.4, 6.5, 6.6, 6.7, 6.8, 6.9, 7.0, 7.1, 7.2, 7.3, 7.4, 7.5, 7.6, 7.7, 7.8, 7.9, 8.0, 8.1, 8.2, 8.3, 8.4, 8.5, 8.6, 8.7, 8.8, 8.9 또는 9.0이다.

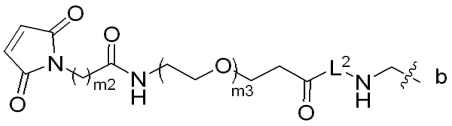
[0131] 본 개시는 또한 일반 구조식이 L'-D인 약물-링커 화합물 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염을 제공하며, 여

기서:

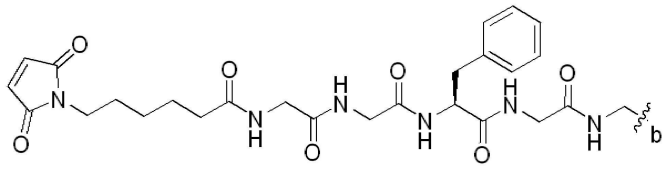
[0132] 약물 유닛 D는 앞서 기재된 어느 한 항에 정의된 바와 같고;

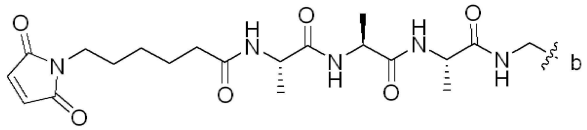
[0133] L'는  또는  로부터 선택되고, 이의 b 단은 약물 유닛 D에 공유적으로 연결되고, L^1, L^2, m1, m2 및 m3은 앞서 기재된 어느 한 항에 정의된 바와 같다.

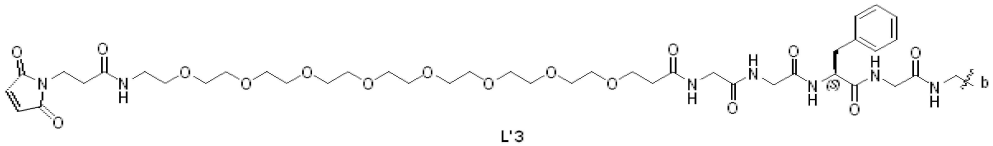
[0134] 일부 실시양태에서, L'는  로부터 선택되고, 이의 b 단은 약물 유닛 D에 공유적으로 연결되며, m1은 5로부터 선택되고, L^1은 Gly-Gly-Phe-Gly 테트라펩티드 잔기 또는 Ala-Ala-Ala 트리펩티드 잔기로부터 선택된다.

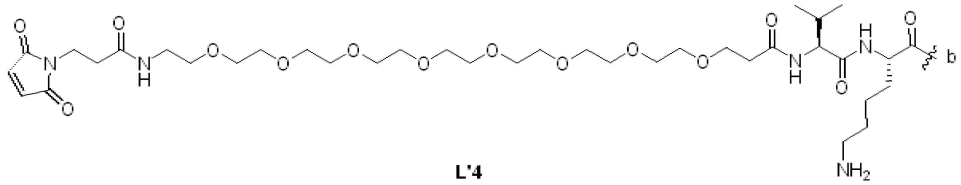
[0135] 일부 실시양태에서, L'는  로부터 선택되고, 이의 b 단은 약물 유닛 D에 공유적으로 연결되며, m2는 2로부터 선택되고, m3은 8로부터 선택되며, L^2는 Gly-Gly-Phe-Gly 테트라펩티드 잔기 또는 Val-Lys 디펩티드 잔기로부터 선택된다.

[0136] 일부 실시양태에서, L'는 하기 화학 구조 중 하나로부터 선택된다:

[0137] 
L'1

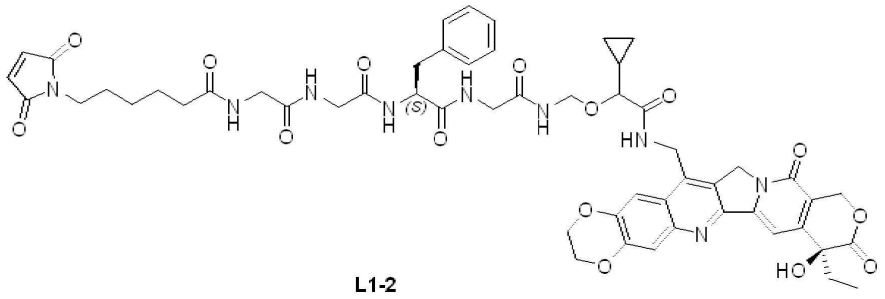
[0138] 
L'2


L'3

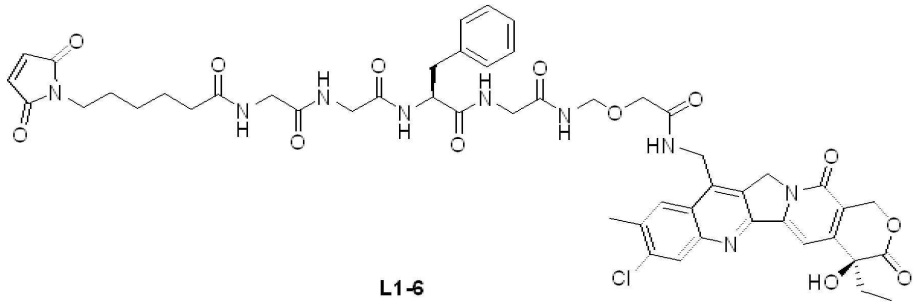

L'4

[0139] 또는 , 이의 b 단은 약물 유닛 D에 공유적으로 연결된다.

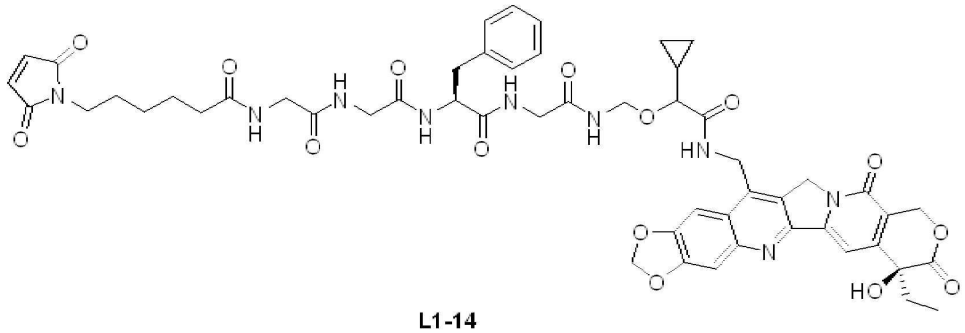
[0140] 일부 실시양태에서, 본 개시의 일반식이 L'-D인 약물-링커 화합물 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염은 하기 화합물 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염으로부터 선택된다:

[0141] 

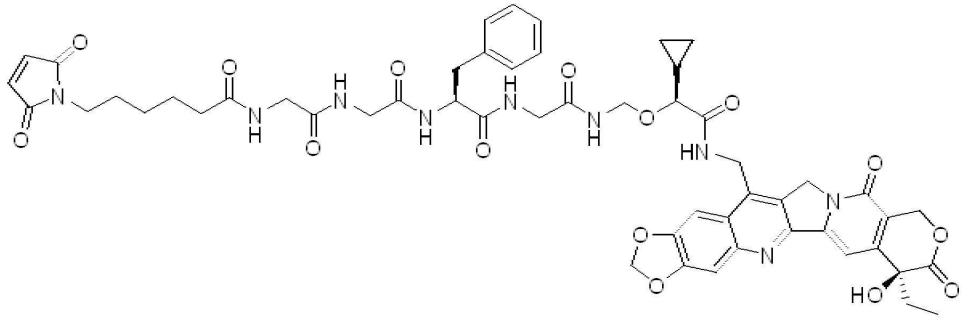
L1-2

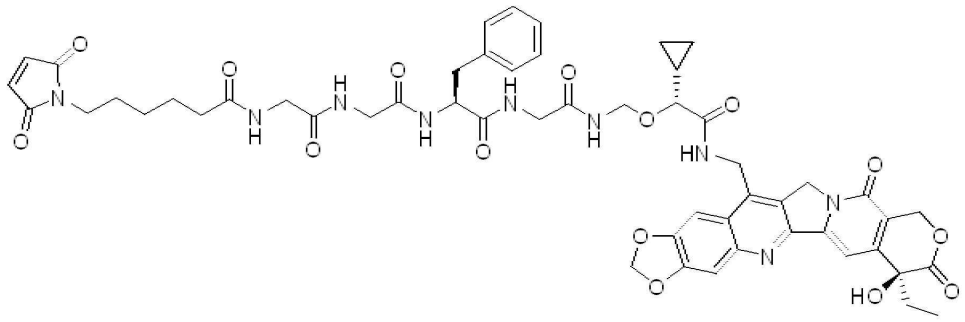
[0142] 

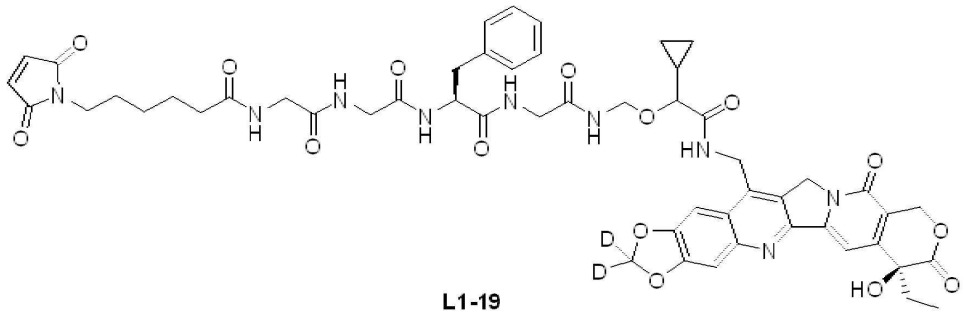
L1-6

[0143] 

L1-14

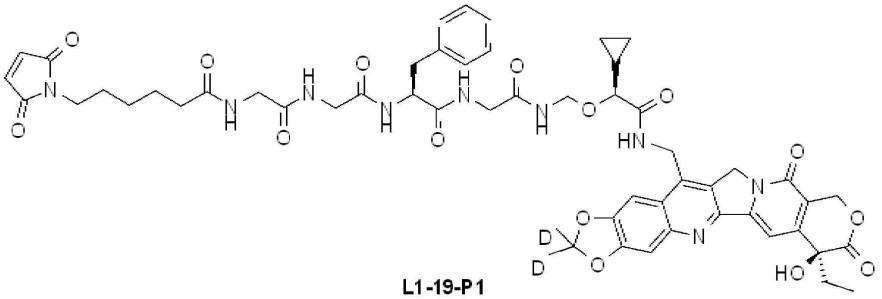
[0144] 

[0145] 



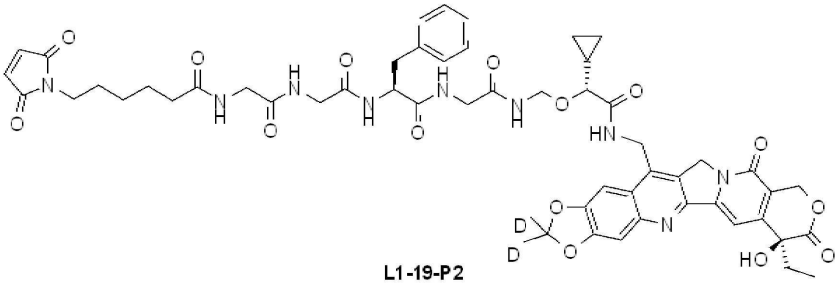
L1-19

[0146]



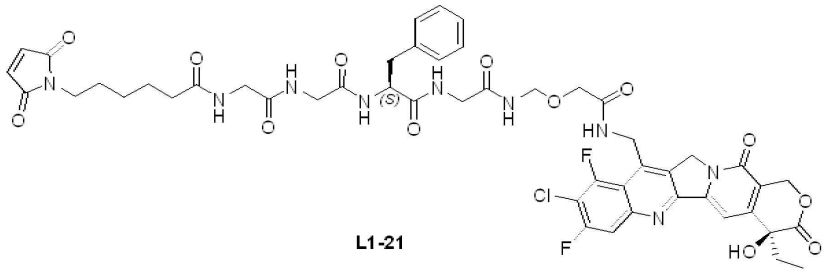
L1-19-P1

[0147]



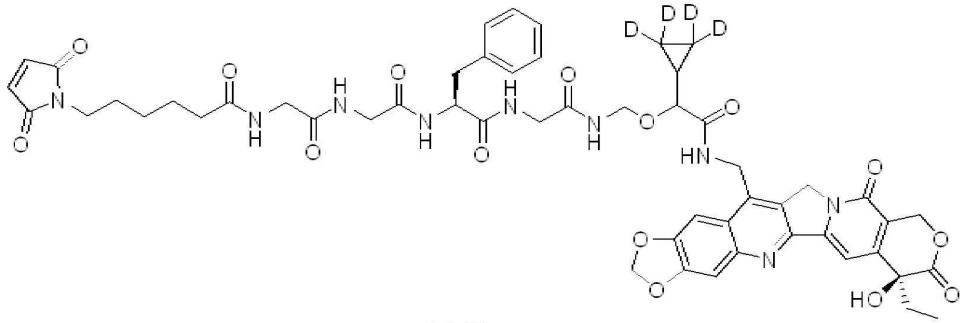
L1-19-P2

[0148]



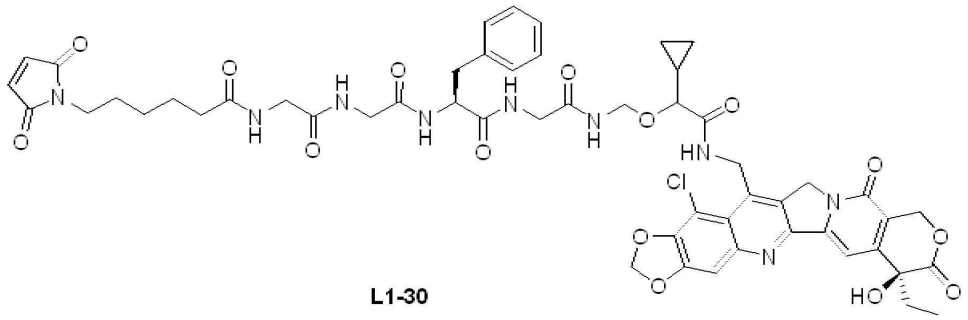
L1-21

[0149]

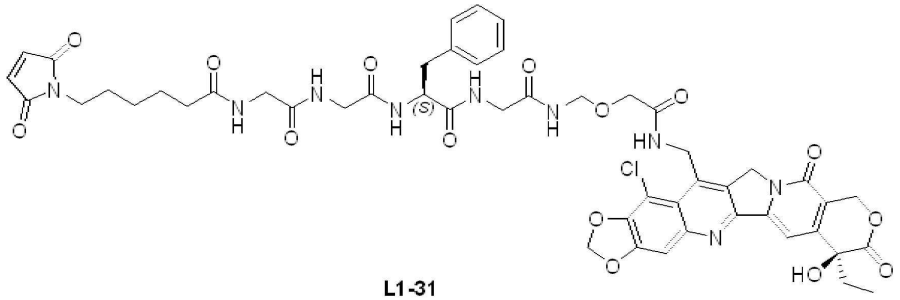


L1-24

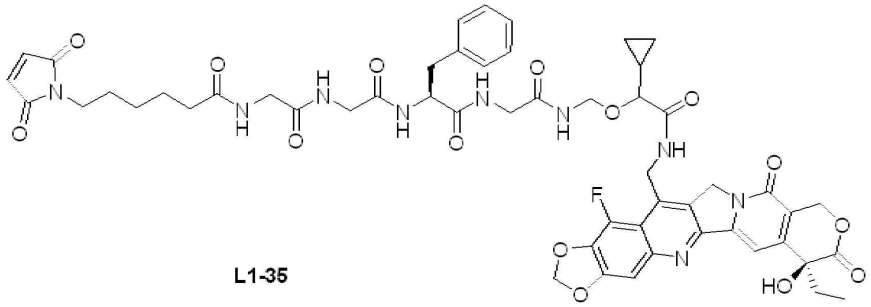
[0150]

[0151] 

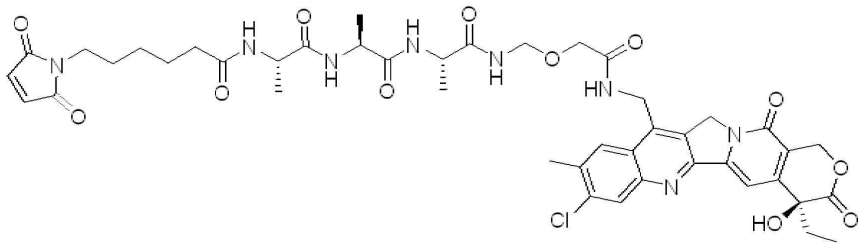
L1-30

[0152] 

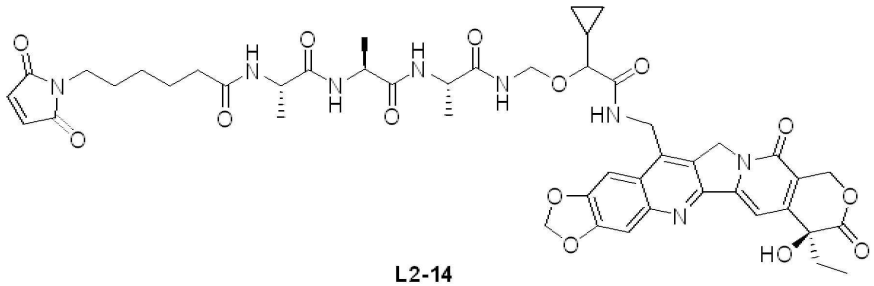
L1-31

[0153] 

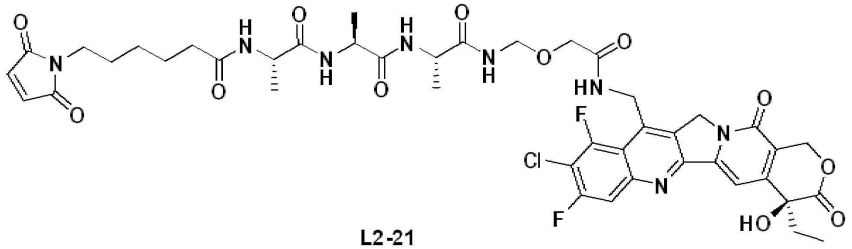
L1-35

[0154] 

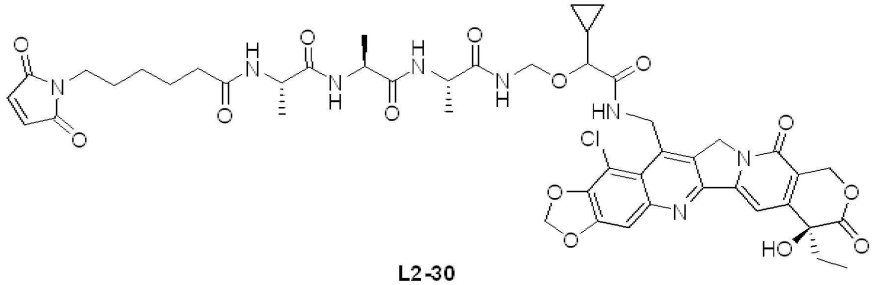
L2-6

[0155] 

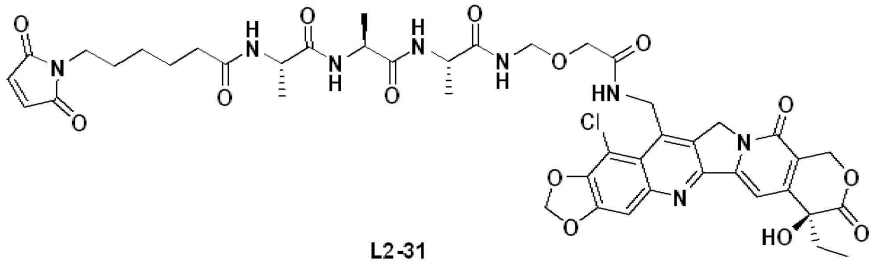
L2-14

[0156] 

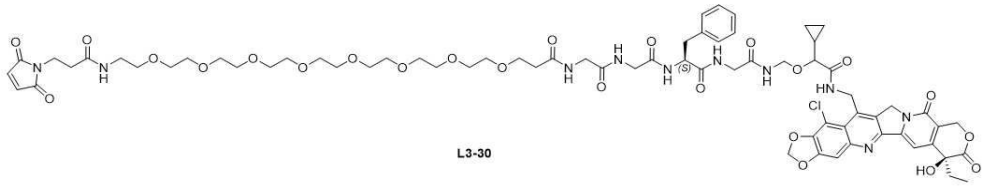
L2-21

[0157] 

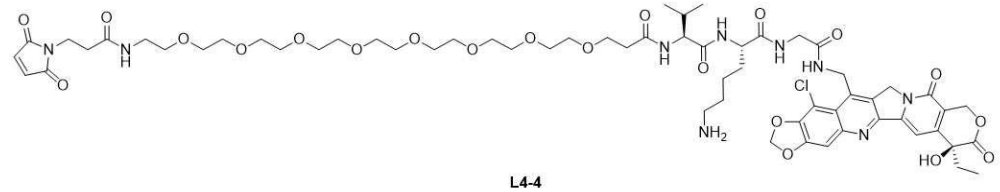
L2-30

[0158] 

L2-31

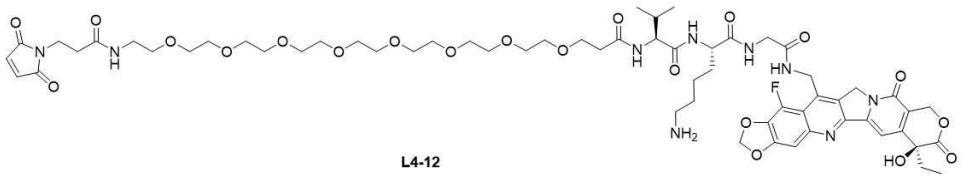
[0159] 

L3-30

[0160] 

L4-4

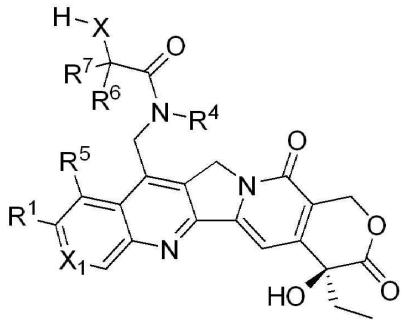
또는



L4-12

.

[0161] 본 개시는 또한 하기 식 (D-H)로 표시되는 화합물 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염을 제공하며:

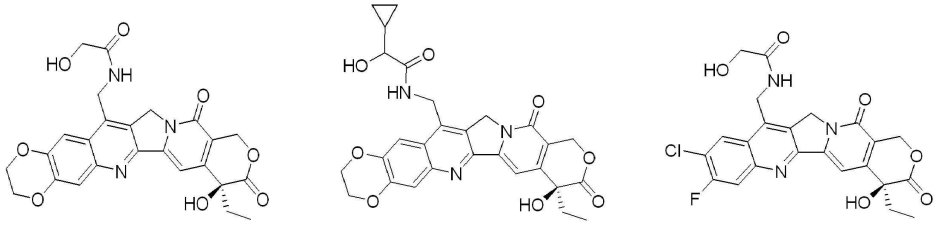
[0162] 

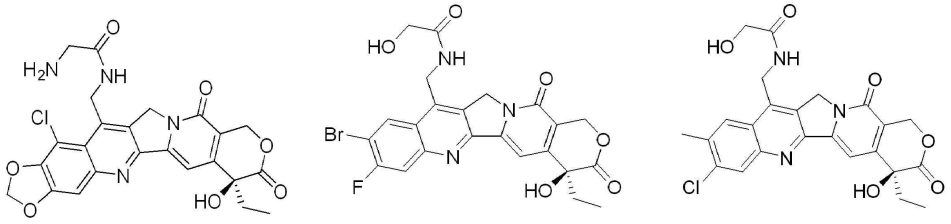
[0163] (D-H)

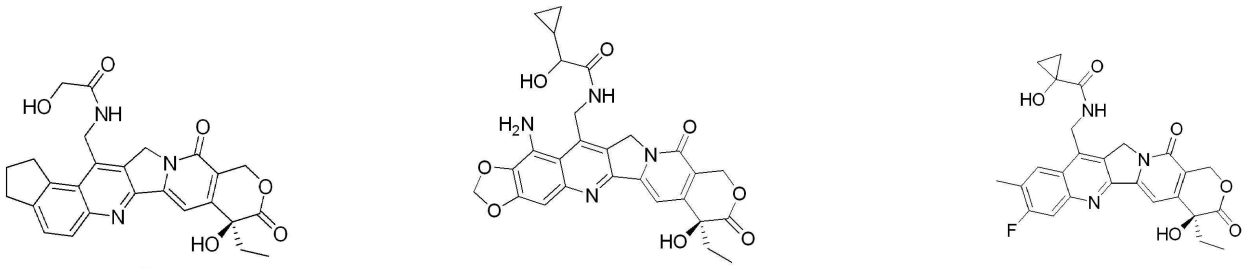
[0164] 여기서,

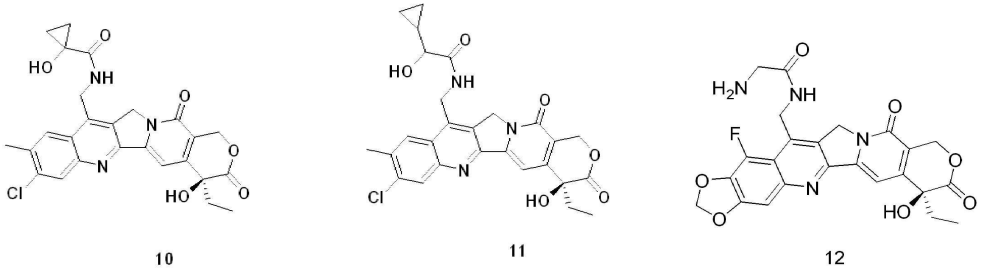
[0165] R^1, X_1, X, R^4, R^5, R^6, R^7은 앞서 기재된 어느 한 항에 정의된 바와 같다.

[0166] 일부 실시양태에서, 식 (D-H)로 표시되는 화합물 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염은 하기로 표시되는 화합물 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염으로부터 선택된다:

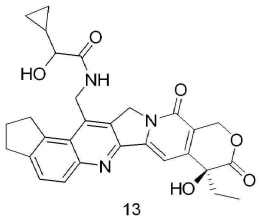
[0167] 
1 2 3

[0168] 
4 5 6

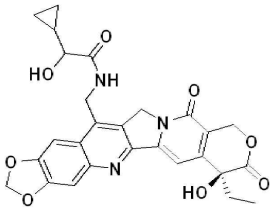
[0169] 
7 8 9


10 11 12

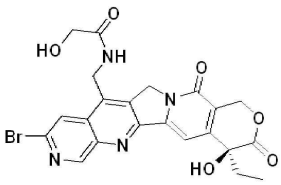
[0170]



13

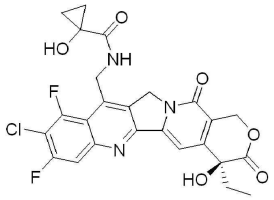


14

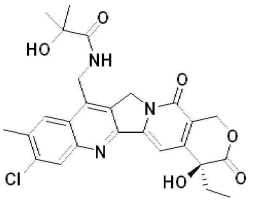


15

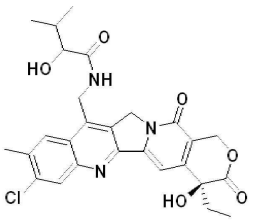
[0171]



16

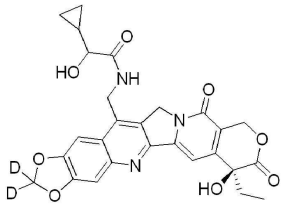


17

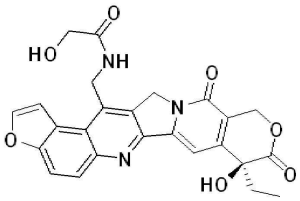


18

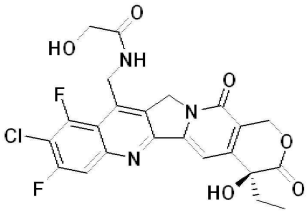
[0172]



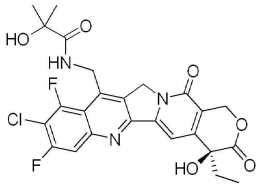
19



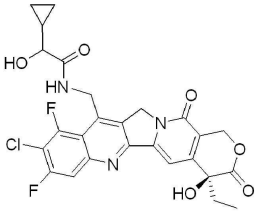
20



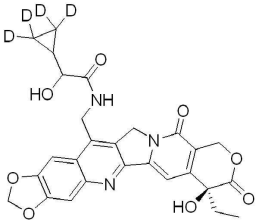
21



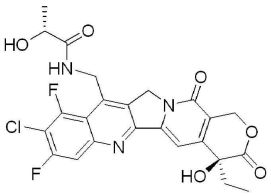
22



23

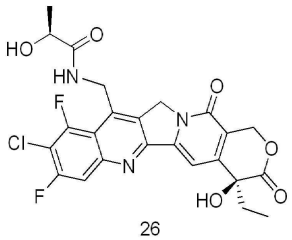


24

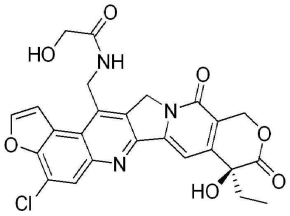


25

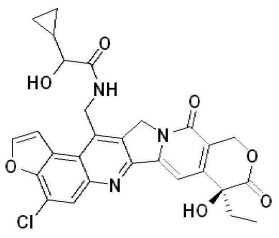
[0173]



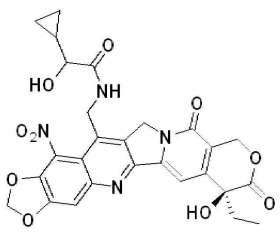
26



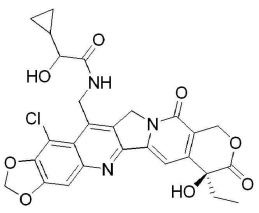
27



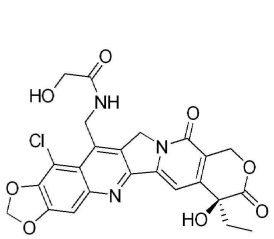
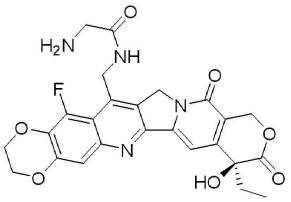
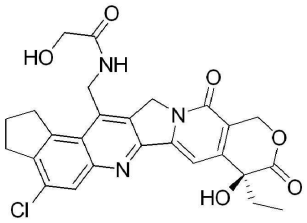
28

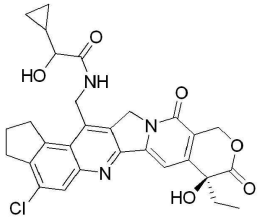
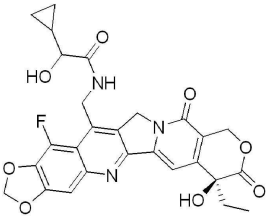
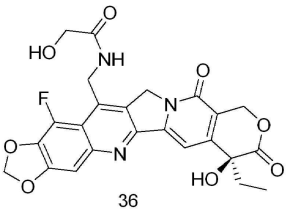


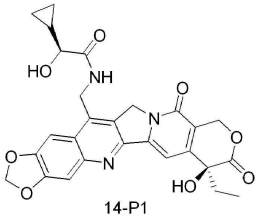
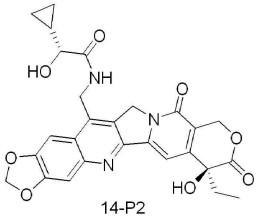
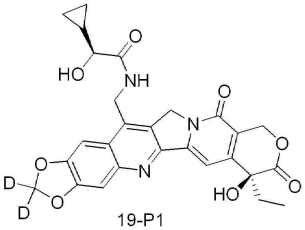
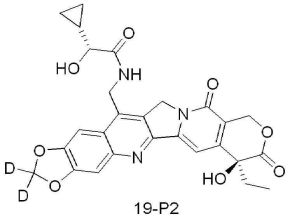
29

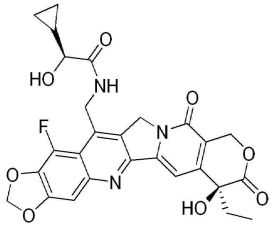
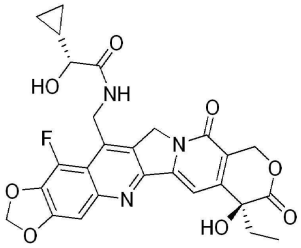
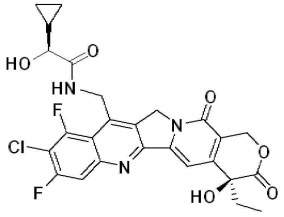
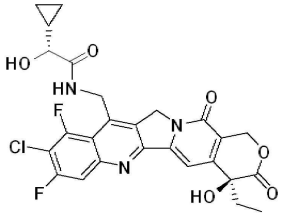
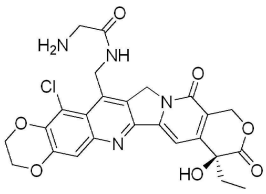
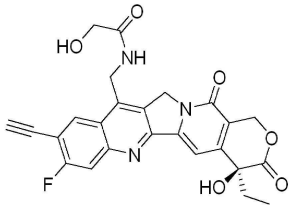
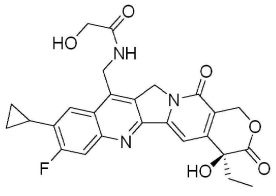


30

[0174] 
31

32

33

[0175] 
34

35

36

[0176] 
14-P1

14-P2

19-P1

19-P2

[0177] 





또는

.

[0178] 다른 일 측면으로, 본 개시는 본 개시의 전술한 일반식이 Pc-(L-D)$_n$인 리간드-약물 접합체 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염 및 약학적으로 허용 가능한 부형제를 포함하는 약학 조성물을 제공한다.

[0179] 다른 일 측면으로, 본 개시는 치료를 필요로 하는 포유동물, 바람직하게는 인간에게 치료 유효량의 전술한 일반식이 Pc-(L-D)$_n$인 리간드-약물 접합체 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염 또는 이의 약학 조성물을 투여하는 단계를 포함하는, 포유동물 종양을 치료하는 방법을 제공한다.

[0180] 다른 일 측면으로, 본 개시는 종양을 치료하는 약물의 제조에 있어서 전술한 일반식이 Pc-(L-D)$_n$인 리간드-약물 접합체 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염 또는 이의 약학 조성물의 용도를 제공한다.

[0181] 다른 일 측면으로, 본 개시는 종양을 치료하는 데 있어서 전술한 일반식이 Pc-(L-D)$_n$인 리간드-약물 접합체 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염 또는 이의 약학 조성물의 용도를 제공한다.

[0182] 다른 일 측면으로, 본 개시는 종양을 치료하는 전술한 일반식이 Pc-(L-D)$_n$인 리간드-약물 접합체 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염 또는 이의 약학 조성물을 제공한다.

[0183] 다른 일 측면으로, 본 개시는 본 개시의 전술한 식 (D-H)로 표시되는 화합물 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염 및 약학적으로 허용 가능한 부형제를 포함하는 약학 조성물을 제공한다.

[0184] 다른 일 측면으로, 본 개시는 치료를 필요로 하는 포유동물, 바람직하게는 인간에게 치료 유효량의 전술한 식 (D-H)로 표시되는 화합물 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염 또는 이의 약학 조성물을 투여하는 단계를 포함하는, 포유동물의 종양을 치료하는 방법을 제공한다.

[0185] 다른 일 측면으로, 본 개시는 종양을 치료하는 약물의 제조에 있어서 전술한 식 (D-H)로 표시되는 화합물 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염 또는 이의 약학 조성물의 용도를 제공한다.

[0186] 다른 일 측면으로, 본 개시는 종양을 치료하는 데 있어서 전술한 식 (D-H)로 표시되는 화합물 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염, 또는 이의 약학 조성물의 용도를 제공한다.

[0187] 다른 일 측면으로, 본 개시는 종양을 치료하는 전술한 식 (D-H)로 표시되는 화합물 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염 또는 이의 약학 조성물을 제공한다.

[0188] 다른 일 측면으로, 본 개시는 본 개시의 전술한 일반식이 L'-D인 약물-링커 화합물을 전술한 리간드와 커플링하는 단계를 포함하는, 일반식이 Pc-(L-D)$_n$인 리간드-약물 접합체 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염의 제조 방법을 제공하며, 선택적으로, 상기 리간드는 항체 또는 이의 항원 결합 단편이다.

[0189] 다른 일 측면으로, 본 개시는 본 개시의 전술한 약물 유닛 D를 전술한 리간드 유닛 Pc와 연결시키는 단계를 포함하는, 일반식이 Pc-(L-D)$_n$인 리간드-약물 접합체 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염의 제조 방법을 제공하며; 선택적으로 전술한 링커 유닛 L를 통해 연결시키고; 선택적으로, 리간드는 항체 또는 이의 항원 결합 단편이다.

[0190] 다른 일 측면으로, 본 개시는 전술한 일반식이 Pc-(L-D)$_n$인 리간드-약물 접합체 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염의 제조에 있어서, 전술한 식 (D-H)로 표시되는 화합물 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염의 용도, 및/또는 전술한 일반식이 L'-D인 약물-링커 화합물 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염의 제조에 있어서, 전술한 식 (D-H)로 표시되는 화합물 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염의 용도를 제공한다.

[0191] 본 개시에 제공되는 리간드-약물 접합체는 유의한 항염증 활성 및/또는 감소된 독성 부작용을 갖는다.

도면의 간단한 설명

[0192] 도 1은 화합물 19-P1의 X선 단결정 회절 분석 결과를 나타낸다.

도 2는 OVCAR3 피하 종양 모델의 종양 성장 곡선을 나타낸다.

도 3은 OVCAR3 피하 종양 모델의 종양 성장 곡선을 나타낸다.

도 4는 OVCAR3 피하 종양 모델의 종양 성장 곡선을 나타낸다.

도 5는 OVCAR3 피하 종양 모델의 마우스 체중 변화 곡선을 나타낸다.

도 6은 H838 피하 종양 모델의 종양 성장 곡선을 나타낸다.

도 7은 H838 피하 종양 모델의 마우스 체중 변화 곡선을 나타낸다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0193] 용어에 대한 정의 및 설명

[0194] 별도로 설명되지 않는 한, 본 개시에 사용되는 용어는 하기 함의를 가지며, 본 개시에 기재된 그룹 및 용어에 대한 정의는 예시로서의 정의, 예시적 정의, 바람직한 정의, 표에 기재된 정의, 실시예의 구체적인 화합물의 정의 등을 포함하고, 서로 간에 임의로 조합 및 결합될 수 있다. 특정한 용어는 특별히 정의되지 않은 상황, 불확정 또는 명확하지 않은 것으로 간주되어서는 안 되며, 당업계의 일반적인 함의에 따라 이해되어야 한다. 본원에 제품명이 나타나는 경우, 그 대응되는 제품 또는 그 활성 성분을 지칭하는 것을 목적으로 한다.

[0195] 용어 "리간드"는 표적 세포와 관련된 항원 또는 수용체를 식별하고 결합할 수 있는 거대분자 화합물을 가리킨다. 리간드는 리간드에 결합된 표적 세포 집단에 약물을 전달하는 기능을 하며, 이러한 리간드는 단백질 호르몬, 응집소, 성장 인자, 항체 또는 세포에 결합할 수 있는 기타 분자를 포함하나 이에 한정되지 않는다. 본 개시의 실시양태에서, 리간드 또는 리간드 유닛은 Pc로 표시되며, 리간드는 리간드 상의 헤테로 원자를 통해 링커 유닛과 함께 연결 결합을 형성할 수 있다. 본 개시의 일부 실시양태에서, 리간드는 키메라 항체, 인간화 항체, 전체 인간 항체 또는 마우스 유래 항체로부터 선택되는 항체 또는 항원 결합 단편으로부터 선택되고; 본 개시의 일부 실시양태에서, 항체는 단클론 항체이다.

[0196] 용어 "링커" 또는 "링커 유닛"은 일단이 리간드에 연결되고 다른 일단이 약물에 연결된 화학 구조 단편 또는 화학 결합을 가리킨다.

[0197] 용어 "약물"은 유기체에서 생물학적 활성을 갖는 소분자 화합물을 가리킨다. 본 개시의 일부 실시양태에서, 약물은 항염증 기능을 갖는 글루코코르티코이드 수용체 작용제 또는 이에 상응하는 인산 에스테르 분자이다.

[0198] 용어 "리간드-약물 접합체"는 안정한 링커 유닛을 통해 생물학적 활성을 갖는 약물에 연결되는 리간드를 가리킨다. 본 개시의 일부 실시양태에서, "리간드-약물 접합체"는 항체-약물 접합체(antibody drug conjugate, ADC)이고, ADC는 단클론 항체 또는 항체 단편을 안정적인 링커 유닛을 통해 생물학적 활성을 갖는 약물과 서로 연결시키는 것을 가리킨다.

[0199] 용어 "DAR" 또는 "약물-항체 비율"은 각 항체 분자에 연결된 소분자 글루코코르티코이드 수용체 작용제 약물의 평균 수를 가리킨다. 본 개시의 항체-약물 접합체에서, DAR은 정수일 수도 있고 소수일 수도 있는 변수 "n"에 의해 정의된다.

[0200] 용어 "항체"는 가장 넓은 의미로 사용되며, 면역글로불린의 중쇄 가변 영역으로부터 유래된 충분한 서열 및/또는 면역글로불린 경쇄 가변 영역으로부터 유래된 충분한 서열을 포함하여, 항원에 특이적으로 결합할 수 있는 폴리펩티드 또는 폴리펩티드 조합을 가리킨다. 본원에서 "항체"는 원하는 항원 결합 활성을 나타내는 한, 다양한 형태 및 다양한 구조를 망라한다. 본원의 "항체"는 이식된 상보성 결정 영역(CDR) 또는 CDR 유도체를 갖는 대체용 단백질 스캐폴드 또는 인공 스캐폴드를 포함한다. 이와 같은 스캐폴드는 항체 유래 스캐폴드(예를 들어, 항체의 3차원 구조를 안정화시키기 위해 도입된 돌연변이를 포함) 및 생체적합성 중합체 등을 포함하는 완전 합성 스캐폴드를 포함한다. 예를 들어, Korndorfer 등, 2003, Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics, 53(1):121-129(2003); Roque 등, Biotechnol. Prog. 20:639-654 (2004) 등을 참조한다. 이와 같은 스캐폴드는 또한 테나신, 피브로넥틴, 펩티드 압타머 등을 포함하나 이에 한정되지 않는, CDR을 이식하는 데 사용될 수 있는 당업계에 알려진 스캐폴드 단백질과 같은 비항체 유래 스캐폴드를 포함할 수 있다.

[0201] 본원의 "항체"는 두 개의 중쇄(HC)와 두 개의 경쇄(LC)로 구성된 면역글로불린에 속하는 전형적인 "사중 사슬 항체"를 포함하며; 중쇄는 N 단에서 C 단 방향으로 중쇄 가변 영역(VH), 중쇄 불변 영역 CH1 도메인, 힌지 영역(HR), 중쇄 불변 영역 CH2 도메인, 중쇄 불변 영역 CH3 도메인으로 구성되는 폴리펩티드 사슬을 가리키며; 또한 상기 전장 항체가 IgE 아이소타입인 경우, 선택적으로 중쇄 불변 영역 CH4 도메인를 더 포함하고; 경쇄는 N 단에서 C 단 방향으로 경쇄 가변 영역(VL)과 경쇄 불변 영역(CL)으로 구성되는 폴리펩티드 사슬이며; 중쇄와 중쇄 사이, 중쇄와 경쇄 사이는 이황화 결합을 통해 연결되어 "Y"형 구조를 형성한다. 면역글로불린 중쇄 불변 영역의 아미노산 구성과 배열 순서가 다르기 때문에, 이의 항원성도 다르다. 이를 바탕으로, 본원의 "면역글로불린"을 IgM, IgD, IgG, IgA 및 IgE의 다섯 가지 유형(혹은 면역글로불린의 아이소타입이라고 칭함)으로 분류할 수 있고, 이에 상응하는 중쇄는 각각 μ 사슬, δ 사슬, γ 사슬, α 사슬 및 ε 사슬이다. 동일한 유형의 Ig는 이의 힌지 영역 아미노산 구성과 중쇄 이황화 결합의 수 및 위치의 차이에 따라, 서로 다른 서브클래스로 분류될 수 있으며, 예를 들어 IgG는 IgG1, IgG2, IgG3 및 IgG4로 분류할 수 있고, IgA는 IgA1과 IgA2로 분류할 수 있다. 경쇄는 불변 영역의 상이함에 따라 κ 사슬 또는 λ 사슬로 분류된다. 다섯 가지 유형 Ig의 각 Ig에는 모두 κ 사슬 또는 λ 사슬이 있을 수 있다.

[0202] 본원의 "항체"는 또한 단봉 낙타(Camelus dromedarius), 쌍봉 낙타(Camelus bactrianus), 라마(Lama glama),

구아나코(Lama guanicoe) 및 알파카(Vicugna pacos) 등으로부터 생성된 중쇄 항체(heavy-chain antibodies, HCAbs) 및 상어 등 연골 어류에서 발견되는 면역글로불린 신규 항원 수용체(Ig new antigen receptor, IgNAR)와 같이 경쇄를 포함하지 않는 항체를 포함한다.

[0203] 본원의 "항체"는 인간 및 비인간 동물을 포함하나 이에 한정되지 않는 모든 동물로부터 유래할 수 있으며, 상기 비인간 동물은 영장류 동물, 포유동물, 설치류 동물 및 척추동물, 예를 들어 낙타과 동물, 라마, 구아나코, 알파카, 양, 토끼, 마우스, 랫트 또는 연골 어류(예를 들어, 상어)로부터 선택할 수 있다.

[0204] 본원의 "항체"는 단클론 항체, 다클론 항체, 단일 특이적 항체, 다중 특이적 항체(예를 들어, 이중 특이적 항체), 1가 항체, 다가 항체, 온전한 항체, 온전한 항체의 단편, 네이키드 항체, 접합된 항체, 키메라 항체, 인간화 항체 또는 전체 인간 항체를 포함하나 이에 한정되지 않는다.

[0205] 용어 "단클론 항체"는 대체로 동질적인 항체 집단에서 얻은 항체를 가리키며, 즉 가능한 변이체(예를 들어 천연적으로 존재하는 돌연변이를 함유하거나 통상적으로 소량으로 존재하는 제제의 생산 과정에 생성된 변이체) 이외에, 상기 집단으로 구성되는 각 항체가 동일하고/동일하거나 동일한 에피토프에 결합한다. 통상적으로 서로 다른 결정기(에피토프)에 대해 서로 다른 항체를 포함하는 다클론 항체 제제와 달리, 단클론 항체 제제의 각 단클론 항체는 항원의 단일 결정기에 대한 것이다. 본원에서 수식어 "단클론"은 임의의 특정 방법을 통해 상기 항체 또는 항원 결합 분자를 생산해야 한다는 의미로 해석되어서는 안 된다. 예를 들어, 단클론 항체는 하이브리도마 기술, DNA 재조합 방법, 파지 라이브러리 디스플레이 기술 및 인간 면역글로불린 유전자좌의 전부 또는 일부를 함유하는 형질전환 동물을 이용하는 방법 및 당업계에서 알려진 기타 방법을 포함(이에 한정되지 않음)하는 다양한 기술에 의해 제조하여 얻을 수 있다.

[0206] 용어 "천연 항체"는 다세포 유기체의 면역계에 의해 생산되고 쌓을 이루는 항체를 가리킨다. 본원의 용어 "조작된 항체"는 유전자 조작, 항체 조작 등의 기술을 통해 얻은 비천연 항체를 가리키며, 예시적으로, "조작된 항체"에는 인간화 항체, 소분자 항체(예를 들어 scFv 등), 이중 특이적 항체 등을 포함한다.

[0207] 용어 "단일 특이적"은 각 결합 부위가 동일한 항원의 동일한 에피토프에 결합하는 하나 이상의 결합 부위를 갖는 것을 가리킨다.

[0208] 용어 "다중 특이적 항체"는 적어도 두 개의 항원 결합 부위를 갖는 것을 가리키며, 상기 적어도 두 개의 항원 결합 부위의 각 항원 결합 부위는 동일한 항원의 서로 다른 에피토프 또는 서로 다른 항원의 서로 다른 에피토프에 결합한다. 따라서, 예컨대 "이중 특이적", "삼중 특이적", "사중 특이적" 등의 용어는 항체/항원 결합 분자가 결합할 수 있는 서로 다른 에피토프의 수를 가리킨다.

[0209] 용어 "가"는 항체/항원 결합 분자에 정의된 수의 결합 부위가 존재함을 가리킨다. 따라서, 용어 "1가", "2가", "4가" 및 "6가"는 각각 항체/항원 결합 분자의 한 개의 결합 부위, 두 개의 결합 부위, 네 개의 결합 부위 및 여섯 개의 결합 부위가 존재함을 나타낸다.

[0210] 본원의 "전장 항체", "완전한 항체" 및 "온전한 항체"는 본원에서 상호 교환적으로 사용될 수 있으며, 천연 항체 구조와 대체로 유사한 구조를 갖는 것을 가리킨다.

[0211] 본원의 "항원 결합 단편" 및 "항체 단편"은 본원에서 상호 교환적으로 사용될 수 있으며, 이는 온전한 항체의 전체 구조를 갖지 않고, 온전한 항체의 일부 또는 그 일부의 변이체만을 포함하며, 상기 일부 또는 그 일부의 변이체는 항원에 결합하는 능력을 갖는다. 본원에서 "항원 결합 단편" 또는 "항체 단편"은 Fab, Fab', Fab'-SH, F(ab')2, Fv, VHH 및 scFv를 포함하나 이에 한정되지 않는다.

[0212] 온전한 항체가 파파인에 의해 소화되어 "Fab" 단편이라고 칭하는 두 개의 동일한 항원 결합 단편을 생성하며, 각각은 중쇄 및 경쇄의 가변 도메인뿐만 아니라 경쇄의 불변 도메인과 중쇄의 제1 불변 도메인(CH1)을 함유한다. 이와 같이, 본원의 용어 "Fab 단편"은 경쇄의 VL 도메인 및 불변 도메인(CL)의 경쇄 단편 및 중쇄의 VH 도메인 및 제1 불변 도메인(CH1)을 포함하는 항체 단편을 가리킨다. Fab' 단편은 중쇄 CH1 도메인의 카르복시 말단에 항체의 힌지 영역으로부터 유래된 하나 이상의 시스테인을 포함하는 소수의 잔기가 증가된다는 점에서 Fab 단편과 다르다. Fab'-SH는 불변 도메인의 시스테인 잔기가 유리 티올 그룹을 운반하는 Fab' 단편이다. 펩신에 의해 처리되어 두 개의 항원 결합 부위(두 개의 Fab 단편)와 Fc 영역의 일부를 갖는 F(ab')2 단편을 생성한다.

[0213] "Fv 단편"은 온전한 항원 결합 부위를 포함하는 IgG 및 IgM에 의해 생성된 가장 작은 단편이며, Fv 단편은 Fab와 동일한 결합 특성 및 유사한 3차원 결합 특성을 가지며, Fv 단편의 VH 및 VL 사슬은 비공유적 상호작용에 의

해 결합된다.

[0214] 용어 "scFv"(single-chain variable fragment)는 VL 및 VH 도메인을 포함하는 단일 폴리펩티드 사슬을 가리키며, 여기서 상기 VL 및 VH는 링커(linker)에 의해 연결된다(예를 들어 Bird 등, Science 242:423-426 (1988); Huston 등, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85:5879-5883(1988); 및 Pluckthun, The Pharmacology of Monoclonal Antibodies, 제113권, Roseburg 및 Moore 편집, Springer-Verlag, 뉴욕, 제269-315페이지(1994) 참조). 이와 같은 scFv 분자는 일반 구조: NH2-VL-링커-VH-COOH 또는 NH2-VH-링커-VL-COOH를 가질 수 있다. 적합한 종래기술의 경우, 링커는 중복된 GGGGS 아미노산 서열 또는 이의 변이체로 구성된다. 예를 들어, 아미노산 서열(GGGGS) 4를 갖는 링커를 사용할 수 있으나, 이의 변이체를 사용할 수도 있다(Holliger 등(1993), Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:6444-6448). 본 개시에 사용될 수 있는 다른 링커는 Alfthan 등(1995), Protein Eng. 8:725-731, Choi 등(2001) Eur. J. Immunol. 31:94-106. Hu 등(1996), Cancer Res.56:3055-3061, Kipriyanov 등(1999), J. Mol. Biol. 293:41-56 및 Roovers 등(2001), Cancer Immunol에서 설명되어 있다. 일부 상황에는, scFv의 VH와 VL 사이에 이황화 결합이 존재하여 이황화 결합으로 연결된 Fv(dsFv)를 형성할 수도 있다.

[0215] 용어 "디아바디(diabody)"는, 이의 VH 및 VL 도메인이 단일 폴리펩티드 사슬에서 발현되지만, 너무 짧은 링커를 사용하면 동일한 사슬의 두 도메인 사이의 쌍을 이룰 수 없어 도메인이 다른 사슬의 상보적인 도메인과 쌍을 이루어 두 개의 항원 결합 부위를 생성하도록 강요한다(예를 들어, Holliger P. 등, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90: 6444-6448 (1993), 및 Poljak R. J. 등, Structure 2:1121-1123(1994)을 참조).

[0216] 용어 "키메라 항체(Chimeric antibody)"는 경쇄 또는/및 중쇄의 일부가 한 항체(특정 종으로부터 유래되거나 특정 항체 클래스 또는 서브클래스에 속할 수 있음)로부터 유래되고, 경쇄 또는/및 중쇄의 다른 일부가 다른 한 항체(동일하거나 상이한 종으로부터 유래될 수 있거나 동일하거나 상이한 항체 클래스 또는 서브클래스에 속할 수 있음)로부터 유래되지만 어떤 경우에도 여전히 표적 항원에 대한 결합 활성을 유지하는 항체를 가리킨다(Cabilly 등, U.S.P 4,816,567; Morrison 등, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 81:6851 6855(1984)). 예를 들어, 용어 "키메라 항체"는 항체의 중쇄 및 경쇄 가변 영역이 제1 항체(예를 들어, 마우스 유래 항체)로부터 유래되고, 항체의 중쇄 및 경쇄 불변 영역이 제2 항체(예를 들어, 인간 항체)로부터 유래되는 항체(예를 들어, 인간-마우스 키메라 항체)를 포함할 수 있다.

[0217] 용어 "인간화 항체"는 유전자 조작을 통해 개조된 비인간 항체를 가리키며, 인간 항체의 서열과 상동성을 높이기 위해 이의 아미노산 서열이 변형된다. 통상적으로, 인간화 항체의 전부 또는 부분 CDR 영역은 비인간 항체(공여자 항체)로부터 유래되고, 전부 또는 부분의 비CDR 영역(예를 들어, 가변 영역의 FR 및/또는 불변 영역)은 인간 면역글로불린(수용체 항체)로부터 유래된다. 인간화 항체는 통상적으로 공여자 항체의 예상 성질을 보존 또는 부분적으로 보존한 것으로, 항원 특이성, 친화성, 반응성, 면역 세포 활성을 향상시키는 능력, 면역응답을 증강시키는 능력 등을 포함하나 이에 한정되지 않는다.

[0218] 용어 "전체 인간 항체"는 FR 및 CDR 양자가 모두 인간 생식계열 면역글로불린 서열로부터 유래된 가변 영역을 갖는 항체를 가리킨다. 또한, 항체가 불변 영역을 포함하는 경우, 불변 영역도 인간 생식계열 면역글로불린 서열로부터 유래된다. 본원의 "전체 인간 항체"는 인간 생식계열 면역글로불린 서열에 의해 코딩되지 않는 아미노산 잔기(예를 들어, 체외 무작위 또는 부위 특이적 돌연변이 유발에 의해 또는 체내 체세포 돌연변이에 의해 도입된 돌연변이)를 포함할 수 있다. 그러나, 본원의 "전체 인간 항체"는 다른 포유동물 종(예를 들어, 마우스)의 생식계열로부터 유래된 CDR 서열이 인간 프레임워크 서열에 이식된 항체를 포함하지 않는다.

[0219] 용어 "가변 영역"은 항원과 결합할 수 있도록 하는 항체의 중쇄 또는 경쇄에 포함되는 영역을 가리키며, "중쇄 가변 영역"은 "VH" 및 "HCVR"과 상호 교환적으로 사용할 수 있고, "경쇄 가변 영역"은 "VL" 및 "LCVR"과 상호 교환적으로 사용할 수 있다. 천연 항체의 중쇄 및 경쇄의 가변 영역(각각 VH 및 VL)은 일반적으로 유사한 구조를 가지며, 각 도메인은 네 개의 보존적 프레임워크 영역(FR)과 세 개의 초가변 영역(HVR)을 포함한다. 예를 들어, Kindt 등, Kuby Immunology, 제6판, W. H. Freeman and Co., p. 91(2007)을 참조한다. 단일 VH 또는 VL 도메인은 항원 결합 특이성을 부여하는 데 충분할 수 있다. 본원의 용어 "상보성 결정 영역"과 "CDR"은 상호 교환적으로 사용할 수 있으며, 통상적으로 중쇄 가변 영역(VH) 또는 경쇄 가변 영역(VL)의 초가변 영역(HVR)을 가리키며, 해당 부위는 공간적 구조 측면에서 항원 에피토프와 정밀한 상보성을 형성할 수 있기 때문에 상보성 결정 영역이라고도 칭하며, 여기서, 중쇄 가변 영역 CDR은 HCDR로 약칭할 수 있고, 경쇄 가변 영역 CDR은 LCDR로 약칭할 수 있다. 본원의 용어 "프레임워크 영역" 또는 "FR 영역"은 상호 교환적으로 사용할 수 있으며, 항체 중쇄 가변 영역 또는 경쇄 가변 영역에서 CDR 이외의 아미노산 잔기를 가리킨다. 통상적으로 전형적인 항체 가변 영역은 FR1-CDR1-FR2-CDR2-FR3-CDR3-FR4의 순서로 4개의 FR 영역과 3개의 CDR 영역으로 구성된다.

[0220] 본원의 "CDR"은 Kabat 넘버링 시스템, Chothia 넘버링 시스템 또는 IMGT 넘버링 시스템을 포함하나 이에 한정되지 않는 당업계에서 공지된 방식으로 표시하고 정의할 수 있으며, 사용되는 도구 웹사이트는 AbRSA 웹사이트(http://cao.labshare.cn/AbRSA/cdrs.php), abYsis 웹사이트(www.abysis.org/abysis/sequence_input/key_annotation/key_annotation.cgi) 및 IMGT 웹사이트(http://www.imgt.org/3Dstructure-DB/cgi/DomainGapAlign.cgi#results)를 포함하나 이에 한정되지 않는다. 본원의 CDR은 서로 다른 방식으로 정의된 아미노산 잔기의 중첩(overlap) 및 하위 집합을 포함한다.

[0221] 본원의 용어 "중쇄 불변 영역"은 항체 중쇄의 카르복시 말단 부분을 가리키며, 이는 항체와 항원의 결합에 직접 관여하지는 않지만, Fc 수용체와의 상호 작용과 같은 이펙터 기능을 나타내고, 항체의 가변 도메인에 비해 보다 더 보존적인 아미노산 서열을 갖는다. "중쇄 불변 영역"은 적어도 CH1 도메인, 힌지 영역, CH2 도메인, CH3 도메인, 또는 이의 변이체 또는 단편을 포함한다. "중쇄 불변 영역"은 "전장 중쇄 불변 영역" 및 "중쇄 불변 영역 단편"을 포함하는 것으로, 전자는 천연 항체 불변 영역과 대체로 유사한 구조를 갖는 반면, 후자는 "전장 중쇄 불변 영역의 일부"만을 포함한다. 예시적으로, 전형적인 "전장 항체 중쇄 불변 영역"은 CH1 도메인-힌지 영역-CH2 도메인-CH3 도메인으로 구성되며; 항체가 IgE인 경우, 이는 CH4 도메인을 더 포함하고; 항체가 중쇄 항체인 경우, 이는 CH1 도메인을 포함하지 않는다. 예시적으로, 전형적인 "중쇄 불변 영역 단편"은 CH1, Fc 또는 CH3 도메인으로부터 선택될 수 있다.

[0222] 본원의 용어 "경쇄 불변 영역"은 항체 경쇄의 카르복시 말단 부분을 가리키며, 이는 항체와 항원의 결합에 직접 관여하지는 않으며, 상기 경쇄 불변 영역은 불변 κ 도메인 또는 불변 λ 도메인으로부터 선택될 수 있다.

[0223] 본원의 용어 "Fc"는 온전한 항체가 파파인 가수분해에 의해 형성된 항체의 카르복시 말단 부분을 가리키며, 전형적으로, 이는 항체의 CH3 및 CH2 도메인을 포함한다. Fc 영역은 예를 들어 천연 서열 Fc 영역, 재조합 Fc 영역 및 변이체 Fc 영역을 포함한다. 비록 면역글로불린 중쇄의 Fc 영역의 경계는 약간 변할 수 있지만, 인간 IgG 중쇄의 Fc 영역은 통상적으로 Cys226 위치의 아미노산 잔기 또는 Pro230에서 이의 카르복시 말단까지 연장되는 것으로 정의된다. Fc 영역의 C 말단 라이신(Kabat 넘버링 시스템에 따른 잔기 447)은 예를 들어, 항체의 생성 또는 정제 과정에서 제거될 수 있거나, 항체의 중쇄를 코딩하는 핵산에 대한 재조합 공정에 의해 제거될 수도 있으므로, Fc 영역은 Lys447을 포함할 수 있고 포함하지 않을 수도 있다.

[0224] 본원의 용어 "동일성"은 두 개의 아미노산 서열 또는 두 개의 핵산 서열의 "동일성" 백분율을 결정하기 위해, 최적의 비교를 위해 상기 서열을 정렬(예를 들어, 최적의 정렬을 위해 제1 및 제2 아미노산 서열 또는 핵산 서열 중 하나 또는 둘에 갭을 도입하거나, 비상동 서열이 비교 목적을 위해 폐기될 수 있음)하는 방식을 통해 계산하여 얻을 수 있다. 이어서, 대응하는 아미노산 위치 또는 뉴클레오티드 위치에 있는 아미노산 잔기 또는 뉴클레오티드를 비교한다. 제1 서열의 위치가 제2 서열의 대응하는 위치에 있는 동일한 아미노산 잔기 또는 뉴클레오티드로 채워지면 상기 분자는 이 위치에서 동일하다.

[0225] 두 서열 사이의 동일성 백분율은 두 서열을 최적으로 정렬하기 위해 도입되어야 하는 갭의 수와 각 갭의 길이를 고려하여, 상기 서열이 공유하는 동일한 위치에 따라 변화한다.

[0226] 수학적 알고리즘을 이용하여 두 서열 간의 서열 비교 및 동일성 백분율 계산을 실현할 수 있다. 예를 들어, GCG 소프트웨어 패키지의 GAP 프로그램에 통합된 Needlema 및 Wunsch((1970) J. Mol. Biol. 48:444-453) 알고리즘(www.gcg.com에서 획득 가능)을 사용하여, Blossum 62 매트릭스 또는 PAM250 매트릭스를 사용하고, 갭 가중치를 16, 14, 12, 10, 8, 6 또는 4로 하고, 길이 가중치를 1, 2, 3, 4, 5 또는 6으로 하며, 두 아미노산 서열 사이의 동일성 백분율을 결정한다. 또 다른 예로, GCG 소프트웨어 패키지의 GAP 프로그램(www.gcg.com에서 획득 가능)을 사용하여, NWSgapdna.CMP 매트릭스를 사용하고, 갭 가중치를 40, 50, 60, 70 또는 80으로 하고, 길이 가중치를 1, 2, 3, 4, 5 또는 6으로 하며, 두 뉴클레오티드 서열 사이의 동일성 백분율을 결정한다. 특히 바람직한 파라미터 세트(및 별도로 설명되지 않는 한 사용해야 하는 하나의 파라미터 세트)는 갭 페널티 12, 갭 연장 페널티 4 및 프레임시프트 갭 페널티 5를 채택하는 Blossum62 점수 매트릭스이다.

[0227] 본원에서 "n은 1~16의 실수이다"는 n이 1 이상 또는 16 이하의 임의의 실수임을 가리킨다.

[0228] 본원에서, " "는 연결 부위를 나타낸다.

[0229] 본원에서 라세미체 또는 순수한 거울상 화합물의 도식적 표현은 Maehr, J. Chem. 편집, 1985, 62:114-120으로부터 유래된 것이다. 별도로 설명되지 않는 한, 웨지 결합 및 점선 웨지 결합(및)을 사용하여 하나의 입체

중심의 절대 배열을 나타내며, 흑색 점선 결합과 점선 결합(및)을 사용하여 하나의 입체 중심의 상대 배열(예를 들어, 지환족 화합물의 시스-트랜스 배열)을 나타낸다.

[0230] 용어 "호변 이성질체"는 분자 내 특정 원자가 두 위치 사이에서 빠르게 이동하여 생성되는 작용기 이성질체를 가리킨다. 본 개시의 화합물은 호변 이성질 현상을 나타낼 수 있다. 호변 이성질체의 화합물은 두 가지 이상의 상호 전환 가능한 유형으로 존재할 수 있다. 호변 이성질체는 일반적으로 평형 형태로 존재하며, 단일 호변 이성질체를 분리하려는 시도는 통상적으로 물리적 및 화학적 특성이 화합물의 혼합물과 일치하는 혼합물을 생성한다. 평형 위치는 분자 내의 화학적 특성에 따라 달라진다. 예를 들어, 아세트알데히드와 같은 많은 지방족 알데히드와 케톤에서는 케토 형태가 우세한 반면, 페놀에서는 에놀 형태가 우세한다. 본 개시는 화합물의 모든 호변 이성질체 형태를 포함한다.

[0231] 용어 "입체 이성질체"는 시스-트랜스 이성질체, 거울상 이성질체 및 부분입체 이성질체를 포함하는 분자 내 원자의 서로 다른 공간 배열로 인해 발생하는 이성질체를 가리킨다.

[0232] 본 개시의 화합물은 탄소 원자, 황 원자, 질소 원자, 인 원자 또는 비대칭 이중 결합과 같은 비대칭 원자를 가질 수 있으므로, 본 개시의 화합물은 특정 기하학적 이성질체 또는 입체 이성질체 형태로 존재할 수 있다. 특정 기하학적 이성질체 또는 입체 이성질체 형태는 시스 이성질체 및 트랜스 이성질체, E형 및 Z형 기하 이성질체, (-)- 및 (+)-거울상 이성질체, (R)- 및 (S)-거울상 이성질체, 부분입체 이성질체, (D)-이성질체, (L)-이성질체, 및 이의 라세미 혼합물 또는 거울상 이성질체 또는 부분입체 이성질체가 풍부하게 보유되는 혼합물과 같은 다른 혼합물일 수 있으며, 위의 모든 이러한 이성질체 및 이들의 혼합물은 모두 본 개시 화합물의 정의 범위 내에 속한다. 알킬 등 치환기에는 별도의 비대칭 탄소 원자, 비대칭 황 원자, 비대칭 질소 원자 또는 비대칭 인 원자가 존재할 수 있으며, 모든 치환기에 관련된 이러한 이성질체 및 이들의 혼합물도 모두 본 개시 화합물의 정의 범위 내에 포함된다. 본 개시의 비대칭 원자를 함유하는 화합물은 순수한 광학 활성 형태 또는 라세미 형태로 분리될 수 있고, 순수한 광학 활성 형태는 라세미 혼합물로부터 분리되거나 또는 키랄 원재료 또는 키랄 시약을 사용하여 합성될 수 있다.

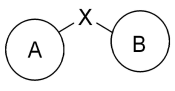
[0233] 용어 "치환되다"는 특정 원자의 원자가 상태가 정상적이고 치환된 화합물이 안정적이기만 하면, 특정 원자 상의 임의의 하나 이상의 수소 원자가 치환기에 의해 치환되는 것을 가리킨다. 치환기가 옥소(즉 =O)일 경우, 두 개의 수소 원자가 치환되고 방향족기에 옥소가 발생하지 않는 것을 의미한다.

[0234] 용어 "선택적" 또는 "선택적으로"는 후속적으로 설명되는 사건 또는 상황이 일어날 수 있거나 또는 일어나지 않을 수 있음을 가리키며, 해당 설명은 상기 사건 또는 상황이 발생하는 경우, 또한 상기 사건 또는 상황이 발생하지 않는 경우가 포함된다. 예를 들어, 에틸이 "선택적으로" 할로겐에 의해 치환된다는 것은 에틸이 치환되지 않은 것(CH_2CH_3), 단일 치환된 것(CH_2CH_2F, CH_2CH_2Cl 등), 다중 치환된 것($CHFCH_2F$, CH_2CHF_2, $CHFCH_2Cl$, CH_2CHCl_2 등) 또는 완전 치환된 것(CF_2CF_3, CF_2CCl_3, CCl_2CCl_3 등)일 수 있음을 가리킨다. 당업자는 하나 이상의 치환기를 포함하는 임의의 그룹에 대해, 공간에 존재할 수 없고/없거나 합성될 수 없는 치환 또는 치환 패턴이 도입되지 않을 것이라는 점을 이해해야 한다.

[0235] 화합물의 구성 또는 구조에서 어떠한 변수(예를 들어, R^a 및 R^b)가 한 번 이상 나타날 경우, 이는 각 경우마다 독립적으로 정의된다. 예를 들어, 하나의 그룹이 2개의 R^b에 의해 치환될 경우, 각 R^b는 모두 독립적인 선택 항목을 가진다.

[0236] $-(CH_2)_0-$와 같이 연결 그룹의 수가 0인 경우, 해당 연결 그룹이 결합임을 나타낸다.

[0237] 변수 중 하나가 화학 결합으로부터 선택되거나 존재하지 않는 경우, 이에 연결된 두 그룹이 직접 연결됨을 나타내며, 예를 들어, A-L-Z의 L이 결합을 나타내는 경우 해당 구조는 실제로 A-Z임을 나타낸다.

[0238] 본원에서 언급된 연결 그룹의 그 연결 방향이 밝히지 않은 경우, 이 연결 방향은 임의적이다. 예를 들어, 구조 유닛 

의 X가 "C_1-C_3 알킬렌-O"로부터 선택되는 경우, 이때 X는 고리 A와 고리 B를 왼쪽에서 오른쪽 방향으로 연결하여 "고리 A-C_1-C_3 알킬렌-O-고리 B"를 형성할 수 있고, 고리 A와 고리 B를 오른쪽에서 왼쪽 방향으로 연결하여 "고리 A-O-C_1-C_3 알킬렌-고리 B"를 형성할 수도 있다.

[0239] 본원에서 C_m-C_n은, m~n 범위 내에서 정수 개의 탄소 원자를 갖는 것을 가리킨다.

[0240] 용어 "알킬"은 일반식이 C_nH_{2n+1}인 탄화수소기를 가리키며, 해당 알킬은 직쇄 또는 분지쇄일 수 있다. 용어 "C_1-C_6 알킬"은 1, 2, 3, 4, 5 또는 6개의 탄소 원자를 갖는 직쇄 또는 분지쇄 포화 탄화수소기를 나타내는 것으로 이해되어야 한다. 상기 알킬은 메틸, 에틸, 프로필, 부틸, 펜틸, 헥실, 이소프로필, 이소부틸, sec-부틸, tert-부틸, 이소펜틸, 2-메틸부틸, 1-메틸부틸, 1-에틸프로필, 1,2-디메틸프로필, 네오펜틸, 1,1-디메틸프로필, 4-메틸펜틸, 3-메틸펜틸, 2-메틸펜틸, 1-메틸펜틸, 2-에틸부틸, 1-에틸부틸, 3,3-디메틸부틸, 2,2-디메틸부틸, 1,1-디메틸부틸, 2,3-디메틸부틸, 1,3-디메틸부틸 또는 1,2-디메틸부틸 등을 포함하나 이에 한정되지 않고; 용어 "C_1-C_3 알킬"은 메틸, 에틸, n-프로필, 이소프로필과 같은 1 내지 3개의 탄소 원자를 함유하는 알킬을 가리킨다.

[0241] 본원에 기재된 "C_1-C_6 알킬"은 "C_1-C_3 알킬"을 추가로 포함할 수 있다.

[0242] 용어 "알키닐"은 탄소 원자와 수소 원자로 구성되는 직쇄 또는 분지쇄의 적어도 하나의 삼중 결합을 갖는 불포화 지방족 탄화수소기를 가리킨다. 예를 들어, 용어 "C_2-C_6 알키닐"은 바람직하게는 하나 이상의 삼중 결합을 포함하고 2, 3, 4, 5 또는 6개의 탄소 원자를 갖는 직쇄 또는 분지쇄의 탄화수소를 나타내는 것으로 이해해야 한다. "C_2-C_6 알키닐"의 예시로는 에티닐(-C≡CH), 프로프-1-알키닐(1-프로피닐, -C≡CCH_3), 프로프-2-알키닐(-CH_2C≡CH), 부트-1-알키닐, 부트-2-알키닐 또는 부트-3-알키닐이 포함되나 이에 한정되지 않는다. "C_2-C_6 알키닐"은 "C_2-C_3 알키닐"을 포함할 수 있고, "C_2-C_3 알키닐"의 예시로는 에티닐(-C≡CH), 프로프-1-알키닐(1-프로피닐, -C≡CCH_3), 프로프-2-알키닐(-CH_2C≡CH)이 포함된다.

[0243] 용어 "사이클로알킬"은 완전히 포화되고 단일 고리, 앤드 고리, 브릿지 고리 또는 스피로 고리 등 형태로 존재하는 탄소 고리를 가리킨다. 용어 "C_3-C_6 사이클로알킬"은 3~6개의 탄소 원자를 갖는 포화된 단일 고리, 앤드 고리, 스피로 고리 또는 브릿지 고리를 나타내는 것으로 이해되어야 하며, 구체적인 예시로는 사이클로프로필, 사이클로부틸, 사이클로펜틸, 사이클로헥실 등이 포함되나 이에 한정되지 않는다.

[0244] 용어 "사이클로알케닐"은 완전히 포화되지 않고 단일 고리, 축합 고리, 브릿지 고리 또는 스피로 고리 형태로 존재하는 비방향족 탄소 고리를 가리킨다. 별도로 명시되지 않는 한, 해당 탄소 고리는 통상적으로 5 내지 8원 고리이다. 용어 "C_5-C_7 사이클로알케닐"은 고리 원자 수가 5, 6 또는 7인 사이클로알케닐을 가리키며, 구체적인 예시로는 사이클로펜테닐, 사이클로펜타디에닐, 사이클로헥세닐, 사이클로헥사디에닐, 사이클로헵테닐 또는 사이클로헵타디에닐 등이 포함되나 이에 한정되지는 않는다. 용어 "C_5-C_7 사이클로알케닐"은 "C_5-C_6 사이클로알케닐" 등 범위를 포함할 수 있다. 용어 "C_5-C_6 사이클로알케닐"은 고리 원자 수가 5 또는 6인 사이클로알케닐을 가리키며, 구체적인 예시로는 사이클로펜테닐, 사이클로펜타디에닐, 사이클로헥세닐, 사이클로헥사디에닐 등이 포함되나 이에 한정되지 않는다.

[0245] 용어 "헤테로사이클릴"은 고리 원자에 1~5개의 헤테로 원자 또는 헤테로 원자단(즉, 헤테로 원자를 함유하는 원자단)이 포함되는 완전히 포화되거나 부분적으로 포화된 단일 고리, 앤드 고리, 스피로 고리 또는 브릿지 고리 그룹을 가리키며, 상기 "헤테로 원자 또는 헤테로 원자단"은 질소 원자(N), 산소 원자(O), 황 원자(S), 인 원자(P), 붕소 원자(B), -S(=O)$_2$-, -S(=O)-, -P(=O)$_2$-, -P(=O)-, -NH-, -S(=O)(=NH)-, -C(=O)NH- 또는 -NHC(=O)NH 등을 포함하나 이에 한정되지 않는다. 용어 "4-7원 헤테로사이클릴"은 고리 원자 수가 4, 5, 6 또는 7인 헤테로사이클릴을 의미하며, 이의 고리 원자에는 앞서 기재된 것으로부터 독립적으로 선택되는 1~3개의 헤테로 원자 또는 헤테로 원자단이 함유된다. 여기서, 4원 헤테로사이클릴의 예시로는 아제티딘 및 옥세탄이 포함되나 이에 한정되지 않고; 5원 헤테로사이클릴의 예시로는 테트라하이드로푸라닐, 디옥솔릴, 피롤리디닐, 이미다졸리디닐, 피라졸리디닐, 피롤리닐, 4,5-디하이드로옥사졸 또는 2,5-디하이드로-1H-피롤릴이 포함되나 이에 한정되지 않고; 6원 헤테로사이클릴의 예시로는 테트라하이드로피라닐, 피페리디닐, 모르폴리닐, 디티아닐, 티오모르폴리닐, 피페라지닐, 트리티아닐, 테트라하이드로피리딜 또는 4H-[1,3,4]티아디아지닐이 포함되나 이에 한정되지 않으며; 7원 헤테로사이클릴의 예시로는 디아제파닐이 포함되지만 이에 한정되지 않는다. 바람직하게는, "4-7원 헤테로사이클릴"은 "4-7원 헤테로사이클로알킬", "5-6원 헤테로사이클릴", "5-6원 헤테로사이클로알킬" 등 범위를 포함할 수 있다.

[0246] 용어 "5-6원 헤테로아릴"은 5 또는 6개의 고리 원자를 가지고, N, O 및 S로부터 독립적으로 선택되는 1~3개, 바람직하게는 1~2개의 헤테로 원자를 포함하는 방향족 고리를 가리킨다. 특히, 5-6원 헤테로아릴은 티에닐, 푸라

닐, 피롤릴, 옥사졸릴, 티아졸릴, 이미다졸릴, 피라졸릴, 이속사졸릴, 이소티아졸릴, 옥사디아졸릴, 트리아졸릴, 티아디아졸릴, 피리딜, 피리다지닐, 피리미디닐, 피라지닐 또는 트리아지닐 등으로부터 선택된다.

[0247] 용어 "할로" 또는 "할로겐"은 불소, 염소, 브롬 및 요오드를 가리킨다.

[0248] 용어 "치료"는 치료 대상체의 암, 자가면역성 질환 및 바이러스 감염의 진행과 같은 원하지 않는 생리학적 변화 또는 병변을 예방 및 완화(감소)시키는 것을 목적으로 하는, 외과 수술 또는 약물 처리(surgical or therapeutic treatment)를 가리킨다. 유익하거나 또는 원하는 임상 결과로는 검측 또는 검측 불가에 관계없이 증상 완화, 질환 정도 약화, 질환 상태 안정화(즉, 악화되지 않음), 질환 진행의 지연 또는 둔화, 질환 상태의 개선 또는 완화, 및 완화(부분 완화 또는 완전 완화 막론)를 포함하나 이에 한정되지는 않는다. 치료를 필요로 하는 대상체는 병증 또는 질환을 앓고 있는 대상체뿐만 아니라 병증 또는 질환에 걸리기 쉬운 대상체 또는 병증 또는 질환을 예방하고자 하는 대상체를 포함한다. 완화, 경감, 약화, 둔화, 지연 등의 용어를 언급할 때, 그 의미에는 제거, 소멸, 발생하지 않음 등의 상황도 포함한다.

[0249] 용어 "유효량"은 질환의 병증 또는 해당 질환의 진행을 방지하거나 완화시키기 위해 세포, 조직 또는 대상체에 단독으로 또는 다른 치료제와 조합하여 투여할 때 효과적인 치료제의 양을 가리킨다. "유효량"은 또한 증상을 완화시키기에 충분한 화합물의 양, 예를 들어 관련 의학적 병증을 치료, 치유, 방지 또는 지연시키거나 또는 이러한 병증을 치료, 치유, 방지 또는 완화시키는 속도를 가속화하기에 충분한 화합물의 양을 가리킨다. 활성 성분이 개체에게 단독으로 투여되는 경우, 치료 유효량은 단지 그 성분의 양만을 가리킨다. 어느 하나의 조합에 응용하는 경우, 치료 유효량은 조합 투여, 순차적으로 투여 또는 동시 투여 여부에 관계없이 치료 작용을 나타내는 활성 성분의 조합된 용량을 가리킨다.

[0250] 용어 "피험자"는 본 개시에 기재된 특정 질환 또는 병증에 대한 치료를 받는 유기체를 가리킨다. 대상체 및 환자의 예시로는 질환 또는 병증에 대한 치료를 받는 인간, 영장류 동물(예를 들어, 원숭이) 또는 비영장류 포유동물과 같은 포유동물이 포함된다.

[0251] "치료적 유효량"을 구성하는 본 개시의 화합물의 양은 해당 화합물, 질환 상태 및 이의 중증도, 투약 방식 및 치료할 포유동물의 연령에 따라 달라질 것이지만, 일상적으로 당업자가 자신의 지식 및 본 개시의 내용에 따라 결정할 수 있다.

[0252] 용어 "약학적으로 허용 가능한"은 신뢰할 수 있는 의학적 판단 범위 내에서, 과도한 독성, 자극성, 과민성 반응 또는 다른 문제나 합병증 없이 인간 및 동물 조직과 접촉하기에 적절하고 합리적인 이득과 위험도에 알맞는 화합물, 재료, 조성물 및/또는 제형을 대상으로 한다.

[0253] 용어 "약학적으로 허용 가능한 염"은 화합물이 무기산 또는 유기산과 형성된 염 및 화합물이 무기염 또는 유기염과 형성된 염을 포함하는 약학적으로 허용 가능한 산 또는 염기의 염을 가리킨다.

[0254] 용어 "약학 조성물"은 본 개시의 하나 이상의 화합물 또는 이의 염과 약학적으로 허용 가능한 부형제로 구성된 혼합물을 가리킨다. 약학 조성물의 목적은 본 개시의 화합물을 유기체에 투여하는 것을 유리하게 하는 것이다.

[0255] 용어 "약학적으로 허용 가능한 부형제"는 유기체에 뚜렷한 자극적 작용이 없고, 해당 활성 화합물의 생물학적 활성 및 성능을 손상시키지 않는 그런 부형제를 가리킨다. 적합한 부형제는 당업자가 숙지된 부형제이며, 예를 들어 탄수화물, 왁스, 수용성 및/또는 수 팽창 가능한 중합체, 친수성 또는 소수성 물질, 젤라틴, 오일, 용매, 물 등이다.

[0256] 단어 "포함하다(comprise)"와 이의 변이체인 예를 들어 comprises 또는 comprising은 개방적이고 비배타적인 의미, 즉 "포함하나 이에 한정되지 않는다"로 이해될 수 있다.

[0257] 본 개시는 본원에 기재된 바와 동일하나, 하나 이상의 원자가 원자량 또는 질량수가 자연에서 통상적으로 발견되는 것과 다른 원자량 또는 질량수의 원자에 의해 치환되는 동위 원소가 표기된 본 개시의 화합물을 더 포함한다. 본 개시의 화합물에 결합될 수 있는 동위 원소의 예시로는 수소, 탄소, 질소, 산소, 인, 황, 불소, 요오드 및 염소의 동위 원소가 포함되며, 예컨대, 각각 ^{2}H, ^{3}H, ^{11}C, ^{13}C, ^{14}C, ^{13}N, ^{15}N, ^{15}O, ^{17}O, ^{18}O, ^{31}P, ^{32}P, ^{35}S, ^{18}F, ^{123}I, ^{125}I 및 ^{36}Cl 등이다.

[0258] 특정 동위 원소가 표기된 본 개시의 화합물(예를 들어, ^{3}H 및 ^{14}C로 표기됨)은 화합물 및/또는 기질 조직 분포 분석에 사용할 수 있다. 삼중수소화(즉 ^{3}H) 및 탄소-14(즉 ^{14}C) 동위 원소는 제조 용이성 및 검출 가능성으로 인

해 특히 바람직하다. ^{15}O, ^{13}N, ^{11}C 및 ^{18}F와 같은 양전자 방출 동위 원소는 기질 점유율을 측정하기 위한 양전자 방출 단층 촬영(PET) 연구에 사용될 수 있다. 본 개시의 동위 원소 표지된 화합물은 통상적으로 본원에 개시된 방안 및/또는 실시예의 그런 유사한 하기 절차를 통해, 동위 원소 표지된 시약으로 비 동위 원소 표지된 시약을 치환하여 제조할 수 있다.

[0259] 본 개시의 약학 조성물은 적합한 단위 제형의 무균 용액, 현탁액 또는 동결건조 제품과 같은 비경구 투약에 적합할 수 있다. 예를 들어, 본 개시의 약학 조성물은 근육 내 또는 피하 투약을 위한 무균 주사 수용액의 형태일 수 있다. 본 개시의 약학 조성물은 물, 링거액 또는 등장성 염화나트륨 용액과 같은 다른 용매 및 용제와 함께 사용될 수 있다.

[0260] 본원에 기재된 화합물의 모든 투여 방법에서, 일일 투약량은 0.001mg/kg 내지 600mg/kg 체중, 바람직하게는 0.05mg/kg 내지 200mg/kg 체중, 보다 바람직하게는 0.1mg/kg 내지 100mg/kg 체중이며, 단일 또는 분할 용량의 형태이다.

[0261] 본 개시의 화합물은 하기에 열거된 구체적인 실시양태, 이와 다른 화학적 합성 방법과의 조합에 의해 형성된 실시양태 및 당업자에게 잘 숙지된 동등한 대체 방안을 포함하는, 당업자에게 숙지된 다양한 합성 방법에 의해 제조될 수 있으며, 바람직한 실시양태는 본 개시의 실시예를 포함하나 이에 한정되지 않는다.

[0262] 본 개시의 구체적인 실시양태의 화학 반응은 적합한 용매에서 완료되며, 상기 용매는 본 개시의 화학적 변화와 이의 필요한 시약 및 재료에 적합해야 한다. 본 개시의 화합물을 얻기 위해, 당업자는 때로 종래 실시양태에 기초하여 합성 단계 또는 반응 절차를 변경하거나 선택해야 할 필요가 있다.

[0263] 당업계에서 합성 경로를 계획할 때 중요한 한 고려 사항은 반응성 작용기(예컨대,본 개시의 아미노 및 카르복실)에 대한 적절한 보호기를 선택하는 것이고, 예를 들어, Greene's Protection Groups in Organic Synthesis(제4판). Hoboken, New Jersey: John Wiley & Sons, Inc을 참조할 수 있다. 본 개시에 인용된 모든 참고 문헌은 전체 내용이 본 개시에 포함된다.

[0264] **발명을 실시하기 위한 구체적인 내용**

[0265] 이하 실시예를 통해 본 개시를 상세히 설명하지만, 본 개시를 불리하게 제한하는 것을 의미하는 것은 아니다. 본원에서는 본 개시를 상세히 설명하고, 이의 구체적인 실시양태도 개시하였으며, 당업자에게는 본 개시의 정신과 범위를 벗어나지 않는 상황에서 본 개시의 구체적인 실시양태에 대한 다양한 변경을 수행할 수 있다는 것이 자명할 것이다. 본 개시에 사용되는 모든 시약은 시판되고 있으며 추가 정제 없이 바로 사용할 수 있는 것이다.

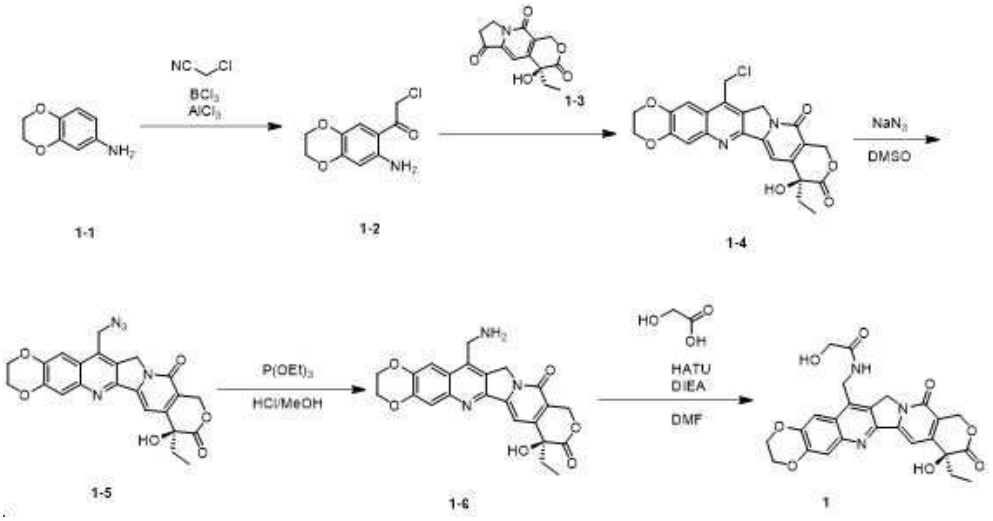
[0266] 별도로 설명하지 않는 한, 혼합 용매에 대해 표현된 비율은 부피 혼합 비율이다.

[0267] 별도로 설명하지 않는 한, %는 wt%를 가리킨다.

[0268] 화합물은 수동으로 또는 ChemDraw® 소프트웨어를 사용하여 명명되며, 시판되는 화합물은 공급업체 카탈로그 명칭을 채택한다.

[0269] 화합물의 구조는 핵자기공명(NMR) 및/또는 질량분석(MS)을 통해 결정된다. NMR 시프트 단위는 10^{-6}(ppm)이다. NMR 측정 용매는 중수소화 디메틸설폭시드, 중수소화 클로로포름, 중수소화 메탄올 등이며, 내부 표준은 테트라메틸실란(TMS)이며; "IC_{50}"은 절반 억제 농도를 가리키며, 최대 억제 효과의 절반이 달성되는 농도를 가리키며, "EC_{50}"은 최대 효과 농도의 절반에서 최대 효과의 50%를 일으키는 농도를 가리킨다.

[0270] **실시예 1. (*S*)-*N*-((8-에틸-8-하이드록시-9,12-디옥소-2,3,8,9,12,14-헥사하이드로-1*H*-[1,4]디옥시노[2,3-*g*]피라노[3',4':6,7]인돌리지노[1,2-*b*]퀴놀린-15-일)메틸)-2-하이드록시아세트아미드(화합물 1)**

[0271] 

[0272] **단계 1: 1-(7-아미노-2,3-디하이드로벤조[*b*][1,4]디옥신-6-일)-2-클로로에탄-1-온(중간체 1-2)의 합성**

[0273] **반응물 1-1**(500mg, 3.31mmol)을 1,2-디클로로에탄(3mL)에 용해시키고, 반응액을 0℃로 냉각시키고, 여기에 삼염화붕소(1M, 2.65mL)와 삼염화알루미늄(573.36mg, 4.30mmol)을 첨가하고, 질소 보호 하에 0℃에서 반응액 혼합물에 클로로아세토니트릴(299.67mg, 3.97mmol)을 첨가하고, 반응액을 질소 보호 하에 90℃에서 16시간 동안 교반하였다. LC-MS로 반응이 완료되었음을 검출하였다. 반응액을 실온으로 냉각시키고, 얼음물(30mL) 및 1N HCl(10mL)을 순차적으로 첨가하고, 이어서 30분 동안 교반하였다. 반응액에 디클로로메탄(30mL*3)을 첨가하고 3회 추출하고, 유기상을 합하여 포화 식염수(30mL)로 세척하고, 세척 후의 유기상을 적당량의 무수 황산나트륨으로 건조시켰다. 건조될 때까지 감압 농축하여, 조생성물을 분취용 박층 크로마토그래피(실리카, 석유 에테르:에틸 아세테이트=9:1)를 거쳐 표제 화합물(210mg)을 얻었다.

[0274] MS m/z (ESI): 228.0 $[M+H]^+$.

[0275] **단계 2: (*S*)-15-(클로로메틸)-8-에틸-8-하이드록시-2,3,11,14-테트라하이드로-12*H*-[1,4]디옥시노[2,3-*g*]피라노[3',4':6,7]인돌리지노[1,2-*b*]퀴놀린-9,12(8*H*)-디온(중간체 1-4)의 합성**

[0276] **중간체 1-2**(100mg, 439.28μmol) 및 **중간체 1-3**(115.64mg, 439.28μmol)을 무수 톨루엔(3mL)에 용해시키고, 여기에 피리디늄 p-톨루엔설폰산염(22.08mg, 87.86μmol)을 첨가하고 반응액을 질소 보호 하에 100℃에서 16시간 동안 교반하였다. LC-MS로 반응이 완료되었음을 검출하였다. 반응액을 실온으로 냉각시키고, 반응액을 여과하고, 필터 케이크를 에탄올(5mL*2)로 세척하여 조생성물인 표제 화합물(130mg)을 얻었다.

[0277] MS m/z (ESI): 455.1 $[M+H]^+$.

[0278] **단계 3: (*S*)-15-(아지도메틸)-8-에틸-8-하이드록시-2,3,11,14-테트라하이드로-12*H*-[1,4]디옥시노[2,3-*g*]피라노[3',4':6,7]인돌리지노[1,2-*b*]퀴놀린-9,12(8*H*)-디온(중간체 1-5)의 합성**

[0279] **중간체 1-4**(120mg, 263.82μmol)를 디메틸설폭사이드(1mL)에 용해시키고, 여기에 아지드화나트륨(25.73mg, 395.73μmol)을 첨가하고, 반응액을 질소 보호 하에 25℃에서 3시간 동안 교반하였다. LC-MS로 반응이 완료되었음을 검출하였다. 여기에 얼음물(2mL)을 첨가하고, 0.5시간 동안 교반하고, 여과하여 조생성물인 표제 화합물(90mg)을 얻었다.

[0280] MS m/z (ESI): 462.1 $[M+H]^+$.

[0281] **단계 4: (*S*)-15-(아미노메틸)-8-에틸-8-하이드록시-2,3,11,14-테트라하이드로-12*H*-[1,4]디옥시노[2,3-*g*]피라노[3',4':6,7]인돌리지노[1,2-*b*]퀴놀린-9,12(8*H*)-디온(중간체 1-6)의 합성**

[0282] **중간체 1-5**(90mg, 195.05μmol)를 무수 톨루엔(1mL)에 용해시키고, 여기에 트리에틸포스페이트(81.02mg, 487.62μmol)를 첨가하고 반응액을 질소 보호 하에 100℃에서 3시간 동안 교반하였다. 반응액을 25℃로 냉각시키고, 여기에 염산 메탄올 용액(0.5mL)을 첨가하고 반응액을 질소 보호 하에 85℃에서 16시간 동안 교반하였다. LC-MS로 반응이 완료되었음을 검출하였다. 반응액을 실온으로 냉각시키고, 여과하여 표제 화합물(18mg)을 얻었다.

[0283] MS m/z (ESI): 436.1 $[M+H]^+$.

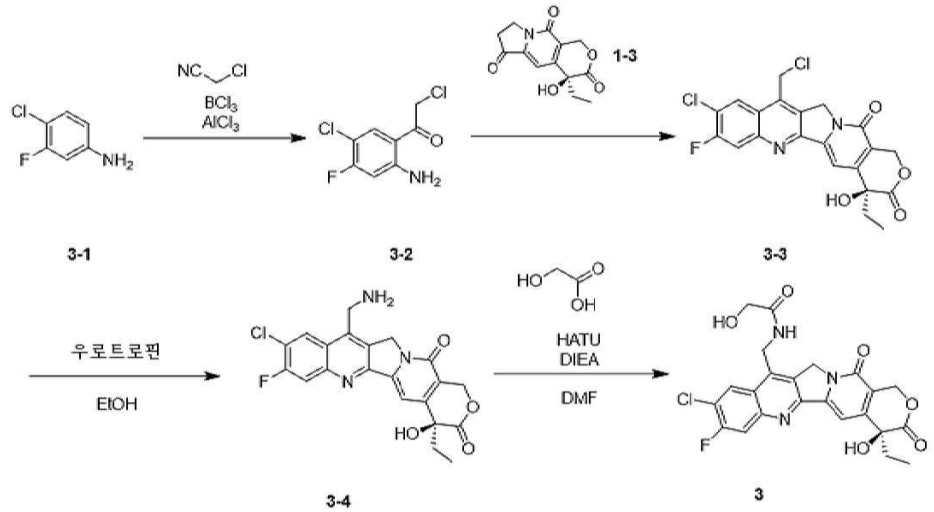
[0284] **단계 5: (*S*)-*N*-((8-에틸-8-하이드록시-9,12-디옥소-2,3,8,9,12,14-헥사하이드로-1*H*-[1,4]디옥시노[2,3-*g*]피라노[3',4':6,7]인돌리지노[1,2-*b*]퀴놀린-15-일)메틸)-2-하이드록시아세트아미드(화합물 1)의 합성**

[0285] **중간체 1-6**(18mg, 41.34μmol) 및 2-하이드록시아세트산(15.72mg, 206.69μmol)을 무수 *N*,*N*-디메틸포름아미드(1mL)에 용해시키고, 여기에 2-(7-아자벤조트리아졸)-*N*,*N*,*N*',*N*'-테트라메틸우로늄 헥사플루오로포스페이트(HATU)(23.58mg, 62.01μmol) 및 *N*,*N*-디이소프로필에틸아민(DIEA)(16.03mg, 124.02μmol)을 첨가하고, 반응액을 25℃에서 3시간 동안 교반하였다. LC-MS로 반응이 완료되었음을 검출하였다. 반응액을 여과하고, 분취용 고성능 액체 크로마토그래피(YMC-Actus Triart C18 컬럼 5μm 실리카, 직경 25mm, 길이 100mm; 용리액으로서 물(0.05%의 포름산 함유)과 아세토니트릴의 극성이 점차적으로 감소하는 혼합물을 사용하고; 아세토니트릴 구배 비율 10%~30%, 용리 시간 12분)로 정제하여 표제 화합물(7mg)을 얻었다.

[0286] MS m/z (ESI): 494.1 $[M+H]^+$.

[0287] **^{1}H NMR (400MHz, DMSO-d_6)** δ = 8.69 (t, *J* = 6.0 Hz, 1H), 7.92 (s, 1H), 7.56 (s, 1H), 7.26 (s, 1H), 6.49 (s, 1H), 5.57 (t, *J* = 5.7 Hz, 1H), 5.46 (s, 2H), 5.43 (s, 2H), 4.74 (d, *J* = 6.0 Hz, 2H), 4.44 (s, 4H), 3.82 (d, *J* = 5.6 Hz, 2H), 1.94-1.80 (m, 2H), 0.88 (m, 3H).

[0288] **실시예 3. (*S*)-*N*-((9-클로로-4-에틸-8-플루오로-4-하이드록시-3,14-디옥소-3,4,12,14-테트라하이드로-1*H*-피라노[3',4':6,7]인돌리지노[1,2-*b*]퀴놀린-11-일)메틸)-2-하이드록시아세트아미드(화합물 3)**

[0289] 

[0290] **단계 1: 1-(2-아미노-5-클로로-4-플루오로페닐)-2-클로로에탄-1-온(중간체 3-2)의 합성**

[0291] 삼염화붕소(1M, 13.74mL)를 1,2-디클로로에탄(24mL)에 용해시키고 반응액을 0℃로 냉각시키고, 여기에 **반응물 3-1**(2g, 13.74mmol) 및 클로로아세토니트릴(1.56g, 20.61mmol)을 첨가하고, 반응액을 0℃에서 10분 동안 교반하고, 여기에 삼염화알루미늄(2.38g, 17.86mmol)을 첨가하였다. 이어서, 질소 보호 하에 반응액의 온도를 25℃로 승온시키고 10분 동안 교반하였다. 반응액을 질소 보호 하에 90℃에서 18시간 동안 교반하였다. LC-MS로 반응이 완료되었음을 검출하였다. 반응액을 실온으로 냉각시키고, 얼음물(50mL) 및 5%의 HCl(10mL)을 순차적으로 천천히 첨가하고 25℃에서 30분 동안 교반한 다음, 디클로로메탄(50mL)을 첨가하고 유기상을 물(2mL*2)로 세척하고, 세척 후의 유기상을 적당량의 무수 황산나트륨으로 건조시켰다. 건조될 때까지 감압 농축하여, 조생성물을 분취용 고성능 액체 크로마토그래피(YMC-Actus Triart C18 컬럼 5μm 실리카, 직경 25mm, 길이 100mm; 용리액으로서 물(0.05%의 포름산 함유)과 아세토니트릴의 극성이 점차적으로 감소하는 혼합물을 사용하고; 아세토니트릴 구배 비율 40%~60%, 용리 시간 10분)로 정제하여 표제 화합물(320mg)을 얻었다.

[0292] MS m/z (ESI): 222.0 $[M+H]^+$.

[0293] **단계 2: (*S*)-9-클로로-11-(클로로메틸)-4-에틸-8-플루오로-4-하이드록시-1,12-디하이드로-14*H*-피라노[3',4':6,7]인돌리지노[1,2-*b*]퀴놀린-3,14(4*H*)-디온(중간체 3-3)의 합성**

[0294] **중간체 3-2**(220mg, 990.80μmol) 및 **중간체 1-3**(273.86mg, 1.04mmol)을 톨루엔(2mL)에 용해시키고, 여기에 피리디늄 p-톨루엔설폰산염(24.90mg, 99.08μmol)을 첨가하였다. 반응액을 100℃에서 18시간 동안 교반하였다. LC-MS로 반응이 완료되었음을 검출하였다. 반응액을 실온으로 냉각시키고, 에탄올(1mL)을 첨가하고, 반응액을 25℃에서 0.5시간 동안 교반하였다. 반응액을 여과하고, 필터 케이크를 에탄올(2mL*2)로 세척하여 조생성물인 표제 화합물(270mg)을 얻었다.

[0295] MS m/z (ESI): 449.0 $[M+H]^+$.

[0296] **단계 3: (*S*)-11-(아미노메틸)-9-클로로-4-에틸-8-플루오로-4-하이드록시-1,12-디하이드로-14*H*-피라노[3',4':6,7]인돌리지노[1,2-*b*]퀴놀린-3,14(4*H*)-디온 (3-4)의 합성**

[0297] **중간체 3-3**(50mg, 111.29μmol)을 에탄올(1mL)에 용해시키고, 여기에 우로트로핀(23.40mg, 166.94μmol)을 첨가하였다. 반응액을 90℃에서 1.5시간 동안 교반하였다. LC-MS로 반응이 완료되었음을 검출하였다. 반응액을 실온으로 냉각시키고, 건조될 때까지 감압 농축하여, 분취용 고성능 액체 크로마토그래피(YMC-Actus Triart C18 컬럼 5μm 실리카, 직경 25mm, 길이 100mm; 용리액으로서 물(0.225%의 포름산 함유)과 메탄올의 극성이 점차적으로 감소하는 혼합물을 사용하고; 메탄올 구배 비율 0%~30%, 용리 시간 12분)로 정제하여 표제 화합물(22mg)을 얻었다.

[0298] MS m/z (ESI): 430.1 $[M+H]^+$.

[0299] ^{1}**H NMR (400MHz, DMSO-d$_6$)** δ = 8.71 (d, *J* = 8.0 Hz, 1H), 8.23 (d, *J* = 10.3 Hz, 1H), 8.14 (s, 0.3H, HCOOH), 7.36 (s, 1H), 6.57 (s, 1H), 5.52 (s, 2H), 5.46 (s, 2H), 4.55 (s, 2H), 1.93-1.84 (m, 2H), 0.90-0.85 (m, 3H).

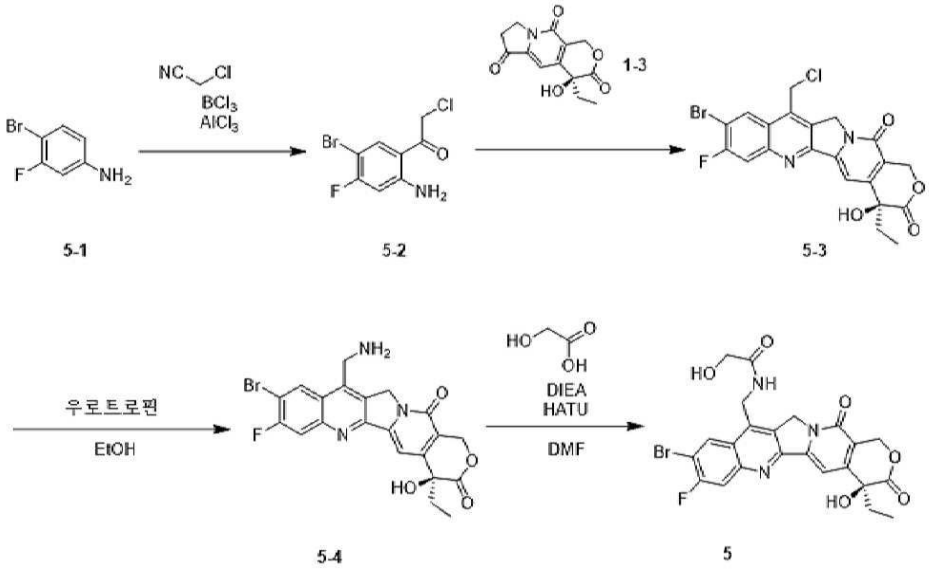
[0300] **단계 4: (*S*)-*N*-((9-클로로-4-에틸-8-플루오로-4-하이드록시-3,14-디옥소-3,4,12,14-테트라하이드로-1*H*-피라노[3',4':6,7]인돌리지노[1,2-*b*]퀴놀린-11-일)메틸)-2-하이드록시아세트아미드(화합물 3)의 합성**

[0301] **3-4**(22mg, 51.18μmol) 및 2-하이드록시아세트산(19.46mg, 255.92μmol)을 무수 *N*,*N*-디메틸포름아미드(1mL)에 용해시키고, 여기에 HATU(29.19mg, 76.77μmol) 및 *N*,*N*-디이소프로필에틸아민(19.84mg, 153.55μmol)을 첨가하고, 반응액을 25℃에서 1.5시간 동안 교반하였다. LC-MS로 반응이 완료되었음을 검출하였다. 반응액을 여과하고 건조될 때까지 감압 농축하여, 조생성물을 분취용 고성능 액체 크로마토그래피(YMC-Actus Triart C18 컬럼 5μm 실리카, 직경 25mm, 길이 100mm; 용리액으로서 물(0.05%의 포름산 함유)과 아세토니트릴의 극성이 점차적으로 감소하는 혼합물을 사용하고; 아세토니트릴 구배 비율 10%~40%, 용리 시간 12분)로 정제하여 표제 화합물(2.20mg)을 얻었다.

[0302] MS m/z (ESI): 488.1 $[M+H]^+$.

[0303] ^{1}**H NMR (400MHz, DMSO-d$_6$)** δ = 8.90-8.85 (m, 2H), 8.20 (d, *J* = 10.3 Hz, 1H), 7.35 (s, 1H), 6.55 (s, 1H), 5.60 (t, *J* = 5.7 Hz, 1H), 5.56 (s, 2H), 5.45 (s, 2H), 4.83 (d, *J* = 6.0 Hz, 2H), 3.83 (d, *J* = 5.8 Hz, 2H), 1.93-1.81 (m, 2H), 0.88 (m, 3H).

[0304] **실시예 5. (*S*)-*N*-((9-브로모-4-에틸-8-플루오로-4-하이드록시-3,14-디옥소-3,4,12,14-테트라하이드로-1*H*-피라노[3',4':6,7]인돌리지노[1,2-*b*]퀴놀린-11-일)메틸)-2-하이드록시아세트아미드(화합물 5)**



[0305]

[0306] **단계 1: 1-(2-아미노-5-브로모-4-플루오로페닐)-2-클로로에탄-1-온(중간체 5-2)의 합성**

[0307] 삼염화붕소(1M, 10.53mL)를 1,2-디클로로에탄(24mL)에 용해시키고, 반응액을 0℃로 냉각시키고, 여기에 **중간체 5-1**(2g, 10.53mmol) 및 클로로아세토니트릴(1.19g, 15.79mmol)을 첨가하고, 반응액을 0℃에서 10분 동안 교반하고, 여기에 삼염화알루미늄(1.82g, 13.68mmol)을 첨가하였다. 반응액을 질소 보호 하에 25℃에서 10분 동안 교반하였다. 이어서, 온도를 90℃로 승온시키고 18시간 동안 교반하였다. LC-MS로 반응이 완료되었음을 검출하였다. 반응액을 실온으로 냉각시키고, 얼음물(50mL) 및 5%의 HCl(10mL)을 순차적으로 천천히 첨가하고 25℃에서 30분 동안 교반한 다음, 디클로로메탄(50mL)을 첨가하고 유기상을 물(2mL*2)로 세척하고, 세척 후의 유기상을 적당량의 무수 황산나트륨으로 건조시켰다. 분취용 고성능 액체 크로마토그래피(YMC-Actus Triart C18 컬럼 5μm 실리카, 직경 25mm, 길이 100mm; 용리액으로서 물(0.05%의 포름산 함유)과 아세토니트릴의 극성이 점차적으로 감소하는 혼합물을 사용하고; 아세토니트릴 구배 비율 39%~49%, 용리 시간 12분)로 정제하여 표제 화합물(380mg)을 얻었다.

[0308] MS m/z (ESI): 265.9 $[M+H]^+$.

[0309] **단계 2: (*S*)-9-브로모-11-(클로로메틸)-4-에틸-8-플루오로-4-하이드록시-1,12-디하이드로-14*H*-피라노[3',4':6,7]인돌리지노[1,2-*b*]퀴놀린-3,14(4*H*)-디온(중간체 5-3)의 합성**

[0310] **중간체 5-2**(200mg, 750.48μmol) 및 **중간체 1-3**(207.44mg, 788.01μmol)을 무수 톨루엔(4mL)에 용해시키고, 여기에 피리디늄 p-톨루엔설폰산염(22.63mg, 90.06μmol)을 첨가하였다. 반응액을 100℃에서 18시간 동안 교반하였다. LC-MS로 반응이 완료되었음을 검출하였다. 반응액을 실온으로 냉각시키고, 에탄올(1mL)을 첨가하고, 반응액을 25℃에서 0.5시간 동안 교반하였다. 반응액을 여과하고, 필터 케이크를 에탄올(2mL*2)로 세척하여 조생성물인 표제 화합물(200mg)을 얻었다.

[0311] MS m/z (ESI): 493.0 $[M+H]^+$.

[0312] **단계 3: (*S*)-11-(아미노메틸)-9-브로모-4-에틸-8-플루오로-4-하이드록시-1,12-디하이드로-14*H*-피라노[3',4':6,7]인돌리지노[1,2-*b*]퀴놀린-3,14(4*H*)-디온(중간체 5-4)의 합성**

[0313] **중간체 5-3**(200mg, 405.10μmol)을 에탄올(4mL)에 용해시키고, 여기에 우로트로핀(113.58mg, 810.19μmol)을 첨가하였다. 반응액을 90℃에서 1.5시간 동안 교반하였다. LC-MS로 반응이 완료되었음을 검출하였다. 반응액을 실온으로 냉각시키고, 건조될 때까지 감압 농축하여, 조생성물을 분취용 고성능 액체 크로마토그래피(YMC-Actus Triart C18 컬럼 5μm, 직경 25mm, 길이 100mm; 용리액으로서 물(0.225%의 포름산 함유)과 아세토니트릴의 극성이 점차적으로 감소하는 혼합물을 사용하고; 아세토니트릴 구배 비율 6%~26%, 용리 시간 12분)로 정제하여 표제 화합물(30mg)을 얻었다.

[0314] MS m/z (ESI):476.0 $[M+H]^+$.

[0315] **^{1}H NMR (400MHz, DMSO-d_6)** δ = 8.83 (d, *J* = 7.4 Hz, 1H), 8.18 (d, *J* = 9.8 Hz, 1H), 8.14 (s, 0.4H, HCOOH), 7.36 (s, 1H), 6.57 (s, 1H), 5.52 (s, 2H), 5.46 (s, 2H), 4.53 (s, 2H), 1.92-1.85 (m, 2H), 0.88 (t, *J* = 7.3 Hz, 3H).

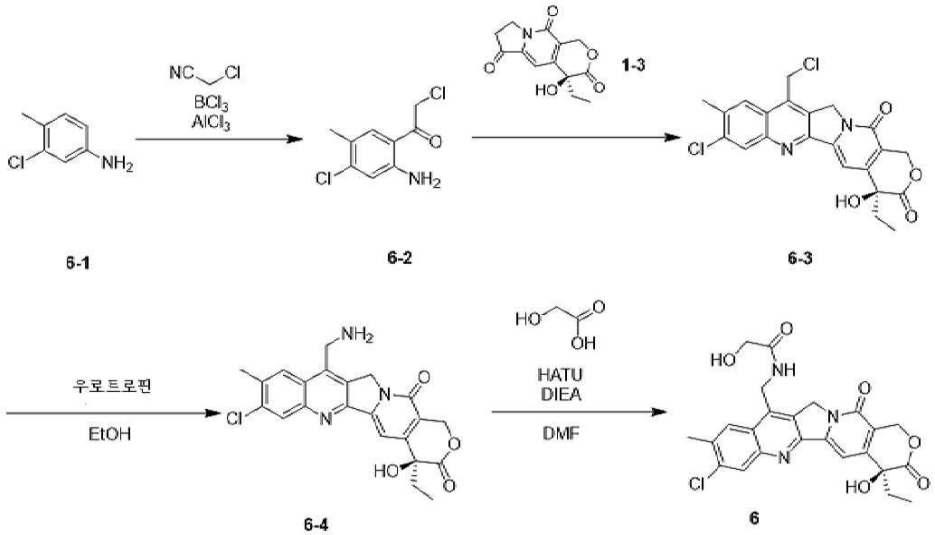
[0316] **단계 4: (*S*)-*N*-((9-브로모-4-에틸-8-플루오로-4-하이드록시-3,14-디옥소-3,4,12,14-테트라하이드로-1*H*-피라노[3',4':6,7]인돌리지노[1,2-*b*]퀴놀린-11-일)메틸)-2-하이드록시아세트아미드(화합물 5)의 합성**

[0317] **중간체 5-4**(15mg, 26.88μmol) 및 2-하이드록시아세트산(10.22mg, 134.41μmol)을 무수 *N*,*N*-디메틸포름아미드(1mL)에 용해시키고, 여기에 HATU(15.33mg, 40.32μmol) 및 *N*,*N*-디이소프로필에틸아민(10.42mg, 80.65μmol)을 첨가하고, 반응액을 25℃에서 1시간 동안 교반하였다. LC-MS로 반응이 완료되었음을 검출하였다. 반응액을 여과하고 건조될 때까지 감압 농축하여, 조생성물을 분취용 고성능 액체 크로마토그래피(YMC-Actus Triart C18 컬럼 5μm, 직경 25mm, 길이 100mm; 용리액으로서 물(0.05%의 포름산 함유)과 아세토니트릴의 극성이 점차적으로 감소하는 혼합물을 사용하고, 아세토니트릴 구배 비율 6%~36%, 용리 시간 12분)로 정제하여 표제 화합물(2.09mg)을 얻었다.

[0318] MS m/z (ESI): 532.0 $[M+H]^+$.

[0319] **^{1}H NMR (400MHz, DMSO-d_6)** δ = 9.00 (d, *J* = 7.5 Hz, 1H), 8.86 (t, *J* = 5.9 Hz, 1H), 8.15 (d, *J* = 9.8 Hz, 1H), 7.35 (s, 1H), 6.54 (s, 1H), 5.60 (t, *J* = 5.7 Hz, 1H), 5.56 (s, 2H), 5.45 (s, 2H), 4.83 (d, *J* = 5.8 Hz, 2H), 3.83 (d, *J* = 5.9 Hz, 2H), 1.94-1.82 (m, 2H), 0.88 (t, *J* = 7.4 Hz, 3H).

[0320] **실시예 6. (*S*)-*N*-((8-클로로-4-에틸-4-하이드록시-9-메틸-3,14-디옥소-3,4,12,14-테트라하이드로-1*H*-피라노[3',4':6,7]인돌리지노[1,2-*b*]퀴놀린-11-일)메틸)-2-하이드록시아세트아미드(화합물 6)**

[0321] 

[0322] **단계 1: 1-(2-아미노-4-클로로-5-메틸페닐)-2-클로로에탄-1-온(중간체 6-2)의 합성**

[0323] 삼염화붕소(1M, 2.82mL)를 1,2-디클로로에탄(8mL)에 용해시키고 반응액을 0℃로 냉각시키고, 여기에 **반응물 6-1**(0.5g, 3.53mmol) 및 클로로아세토니트릴(319.91g, 4.24mmol)을 첨가하고, 반응액을 0℃에서 10분 동안 교반하고, 여기에 삼염화알루미늄(612.09mg, 4.59mmol)을 첨가하였다. 반응액을 질소 보호 하에 25℃에서 10분 동안 교반하였다. 이어서, 반응액의 온도를 90℃로 승온시키고 18시간 동안 교반하였다. LC-MS로 반응이 완료되었음을 검출하였다. 반응액을 실온으로 냉각시키고, 얼음물(25mL) 및 5%의 HCl(5mL)을 순차적으로 천천히 첨가하고 25℃에서 30분 동안 교반한 다음, 디클로로메탄(20mL)을 첨가하고 유기상을 물(20mL*2)로 세척하고, 세척 후의 유기상을 적당량의 무수 황산나트륨으로 건조시켰다. 분취용 박층 크로마토그래피(실리카, 석유 에테르:에틸 아세테이트=9:1)를 거쳐 표제 화합물(500mg)을 얻었다.

[0324] MS m/z (ESI): 218.0 $[M+H]^+$

[0325] **단계 2: (*S*)-8-클로로-11-(클로로메틸)-4-에틸-4-하이드록시-9-메틸-1,12-디하이드로-14*H*-피라노[3', 4':6,7]**

인돌리지노[1,2-*b*]퀴놀린-3,14(4*H*)-디온(중간체 6-3)의 합성

[0326] **중간체 6-2**(250mg, 1.15mmol) 및 **중간체 1-3**(316.87mg, 1.20mmol)을 톨루엔(5mL)에 용해시키고, 여기에 피리디늄 p-톨루엔설폰산염(34.57mg, 137.56μmol)을 첨가하였다. 반응액을 100℃에서 18시간 동안 교반하였다. LC-MS로 반응이 완료되었음을 검출하였다. 반응액을 실온으로 냉각시키고, 에탄올(1mL)을 첨가하고, 반응액을 25℃에서 0.5시간 동안 교반하였다. 반응액을 여과하고, 필터 케이크를 에탄올(2mL*2)로 세척하여 조생성물인 표제 화합물(230mg)을 얻었다.

[0327] MS m/z (ESI): 445.1 $[M+H]^+$.

[0328] **단계 3: (*S*)-11-(아미노메틸)-8-클로로-4-에틸-4-하이드록시-9-메틸-1,12-14*H*-피라노[3',4': 6,7]인돌리지노[1,2-*b*]퀴놀린-3,14(4*H*)-디온(중간체 6-4)의 합성**

[0329] **중간체 6-3**(49.56mg, 111.29μmol)을 에탄올(0.5mL)에 용해시키고, 여기에 우로트로핀(23.40mg, 166.94μmol)을 첨가하였다. 반응액을 90℃에서 1.5시간 동안 교반하였다. LC-MS로 반응이 완료되었음을 검출하였다. 반응액을 실온으로 냉각시키고, 건조될 때까지 감압 농축하여, 분취용 고성능 액체 크로마토그래피(YMC-Actus Triart C18 컬럼 5μm, 직경 25mm, 길이 100mm; 용리액으로서 물(0.225%의 포름산 함유)과 아세토니트릴의 극성이 점차적으로 감소하는 혼합물을 사용하고; 아세토니트릴 구배 비율 2%~32%, 용리 시간 12분)로 정제하여 표제 화합물(11.0mg)을 얻었다.

[0330] MS m/z (ESI): 426.2 $[M+H]^+$.

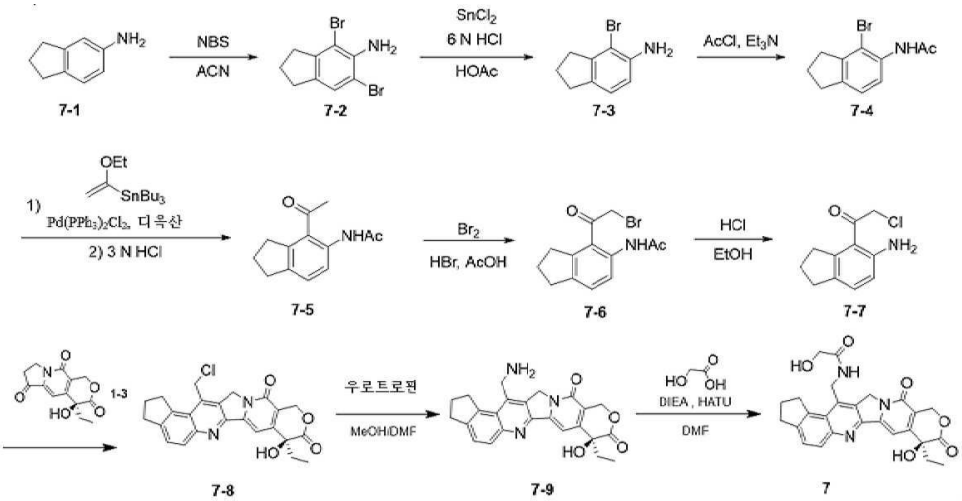
[0331] **단계 4: (*S*)-*N*-((8-클로로-4-에틸-4-하이드록시-9-메틸-3,14-디옥소-3,4,12,14-테트라하이드로-1*H*-피라노[3',4':6,7]인돌리지노[1,2-*b*]퀴놀린-11-일)메틸)-2-하이드록시아세트아미드(화합물 6)의 합성**

[0332] **중간체 6-4**(11mg, 25.83μmol) 및 2-하이드록시아세트산(9.82mg, 129.15μmol)을 무수 *N*,*N*-디메틸포름아미드(0.5mL)에 용해시키고, 여기에 HATU(14.73mg, 38.74μmol) 및 *N*,*N*-디이소프로필에틸아민(10.01mg, 77.49μmol)을 첨가하고, 반응액을 25℃에서 1시간 동안 교반하였다. LC-MS로 반응이 완료되었음을 검출하였다. 반응액을 여과하고 건조될 때까지 감압 농축하여, 조생성물을 분취용 고성능 액체 크로마토그래피(YMC-Actus Triart C18 컬럼 5μm, 직경 25mm, 길이 100mm; 용리액으로서 물(0.05%의 포름산 함유)과 아세토니트릴의 극성이 점차적으로 감소하는 혼합물을 사용하고, 아세토니트릴 구배 비율 10%~40%, 용리 시간 12분)로 정제하여 표제 화합물(3.00mg)을 얻었다.

[0333] MS m/z (ESI): 484.1 $[M+H]^+$.

[0334] ^{1}H NMR (400MHz, DMSO-d_6) δ = 8.77 (t, *J* = 6.1 Hz, 1H), 8.52 (s, 1H), 8.26 (s, 1H), 7.32 (s, 1H), 6.54 (s, 1H), 5.59 (t, *J* = 5.8 Hz, 1H), 5.52 (s, 2H), 5.44 (s, 2H), 4.85 (d, *J* = 6.0 Hz, 2H), 3.84 (d, *J* = 5.6 Hz, 2H), 2.60 (s, 3H), 1.91-1.82 (m, 2H), 0.88 (t, *J* = 7.3 Hz, 3H)

[0335] **실시예 7. (*S*)-*N*-((8-에틸-8-하이드록시-9,12-디옥소-2,3,8,9,12,14-헥사하이드로-1*H*,11*H*-사이클로펜타[*f*]피라노[3',4':6,7]인돌리지노[1,2-*b*]퀴놀린-15-일)메틸)-2-하이드록시아세트아미드(화합물 7)**



[0336]

[0337] **단계 1: 4,6-디브로모-2,3-디하이드로-1*H*-인덴-5-아민(중간체 7-2)의 합성**

[0338] **중간체 7-1**(10.0g)을 무수 아세토니트릴에 용해시키고, 0℃에서 *N*-브로모숙신이미드(NBS)(27.5g)를 배치로 첨가한 다음, 실온에서 밤새 교반하였다. 반응액을 여과하고, 여과액을 감압 농축하고 잔류물을 200mL의 에틸 아세테이트에 용해시키고 물(100mL*2)로 세척하였다. 얻어진 유기상을 무수 황산나트륨으로 건조시키고, 실리카겔과 혼합한 후 규조토 위에 놓고, 500mL의 석유 에테르로 세척하고, 여과액을 농축하여 표제 화합물(17.0g)을 얻었다.

[0339] MS m/z (ESI): 289.9 $[M+H]^+$.

[0340] **단계 2: 4-브로모-2,3-디하이드로-1*H*-인덴-5-아민(중간체 7-3)의 합성**

[0341] **중간체 7-2**(15.0g) 및 염화제일주석(15.0g)을 75mL의 초산에 용해시키고, 6N 농염산 140mL를 첨가하고 90℃에서 3시간 동안 반응시켰다. 반응 시스템을 실온으로 냉각시키고, 농축하여 초산을 제거하고, 잔류물을 100mL의 에틸 아세테이트에 용해시키고, 포화 탄산나트륨 수용액으로 pH를 약 8로 조절하고 여과하여, 여과액에서 유기상을 분리하고 에틸 아세테이트(50mL*3)로 수상을 추출하였다. 유기상을 합하여 무수 황산나트륨으로 건조시키고, 여과하고, 여과액을 감압 농축하여 표제 화합물(10g)을 얻었다.

[0342] MS m/z (ESI): 212.0 $[M+H]^+$.

[0343] **단계 3: *N*-(4-브로모-2,3-디하이드로-1*H*-인덴-5-일)아세트아미드(중간체 7-4)의 합성**

[0344] **중간체 7-3**(10.0g)을 100mL의 무수 디클로로메탄에 용해시키고 트리에틸아민(10.6g)을 첨가하고, 0℃에서 염화아세틸(5.5g)을 드롭방식으로 천천히 첨가한 후, 반응 시스템을 실온에서 밤새 교반하였다. 반응액을 물(100mL*2)로 세척하고, 유기상을 무수 황산나트륨으로 건조시키고 여과하였다. 여과액을 감압 농축하고, 잔류물을 실리카겔 컬럼 크로마토그래피(석유 에테르:에틸 아세테이트=90:10)로 정제하여 표제 화합물(7.1g)을 얻었다.

[0345] MS m/z (ESI): 254.0 $[M+H]^+$.

[0346] **단계 4: *N*-(4-아세틸-2,3-디하이드로-1*H*-인덴-5-일)아세트아미드(중간체 7-5)의 합성**

[0347] 질소 보호 하에, **중간체 7-4**(6.7g) 및 트리부틸-(2-에톡시비닐)주석(10.4g)을 100mL의 무수 1,4-디옥산에 용해시킨 후, 비스(트리페닐포스핀)팔라듐 디클로라이드(1.8g)에 첨가한 다음, 반응 시스템을 100℃에서 밤새 교반하였다. 반응액을 실온으로 냉각시키고, 3N 염산 30mL를 첨가하고 실온에서 1시간 동안 교반하였다. 반응액을 규조토로 여과하고 얻어진 여과액을 100mL의 에틸 아세테이트로 희석하고 물(100mL*2)로 세척하였다. 유기상을 무수 황산나트륨으로 건조시키고, 여과하고, 여과액을 감압 농축하고, 잔류물을 실리카겔 컬럼 크로마토그래피(석유 에테르:에틸 아세테이트=85:15)로 정제하여 표제 화합물(4.7g)을 얻었다.

[0348] MS m/z (ESI): 218.1 $[M+H]^+$.

[0349] **단계 5: *N*-(4-(2-브로모아세틸)-2,3-디하이드로-1*H*-인덴-5-일)아세트아미드(중간체 7-6)의 합성**

[0350] **중간체 7-5**(4.7g)를 50mL의 초산에 용해시키고, 33%의 브롬화수소산-아세트산 용액 7.3g을 첨가하고, 실온에서 브로민(2.85g)을 드롭방식으로 천천히 첨가한 후, 실온에서 3시간 동안 계속 교반하면서 반응시켰다. 반응이 끝난 후, 반응액을 얼음물에 붓고 다량의 고체가 석출될 때까지 교반하고, 여과하여, 필터 케이크를 석유 에테르로 세척하여 얻어진 고체를 건조시켜 표제 화합물(5.0g)을 얻었다.

[0351] MS m/z (ESI): 296.0 $[M+H]^+$.

[0352] **단계 6: 1-(5-아미노-2,3-디하이드로-1*H*-인덴-4-일)-2-클로로에탄-1-온(중간체 7-7)의 합성**

[0353] **중간체 7-6**(5.0g)을 30mL의 에탄올에 용해시키고, 6N 농염산 35mL를 첨가하고 반응 시스템을 80℃에서 2시간 동안 교반하였다. 반응 시스템을 실온으로 냉각시키고, 감압 농축하여 용매를 제거하고 잔류물을 100mL의 디클로로메탄에 용해시키고, 포화 탄산수소나트륨 수용액으로 pH를 약 7로 조절하여 유기상을 분리하고, 수상을 디클로로메탄(50mL* 2)으로 추출하였다. 유기상을 합하여 무수 황산나트륨으로 건조시키고, 여과하고, 여과액을 감압 농축하고 잔류물을 실리카겔 컬럼 크로마토그래피(석유 에테르:에틸 아세테이트=75:25)로 정제하여 표제 화합물(840mg)을 얻었다.

[0354] MS m/z (ESI): 210.0 $[M+H]^+$.

[0355] **단계 7: (*S*)-15-(클로로메틸)-8-에틸-8-하이드록시-1,2,3,8,11,14-헥사하이드로-9*H*,12*H*-사이클로펜타[*f*]피라노[3',4':6,7]인돌리지노[1,2-*b*]퀴놀린-9,12-디온(중간체 7-8)의 합성**

[0356] **중간체 7-7**(100mg) 및 **중간체 1-3**(125.55mg)을 톨루엔(5mL)에 용해시키고, 여기에 피리디늄 p-톨루엔설폰산염(5.99mg)을 첨가하였다. 반응액을 90℃에서 18시간 동안 교반하였다. 반응액을 실온으로 냉각시키고, 에탄올(1mL)을 첨가하고, 반응액을 25℃에서 0.5시간 동안 교반하였다. 반응액을 여과하고, 필터 케이크를 석유 에테르(2mL*2)로 세척하여 표제 화합물(180mg)을 얻었다.

[0357] MS m/z (ESI): 437.0 $[M+H]^+$.

[0358] **단계 8: (*S*)-15-(아미노메틸)-8-에틸-8-하이드록시-1,2,3,8,11,14-헥사하이드로-9*H*,12*H*-사이클로펜타[*f*]피라노[3',4':6,7]인돌리지노[1,2-*b*]퀴놀린-9,12-디온(중간체 7-9)의 합성**

[0359] **중간체 7-8**(50mg)을 메탄올(1mL)과 *N*,*N*-디메틸포름아미드(1mL)의 혼합 용액에 용해시키고, 여기에 우로트로핀(483.13mg)을 첨가하였다. 반응액을 50℃에서 4시간 동안 교반하였다. 반응이 끝난 후, 반응액을 실온으로 냉각시키고, 농염산(0.5mL)을 첨가하고 0.5시간 동안 교반한 후, 건조될 때까지 감압 농축하여, 잔류물을 분취용 고성능 액체 크로마토그래피(Waters Xbridge C18 컬럼 5μm, 직경 25mm, 길이 100mm; 용리액으로서 물(0.225%의 포름산 함유)과 아세토니트릴의 극성이 점차적으로 감소하는 혼합물을 사용하고; 아세토니트릴 구배 비율 20%~40%, 용리 시간 12분)로 정제하여 표제 화합물(22.0mg)을 얻었다.

[0360] MS m/z (ESI): 418.2 $[M+H]^+$.

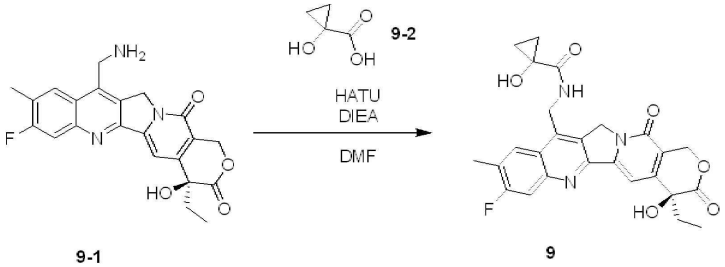
[0361] **단계 9: (*S*)-*N*-((8-에틸-8-하이드록시-9,12-디옥소-2,3,8,9,12,14-헥사하이드로-1*H*,11*H*-사이클로펜타[*f*]피라노[3',4':6,7]인돌리지노[1,2-*b*]퀴놀린-15-일)메틸)-2-하이드록시아세트아미드(화합물 7)의 합성**

[0362] **중간체 7-9**(15mg) 및 하이드록시아세트산(10.93mg)을 무수 *N*,*N*-디메틸포름아미드(0.5mL)에 용해시키고, 여기에 HATU(27.32mg) 및 디이소프로필에틸아민(4.64mg)을 첨가하고 반응액을 25℃에서 1시간 동안 교반하였다. 반응이 끝난 후, 반응액을 여과하고, 여과액이 건조될 때까지 감압 농축하여, 잔류물을 분취용 고성능 액체 크로마토그래피(Waters Xbridge C18 컬럼 5μm, 직경 25mm, 길이 100mm; 용리액으로서 물(0.05%의 포름산 함유)과 아세토니트릴의 극성이 점차적으로 감소하는 혼합물을 사용하고; 아세토니트릴 구배 비율 30%~50%, 용리 시간 12분)로 정제하여 표제 화합물(9.0mg)을 얻었다.

[0363] MS m/z (ESI): 476.2$[M+H]^+$.

[0364] **^{1}H NMR (400MHz, DMSO-d_6)** δ = 8.28 (t, *J* = 5.1 Hz, 1H), 8.02 (d, *J* = 8.5 Hz, 1H), 7.78 (d, *J* = 8.3 Hz, 1H), 7.30 (s, 1H), 6.53 (s, 1H), 5.49-5.45 (m, 1H), 5.43 (s, 2H), 5.36 (s, 2H), 4.97 (d, *J* = 5.0 Hz, 2H), 3.88 (d, *J* = 5.5 Hz, 2H), 3.57 (t, *J* = 7.2 Hz, 2H), 3.09 (t, *J* = 7.4 Hz, 2H), 2.23-2.15 (m, 2H), 1.95-1.80 (m, 2H), 0.88 (t, *J* = 7.3 Hz, 3H).

[0365] **실시예 9. (*S*)-*N*-((4-에틸-8-플루오로-4-하이드록시-9-메틸-3,14-디옥소-3,4,12,14-테트라하이드로-1*H*-피라노[3',4':6,7]인돌리지노[1,2-*b*]퀴놀린-11-일)메틸)-1-하이드록시사이클로프로판-1-카르복스아미드(화합물 9)**

[0366] 

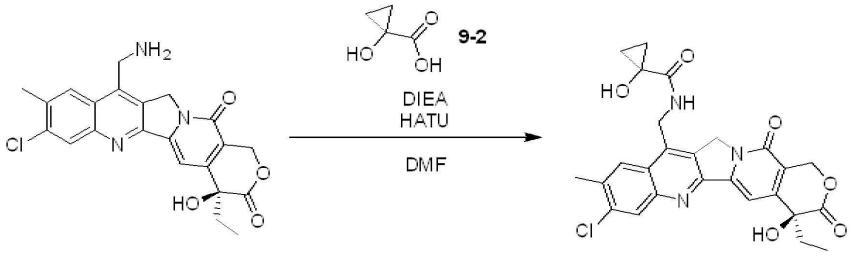
[0367] **중간체 9-1**(6.00mg, 14.66μmol, 특허 문헌 WO2020219287에 보고된 방법에 따라 합성 가능) 및 **중간체 9-2**(4.49mg, 43.97μmol)를 무수 *N*,*N*-디메틸포름아미드(0.5mL)에 용해시키고, 여기에 HATU(8.36mg, 21.98μmol) 및 *N*,*N*-디이소프로필에틸아민(5.68mg, 43.97μmol)을 첨가하고, 반응액을 25℃에서 1시간 동안 교반하였다. LC-

MS로 반응이 완료되었음을 검출하였다. 반응액을 여과하고, 분취용 고성능 액체 크로마토그래피(YMC-Actus Triart C18 컬럼 5μm 실리카, 직경 25mm, 길이 100mm; 용리액으로서 물(0.05%의 포름산 함유)과 아세토니트릴의 극성이 점차적으로 감소하는 혼합물을 사용하고; 아세토니트릴 구배 비율 6%~36%, 용리 시간 12분)로 정제하여 표제 화합물(3.00mg)을 얻었다.

[0368] MS m/z (ESI): 494.2 $[M+H]^+$.

[0369] **^{1}H NMR (400MHz, DMSO-d_6)** δ = 8.96 (t, *J* = 6.0 Hz, 1H), 8.50 (d, *J* = 8.3 Hz, 1H), 7.90 (d, *J* = 10.9 Hz, 1H), 7.32 (s, 1H), 6.53 (s, 1H), 6.30 (s, 1H), 5.52 (s, 2H), 5.44 (s, 2H), 4.85 (d, *J* = 5.9 Hz, 2H), 2.53 (s, 3H), 1.92-1.83 (m, 2H), 1.05-1.00 (m, 2H), 0.88 (t, *J* = 7.3 Hz, 3H), 0.85-0.81 (m, 2H).

[0370] **실시예 10. (*S*)-*N*-((8-클로로-4-에틸-4-하이드록시-9-메틸-3,14-디옥소-3,4,12,14-테트라하이드로-1*H*-피라노[3',4':6,7]인돌리지노[1,2-*b*]퀴놀린-11-일)메틸)-1-하이드록시사이클로프로판-1-카르복스아미드(화합물 10)**



6-4 10

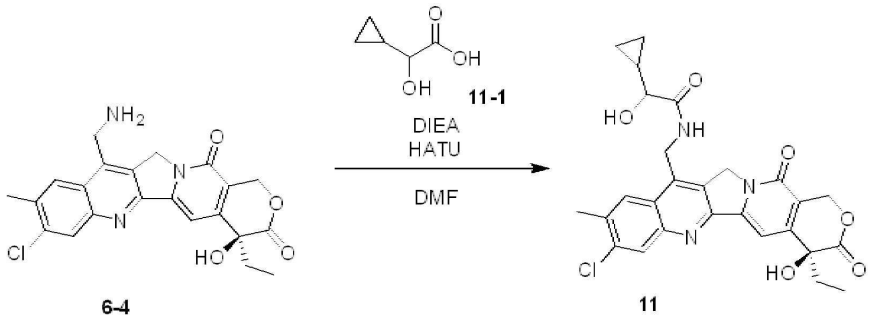
[0371]

[0372] **중간체 6-4**(6.24mg, 14.66μmol) 및 **중간체 9-2**(4.49mg, 43.97μmol)를 *N*,*N*-디메틸포름아미드(1mL)에 용해시키고, 여기에 HATU(8.36mg, 21.98μmol) 및 DIEA(5.68mg, 43.97μmol)를 첨가하고, 반응액을 25℃에서 1시간 동안 교반하였다. LC-MS로 반응이 완료되었음을 검출하였다. 반응액을 여과하고 건조될 때까지 감압 농축하였다. 조생성물을 분취용 고성능 액체 크로마토그래피(YMC-Actus Triart C18 컬럼 5μm 실리카, 직경 25mm, 길이 100mm; 용리액으로서 물(0.225%의 포름산 함유)과 아세토니트릴의 극성이 점차적으로 감소하는 혼합물을 사용하고; 아세토니트릴 구배 비율 16%~46%, 용리 시간 12분)로 정제하여 표제 화합물(2.20mg)을 얻었다.

[0373] MS m/z (ESI): 510.1 $[M+H]^+$.

[0374] **1H NMR (400MHz, DMSO-d_6)** δ = 8.96 (t, *J* = 5.9 Hz, 1H), 8.54 (s, 1H), 8.26 (s, 1H), 7.32 (s, 1H), 6.54 (s, 1H), 6.29 (s, 1H), 5.52 (s, 2H), 5.44 (s, 2H), 4.84 (d, *J* = 6.0 Hz, 2H), 2.59 (s, 3H), 1.94-1.80 (m, 2H), 1.01 (d, *J* = 3.0 Hz, 2H), 0.88 (t, *J* = 7.3 Hz, 3H), 0.83 (d, *J* = 3.0 Hz, 2H).

[0375] **실시예 11. *N*-(((*S*)-8-클로로-4-에틸-4-하이드록시-9-메틸-3,14-디옥소-3,4,12,14-테트라하이드로-1*H*-피라노[3',4':6,7]인돌리지노[1,2-*b*]퀴놀린-11-일)메틸)-2-사이클로프로필-2-하이드록시아세트아미드(화합물 11)**



6-4 11

[0376]

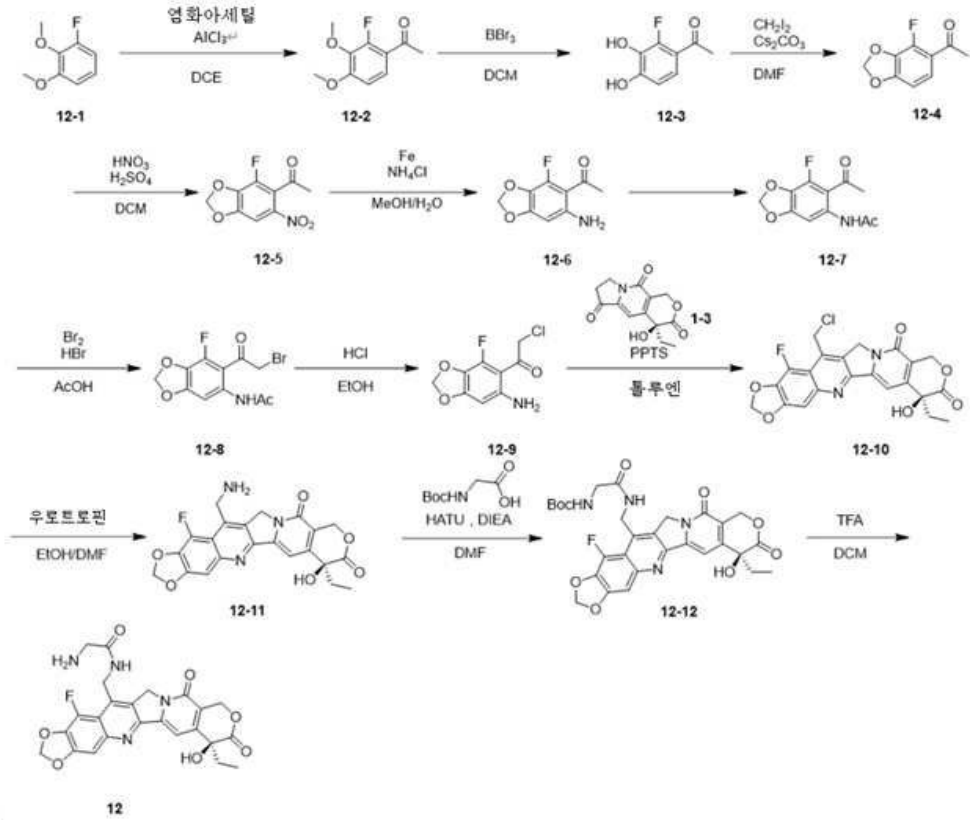
[0377] **중간체 6-4**(6.0mg, 14.09μmol) 및 **중간체 11-1**(8.18mg, 70.45μmol)을 *N*,*N*-디메틸포름아미드(0.5mL)에 용해시키고, 여기에 HATU(8.04mg, 21.13μmol) 및 DIEA(5.46mg, 42.27μmol)를 첨가하고, 반응액을 25℃에서 1시간 동안 교반하였다. LC-MS로 반응이 완료되었음을 검출하였다. 반응액을 여과하고 건조될 때까지 감압 농축하여, 조생성물을 분취용 고성능 액체 크로마토그래피(YMC-Actus Triart C18 컬럼 5um, 직경 25mm, 길이 100mm; 용리액으로서 물(0.225%의 포름산 함유)과 아세토니트릴의 극성이 점차적으로 감소하는 혼합물을 사용하고; 아세토

니트릴 구배 비율 16%~46%, 용리 시간 12분)로 정제하여 표제 화합물(3.0mg)을 얻었다.

[0378] MS m/z (ESI): 524.1 $[M+H]^+$.

[0379] **^{1}H NMR (400MHz, DMSO-d_6)** δ = 8.66 (t, *J* = 5.9 Hz, 1H), 8.47 (s, 1H), 8.26 (s, 1H), 7.32 (s, 1H), 6.54 (s, 1H), 5.53 (d, *J* = 5.0 Hz, 1H), 5.50 (s, 2H), 5.44 (s, 2H), 4.91-4.76 (m, 2H), 3.61-3.55 (m, 1H), 2.59 (s, 3H), 1.94-1.82 (m, 2H), 1.05-0.97 (m, 1H), 0.88 (t, *J* = 7.3 Hz, 3H), 0.34- 0.31 (m, 2H), 0.29-0.20 (m, 2H).

[0380] **실시예 12. (*S*)-2-아미노-*N*-((7-에틸-15-플루오로-7-하이드록시-8,11-디옥소-7,8,11,13-테트라하이드로-10*H*-[1,3]디옥솔로[4,5-*g*]피라노[3',4':6,7]인돌리지노[1,2-*b*]퀴놀린-14-일)메틸)아세트아미드(화합물 12)**



[0381]

[0382] **단계 1: 1-(2-플루오로-3,4-디메톡시페닐)에탄-1-온(중간체 12-2)의 합성**

[0383] **중간체 12-1**(25.0g)을 1,2-디클로로에탄(DCE, 250mL)에 용해시키고, 반응액을 0℃로 냉각시키고, 여기에 삼염화알루미늄(64.04g)을 천천히 첨가한 후, 반응액에 염화아세틸(64.04g)을 드롭방식으로 첨가하였다. 반응액을 질소 분위기 하에 0℃에서 2시간 동안 교반하였다. 반응이 끝난 후, 여기에 물(300mL)을 첨가하고 에틸 아세테이트(150mL*3회)로 추출하고, 유기상을 합하여 무수 황산나트륨으로 건조시켰다. 여과한 후, 유기상을 감압 농축시켰다. 잔류물을 실리카겔 컬럼 크로마토그래피(ISCO®; 120g SepaFlash® 고속 실리카겔 컬럼, 구배 0~50%의 석유 에테르/에틸 아세테이트, 유속 70mL/분)로 정제하여 표제 화합물(21.0g)을 얻었다.

[0384] MS m/z (ESI): 199.0 $[M+H]^+$.

[0385] **단계 2: 1-(2-플루오로-3,4-디하이드록시페닐)에탄-1-온(중간체 12-3)의 합성**

[0386] **중간체 12-2**(15.00g)를 무수 디클로로메탄(DCM, 150mL)에 용해시키고, 반응액을 -78℃로 냉각시키고, 여기에 삼브롬화붕소(56.88g)를 드롭방식으로 천천히 첨가하고, 반응액을 질소 분위기 하에 -78℃에서 2시간 동안 교반한 다음, 0℃로 승온시키고 4시간 동안 반응시켰다. 반응이 끝난 후, 반응액을 얼음물에 드롭방식으로 천천히 첨가하여 퀜칭하고, 퀜칭이 완료된 후, 에틸 아세테이트(150mL*3회)로 추출하고 유기상을 합하여 무수 황산나트륨으로 건조시켰다. 여과한 후, 유기상을 감압 농축시켰다. 잔류물을 실리카겔 컬럼 크로마토그래피(ISCO®; 120g SepaFlash® 고속 실리카겔 컬럼, 구배 0~50% 석유 에테르/에틸 아세테이트, 유속 70mL/분)로 정제하여 표제 화

합물(8.50g)을 얻었다.

[0387] MS m/z (ESI): 171.0 $[M+H]^+$.

[0388] **단계 3: 1-(4-플루오로벤조[*d*][1,3]디옥솔로-5-일)에탄-1-온(중간체 12-4)의 합성**

[0389] **중간체 12-3**(4.0g)을 무수 *N*,*N*-디메틸포름아미드(40mL)에 용해시키고, 여기에 탄산세슘(11.49g) 및 1,2-디요오도메탄(18.89g)을 첨가하였다. 반응액을 질소 분위기 하에 100℃에서 8분 동안 교반하였다. 반응이 끝난 후, 반응액을 물에 천천히 붓고 에틸 아세테이트(50mL*3회)로 추출하고, 유기상을 합하여 무수 황산나트륨으로 건조시켰다. 여과한 후, 유기상을 감압 농축시켰다. 잔류물을 실리카겔 컬럼 크로마토그래피(ISCO®; 24g SepaFlash® 고속 실리카겔 컬럼, 구배 0~15%의 석유 에테르/에틸 아세테이트, 유속 60mL/분)로 정제하여 표제 화합물(2.0g)을 얻었다.

[0390] MS m/z (ESI): 183.0 $[M+H]^+$.

[0391] **단계 4: 1-(4-플루오로-6-니트로벤조[*d*][1,3]디옥솔로-5-일)에탄-1-온(중간체 12-5)의 합성**

[0392] **중간체 12-4**(2.0g)를 무수 디클로로메탄(15mL)에 용해시키고, 여기에 농황산(5.38g, 98% 질량 분율)을 첨가하고 반응액을 0℃로 냉각시켰다. 이어서, 반응액에 농질산(3.46g, 68% 질량 분율)을 드롭방식으로 천천히 첨가하였다. 반응액을 25℃에서 2시간 동안 교반하였다. 반응이 끝난 후, 반응액을 얼음물(50mL)에 드롭방식으로 천천히 첨가한 다음, 에틸 아세테이트(50mL)를 첨가하고 유기상을 물(50mL*2)로 세척하고, 세척 후의 유기상을 적당량의 무수 황산나트륨으로 건조시켰다. 유기상이 건조될 때까지 감압 농축하였다. 잔류물을 실리카겔 컬럼 크로마토그래피(ISCO®; 24g SepaFlash® 고속 실리카겔 컬럼, 구배 0~40%의 석유 에테르/에틸 아세테이트, 유속 60mL/분)로 정제하여 표제 화합물(1.8g)을 얻었다.

[0393] **^{1}H NMR(400MHz, 중수소화 클로로포름)** δ = 7.51(s, 1H), 6.26(s, 2H), 2.63(s, 3H).

[0394] **단계 5: 1-(6-아미노-4-플루오로벤조[*d*][1,3]디옥솔로-5-일)에탄-1-온(중간체 12-6)의 합성**

[0395] **중간체 12-5**(1.8g)을 무수 메탄올(18mL) 및 물(9mL)에 용해시키고, 여기에 염화암모늄(635.83mg) 및 철분(2.21mg)을 첨가하였다. 반응액을 질소 분위기 하에 80℃에서 2시간 동안 교반하였다. 반응이 끝난 후, 반응액을 실온으로 냉각시켰다. 반응액을 여과하고, 여과액을 에틸 아세테이트(50mL)로 희석하고, 유기상을 물(50mL*2)로 세척하고, 세척 후의 유기상을 적당량의 무수 황산나트륨으로 건조시켰다. 유기상이 건조될 때까지 감압 농축하여 표제 화합물(1.5g)을 얻었다.

[0396] MS m/z (ESI): 198.0 $[M+H]^+$.

[0397] **단계 6: *N*-(6-아세틸-7-플루오로벤조[*d*][1,3]디옥솔로-5-일)아세트아미드(중간체 12-7)의 합성**

[0398] **중간체 12-6**(500.0mg)을 무수 디클로로메탄(5mL)에 용해시키고, 여기에 피리딘(601.79mg)을 첨가하고, 질소 분위기 하에 반응에 염화아세틸(398.14mg)을 드롭방식으로 첨가하였다. 반응액을 질소 분위기 하에 25℃에서 1.5시간 동안 교반하였다. 반응이 끝난 후, 유기상이 건조될 때까지 감압 농축하였다. 잔류물을 실리카겔 컬럼 크로마토그래피(ISCO®; 12g SepaFlash® 고속 실리카겔 컬럼, 구배 0~40% 석유 에테르/에틸 아세테이트, 유속 60mL/분)로 정제하여 표제 화합물(380.0mg)을 얻었다.

[0399] **^{1}H NMR(400MHz, 중수소화 클로로포름)** δ = 11.72(s, 1H), 8.18(d, *J* = 1.0Hz, 1H), 6.10(s, 2H), 2.64(d, *J* = 8.4Hz, 3H), 2.22 (s, 3H).

[0400] **단계 7: *N*-(6-(2-브로모아세틸)-7-플루오로벤조[*d*][1,3]디옥솔로-5-일)아세트아미드(중간체 12-8)의 합성**

[0401] **중간체 12-7**(380.0mg)을 아세트산(3mL)에 용해시키고, 여기에 브롬화수소의 아세트산 용액(1.95g, 함량 33%)을 첨가한 후, 반응액에 액체 브로민(256.42mg)을 드롭방식으로 천천히 첨가하였다. 반응액을 25℃에서 1시간 동안 교반하였다. 반응이 끝난 후, 반응액을 얼음물에 천천히 붓고 0.5시간 동안 교반하여 여과하고, 필터 케이크를 물(20 mL*2)로 세척하고, 필터 케이크를 건조시켜 표제 화합물(400.0mg)을 얻었다.

[0402] MS m/z (ESI): 317.8 $[M+H]^+$.

[0403] **단계 8: 1-(6-아미노-4-플루오로벤조[*d*][1,3]디옥솔로-5-일)-2-클로로에탄-1-온(중간체 12-9)의 합성**

[0404] **중간체 12-8**(400.0mg)을 무수 에탄올(2mL) 및 농염산(2mL)에 용해시키고, 반응액을 60℃에서 3시간 동안 교반하였다. 반응이 끝난 후, 반응액을 실온으로 냉각시키고, 얼음물(20mL)을 순차적으로 천천히 첨가하고, 포화 탄산수소나트륨으로 pH=8로 조절한 다음, 에틸 아세테이트(40mL)를 첨가하고, 유기상을 물(20mL*2)로 세척하고, 세척 후의 유기상을 적당량의 무수 황산나트륨으로 건조시켰다. 유기상이 건조될 때까지 감압 농축하여 표제 화합물(220.0mg)을 얻었다.

[0405] MS m/z (ESI): 232.0 $[M+H]^+$.

[0406] **단계 9: (*S*)-14-(클로로메틸)-7-에틸-15-플루오로-7-하이드록시-10,13-디하이드로-1*H*-[1,3]디옥솔로[4,5-*g*]피라노[3',4':6,7]인돌리지노[1,2-*b*]퀴놀린-8,11(7*H*)-디온(중간체 12-10)의 합성**

[0407] **중간체 12-9**(200.0mg) 및 **중간체 1-3** (227.32mg)을 톨루엔(3mL)에 용해시키고, 여기에 피리디늄 p-톨루엔설폰산염(21.70mg)을 첨가하였다. 반응액을 90℃에서 16시간 동안 교반하였다. 반응이 끝난 후, 반응액을 실온으로 냉각시키고, 에탄올(1mL)을 첨가하고, 반응액을 25℃에서 0.5시간 동안 교반하였다. 반응액을 여과하고, 필터 케이크를 에탄올(5mL*2)로 세척하여 표제 화합물(320.0mg)을 얻었다.

[0408] MS m/z (ESI): 459.0 $[M+H]^+$.

[0409] **단계 10: (*S*)-14-(아미노메틸)-7-에틸-15-플루오로-7-하이드록시-10,13-디하이드로-1*H*-[1,3]디옥솔로[4,5-*g*]피라노[3',4':6,7]인돌리지노[1,2-*b*]퀴놀린-8,11(7*H*)-디온(중간체 12-11)의 합성**

[0410] **중간체 12-10**(260.00mg)을 무수 메탄올(1mL)과 무수 *N*,*N*-디메틸포름아미드(1mL)에 용해시키고, 여기에 우로트로핀(238.32mg)을 첨가하였다. 반응액을 50℃에서 3시간 동안 교반하였다. 반응이 끝난 후, 반응액을 실온으로 냉각시키고, 건조될 때까지 감압 농축하여, 분취용 고성능 액체 크로마토그래피(Boston Prime C18 컬럼 5μm 실리카, 직경 30mm, 길이 150mm; 용리액으로서 물(0.225%의 포름산 함유)과 아세토니트릴의 극성이 점차적으로 감소하는 혼합물을 사용하고; (아세토니트릴 구배 비율 0%~30%, 용리 시간 14분))로 정제하여 표제 화합물(85.0mg)을 얻었다.

[0411] MS m/z (ESI): 440.0 $[M+H]^+$.

[0412] **^{1}H NMR (400MHz, DMSO-d_6)** δ = 7.49 (s, 1H), 7.26 (s, 1H), 6.53 (s, 1H), 6.38 (s, 2H), 5.44 (s, 4H), 4.27 (s, 2H), 1.94-1.79 (m, 2H), 0.88 (t, *J* = 7.3 Hz, 3H).

[0413] **단계 11: tert-부틸 (*S*)-(2-(((7-에틸-15-플루오로-7-하이드록시-8,11-디옥소-8,10,11,13-테트라하이드로-10*H*-[1,3]디옥솔로[4,5-*g*]피라노[3',4':6,7]인돌리지노[1,2-*b*]퀴놀린-14-일)메틸)아미노)-2-옥소에틸)카바메이트 (중간체 12-12)의 합성**

[0414] **중간체 12-11**(7mg) 및 2-((tert-부톡시카르보닐)아미노)아세트산(5.58mg)을 무수 *N*,*N*-디메틸포름아미드(1mL)에 용해시키고, 여기에 2-(7-아자벤조트리아졸)-*N*,*N*,*N*',*N*'-테트라메틸우로늄 헥사플루오로포스페이트(12.11mg) 및 디이소프로필에틸아민(2.06mg)을 첨가하고, 반응액을 25℃에서 1시간 동안 교반하였다. 반응이 끝난 후, 반응액이 건조될 때까지 농축하여 표제 화합물(8.00mg)을 얻었다.

[0415] MS m/z (ESI): 597.3 $[M+H]^+$.

[0416] **단계 12: (*S*)-2-아미노-*N*-((7-에틸-15-플루오로-7-하이드록시-8,11-디옥소-7,8,11,13-테트라하이드로-10*H*-[1,3]디옥솔로[4,5-*g*]피라노[3',4':6,7]인돌리지노[1,2-*b*]퀴놀린-14-일)메틸)아세트아미드(화합물 12)의 합성**

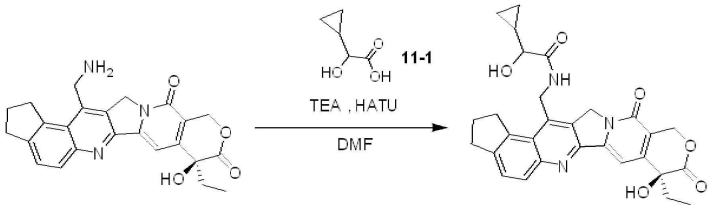
[0417] **중간체 12-12**(6mg)를 디클로로메탄(0.5mL)에 용해시키고, 여기에 트리플루오로아세트산(902.27mg)을 첨가하고 반응액을 25℃에서 1시간 동안 교반하였다. 반응이 끝난 후, 반응액이 건조될 때까지 감압 농축하여, 잔류물을 분취용 고성능 액체 크로마토그래피(Waters Xbridge C18 컬럼 5μm, 직경 25mm, 길이 100mm; 용리액으로서 물(0.05%의 포름산 함유)과 아세토니트릴의 극성이 점차적으로 감소하는 혼합물을 사용하고; (아세토니트릴 구배 비율 2%~32%, 용리 시간 12분))로 정제하여 표제 화합물(1.3mg)을 얻었다.

[0418] MS m/z (ESI): 497.1 $[M+H]^+$.

[0419] **^{1}H NMR (400MHz, DMSO-d_6)** δ = 8.80-8.58 (m, 1H), 7.51 (s, 1H), 7.26 (s, 1H), 6.52 (s, 1H), 6.40 (s,

2H), 5.50 (s, 2H), 5.43 (s, 2H), 4.85 (s, 2H), 3.09-2.75 (m, 2H), 1.92-1.79 (m, 2H), 0.87 (t, *J* = 7.1 Hz, 3H).

[0420] **실시예 13. 2-사이클로프로필-*N*-(((*S*)-8-에틸-8-하이드록시-9,12-디옥소-2,3,8,9,12,14-헥사하이드로-1*H*,11*H*-사이클로펜타[*f*]피라노[3',4':6,7]인돌리지노[1,2-*b*]퀴놀린-15-일)메틸)-2-하이드록시아세트아미드(화합물 13)**



7-9 13

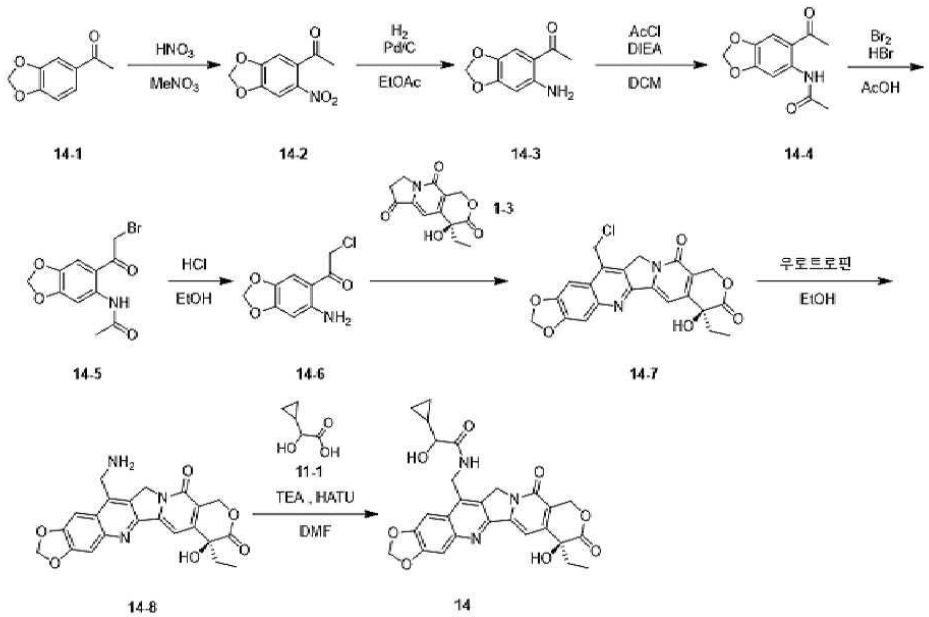
[0421]

[0422] **중간체 7-9**(10mg) 및 **중간체 11-1**(8.34mg)을 무수 *N*,*N*-디메틸포름아미드(0.5mL)에 용해시키고, 여기에 HATU(13.66mg) 및 디이소프로필에틸아민(3.10mg)을 첨가하고, 반응액을 25℃에서 1시간 동안 교반하였다. 반응이 끝난 후, 반응액을 여과하고, 여과액이 건조될 때까지 감압 농축하여, 잔류물을 분취용 고성능 액체 크로마토그래피(Waters Xbridge C18 컬럼 5μm, 직경 25mm, 길이 100mm; 용리액으로서 물(0.05%의 포름산 함유)과 아세토니트릴의 극성이 점차적으로 감소하는 혼합물을 사용하고; 아세토니트릴 구배 비율 34%~54%, 용리 시간 12분)로 정제하여 표제 화합물(0.8mg)을 얻었다.

[0423] MS m/z (ESI): 516.2 $[M+H]^+$.

[0424] **^{1}H NMR (400MHz, DMSO-d_6)** δ = 8.25 (t, *J* = 5.0 Hz, 1H), 8.01 (d, *J* =8.5 Hz, 1H), 7.78 (d, *J* = 8.5 Hz, 1H), 7.30 (s, 1H), 6.53 (s, 1H), 5.43 (s, 2H), 5.36 (s, 2H), 4.99-4.85 (m, 2H), 3.59 (s, 1H), 3.56 (d, *J* = 6.3 Hz, 2H), 3.08 (t, *J* = 7.7 Hz, 2H), 2.23-2.16 (m, 2H), 1.92-1.72 (m, 2H), 1.15-1.01 (m, 1H), 0.88 (t, *J* = 7.4 Hz, 3H), 0.46-0.19 (m, 4H)

[0425] **실시예 14-1. 2-사이클로프로필-*N*-(((*S*)-7-에틸-7-하이드록시-8,11-디옥소-7,8,11,13-테트라하이드로-10*H*-[1,3]디옥솔로[4,5-*g*]피라노[3',4':6,7]인돌리지노[1,2-*b*]퀴놀린-14-일)메틸)-2-하이드록시아세트아미드(화합물 14)**



14-1 14-2 14-3 14-4 14-5 14-6 14-7 14-8 14

[0426]

[0427] **단계 1: 1-(6-니트로벤조[*d*][1,3]디옥솔로-5-일)에타논(중간체 14-2)의 합성**

[0428] **중간체 14-1**(10.0g, 60.92mmol)을 니트로메탄(100mL)에 용해시키고, 여기에 질산(35.43g, 365.50mmol, 순도 65%)을 천천히 첨가하고, 반응액을 25℃에서 2.5시간 동안 교반하였다. 반응이 끝난 후, 반응액에 포화 탄산수

소나트륨 용액을 천천히 첨가하여 pH를 7~8로 조절한 후, 여기에 디클로로메탄(100mL)을 첨가하고 유기상을 물(50mL*2)로 세척하고, 세척 후의 유기상을 적당량의 무수 황산나트륨으로 건조시켰다. 분취용 박층 크로마토그래피(석유 에테르:에틸 아세테이트=1:2)로 정제하여 표제 화합물(5g)을 얻었다.

[0429] MS m/z (ESI): 210.0 $[M+H]^+$.

[0430] **단계 2: 1-(6-아미노벤조[*d*][1,3]디옥솔로-5-일)에타논(중간체 14-3)의 합성**

[0431] **중간체 14-2**(2.37g, 11.33mmol)를 무수 에탄올(25mL)에 용해시키고, 여기에 팔라듐 탄소(0.2g, 순도 10%)를 첨가하고, 반응액을 수소 보호 하에 25℃에서 16시간 동안 교반하였다. 반응이 끝난 후, 반응액을 여과하고, 필터 케이크를 에틸 아세테이트로 2회 세척하고, 여과액이 건조될 때까지 감압 농축하여 표제 화합물(1.6g)을 얻었다.

[0432] MS m/z (ESI): 180.1 $[M+H]^+$.

[0433] **단계 3: *N*-(6-아세틸벤조[*d*][1,3]디옥솔로-5-일)아세트아미드(중간체 14-4)의 합성**

[0434] **중간체 14-3**(1.0g, 5.58mmol)을 디클로로메탄(10mL)에 용해시키고 반응액을 0℃로 냉각시키고, 여기에 *N*,*N*-디이소프로필에틸아민(DIEA)(1.08g, 8.37mmol) 및 염화아세틸(569.55mg, 7.26mmol)을 첨가하였다. 반응액을 25℃에서 1.5시간 동안 교반하였다. 반응이 끝난 후, 반응액이 건조될 때까지 감압 농축하여 표제 화합물(1.23g)을 얻었다.

[0435] MS m/z (ESI):222.1 $[M+H]^+$.

[0436] **단계 4: *N*-(6-(2-브로모아세틸)벤조[*d*][1,3]디옥솔로-5-일)아세트아미드(중간체 14-5)의 합성**

[0437] **중간체 14-4**(1.23g, 5.00mmol)를 아세트산(12mL)에 용해시키고, 여기에 브롬화수소의 아세트산 용액(1.84g, 7.51mmol, 순도 33%)을 첨가한 후, 여기에 액체 브로민(959.69mg, 6.01mmol)을 천천히 첨가하고, 반응액을 25℃에서 1시간 동안 교반하였다. 반응이 끝난 후, 반응액을 얼음물에 붓고 10분 동안 교반하였다. 여과하고, 필터 케이크를 물로 2회 세척하고, 건조될 때까지 감압 농축하여, 잔류물에 에틸 아세테이트(2mL) 및 석유 에테르(10mL)를 첨가하고 반응액을 25℃에서 0.5시간 동안 교반하였다. 반응액을 여과하고, 필터 케이크를 건조시켜 표제 화합물(500mg)을 얻었다.

[0438] MS m/z (ESI): 300.0 $[M+H]^+$.

[0439] **단계 5: 1-(6-아미노벤조[*d*][1,3]디옥솔로-5-일)-2-클로로에타논(중간체 14-6)의 합성**

[0440] **중간체 14-5**(0.2g, 666.43μmol)를 무수 에탄올(1mL) 및 농염산(1mL)에 용해시키고, 반응액을 60℃에서 16시간 동안 교반하였다. 반응이 끝난 후, 반응액을 실온으로 냉각시키고, 얼음물(10mL) 및 포화 탄산수소나트륨(10mL)을 순차적으로 천천히 첨가한 후, 디클로로메탄(50mL)을 첨가하고, 유기상을 물(20mL*2)로 세척하고, 세척 후의 유기상을 적당량의 무수 황산나트륨으로 건조시켰다. 분취용 박층 크로마토그래피(석유 에테르:에틸 아세테이트=6:1)를 거쳐 표제 화합물(160mg)을 얻었다.

[0441] MS m/z (ESI): 214.0 $[M+H]^+$.

[0442] **단계 6: (*S*)-14-(브로모메틸)-7-에틸-7-하이드록시-10,13-디하이드로-11*H*-[1,3]디옥솔로[4,5-*g*]피라노[3',4':6,7]인돌리지노[1,2-*b*]퀴놀린-8,11(7*H*)-디온(중간체 14-7)의 합성**

[0443] **중간체 14-6**(50mg, 234.06μmol) 및 **중간체 1-3**(61.62mg, 234.06μmol)을 톨루엔(1mL)에 용해시키고, 여기에 피리디늄 p-톨루엔설폰산염(5.88mg, 23.41μmol)을 첨가하였다. 반응액을 90℃에서 16시간 동안 교반하였다. 반응이 끝난 후, 반응액을 실온으로 냉각시키고, 에탄올(1mL)을 첨가하고 반응액을 25℃에서 0.5시간 동안 교반하였다. 반응액을 여과하고, 필터 케이크를 에탄올(2mL*2)로 세척한 후, 건조시켜 표제 화합물(60mg)을 얻었다.

[0444] MS m/z (ESI): 441.1 $[M+H]^+$.

[0445] **단계 7: (*S*)-14-(아미노메틸)-7-에틸-7-하이드록시-10,13-디하이드로-11*H*-[1,3]디옥솔로[4,5-*g*]피라노[3',4':6,7]인돌리지노[1,2-*b*]퀴놀린-8,11(7*H*)-디온(중간체 14-8)의 합성**

[0446] **중간체 14-7**(55.00mg, 124.76μmol)을 에탄올(1mL)에 용해시키고, 여기에 우로트로핀(52.47mg, 374.29μmol)을

첨가하였다. 반응액을 80℃에서 1.5시간 동안 교반하였다. 반응이 끝난 후, 반응액을 실온으로 냉각시키고, 건조될 때까지 감압 농축하여, 분취용 고성능 액체 크로마토그래피(YMC-Actus Triart C18 컬럼 5μm, 직경 25mm, 길이 100mm; 용리액으로서 물(0.225%의 포름산 함유)과 메탄올의 극성이 점차적으로 감소하는 혼합물을 사용하고; 메탄올 구배 비율 0%~27%, 용리 시간 12분)로 정제하여 표제 화합물(10mg)을 얻었다.

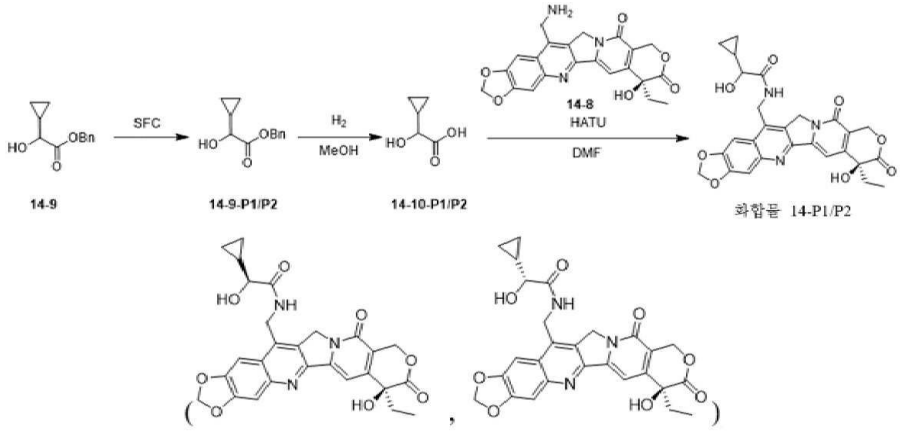
[0447] MS m/z (ESI): 422.1 $[M+H]^+$.

[0448] **단계 8: 2-사이클로프로필-*N*-(((*S*)-7-에틸-7-하이드록시-8,11-디옥소-7,8,11,13-테트라하이드로-10*H*-[1,3]디옥솔로[4,5-*g*]피라노[3',4':6,7]인돌리지노[1,2-*b*]퀴놀린-14-일)메틸)2-하이드록시아세트아미드(화합물 14)의 합성**

[0449] **중간체 14-8**(10.00mg, 20.17μmol) 및 **중간체 11-1**(23.42mg, 201.71μmol)을 무수 *N*,*N*-디메틸포름아미드(0.5mL)에 용해시키고, 여기에 2-(7-아자벤조트리아졸)-*N*,*N*,*N*',*N*'-테트라메틸우로늄 헥사플루오로포스페이트(HATU)(11.50mg, 30.26μmol) 및 *N*,*N*-디이소프로필에틸아민(7.82mg, 60.51μmol)을 첨가하고, 반응액을 25℃에서 1.5시간 동안 교반하였다. 반응이 끝난 후, 반응액을 여과하고, 분취용 고성능 액체 크로마토그래피(YMC-Actus Triart C18 컬럼 5μm, 직경 30mm, 길이 150mm; 용리액으로서 물(0.225%의 포름산 함유)과 아세토니트릴의 극성이 점차적으로 감소하는 혼합물을 사용하고; 아세토니트릴 구배 비율 4%~44%, 용리 시간 9분)로 정제하여 표제 화합물(3mg)을 얻었다.

[0450] MS m/z (ESI): 520.1 $[M+H]^+$.

[0451] **^{1}H NMR (400MHz, DMSO-d_6)** δ = 8.37 (t, *J* = 5.8 Hz, 1H), 7.62 (s, 1H), 7.28 (s, 1H), 7.00 (s, 1H), 6.25 (s, 1H), 6.05 (s, 2H), 5.27 (d, *J* = 5.0 Hz, 1H), 5.23 (s, 2H), 5.18 (s, 2H), 4.48 (d, *J* = 5.5 Hz, 2H), 1.66-1.55 (m, 2H), 0.76-0.40 (m, 1H), 0.63 (t, *J* = 7.3 Hz, 3H), 0.14-0.06 (m, 2H), 0.05-0.04 (m, 2H).



[0452]

[0453] **단계 9: 벤질 2-사이클로프로필-2-하이드록시아세테이트(중간체 14-9-P1/P2)의 제조**

[0454] 중간체 14-9를 분리하여 이성질체 14-9-P1과 14-9-P2를 제조하여 얻었다. **중간체 14-9**(1.3g)를 초임계 유체 크로마토그래피(DAICEL CHIRALPAK AD 컬럼, 10μm 실리카, 직경 30mm, 길이 250mm; 용리액으로서 에탄올(0.1%의 암모니아수 함유)을 사용)를 거쳐 **중간체 14-9-P1**(600mg) 및 **중간체 14-9-P2**(600mg)를 얻었다.

[0455] 상술한 두 가지 이성질체는 하기 키랄 초임계 유체 크로마토그래피 조건에 의해 추가로 분석하였다.

[0456]

컬럼	Chiralpak AD-3 150*4.6mm I.D., 3um	
이동상	A: 이산화탄소	
	B: 메탄올(0.05% 디에틸아민)	
	시간(분)	B 상%
	0	5
	4	40
	0.2	5
	1.8	5
유속	2.5mL/분	
파장	PDA 220nm	
컬럼 온도	35°C	
컬럼 압력	1500Psi	
기기 모델	Waters UPCC with PDA Detector	

[0457] **중간체 14-9-P1**:

[0458] 상술한 키랄 초임계 유체 크로마토그래피 조건에서, 이의 머무름 시간은 2.990분이며;

[0459] ^{1}**H NMR (400MHz, METHANOL-d_4)** δ 7.43-7.29 (m, 5H), 5.29-5.16 (m, 2H), 3.67 (d, *J* = 7.6 Hz, 1H), 1.19-1.07 (m, 1H), 0.58-0.38 (m, 4H).

[0460] **중간체 14-9-P2**:

[0461] 상술한 키랄 초임계 유체 크로마토그래피 조건에서, 이의 머무름 시간은 2.661분이며;

[0462] ^{1}**H NMR (400MHz, METHANOL-d_4)** δ 7.46-7.28 (m, 5H), 5.30-5.16 (m, 2H), 3.67 (d, *J* = 7.6 Hz, 1H), 1.21-1.03 (m, 1H), 0.60-0.36 (m, 4H).

[0463] **단계 10: 2-사이클로프로필-2-하이드록시아세트산(중간체 14-10-P1/P2)의 합성**

[0464] 수소 분위기 하에 **중간체 14-9-P1**(500mg)을 메탄올(15mL)에 첨가하고, 반응액에 함수 팔라듐 탄소(10mg, 10%)를 첨가하고, 반응액을 수소 분위기 하에 25℃에서 16시간 동안 교반하였다. 반응이 끝난 후, 반응물을 여과하고, 여과액을 감압 농축하여 **중간체 14-10-P1**(273mg)을 얻었다.

[0465] ^{1}**H NMR (400MHz, METHANOL-d_4)** δ 3.63 (d, *J* = 7.2 Hz, 1H), 1.21-1.09 (m, 1H), 0.61-0.40 (m, 4H).

[0466] 수소 분위기 하에 **중간체 14-9-P2**(500mg)를 메탄올(15mL)에 첨가하고, 반응액에 함수 팔라듐 탄소(10mg, 10%)를 첨가하고, 반응액을 수소 분위기 하에 25℃에서 16시간 동안 교반하였다. 반응이 끝난 후, 반응액을 여과하고, 여과액을 감압 농축하여 **중간체 14-10-P2**(279mg)를 얻었다.

[0467] ^{1}**H NMR (400MHz, METHANOL-d_4)** δ 3.63 (d, *J* = 7.2 Hz, 1H), 1.19-1.08 (m, 1H), 0.60-0.39 (m, 4H).

[0468] **단계 11: 2-사이클로프로필-*N*-(((*S*)-7-에틸-7-하이드록시-8,11-디옥소-7,8,11,13-테트라하이드로-10*H*-[1,3]디옥솔로[4,5-*g*]피라노[3',4':6,7]인돌리지노[1,2-*b*]퀴놀린-14-일)메틸)2-하이드록시아세트아미드(화합물 14-P1/P2)의 합성**

[0469] **중간체 14-8**(40.00mg) 및 **중간체 14-10-P1**(28.11mg)을 무수 *N*,*N*-디메틸포름아미드(1mL)에 용해시키고, 여기에 2-(7-아자벤조트리아졸)-*N*,*N*,*N*',*N*'-테트라메틸우로늄 헥사플루오로포스페이트(HATU)(46.02mg) 및 *N*,*N*-디이소프로필에틸아민(31.28mg)을 첨가하고, 반응액을 25℃에서 1.5시간 동안 교반하였다. 반응이 끝난 후, 반응액을 분취용 고성능 액체 크로마토그래피(Boston Green ODS C18 컬럼 5μm 실리카, 직경 30mm, 길이 150mm; 용리액으로서 물(0.225%의 포름산 함유)과 아세토니트릴의 극성이 점차적으로 감소하는 혼합물을 사용하고; (아세토니트릴 구배 비율 16%~46%, 용리 시간 12분))로 정제하여 **화합물 14-P1**(22.00mg)을 얻었다.

[0470] MS m/z (ESI): 520.1 $[M+H]^+$.

[0471] ^{1}**H NMR (400MHz, DMSO-d_6)** δ = 8.62 (t, *J* = 5.7 Hz, 1H), 7.86 (s, 1H), 7.52 (s, 1H), 7.25 (s, 1H), 6.51

(s, 1H), 6.29 (s, 2H), 5.47 (s, 2H), 5.43 (s, 2H), 4.73 (d, *J* = 5.9 Hz, 2H), 3.54 (d, *J* = 5.9 Hz, 1H), 1.93-1.78 (m, 2H), 1.06-0.96 (m, 1H), 0.87 (t, *J* = 7.3 Hz, 3H), 0.39-0.30 (m, 2H), 0.29-0.21 (m, 2H).

[0472] **중간체 14-8**(10.00mg) 및 **중간체 14-10-P2**(8.27mg)를 무수 *N*,*N*-디메틸포름아미드(0.5mL)에 용해시키고, 여기에 2-(7-아자벤조트리아졸)-*N*,*N*,*N*',*N*'-테트라메틸우로늄 헥사플루오로포스페이트(18.05mg) 및 *N*,*N*-디이소프로필에틸아민(6.13mg)을 첨가하고, 반응액을 25℃에서 1.5시간 동안 교반하였다. 반응이 끝난 후, 반응액을 직접 분취용 고성능 액체 크로마토그래피(Boston Green ODS C18 컬럼 5μm 실리카, 직경 30mm, 길이 150mm; 용리액으로서 물(0.225%의 포름산 함유)과 아세토니트릴의 극성이 점차적으로 감소하는 혼합물을 사용하고; (아세토니트릴 구배 비율 16%~46%, 용리 시간 12분))로 정제하여 **화합물 14-P2**(8.00mg)를 얻었다.

[0473] MS m/z (ESI): 520.1 $[M+H]^+$.

[0474] **^{1}H NMR (400MHz, DMSO-d_6)** δ = 8.63 (t, *J* = 5.9 Hz, 1H), 7.86 (s, 1H), 7.52 (s, 1H), 7.24 (s, 1H), 6.30 (s, 2H), 5.46 (s, 2H), 5.43 (s, 2H), 4.72 (d, *J* = 6.0 Hz, 2H), 3.55 (d, *J* = 6.0 Hz, 1H), 1.92-1.81 (m, 2H), 1.03-0.97 (m, 1H), 0.88 (t, *J* = 7.3 Hz, 3H), 0.38-0.30 (m, 2H), 0.28-0.22 (m, 2H).

[0475] 두 가지 이성질체는 각각 하기 키랄 초임계 유체 크로마토그래피 분석 방법에 의해 추가로 분석하였다.

[0476]

컬럼	Chiralcel OJ-3 100A 4.6mm I.D., 3μm
이동상	A: 이산화탄소
	B: 에탄올(0.05% 디에틸아민)
유속	2.8mL/분
파장	PDA 254nm
컬럼 온도	35°C
컬럼 압력	1500Psi
기기 모델	Waters UPCC with PDA Detector and QDa Detector

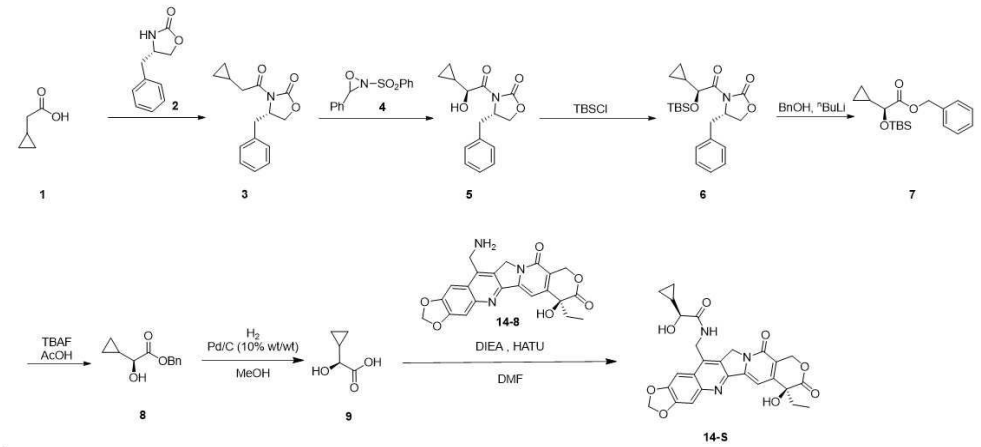
[0477] **화합물 14-P1:**

[0478] 상술한 키랄 초임계 유체 크로마토그래피 조건에서, 이의 머무름 시간은 3.673분이며;

[0479] **화합물 14-P2:**

[0480] 상술한 키랄 초임계 유체 크로마토그래피 조건에서, 이의 머무름 시간은 3.735분이다.

[0481] **실시예 14-2: (*S*)-2-사이클로프로필-*N*-(((*S*)-7-에틸-7-하이드록시-8,11-디옥소-7,8,11,13-테트라하이드로-10*H*-[1,3]디옥솔로[4,5-*g*]피라노[3',4':6,7]인돌리지노[1,2-*b*]퀴놀린-14-일)메틸)-2-하이드록시아세트아미드(화합물 14-S)**

[0482] 

[0483] **단계 1: (*S*)-4-벤질-3-(2-사이클로프로필아세틸)옥사졸리딘-2-온(중간체 3)의 합성**

[0484] **출발 물질 1**(150.0g), 4-디메틸아미노피리딘(160.15g) 및 **출발 물질 2**(221.2g)를 칭량하여 1500mL의 디클로로메탄에 용해시키고 실온에서 15분 동안 교반하였다. 1-에틸-(3-디메틸아미노프로필)카르보디이미드 염산염(EDCI, 359.0g)을 칭량하여 반응액에 배치로 첨가하고, 첨가가 완료된 후 실온에서 약 5시간 동안 교반하였다.

반응이 끝난 후, 반응액에 디클로로메탄(1500mL)을 첨가하여 희석시킨 후, 물(500mL)로 2회, 2N HCl(500mL)로 1회, 포화 탄산수소나트륨 용액(500mL)으로 1회, 포화 식염수 용액(500mL)으로 1회 순차적으로 세척하고, 유기상을 무수 황산나트륨으로 건조시키고, 여과한 다음 여과액이 건조될 때까지 감압 농축하여 표제 화합물(302g)을 얻었다.

[0485] ^{1}**H NMR (400 MHz, $CDCl_3$)** δ 7.32-7.35 (m, 2H), 7.26-7.29 (m, 1H), 7.21-7.23 (m, 2H), 4.68-4.71 (m, 1H), 4.17-4.23 (m, 2H), 3.30-3.33 (dd, 1H), 2.91-2.95 (dd, 1H), 2.78-2.82 (m, 2H), 1.14-1.18 (m, 1H), 0.59-0.63 (m, 2H), 0.21-0.26 (m, 2H).

[0486] **단계 2: (*S*)-4-벤질-3-((*S*)-2-사이클로프로필-2-하이드록시아세틸)옥사졸리딘-2-온(중간체 5)의 합성**

[0487] **중간체 3**(200g)을 칭량하여 2000mL의 무수 테트라하이드로푸란에 용해시키고, 질소 보호 하에 -78℃에서 15분 동안 교반하였다. 이어서, 반응액에 비스(트리메틸실릴)나트륨아미드(443.5mL, 2M 테트라하이드로푸란 용액)를 드롭방식으로 첨가하였다. 드롭방식으로 첨가가 완료된 후, 반응액을 -78℃에서 30분 동안 교반하였다. **중간체 4**(201.5g)를 700mL의 테트라하이드로푸란에 완전히 용해시키고, 반응액에 천천히 드롭방식으로 첨가하였다. 드롭방식으로 첨가가 완료된 후, -78℃에서 2시간 동안 교반하였다. 이어서, 반응액에 빙초산 220mL를 첨가하여 반응액을 퀜칭하였다. 드롭방식으로 첨가가 완료된 후, 점점 실온으로 승온시키고, 반응액에 2N HCl 600mL를 첨가하고 실온(20~25℃)에서 10시간 동안 교반하였다. 이어서, 반응액을 감압 농축하고, 잔류물에 에틸 아세테이트(1000mL) 및 물(200mL)을 첨가하고 20분 동안 교반하였다. 수상을 분리하고 에틸 아세테이트(500mL×2)로 2회 추출하고, 유기상을 합하여 400mL의 포화 $NaHCO_3$ 용액, 400mL의 포화 $Na_2S_2O_3$ 용액 및 포화 식염수로 순차적으로 각각 2회 세척하고, 얻어진 유기상을 무수 황산나트륨으로 건조시키고 여과 한 다음, 여과액이 건조될 때까지 감압 농축하여, 잔류물을 실리카겔 컬럼 크로마토그래피(석유 에테르:에틸 아세테이트=1/30)로 정제하여 표제 화합물(128.7g)을 얻었다.

[0488] ^{1}**H NMR (400 MHz, $CDCl_3$)** δ 7.37 (dd, J = 8.1, 6.8 Hz, 2H), 7.33-7.29 (m, 1H), 7.27-7.23 (m, 2H), 4.81 (dd, J = 7.9, 5.9 Hz, 1H), 4.72 (ddt, J = 10.0, 7.5, 2.9 Hz, 1H), 4.33 (t, J = 8.3Hz, 1H), 4.28 (dd, J = 9.1, 2.5 Hz, 1H), 3.48 (dd, J = 8.2, 3.9 Hz, 1H), 3.35 (dd, J = 13.5, 3.4 Hz,1H), 2.88 (dd, J = 13.5, 9.4 Hz, 1H), 1.36-1.29 (m, 1H), 0.62-0.44 (m, 4H).

[0489] **단계 3: (*S*)-4-벤질-3-((*S*)-2-((tert-부틸디메틸실릴)옥시)-2-사이클로프로필아세틸)옥사졸리딘-2-온(중간체 6)의 합성**

[0490] **중간체 5**(128.7g)를 칭량하여 1300mL의 디클로로메탄에 용해시키고, 이미다졸(56.17g)을 첨가하고 빙욕 하에 15분 동안 교반하였다. 이어서, 반응액에 TBSCl(107.3g)를 배치로 첨가하고 실온에서 3시간 동안 교반하였다. 반응액에 2N HCl 200mL를 첨가하고 20분 동안 교반하고 분액하였다. 유기상을 200mL의 포화 $NaHCO_3$ 용액 및 포화 식염수로 순차적으로 각각 2회 세척하였다. 유기상을 무수 황산나트륨으로 건조시키고 여과한 후, 여과액이 건조될 때까지 감압 농축하여, 잔류물을 실리카겔 컬럼 크로마토그래피(석유 에테르:에틸 아세테이트=80:1)로 정제하여 표제 화합물(160g)을 얻었다.

[0491] ^{1}**H NMR (400 MHz, $CDCl_3$)** δ 7.35-7.37 (m, 2H), 7.30-7.32 (m, 1H), 7.26-7.29 (m, 2H), 5.26-5.31 (m, 1H), 4.67-4.71 (m, 1H), 4.20-4.26 (m, 2H), 3.41-3.44 (dd, 1H), 2.72-2.76 (dd, 1H), 1.25-1.31 (m, 1H), 0.94 (s, 9H), 0.54-0.56 (m, 2H), 0.46-0.48 (m, 2H), 0.12 (s, 6H).

[0492] **단계 4: 벤질 (*S*)-2-((tert-부틸디메틸실릴)옥시)-2-사이클로프로필아세테이트(중간체 7)의 합성**

[0493] 벤질알코올(62.18g)을 칭량하여 500mL의 테트라하이드로푸란에 용해시키고, -25℃에서 교반하였다. n-부틸리튬(213.6mL, 2.5M 테트라하이드로푸란 용액)을 칭량하여 반응액에 천천히 드롭방식으로 첨가하였다. 드롭방식으로 첨가가 완료된 후, -25℃에서 1시간 동안 교반하였다. **중간체 6**(160g)을 칭량하여 320mL의 테트라하이드로푸란에 용해시키고, -25℃에서 반응액에 천천히 드롭방식으로 첨가하였다. 드롭방식으로 첨가가 완료된 후, -15℃에서 3시간 동안 교반하였다. 반응액에 포화 NH_4Cl(200mL) 용액을 첨가하여 반응액을 퀜칭하였다. 이어서, 감압 농축하고 반응액에 400mL의 메틸 tert-부틸 에테르 및 물(150mL)을 첨가하고 30분 동안 교반하고, 분액하고 수상을 메틸 tert-부틸 에테르(200mL×2)로 2회 추출하고, 유기상을 합하여 포화 식염수(250mL)로 1회 세척하고, 무수 황산나트륨으로 건조시키고, 여과한 다음, 여과액을 감압 농축하고, 잔류물을 실리카겔 컬럼 크로마토그래

피(석유 에테르:에틸 아세테이트=100:1)로 정제하여 표제 화합물(125g)을 얻었다.

[0494] ^{1}H NMR (400 MHz, $CDCl_3$) δ 7.28-7.40 (m, 5H), 5.17-5.26 (m, 2H), 3.86-3.89 (m, 1H), 1.21-1.46 (m, 1H), 0.90 (s, 9H), 0.45-0.51 (m, 4H), 0.05 (s, 6H).

[0495] **단계 5: 벤질 (*S*)-2-사이클로프로필-2-하이드록시아세테이트(중간체 8)의 합성**

[0496] **중간체 7**(125g)을 칭량하여 1200mL의 테트라하이드로푸란에 용해시키고 빙초산(35.1g)을 첨가하고 실온에서 5분 동안 교반하였다. 이어서, 반응액에 테트라부틸암모늄 플루오라이드(TBAF, 585mL, 1M 테트라하이드로푸란 용액)를 첨가하고, 반응액을 45℃에서 넣고 4시간 동안 반응시켰다. 반응액을 감압 농축하여 테트라하이드로푸란(600mL)을 제거하고, 잔류물에 300mL의 물과 400mL의 메틸 tert-부틸 에테르를 첨가하고 20분 동안 교반하고, 분액하고, 수상을 메틸 tert-부틸 에테르(200mL)로 2회 추출하고 유기상을 합하여 200mL의 포화 $NaHCO_3$ 용액 및 포화 식염수로 순차적으로 각각 2회 세척하고, 유기상을 무수 황산나트륨으로 건조시키고, 여과한 후, 여과액이 건조될 때까지 감압 농축하여, 잔류물을 실리카겔 컬럼 크로마토그래피(석유 에테르:에틸 아세테이트=60:1)로 정제하여 표제 화합물(68.9g)을 얻었다.

[0497] ^{1}H NMR (400 MHz, $CDCl_3$) δ 7.27-7.39 (m, 5H), 5.22-5.28 (m, 2H), 3.82 (d, 1H), 2.7 (brs, 1H), 1.11-1.15 (m, 1H), 0.41-0.56 (m, 4H).

[0498] **중간체 8**은 하기 키랄 초임계 유체 크로마토그래피 조건에 의해 추가로 분석하였다.

[0499]

컬럼	Chiralpak AD-3 150*4.6mm I.D., 3um	
이동상	A: 이산화탄소	
	B: 메탄올(0.05% 디에틸아민)	
	시간(분)	B 상%
	0	5
	4	40
	0.2	5
	1.8	5
유속	2.5mL/분	
파장	PDA 220nm	
컬럼 온도	35℃	
컬럼 압력	1500Psi	
기기 모델	Waters UPCC with PDA Detector	

[0500] 상술한 키랄 초임계 유체 크로마토그래피 조건에서, **중간체 8**의 머무름 시간은 3.013분이며; 이는 동일한 크로마토그래피 분석 조건에서 실시예 14-1의 **중간체 14-9-P1**의 머무름 시간(2.990분)과 대체로 일치하여, **중간체 8**은 **중간체 14-9-P1**과 배열이 동일하며, 양자는 동일한 화합물이다.

[0501] **단계 6: (*S*)-2-사이클로프로필-2-하이드록시아세트산(중간체 9)의 합성**

[0502] **중간체 8**(5g)을 메탄올(80mL)에 용해시키고, 반응액에 함수 팔라듐 탄소(10% 질량 함량, 0.7g)를 첨가하고, 수소 분위기 하에 25℃에서 16시간 동안 교반하였다. 반응이 끝난 후, 반응액을 여과하고, 여과액이 건조될 때까지 감압 농축한 다음, 표제 화합물(2.4g)을 얻었다.

[0503] ^{1}H NMR (400MHz, METHANOL-d_4) δ = 3.63 (d, J = 7.3 Hz, 1H), 1.20-1.09 (m, 1H), 0.61-0.39 (m, 4H).

[0504] **단계 7: (*S*)-2-사이클로프로필-*N*-(((*S*)-7-에틸-7-하이드록시-8,11-디옥소-7,8,11,13-테트라하이드로-10*H*-[1,3]디옥솔로[4,5-*g*]피라노[3',4':6,7]인돌리지노[1,2-*b*]퀴놀린-14-일)메틸)-2-하이드록시아세트아미드(화합물 14-S)의 합성**

[0505] **중간체 14-8**(90mg) 및 **중간체 9**(49.60mg)를 무수 *N*,*N*-디메틸포름아미드(1mL)에 용해시키고, 여기에 O-(7-아자벤조트리아졸-1-일)-*N*,*N*,*N*,*N*-테트라메틸우로늄 헥사플루오로포스페이트(121.81mg) 및 *N*,*N*-디이소프로필에틸아민(82.81mg)을 첨가하고, 반응액을 25℃에서 16시간 동안 교반하였다. 반응이 끝난 후, 반응액을 고성능 액체 크로마토그래피(컬럼: Boston Green ODS 150*30mm*5um; 이동상: [A: 물(0.225% 포름산), B: 아세토니트릴]; B%: 20%~50%, 12분)로 정제하여 표제 화합물(21mg)을 얻었다.

[0506] MS m/z (ESI): 520.0[M+H]$^+$.

[0507] ^{1}H NMR (400MHz, DMSO-d_6) δ = 8.62 (t, J = 6.1 Hz, 1H), 7.87 (s, 1H), 7.52 (s, 1H), 7.24 (s, 1H), 6.48 (s, 1H), 6.30 (s, 2H), 5.48 (s, 2H), 5.43 (s, 2H), 4.73 (d, J = 5.6 Hz, 2H), 3.54 (d, J = 5.5 Hz, 1H), 1.93-1.80 (m, 2H), 1.05-0.97 (m, 1H), 0.88 (t, J = 7.3 Hz, 3H), 0.39-0.30 (m, 2H), 0.30-0.22 (m, 2H).

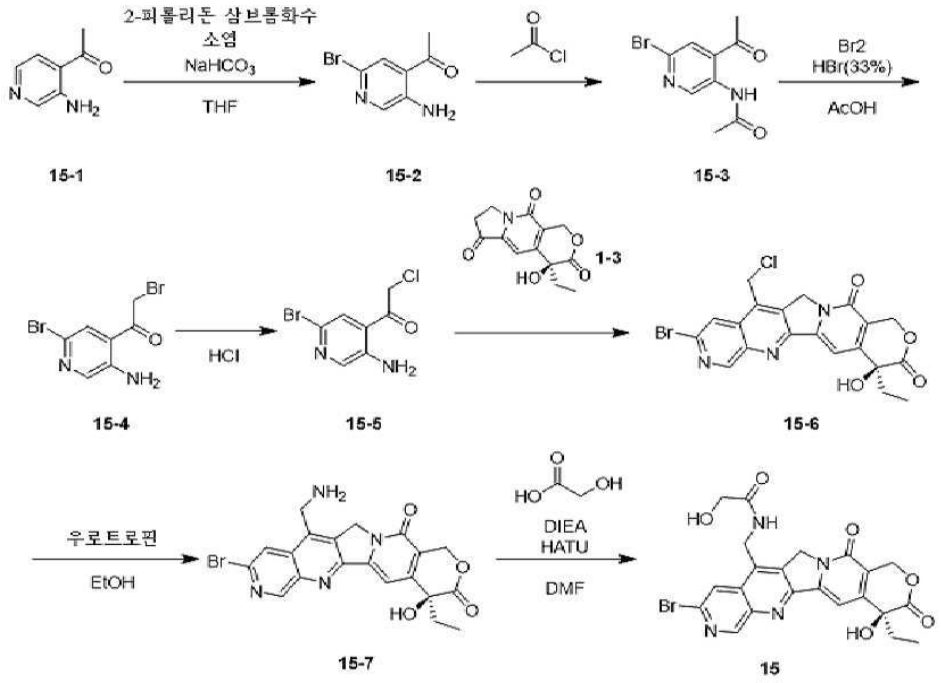
[0508] **화합물 14-S**는 하기 키랄 초임계 유체 크로마토그래피 조건에 의해 추가로 분석하였다.

[0509]

컬럼	Chiralcel OJ-3 100A 4.6mm I.D., 3μm
이동상	A: 이산화탄소
	B: 에탄올(0.05% 디에틸아민)
유속	2.8mL/분
파장	PDA 254nm
컬럼 온도	35°C
컬럼 압력	1500Psi
기기 모델	Waters UPCC with PDA Detector and QDa Detector

[0510] 상술한 키랄 초임계 유체 크로마토그래피 조건에서, **화합물 14-S**의 머무름 시간은 3.654분이며; 이는 동일한 크로마토그래피 분석 조건에서 실시예 14-1에서 제조하여 얻어진 **화합물 14-P1**의 머무름 시간(3.673분)과 대체로 일치하다. 따라서, **화합물 14-S**는 실시예 14-1에서 제조하여 얻어진**화합물 14-P1**과 배열이 동일하며, 양자는 동일한 화합물이라고 판단된다.

[0511] **실시예 15. (*S*)-*N*-((9-브로모-4-에틸-4-하이드록시-3,14-디옥소-3,4,12,14-테트라하이드로-1*H*-피라노[3',4':6,7]인돌리지노[1,2-*b*][1,7]나프티리딘-11-일)메틸)-2-하이드록시아세트아미드(화합물 15)**



[0512]

[0513] **단계 1: 1-(5-아미노-2-브로모피리딘-4-일)에타논(중간체 15-2)의 합성**

[0514] **중간체 15-1**(500mg, 3.67mmol)을 무수 테트라하이드로푸란(90mL)에 용해시키고, 여기에 탄산수소나트륨(617.04mg, 7.34mmol) 및 2-피롤리돈 삼브롬화수소염(1.64g, 5.03mmol)을 첨가하고 반응액을 25℃에서 8시간 동안 교반하였다. 반응이 끝난 후, 반응액을 여과하여 분취용 박층 크로마토그래피(실리카, 석유 에테르:에틸 아세테이트=20:1)를 거쳐 표제 화합물(300mg)을 얻었다.

[0515] MS m/z (ESI): 214.9 [M+H]$^+$.

[0516] **단계 2: *N*-(4-아세틸-6-브로모피리딘-3-일)아세트아미드(중간체 15-3)의 합성**

[0517] **중간체 15-2**(150mg, 697.52mmol)를 디클로로메탄(2mL)에 용해시키고, 반응액을 0℃로 냉각시키고, 여기에 *N*,*N*-

디이소프로필에틸아민(180.30mg, 1.40mmol) 및 염화아세틸(109.51mg, 1.40mmol)을 첨가하였다. 반응액을 25℃에서 3시간 동안 교반하였다. 반응이 끝난 후, 반응액이 건조될 때까지 감압 농축하여 분취용 박층 크로마토그래피(실리카, 석유 에테르:에틸 아세테이트=3:1)를 거쳐 표제 화합물(100mg)을 얻었다.

[0518] MS m/z (ESI):257.0 $[M+H]^+$.

[0519] **단계 3: 1-(5-아미노-2-브로모피리딘-4-일)-2-브로모에타논(중간체 15-4)의 합성**

[0520] **중간체 15-3**(95.00mg, 273.45μmol)을 아세트산(2mL)에 용해시키고, 여기에 브롬화수소의 아세트산 용액(100.57g, 410.18μmol, 순도 33%)을 첨가한 후, 여기에 액체 브로민(48.07mg, 300.80 μmol)을 천천히 첨가하고, 반응액을 25℃에서 1시간 동안 교반하였다. 반응이 끝난 후, 반응액이 건조될 때까지 감압 농축하여 분취용 박층 크로마토그래피(실리카, 석유 에테르:에틸 아세테이트=3:1)를 거쳐 표제 화합물(45mg)을 얻었다.

[0521] MS m/z (ESI): 292.9 $[M+H]^+$.

[0522] **단계 4: 1-(5-아미노-2-브로모피리딘-4-일)-2-클로로에타논(중간체 15-5)의 합성**

[0523] **중간체 15-4**(50.00mg, 170.10μmol)를 농염산(1mL)에 용해시키고 반응액을 60℃에서 16시간 동안 교반하였다. 반응이 끝난 후, 반응액을 실온으로 냉각시키고, 얼음물(10mL) 및 포화 탄산수소나트륨(10mL)을 순차적으로 천천히 첨가한 후, 디클로로메탄(30mL)을 첨가하고, 유기상을 물(20mL*2)로 세척하고, 세척 후의 유기상을 적당량의 무수 황산나트륨으로 건조시켰다. 유기상이 건조될 때까지 감압 농축하여 표제 화합물(25mg)을 얻었다.

[0524] MS m/z (ESI): 248.9 $[M+H]^+$.

[0525] **단계 5: (*S*)-9-브로모-11-(클로로메틸)-4-에틸-4-하이드록시-1,12-디하이드로-14*H*-피라노[3',4':6,7]인돌리지노[1,2-*b*][1,7]나프티리딘-3,14(4*H*)-디온(중간체 15-6)의 합성**

[0526] **중간체 15-5**(25mg, 100.20μmol) 및 **중간체 1-3**(26.38mg, 100.20μmol)을 톨루엔(0.5mL)에 용해시키고, 여기에 피리디늄 p-톨루엔설폰산염(2.52mg, 10.02μmol)을 첨가하였다. 반응액을 90℃에서 16시간 동안 교반하였다. 반응이 끝난 후, 반응액을 실온으로 냉각시키고, 에탄올(1mL)을 첨가하고, 반응액을 25℃에서 0.5시간 동안 교반하였다. 반응액을 여과하고, 필터 케이크를 에탄올(2mL*2)로 세척하여 표제 화합물(30mg)을 얻었다.

[0527] MS m/z (ESI): 475.9 $[M+H]^+$.

[0528] **단계 6: (*S*)-11-(아미노메틸)-9-브로모-4-에틸-4-하이드록시-1,12-디하이드로-14*H*-피라노[3',4':6,7]인돌리지노[1,2-*b*][1,7]나프티리딘-3,14(4*H*)-디온(중간체 15-7)의 합성**

[0529] **중간체 15-6**(30mg, 62.93μmol)을 에탄올(1mL)에 용해시키고, 여기에 우로트로핀(17.64mg, 125.86μmol)을 첨가하였다. 반응액을 80℃에서 2시간 동안 교반하였다. 반응이 끝난 후, 반응액을 실온으로 냉각시키고, 건조될 때까지 감압 농축하여, 분취용 고성능 액체 크로마토그래피(YMC-Actus Triart C18 컬럼 5μm, 직경 25mm, 길이 100mm; 용리액으로서 물(0.225%의 포름산 함유)과 메탄올의 극성이 점차적으로 감소하는 혼합물을 사용하고; 메탄올 구배 비율 0%~25%, 용리 시간 12분)로 정제하여 표제 화합물(4mg)을 얻었다.

[0530] MS m/z (ESI): 457.0 $[M+H]^+$.

[0531] **단계 7: (*S*)-*N*-((9-브로모-4-에틸-4-하이드록시-3,14-디옥소-3,4,12,14-테트라하이드로-1*H*-피라노[3',4':6,7]인돌리지노[1,2-*b*][1,7]나프티리딘-11-일)메틸)-2-하이드록시아세트아미드(화합물 15)의 합성**

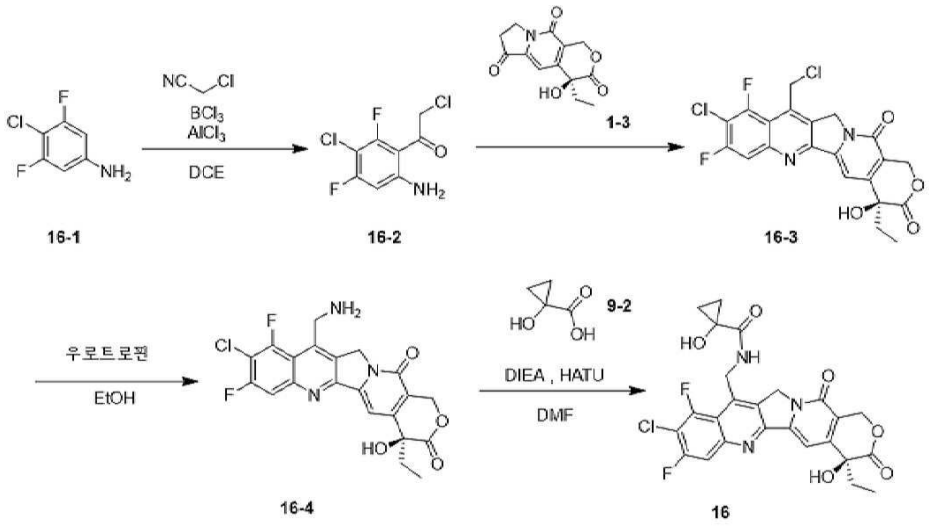
[0532] **중간체 15-7**(4mg, 8.75μmol) 및 하이드록시아세트산(3.33mg, 43.74μmol)을 무수 *N*,*N*-디메틸포름아미드(0.5mL)에 용해시키고, 여기에 HATU(4.99mg, 13.12μmol) 및 *N*,*N*-디이소프로필에틸아민(3.39mg, 26.24μmol)을 첨가하고, 반응액을 25℃에서 2시간 동안 교반하였다. 반응이 끝난 후, 반응액을 여과하고, 분취용 고성능 액체 크로마토그래피(YMC-Actus Triart C18 컬럼 5μm, 직경 25mm, 길이 100mm, 용리액으로서 물(0.05%의 포름산 함유)과 아세토니트릴의 극성이 점차적으로 감소하는 혼합물을 사용하고; 아세토니트릴 구배 비율 8%~28%, 용리 시간 12분)로 정제하여 표제 화합물(1.00mg)을 얻었다.

[0533] MS m/z (ESI): 515.0 $[M+H]^+$.

[0534] **^{1}H NMR (400MHz, DMSO-d_6)** δ = 9.38 (s, 1H), 8.88 (t, *J* = 6.2 Hz, 1H), 8.76 (s, 1H), 7.39 (s, 1H), 6.57

(s, 1H), 5.64-5.61 (m, 1H), 5.60 (s, 2H), 5.45 (s, 2H), 4.80 (d, *J* = 6.0 Hz, 2H), 3.83 (d, *J* = 5.7 Hz, 2H), 1.92-1.80 (m, 2H), 0.88 (t, *J* = 7.3 Hz, 3H).

[0535] **실시예 16. (*S*)-*N*-((9-클로로-4-에틸-8,10-디플루오로-4-하이드록시-3,14-디옥소-3,4,12,14-테트라하이드로-1*H*-피라노[3',4':6,7]인돌리지노[1,2-*b*]퀴놀린-11-일)메틸)-1-하이드록시사이클로프로판-1-카르복스아미드(화합물 16)**



[0536]

[0537] **단계 1: 1-(6-아미노-3-클로로-2,4-디플루오로페닐)-2-클로로에탄-1-온(중간체 16-2)의 합성**

[0538] 삼염화붕소(1M, 6.11mL)를 1,2-디클로로에탄(12mL)에 용해시키고, 반응액을 0℃로 냉각시키고, 여기에 **반응물 16-1**(1g, 6.11mmol) 및 클로로아세토니트릴(784.73mg, 10.39mmol)을 첨가하고, 반응액을 0℃에서 10분 동안 교반하고, 여기에 삼염화알루미늄(1.06g, 7.95mmol)을 첨가하였다. 이어서, 질소 보호 하에 반응액의 온도를 25℃로 승온시키고 10분 동안 교반하였다. 반응액을 질소 보호 하에 90℃에서 18시간 동안 교반하였다. LC-MS로 반응이 완료되었음을 검출하였다. 반응액을 실온으로 냉각시키고, 얼음물(25mL) 및 5%의 염산(5mL)을 순차적으로 천천히 첨가하고 25℃에서 30분 동안 교반한 다음, 디클로로메탄(50mL)을 첨가하고, 유기상을 물(2mL*2)로 세척하고, 세척 후의 유기상을 적당량의 무수 황산나트륨으로 건조시켰다. 건조될 때까지 감압 농축하여, 조생성물을 분취용 박층 크로마토그래피(실리카, 석유 에테르:에틸 아세테이트=9:1)를 거쳐 표제 화합물(340mg)을 얻었다.

[0539] MS m/z (ESI): 240.0 $[M+H]^+$.

[0540] **단계 2: (*S*)-9-클로로-11-(클로로메틸)-4-에틸-8,10-디플루오로-4-하이드록시-1,12-디하이드로-14*H*-피라노[3',4':6,7]인돌리지노[1,2-*b*]퀴놀린-3,14(4*H*)-디온(중간체 16-3)의 합성**

[0541] **중간체 16-2**(0.2g, 833.22μmol) 및 **중간체 1-3**(219.34mg, 833.22μmol)을 톨루엔(4mL)에 용해시키고, 여기에 피리디늄 p-톨루엔설폰산염(20.94mg, 83.32μmol)을 첨가하였다. 반응액을 100℃에서 18시간 동안 교반하였다. LC-MS로 반응이 완료되었음을 검출하였다. 반응액을 실온으로 냉각시키고, 에탄올(1mL)을 첨가하고, 반응액을 25℃에서 0.5시간 동안 교반하였다. 반응액을 여과하고, 필터 케이크를 에탄올(2mL*2)로 세척하여 조생성물인 표제 화합물(190mg)을 얻었다.

[0542] MS m/z (ESI): 467.1 $[M+H]^+$.

[0543] **단계 3: (*S*)-11-(아미노메틸)-9-클로로-4-에틸-8,10-디플루오로-4-하이드록시-1,12-디하이드로-14*H*-피라노[3',4':6,7]인돌리지노[1,2-*b*]퀴놀린-3,14(4*H*)-디온(16-4)의 합성**

[0544] **중간체 16-3**(50mg, 107.01μmol)을 에탄올(1mL)에 용해시키고, 여기에 우로트로핀(45.00mg, 321.03μmol)을 첨가하였다. 반응액을 80℃에서 1.5시간 동안 교반하였다. LC-MS로 반응이 완료되었음을 검출하였다. 반응액을 실온으로 냉각시키고, 건조될 때까지 감압 농축하여, 분취용 고성능 액체 크로마토그래피(YMC-Actus Triart C18 컬럼 5μm 실리카, 직경 25mm, 길이 100mm; 용리액으로서 물(0.225%의 포름산 함유)과 아세토니트릴의 극성이 점차적으로 감소하는 혼합물을 사용하고; 아세토니트릴 구배 비율 2%~32%, 용리 시간 12분)로 정제하여 표제 화

합물(1.22mg)을 얻었다.

[0545] MS m/z (ESI): 448.0 $[M+H]^+$.

[0546] ^{1}**H NMR (400MHz, DMSO-d$_6$)** δ = 8.14 (d, *J* = 9.8 Hz, 1H), 7.36 (s, 1H), 6.57 (s, 1H), 5.55 (s, 2H), 5.46 (s, 2H), 4.35 (d, *J* = 3.0 Hz, 2H), 1.94-1.83 (m, 2H), 0.88 (t, *J* = 7.3 Hz, 3H).

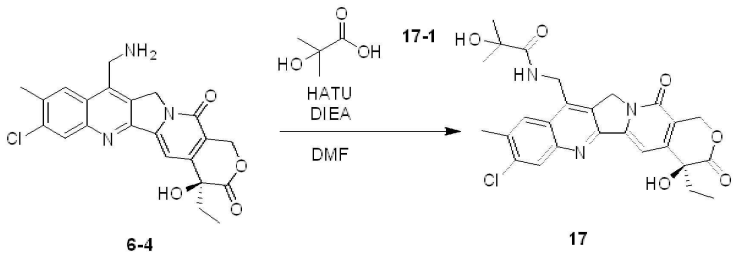
[0547] **단계 4: (*S*)-*N*-((9-클로로-4-에틸-8,10-디플루오로-4-하이드록시-3,14-디옥소-3,4,12,14-테트라하이드로-1*H*-피라노[3',4':6,7]인돌리지노[1,2-*b*]퀴놀린-11-일)메틸)-1-하이드록시사이클로프로판-1-카르복스아미드(화합물 16)의 합성**

[0548] **화합물 16-4**(5.75mg, 12.84 μmol) 및 **중간체 9-2**(3.93mg, 38.52 μmol)를 *N*,*N*-디메틸포름아미드(0.5mL)에 용해시키고, 여기에 HATU(7.32mg, 19.26 μmol) 및 디이소프로필에틸아민(4.98mg, 38.52 μmol)을 첨가하고, 반응액을 30℃에서 1시간 동안 교반하였다. 반응이 끝난 후, 반응액을 여과하고, 분취용 고성능 액체 크로마토그래피(YMC-Actus Triart C18 컬럼 5 μm, 직경 25mm, 길이 100mm; 용리액으로서 물(0.225%의 포름산 함유)과 아세토니트릴의 극성이 점차적으로 감소하는 혼합물을 사용하고; 아세토니트릴 구배 비율 14%~34%, 용리 시간 12분)로 정제하여 표제 화합물(3mg)을 얻었다.

[0549] MS m/z (ESI): 532.1 $[M+H]^+$.

[0550] ^{1}**H NMR (400MHz, DMSO-*d*$_6$)** δ = 8.46 (t, *J* = 5.9 Hz, 1H), 8.16 (d, *J* = 9.8 Hz, 1H), 7.36 (s, 1H), 6.56 (s, 1H), 6.33 (s, 1H), 5.53 (s, 2H), 5.45 (s, 2H), 4.93 (d, *J* = 3.6 Hz, 2H), 1.92-1.82 (m, 2H), 1.04-0.99 (m, 2H), 0.90-0.87 (m, 2H), 0.87-0.82 (m, 3H).

[0551] **실시예 17. (*S*)-*N*-((8-클로로-4-에틸-4-하이드록시-9-메틸-3,14-디옥소-3,4,12,14-테트라하이드로-1*H*-피라노[3',4':6,7]인돌리지노[1,2-*b*]퀴놀린-11-일)메틸)-2-하이드록시-2-메틸프로판아미드(화합물 17)**

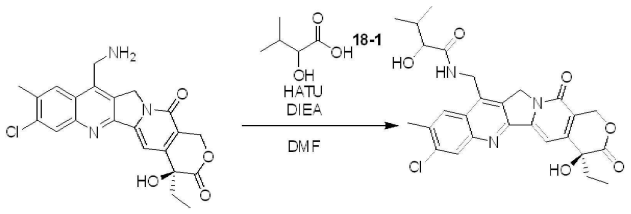
[0552] 

[0553] **중간체 6-4**(5mg, 11.74 μmol) 및 **중간체 17-1**(2.44mg, 23.48 μmol)을 무수 *N*,*N*-디메틸포름아미드(0.5mL)에 용해시키고, 여기에 HATU(8.95mg, 23.48 μmol) 및 *N*,*N*-디이소프로필에틸아민(1.19mg, 11.74 μmol)을 첨가하고, 반응액을 25℃에서 1시간 동안 교반하였다. 반응이 끝난 후, 반응액을 여과하고, 분취용 고성능 액체 크로마토그래피(Waters Xbridge C18 컬럼 5 μm 실리카, 직경 25mm, 길이 100mm; 용리액으로서 물(0.05%의 포름산 함유)과 아세토니트릴의 극성이 점차적으로 감소하는 혼합물을 사용하고; 아세토니트릴 구배 비율 22%~42%, 용리 시간 12분)로 정제하여 표제 화합물(1mg)을 얻었다.

[0554] MS m/z (ESI): 512.1 $[M+H]^+$.

[0555] ^{1}**H NMR (400MHz, Methanol-*d*$_4$)** δ = 8.32 (s, 1H), 8.22 (s, 1H), 7.67 (s, 1H), 5.62 (d, *J* = 16.4 Hz, 1H), 5.52 (s, 2H), 5.42 (d, *J* = 16.4 Hz, 1H), 5.01 (s, 2H), 2.65 (s, 3H), 2.05-1.94 (m, 2H), 1.38 (s, 6H), 1.03 (t, *J* = 7.5 Hz, 3H).

[0556] **실시예 18. *N*-(((*S*)-8-클로로-4-에틸-4-하이드록시-9-메틸-3,14-디옥소-3,4,12,14-테트라하이드로-1*H*-피라노[3',4':6,7]인돌리지노[1,2-*b*]퀴놀린-11-일)메틸)-2-하이드록시-3-메틸부탄아미드(화합물 18)**



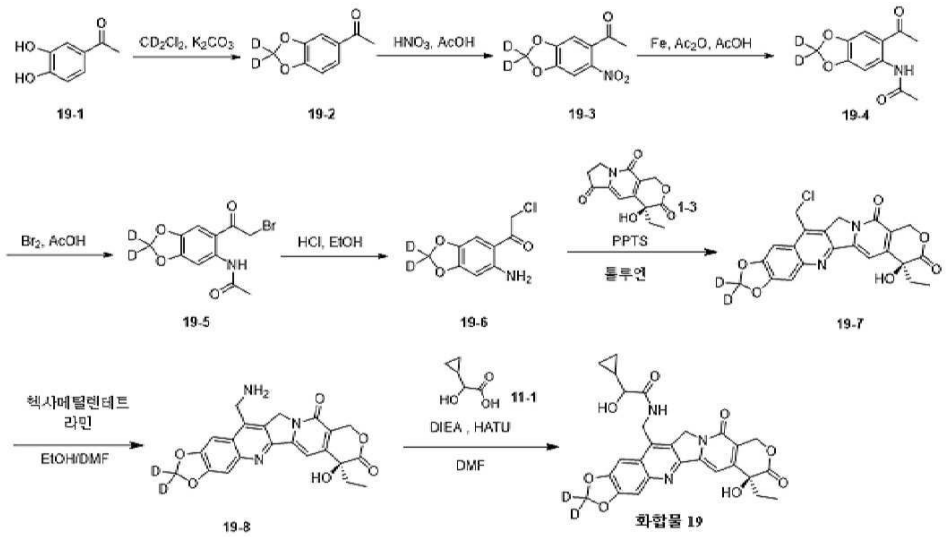
[0557]

[0558] **중간체 6-4**(5mg, 11.74μmol) 및 **중간체 18-1**(2.77mg, 23.48μmol)을 무수 *N*,*N*-디메틸포름아미드(0.5mL)에 용해시키고, 여기에 HATU(8.95mg, 23.48μmol) 및 *N*,*N*-디이소프로필에틸아민(1.19mg, 11.74μmol)을 첨가하고, 반응액을 25℃에서 1시간 동안 교반하였다. 반응이 끝난 후, 반응액을 여과하고, 분취용 고성능 액체 크로마토그래피(Waters Xbridge C18 컬럼 5μm, 직경 25mm, 길이 100mm; 용리액으로서 물(0.05%의 포름산 함유)과 아세토니트릴의 극성이 점차적으로 감소하는 혼합물을 사용하고; 아세토니트릴 구배 비율 25%~45%, 용리 시간 12분)로 정제하여 표제 화합물(1.20mg)을 얻었다.

[0559] MS m/z (ESI): 526.1 $[M+H]^+$.

[0560] **^{1}H NMR (400MHz, Methanol-d_4)** δ = 8.30 (s, 1H), 8.13 (s, 1H), 7.61 (s, 1H), 5.60 (d, *J* = 16.3 Hz, 1H), 5.56-5.45 (m, 2H), 5.42-5.37 (m, 1H), 5.00-4.90 (m, 2H), 3.91 (d, *J* = 3.3 Hz, 1H), 3.13 (d, *J* = 6.5 Hz, 1H), 2.62 (s, 3H), 2.01-1.94 (m, 2H), 1.05-1.00 (m, 6H), 0.77-0.70 (m, 3H).

[0561] **실시예 19-1. 2-사이클로프로필-*N*-(((*S*)-7-에틸-7-하이드록시-8,11-디옥소-7,8,11,13-테트라하이드로-10*H*-[1,3]디옥솔로[4,5-*g*]피라노[3',4':6,7]인돌리지노[1,2-*b*]퀴놀린-14-일-2,2-d_2)메틸)-2-하이드록시아세트아미드 (화합물 19, 화합물 19-P1/P2)**



[0562]

[0563] **단계 1: 1-(벤조[*d*][1,3]디옥솔로-5-일-2,2-d_2)에탄-1-온(중간체 19-2)의 합성**

[0564] **중간체 19-1**(3g)을 무수 DMF 용액(25mL)에 용해시키고 중수소화 디클로로메탄(8.57g) 및 탄산칼륨(8.18g)을 첨가하고, 첨가가 완료된 후, 온도를 90℃로 승온시키고 16시간 동안 교반하였다. 이어서, 반응액을 물(100mL)에 첨가하고 에틸 아세테이트(200mL*2)로 추출하고 유기상을 합하여 포화 식염수(100mL)로 세척하고 무수 황산나트륨으로 건조시켰다. 여과한 후, 여과액이 건조될 때까지 감압 농축하여, 잔류물을 컬럼 크로마토그래피(에틸 아세테이트/석유 에테르=5:1)로 정제하여 표제 화합물(2.4g)을 얻었다.

[0565] MS m/z (ESI): 167.1$[M+H]^+$.

[0566] **단계 2: 1-(6-니트로벤조[*d*][1,3]디옥솔로-5-일-2,2-d_2)에탄-1-온(중간체 19-3)의 합성**

[0567] **중간체 19-2**(2.4g)를 무수 초산(10mL)에 용해시키고 0℃에서 농질산(32.50g, 함량 70%)을 드롭방식으로 첨가하고, 첨가가 완료된 후 0℃에서 10분 동안 교반하였다. 이어서, 온도를 실온으로 승온시키고 1시간 동안 교반하

였다. 반응이 완료된 후, 반응액을 얼음물(200mL)에 드롭방식으로 첨가하고, 여과한 후, 필터 케이크를 건조시켜 표제 화합물(1.9g)을 얻었다.

[0568] MS m/z (ESI): 212.0 $[M+H]^+$.

[0569] ^{1}H NMR (400 MHz, DMSO-d_6) δ 7.69 (s, 1H), 7.30 (s, 1H), 2.49 (s, 3H).

[0570] **단계 3: *N*-(6-아세틸벤조[*d*][1,3]디옥솔로-5-일-2,2-d_2)아세트아미드(중간체 19-4)의 합성**

[0571] **중간체 19-3**(1.8g)을 초산(25mL)에 용해시키고 초산 무수물(1.84g) 및 환원성 철분(4.76g)을 첨가하고 실온에서 1시간 동안 교반하였다. 반응이 완료된 후, 여과하고, 여과액이 건조될 때까지 감압 농축하여 잔류물을 컬럼 크로마토그래피(에틸 아세테이트/석유 에테르=5:1)로 정제하여, 표제 화합물(1.5g)을 얻었다.

[0572] MS m/z (ESI): 224.1 $[M+H]^+$.

[0573] **단계 4: *N*-(6-(2-브로모아세틸)벤조[*d*][1,3]디옥솔로-5-일-2,2-d_2)아세트아미드(중간체 19-5)의 합성**

[0574] **중간체 19-4**(1.45g)의 무수 초산(25mL) 용액에 HBr의 아세트산 용액(2.39g, 함량 33%)을 드롭방식으로 첨가한 후, Br_2(1.07g)을 드롭방식으로 첨가하고, 첨가가 완료된 후, 실온에서 1시간 동안 교반하였다. 반응이 완료된 후, 반응액이 건조될 때까지 감압 농축하여, 잔류물을 물(50mL)에 첨가하고, 에틸 아세테이트(50mL*2)로 추출하고, 유기상을 포화 식염수(50mL)로 세척하고, 무수 황산나트륨으로 건조시키고 여과한 후, 잔류물을 컬럼 크로마토그래피(에틸 아세테이트/석유 에테르=5:1)로 정제하여 표제 화합물(1.3g)을 얻었다.

[0575] MS m/z (ESI): 302.1 $[M+H]^+$.

[0576] **단계 5: 1-(6-아미노벤조[*d*][1,3]디옥솔로-5-일-2,2-d_2)-2-클로로에탄-1-온(중간체 19-6)의 합성**

[0577] **중간체 19-5**(1.2g) 및 농염산(144.82mg)을 에탄올(15mL)에 용해시키고 반응액을 60℃에서 16시간 동안 교반하였다. 반응이 완료된 후, 반응액이 건조될 때까지 감압 농축하여, 잔류물을 고성능 액체 크로마토그래피(YMC-Actus Triart C18 컬럼 5μm 실리카, 직경 30mm, 길이 150mm; 용리액으로서 물(0.05%의 NH_4HCO_3 함유)과 아세토니트릴의 극성이 점차적으로 감소하는 혼합물을 사용하고; (아세토니트릴 구배 비율 40%~50%))로 정제하여 표제 화합물(577mg)을 얻었다.

[0578] MS m/z (ESI): 216.0 $[M+H]^+$.

[0579] **단계 6: (*S*)-14-(클로로메틸)-7-에틸-7-하이드록시-10,13-디하이드로-11*H*-[1,3]디옥솔로[4,5-*g*]피라노[3',4':6,7]인돌리지노[1,2-*b*]퀴놀린-8,11(7*H*)-디온-2,2-d_2(중간체 19-7)의 합성**

[0580] **중간체 19-6**(100.0mg) 및 **중간체 1-3**(109.87mg)을 톨루엔(1mL)과 아세트산염(1mL)에 용해시키고, 여기에 피리디늄 p-톨루엔설폰산염(5.24mg)을 첨가하였다. 반응액을 100℃에서 16시간 동안 교반하였다. 반응이 끝난 후, 반응액을 실온으로 냉각시키고, 반응액을 직접 건조될 때까지 감압 농축하였다. 에탄올(5mL)을 첨가하고, 반응액을 25℃에서 0.5시간 동안 교반하였다. 반응액을 여과하고, 필터 케이크를 에탄올(5mL*2)로 세척하여 표제 화합물(100.0mg)을 얻었다.

[0581] MS m/z (ESI): 443.0 $[M+H]^+$.

[0582] **단계 7: (*S*)-14-(아미노메틸)-7-에틸-7-하이드록시-10,13-디하이드로-11*H*-[1,3]디옥솔로[4,5-*g*]피라노[3',4':6,7]인돌리지노[1,2-*b*]퀴놀린-8,11(7*H*)-디온-2,2-d_2(중간체 19-8)의 합성**

[0583] **중간체 19-7**(100.00mg)을 무수 에탄올(1.5mL) 및 무수 *N*,*N*-디메틸포름아미드(1.5mL)에 용해시키고, 여기에 우로트로핀(94.97mg)을 첨가하였다. 반응액을 50℃에서 6시간 동안 교반하였다. 반응이 끝난 후, 반응액이 건조될 때까지 감압 농축하여, 잔류물을 고성능 액체 크로마토그래피(컬럼: Boston Green ODS 150*30mm*5μm; 이동상: [A: 물(포름산), B: 아세토니트릴]; B%: 0%~30%, 12분)로 정제하여 표제 화합물(25.0mg)을 얻었다.

[0584] MS m/z (ESI): 424.0 $[M+H]^+$.

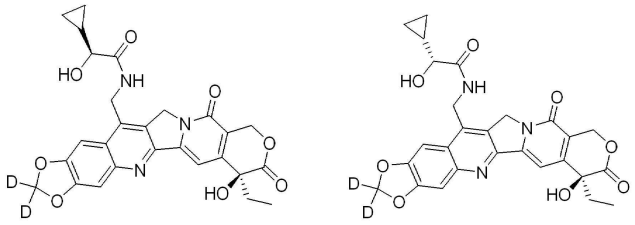
[0585] **단계 8: 2-사이클로프로필-*N*-(((*S*)-7-에틸-7-하이드록시-8,11-디옥소-7,8,11,13-테트라하이드로-1*H*-[1,3]디옥솔로[4,5-*g*]피라노[3',4':6,7]인돌리지노[1,2-*b*]퀴놀린-14-일-2,2-d_2)메틸)-2-하이드록시아세트아미드(화합물 19)의 합성**

[0586] **중간체 19-8**(7mg) 및 **중간체 11-1**(5.76mg)을 무수 *N*,*N*-디메틸포름아미드(0.5mL)에 용해시키고, 여기에 2-(7-아자벤조트리아졸)-*N*,*N*,*N*',*N*'-테트라메틸우로늄 헥사플루오로포스페이트(12.57mg) 및 디이소프로필에틸아민(4.27mg)을 첨가하고, 반응액을 25℃에서 1시간 동안 교반하였다. 반응이 끝난 후, 반응액을 여과하고, 분취용 고성능 액체 크로마토그래피(Waters Xbridge C18 컬럼 5μm, 직경 25mm, 길이 100mm; 용리액으로서 물(0.05%의 포름산 함유)과 아세토니트릴의 극성이 점차적으로 감소하는 혼합물을 사용하고; (아세토니트릴 구배 비율 20%~50%, 용리 시간 12분))로 정제하여 표제 화합물(2.60mg)을 얻었다.

[0587] MS m/z (ESI): 522.1[M+H]$^+$.

[0588] ^{1}**H NMR (400MHz, DMSO-d_6)** δ = 8.62 (t, *J* = 5.9 Hz, 1H), 7.84 (s, 1H), 7.51 (s, 1H), 7.24 (s, 1H), 6.49 (s, 1H), 5.48-5.41 (m, 5H), 4.72 (d, *J* = 5.5 Hz, 2H), 3.59-3.52 (m, 1H), 2.00-1.76 (m, 2H), 1.05-0.96 (m, 1H), 0.88 (t, *J* = 7.4 Hz, 3H), 0.37-0.30 (m, 2H), 0.29-0.19 (m, 2H).

[0589] **단계 9: 2-사이클로프로필-*N*-(((*S*)-7-에틸-7-하이드록시-8,11-디옥소-7,8,11,13-테트라하이드로-1*H*-[1,3]디옥솔로[4,5-*g*]피라노[3',4':6,7]인돌리지노[1,2-*b*]퀴놀린-14-일-2,2-d_2)메틸)-2-하이드록시아세트아미드(화합물 19-P1/P2)의 합성**

[0590] 

[0591] **중간체 19-8**(7mg) 및 **중간체 14-10-P1**(5.76mg)을 무수 *N*,*N*-디메틸포름아미드(0.5mL)에 용해시키고, 여기에 2-(7-아자벤조트리아졸)-*N*,*N*,*N*',*N*'-테트라메틸우로늄 헥사플루오로포스페이트(12.57mg) 및 디이소프로필에틸아민(4.27mg)을 첨가하고, 반응액을 25℃에서 1시간 동안 교반하였다. 반응이 끝난 후, 반응액이 건조될 때까지 감압 농축하여, 잔류물을 분취용 고성능 액체 크로마토그래피(Waters Xbridge C18 컬럼 5μm, 직경 25mm, 길이 100mm; 용리액으로서 물(0.05%의 포름산 함유)과 아세토니트릴의 극성이 점차적으로 감소하는 혼합물을 사용하고; 아세토니트릴 구배 비율 15%~45%, 용리 시간 12분)로 정제하여 **화합물 19-P1**(3.30mg)을 얻었다.

[0592] MS m/z (ESI): 522.1[M+H]$^+$.

[0593] ^{1}**H NMR (400MHz, DMSO-d_6)** δ = 8.62 (t, *J* = 6.0 Hz, 1H), 7.86 (s, 1H), 7.52 (s, 1H), 7.25 (s, 1H), 6.51 (s, 1H), 5.54-5.51 (m, 1H), 5.47 (s, 2H), 5.43 (s, 2H), 4.72 (d, *J* = 6.0 Hz, 2H), 3.55-3.53 (m, 1H), 1.94-1.78 (m, 2H), 1.05-0.96 (m, 1H), 0.88 (t, *J* = 7.3 Hz, 3H), 0.40-0.30 (m, 2H), 0.29-0.19 (m, 2H).

[0594] **중간체 19-8**(7mg) 및 **중간체 14-10-P2**(5.76mg)를 무수 *N*,*N*-디메틸포름아미드(0.5mL)에 용해시키고, 여기에 2-(7-아자벤조트리아졸)-*N*,*N*,*N*',*N*'-테트라메틸우로늄 헥사플루오로포스페이트(12.57mg) 및 디이소프로필에틸아민(4.27mg)을 첨가하고, 반응액을 25℃에서 1시간 동안 교반하였다. 반응이 끝난 후, 반응액이 건조될 때까지 감압 농축하여, 잔류물을 분취용 고성능 액체 크로마토그래피(Waters Xbridge C18 컬럼 5μm, 직경 25mm, 길이 100mm; 용리액으로서 물(0.05%의 포름산 함유)과 아세토니트릴의 극성이 점차적으로 감소하는 혼합물을 사용하고; (아세토니트릴 구배 비율 15%~45%, 용리 시간 12분))로 정제하여 **화합물 19-P2**(4.0mg)를 얻었다.

[0595] MS m/z (ESI): 522.1[M+H]$^+$.

[0596] ^{1}**H NMR (400MHz, DMSO-d_6)** δ = 8.62 (t, *J* = 6.1 Hz, 1H), 7.86 (s, 1H), 7.52 (s, 1H), 7.25 (s, 1H), 6.50 (s, 1H), 5.54-5.51 (m, 1H), 5.46 (s, 2H), 5.43 (s, 2H), 4.72 (d, *J* = 5.8 Hz, 2H), 3.55-3.52 (m, 1H), 1.94-1.80 (m, 2H), 1.04-0.95 (m, 1H), 0.88 (t, *J* = 7.4 Hz, 3H), 0.39-0.30 (m, 2H), 0.29-0.21 (m, 2H).

[0597] 두 가지 이성질체는 각각 하기 키랄 초임계 유체 크로마토그래피 분석 방법에 의해 추가로 분석하였다.

[0598]

컬럼	Chiralcel OD-3 50A 4.6mm I.D., 3μm
이동상	A: 이산화탄소
	B: 에탄올(0.05% 디에틸아민)
유속	4mL/분
파장	PDA 254nm
컬럼 온도	35°C
컬럼 압력	1500Psi
기기 모델	Waters UPCC with PDA Detector and QDa Detector

[0599] **화합물 19-P1:**

[0600] 상술한 키랄 고성능 액체 크로마토그래피조건에서, 이의 머무름 시간은 2.877분이며;

[0601] **화합물 19-P2:**

[0602] 상술한 키랄 고성능 액체 크로마토그래피조건에서, 이의 머무름 시간은 2.690분이다.

[0603] **화합물 19-P1의 배열 확인(X 선 단결정 회절법)**

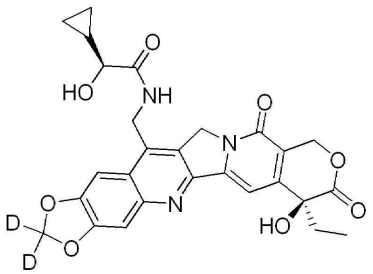
[0604] 단결정 배양 방법: 10mg의 화합물 19-P1 샘플을 칭량하여 1.5mL의 원심분리 튜브에 넣고 300μl의 피리딘을 첨가하여 초음파로 완전히 용해시킨 후 밀봉 필름으로 밀봉하고 밀봉 필름에 작은 구멍 3개를 바늘로 찔러 20~30℃에서 48시간 동안 천천히 휘발시켜 바늘 모양의 결정체를 얻었다.

[0605] 얻어진 단결정 샘플을 X-선 분석하였고, 시험 결과는 표 1 및 도 1을 참조한다.

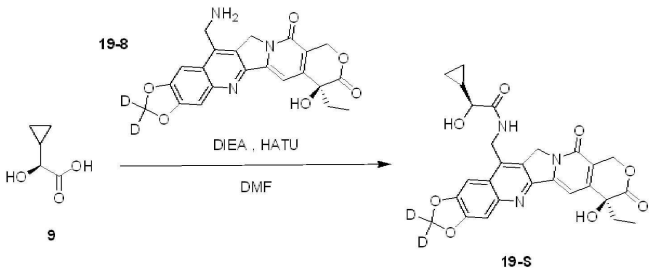
표 1. **화합물 19-P1**의 단결정 샘플과 결정체 데이터

[0606]

화학식	$C_{27}H_{23}D_2N_3O_8, H_2O, 2(C_5H_5N)$
화학식 양	697.73
결정계	단사
공간군	P 1 21 1
a, Å	a=13.7058(5)
B, Å	b= 6.7026(3)
C, Å	c= 18.6204(7)
A, deg	90
B, deg	97.727(3)
Γ, deg	90
부피, $Å^3$	1695.02(12)
Z	2
D_{calc}, g cm^{-3}	1.367
온도, K	193
방사선(파장)	Cu Kα(1.54178)
기기	BRUKER D8 VENTURE
h, k, l 범위	-15<=h<=17, -8<=k<=7, -23<=l<=23
θ 범위	3.254-79.721
프로그램	SHELXL-2014
수집된 데이터	25136
Unique data	6674
$R(F_o)$	0.0571
$Rw(F_o^2)$	0.1713
피팅 적합도	1.045
절대 배열 측정	0.04(11)

[0607] 상술한 X-선 결정체 회절 실험을 통해 **화합물 19-P1**의 화학 구조가  임을 확인하였다.

[0608] **실시예 19-2. (*S*)-2-사이클로프로필-*N*-(((*S*)-7-에틸-7-하이드록시-8,11-디옥소-7,8,11,13-테트라하이드로-10*H*-[1,3]디옥솔로[4,5-*g*]피라노[3',4':6,7]인돌리지노[1,2-*b*]퀴놀린-14-일-2,2-d_2) 메틸)-2-하이드록시아세트아미드(화합물 19-S)의 합성**



[0609]

[0610] **중간체 19-8**(2.4g) 및 **중간체 9**(1645.5mg)를 무수 *N*,*N*-디메틸포름아미드(25mL)에 용해시키고, 여기에 O-(7-아자벤조트리아졸-1-일)-*N*,*N*,*N*,*N*-테트라메틸우로늄 헥사플루오로포스페이트(3.24g) 및 *N*,*N*-디이소프로필에틸아민(1465.11mg)을 첨가하고, 반응액을 25℃에서 3시간 동안 교반하였다. 반응이 끝난 후, 반응액이 건조될 때까지 감압 농축하여, 잔류물에 에틸 아세테이트(100mL)를 첨가하고 16시간 동안 교반하였다. 여과한 후, 필터 케이크에 메탄올(50mL)을 첨가하고 16시간 동안 교반하였다. 여과한 후, 표제 화합물(1.6g)을 얻었다.

[0611] MS m/z (ESI): 522.1[M+H]$^+$.

[0612] ^{1}**H NMR (400MHz, DMSO-d_6)** δ = 8.60 (t, *J* = 5.9 Hz, 1H), 7.84 (s, 1H), 7.50 (s, 1H), 7.23 (s, 1H), 6.48 (s, 1H), 5.49 (d, *J* = 5.1 Hz, 1H), 5.47-5.37 (m, 4H), 4.71 (d, *J* = 5.8 Hz, 2H), 3.54 (t, *J* = 5.6 Hz, 1H), 1.97-1.75 (m, 2H), 1.07-0.94 (m, 1H), 0.87 (t, *J* = 7.3 Hz, 3H), 0.40-0.29 (m, 2H), 0.29-0.20 (m, 2H).

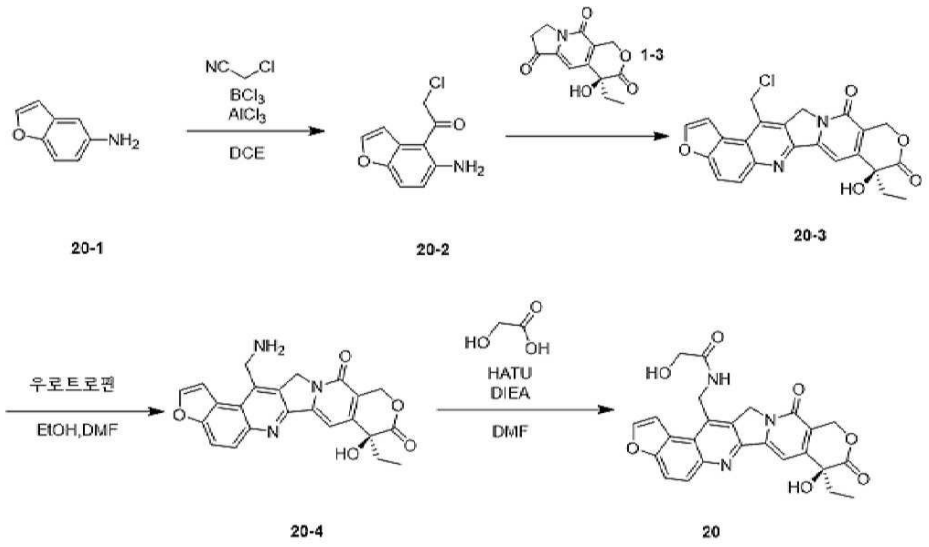
[0613] **화합물 19-S**는 각각 하기 키랄 초임계 유체 크로마토그래피 분석 방법에 의해 추가로 분석하였다.

[0614]

컬럼	Chiralcel OD-3 50A 4.6mm I.D., 3μm
이동상	A: 이산화탄소
	B: 에탄올(0.05% 디에틸아민)
유속	4mL/분
파장	PDA 254nm
컬럼 온도	35℃
컬럼 압력	1500Psi
기기 모델	Waters UPCC with PDA Detector and QDa Detector

[0615] 상술한 키랄 초임계 유체 크로마토그래피 조건에서, 본 실시예에서 제조하여 얻어진 **화합물 19-S**의 머무름 시간은 2.853분이고; 이는 동일한 크로마토그래피 분석 조건에서, 실시예 19-1에서 제조하여 얻어진 **화합물 19-P1**의 머무름 시간(2.877분)과 대체로 일치하다. 따라서, **화합물 19-S와 화합물 19-P1**은 배열이 동일하며, 동일한 화합물이라고 판단된다.

[0616] **실시예 20. (*S*)-*N*-((8-에틸-8-하이드록시-9,12-디옥소-8,9,12,14-테트라하이드로-11*H*-푸라노[3,2-*f*]피라노[3',4':6,7]인돌리지노[1,2-*b*]퀴놀린-15-일)메틸)-2-하이드록시아세트아미드(화합물 20)**



[0617]

[0618] **단계 1: 1-(5-아미노벤조푸란-4-일)-2-클로로에타논(중간체 20-2)의 합성**

[0619] 삼염화붕소(1M, 9.61mL)를 디클로로에탄(14mL)에 용해시키고, 반응액을 0℃로 냉각시키고, 여기에 **중간체 20-1**(1.6g, 12.02mmol) 및 클로로아세토니트릴(1.36g, 18.03mmol)을 첨가하고, 반응액을 0℃에서 10분 동안 교반하고, 여기에 삼염화알루미늄(1.92g, 14.42mmol)을 첨가하였다. 질소 보호 하에 반응액의 온도를 25℃로 승온시키고 10분 동안 교반하였다. 반응액을 질소 보호 하에 90℃에서 18시간 동안 교반하였다. 반응이 끝난 후, 반응액을 실온으로 냉각시키고, 얼음물(50mL) 및 5%의 HCl(10mL)을 순차적으로 천천히 첨가하고 25℃에서 30분 동안 교반한 후, 디클로로메탄(60mL)을 첨가하고, 유기상을 물(30mL)로 세척하고, 세척 후의 유기상을 적당량의 무수 황산나트륨으로 건조시켰다. 분취용 박층 크로마토그래피(석유 에테르:(에틸 아세테이트+에탄올=3:1)=9:1)를 거쳐 표제 화합물(300mg)을 얻었다.

[0620] MS m/z (ESI): 210.0 $[M+H]^+$.

[0621] **^{1}H NMR(400MHz, 클로로포름-d)** δ = 7.72(d, *J* = 2.1Hz, 1H), 7.53(d, *J* = 9.0Hz, 1H), 6.89(d, *J* = 1.4Hz, 1H), 6.66(d, *J* = 9.0Hz, 1H), 4.78(s, 2H)

[0622] **단계 2: (*S*)-15-(클로로메틸)-8-에틸-8-하이드록시-11,14-디하이드로-12*H*-푸라노[3,2-*f*]피라노[3',4':6,7]인돌리지노[1,2-*b*]퀴놀린-9,12(8*H*)-디온(중간체 20-3)의 합성**

[0623] **중간체 20-2**(200mg, 954.07μmol) 및 **중간체 1-3**(251.15mg, 954.07μmol)을 무수 톨루엔(4mL)에 용해시키고, 여기에 피리디늄 p-톨루엔설폰산염(23.98mg, 95.41μmol)을 첨가하고, 반응액을 질소 보호 하에 90℃에서 16시간 동안 교반하였다. 반응이 끝난 후, 반응액을 실온으로 냉각시키고, 반응액을 여과하고, 필터 케이크를 에탄올(3mL*2)로 세척하여 표제 화합물(300mg)을 얻었다.

[0624] MS m/z (ESI): 437.1 $[M+H]^+$.

[0625] **단계 3: (*S*)-15-(아미노메틸)-8-에틸-8-하이드록시-11,14-디하이드로-12*H*-푸라노[3,2-*f*]피라노[3',4':6,7]인돌리지노[1,2-*b*]퀴놀린-9,12(8*H*)-디온(중간체 20-4)의 합성**

[0626] **중간체 20-3**(70mg, 160.24μmol)을 에탄올(0.5mL) 및 무수 *N*,*N*-디메틸포름아미드(0.5mL)에 용해시키고, 여기에 우로트로핀(89.85mg, 640.96μmol)을 첨가하였다. 반응액을 25℃에서 3시간 동안 교반하였다. 반응이 끝난 후, 반응액을 실온으로 냉각시키고, 건조될 때까지 감압 농축하여, 분취용 고성능 액체 크로마토그래피(YMC-Actus Triart C18 컬럼 5μm, 직경 25mm, 길이 100mm; 용리액으로서 물(0.225%의 포름산 함유)과 메탄올의 극성이 점차적으로 감소하는 혼합물을 사용하고; 메탄올 구배 비율 5%~25%, 용리 시간 12분)로 정제하여 표제 화합물(17mg)을 얻었다.

[0627] MS m/z (ESI):418.1 $[M+H]^+$.

[0628] **단계 4: (*S*)-*N*-((8-에틸-8-하이드록시-9,12-디옥소-8,9,12,14-테트라하이드로-11*H*-푸라노[3,2-*f*]피라노**

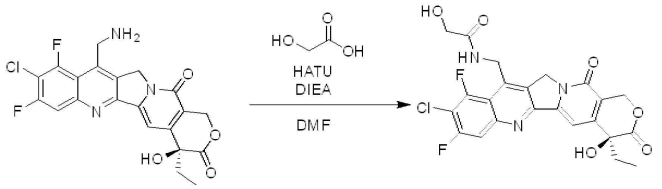
[3',4':6,7]인돌리지노[1,2-*b*]퀴놀린-15-일)메틸)-2-하이드록시아세트아미드(화합물 20)

[0629] **중간체 20-4**(5.00mg, 11.98μmol) 및 하이드록시아세트산(4.55mg, 59.89μmol)을 무수 *N*,*N*-디메틸포름아미드(0.5mL)에 용해시키고, 여기에 HATU(6.83mg, 17.97μmol)와 *N*,*N*-디이소프로필에틸아민(4.64mg, 35.94μmol)을 첨가하고, 반응액을 25℃에서 1시간 동안 교반하였다. 반응이 끝난 후, 반응액을 여과하고, 분취용 고성능 액체 크로마토그래피(YMC-Actus Triart C18 컬럼 5μm, 직경 25mm, 길이 100mm; 용리액으로서 물(0.05%의 포름산 함유)과 아세토니트릴의 극성이 점차적으로 감소하는 혼합물을 사용하고; 아세토니트릴 구배 비율 15%~35%, 용리 시간 12분)로 정제하여 표제 화합물(3mg)을 얻었다.

[0630] MS m/z (ESI): 476.2 $[M+H]^+$.

[0631] ^{1}**H NMR (400MHz, DMSO-d_6)** δ = 8.48-8.41 (m, 1H), 8.35 (d, *J* = 1.8 Hz, 1H), 8.22 (d, *J* = 8.0 Hz, 1H), 8.14 (d, *J* = 8.0 Hz, 1H), 7.76 (s, 1H), 7.35 (s, 1H), 6.54 (s, 1H), 5.58 (t, *J* = 5.6 Hz, 1H), 5.52 (s, 2H), 5.45 (s, 2H), 5.10 (d, *J* = 5.3 Hz, 2H), 3.88 (d, *J* = 5.6 Hz, 2H), 1.93-1.82 (m, 2H), 0.89 (t, *J* = 7.2 Hz, 3H).

[0632] **실시예 21. (*S*)-*N*-((9-클로로-4-에틸-8,10-디플루오로-4-하이드록시-3,14-디옥소-3,4,12,14-테트라하이드로-1*H*-피라노[3',4':6,7]인돌리지노[1,2-*b*]퀴놀린-11-일)메틸)-2-하이드록시아세트아미드(화합물 21)**



16-4 21

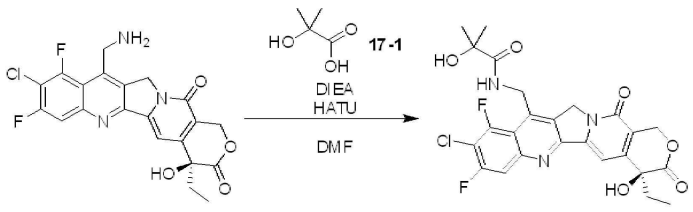
[0633]

[0634] **화합물 16-4**(7mg, 15.63μmol) 및 하이드록시아세트산(1.78mg, 25.48μmol)을 무수 *N*,*N*-디메틸포름아미드(0.5mL)에 용해시키고, 여기에 HATU(11.89mg, 31.26μmol) 및 디이소프로필에틸아민(2.02mg, 15.63μmol)을 첨가하고, 반응액을 25℃에서 1시간 동안 교반하였다. 반응이 끝난 후, 반응액을 여과하고, 분취용 고성능 액체 크로마토그래피(Waters Xbridge C18 컬럼 5μm, 직경 25mm, 길이 100mm; 용리액으로서 물(0.05%의 포름산 함유)과 아세토니트릴의 극성이 점차적으로 감소하는 혼합물을 사용하고; 아세토니트릴 구배 비율 20%~40%, 용리 시간 12분)로 정제하여 표제 화합물(1mg)을 얻었다.

[0635] MS m/z (ESI): 506.1 $[M+H]^+$.

[0636] ^{1}**H NMR (400MHz, Methanol-d_4)** δ = 8.35 (t, *J* = 5.8 Hz, 1H), 8.15 (dd, *J* = 1.8, 9.8 Hz, 1H), 7.36 (s, 1H), 6.57 (s, 1H), 5.59-5.50 (m, 3H), 5.45 (s, 2H), 4.91 (d, *J* = 3.2 Hz, 2H), 3.84 (d, *J* = 5.7 Hz, 2H), 1.90-1.80 (m, 2H), 0.87 (t, *J* = 7.3 Hz, 3H).

[0637] **실시예 22. (*S*)-*N*-((9-클로로-4-에틸-8,10-디플루오로-4-하이드록시-3,14-디옥소-3,4,12,14-테트라하이드로-1*H*-피라노[3',4':6,7]인돌리지노[1,2-*b*]퀴놀린-11-일)메틸)-2-하이드록시-2-메틸프로판아미드(화합물 22)**



16-4 22

[0638]

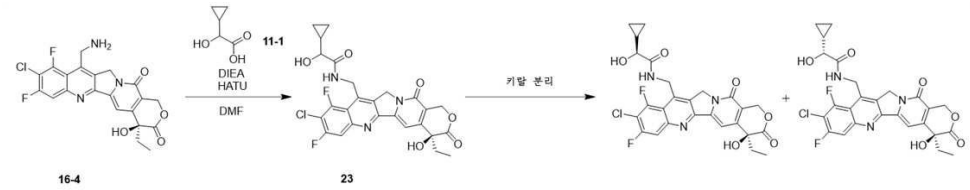
[0639] **화합물 16-4**(20mg, 44.66μmol) 및 **중간체 17-1**(13.95mg, 133.98μmol)을 *N*,*N*-디메틸포름아미드(0.5mL)에 용해시키고, 여기에 HATU(25.47mg, 66.99μmol) 및 *N*,*N*-디이소프로필에틸아민(17.32mg, 133.98μmol)을 첨가하고, 반응액을 25℃에서 1시간 동안 교반하였다. 반응이 끝난 후, 반응액을 여과하고, 분취용 고성능 액체 크로마토그래피(YMC-Actus Triart C18 컬럼 5μm, 직경 25mm, 길이 100mm, 용리액으로서 물(0.225%의 포름산 함유)과 아세토니트릴의 극성이 점차적으로 감소하는 혼합물을 사용하고; 아세토니트릴 구배 비율 20%~40%, 용리 시간

12분)로 정제하여 표제 화합물(1.07mg)을 얻었다.

[0640] MS m/z (ESI): 534.2 $[M+H]^+$.

[0641] ^{1}**H NMR (400MHz, DMSO-d_6)** δ = 8.30 (t, *J* = 5.9 Hz, 1H), 8.19-8.07 (m, 1H), 7.36 (s, 1H), 6.56 (s, 1H), 5.55-5.45 (m, 3H), 5.45 (s, 2H), 4.90 (d, *J* = 3.7 Hz, 2H), 1.90-1.82 (m, 2H), 1.24 (d, *J* = 4.3 Hz, 6H), 0.87 (t, *J* = 7.3 Hz, 3H).

[0642] **실시예 23. *N*-(((*S*)-9-클로로-4-에틸-8,10-디플루오로-4-하이드록시-3,14-디옥소-3,4,12,14-테트라하이드로-1*H*-피라노[3',4':6,7]인돌리지노[1,2-*b*]퀴놀린-11-일)메틸)-2-사이클로프로필-2-하이드록시아세트아미드(화합물 23)**

[0643] 

[0644] **화합물 16-4**(7.0mg, 15.63 μmol) 및 **중간체 11-1**(9.08mg, 78.16 μmol)을 *N*,*N*-디메틸포름아미드(0.5mL)에 용해시키고, 여기에 HATU(8.92mg, 23.45 μmol) 및 디이소프로필에틸아민(6.06mg, 46.89 μmol))을 첨가하고, 반응액을 25℃에서 1시간 동안 교반하였다. 반응이 끝난 후, 반응액을 여과하고, 분취용 고성능 액체 크로마토그래피(YMC-Actus Triart C18 컬럼 5 μm, 직경 25mm, 길이 100mm; 용리액으로서 물(0.225%의 포름산 함유)과 아세토니트릴의 극성이 점차적으로 감소하는 혼합물을 사용하고; 아세토니트릴 구배 비율 41%~61%, 용리 시간 12분)로 정제하여 표제 화합물(7mg)을 얻었다.

[0645] MS m/z (ESI): 546.2 $[M+H]^+$.

[0646] **화합물 23**(7mg)을 분취용 초임계 유체 크로마토그래피(컬럼: DAICEL CHIRALCEL OD-H(250mm*30mm, 5 μm); 이동상: A: 이산화탄소; B: 에탄올; B%: 50%; 유속: 80mL/분)로 분리 정제하여, 화합물 **23-1**(2.1mg, RT: 5.106분) 및 화합물 **23-2**(2.09mg, RT: 5.641분)를 얻었다.

[0647] **화합물 23-1:**

[0648] ^{1}**H NMR (400MHz, DMSO-d_6)** δ = 8.32 (t, *J* = 5.5 Hz, 1H), 8.15 (d, *J* = 9.7 Hz, 1H), 7.36 (s, 1H), 6.57 (s, 1H), 5.53 (s, 2H), 5.47 (d, *J* = 5.1 Hz, 1H), 5.45 (s, 2H), 4.93-4.86 (m, 2H), 2.02-1.96 (m, 1H), 1.91-1.81 (m, 2H), 1.04-0.96 (m, 1H), 0.87 (t, *J* = 7.3 Hz, 3H), 0.37-0.31 (m, 2H), 0.29-0.23 (m, 2H)

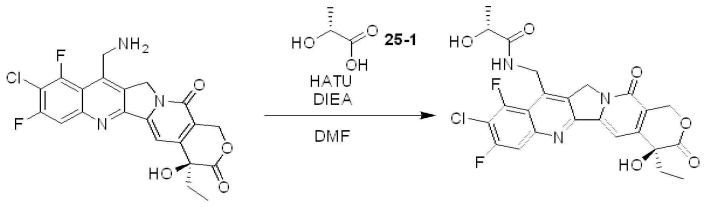
[0649] MS m/z (ESI): 546.2 $[M+H]^+$.

[0650] **화합물 23-2:**

[0651] ^{1}**H NMR (400MHz, DMSO-d_6)** δ = 8.37-8.29 (m, 1H), 8.15 (d, *J* = 9.9 Hz, 1H), 7.36 (s, 1H), 6.57 (s, 1H), 5.53 (s, 2H), 5.50-5.46 (m, 1H), 5.45 (s, 2H), 4.96-4.86 (m, 2H), 2.10-1.95 (m, 1H), 1.92-1.81 (m, 2H), 1.04-0.98 (m, 1H), 0.87 (t, *J* = 7.3 Hz, 3H), 0.40-0.31 (m, 2H), 0.30-0.25 (m, 2H)

[0652] MS m/z (ESI): 546.2 $[M+H]^+$.

[0653] **실시예 25. (*R*)-*N*-(((*S*)-9-클로로-4-에틸-8,10-디플루오로-4-하이드록시-3,14-디옥소-3,4,12,14-테트라하이드로-1*H*-피라노[3',4':6,7]인돌리지노[1,2-*b*]퀴놀린-11-일)메틸)-2-하이드록시프로판아미드(화합물 25)**



16-4 25

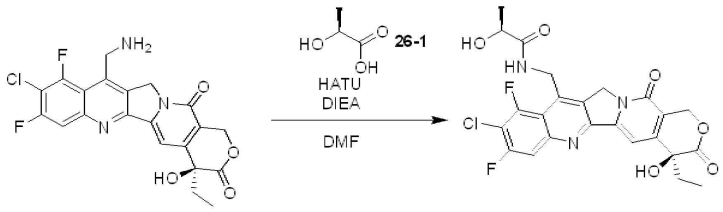
[0654]

[0655] **화합물 16-4**(6mg, 13.40μmol) 및 **중간체 25-1**(2.41mg, 26.80μmol)을 무수 *N*,*N*-디메틸포름아미드(0.5mL)에 용해시키고, 여기에 HATU(10.09mg, 26.80μmol) 및 디이소프로필에틸아민(1.73mg, 13.49μmol)을 첨가하고, 반응액을 25℃에서 1시간 동안 교반하였다. 반응이 끝난 후, 반응액을 여과하고, 분취용 고성능 액체 크로마토그래피(Waters Xbridge C18 컬럼 5μm, 직경 25mm, 길이 100mm; 용리액으로서 물(0.05%의 포름산 함유)과 아세토니트릴의 극성이 점차적으로 감소하는 혼합물을 사용하고; 아세토니트릴 구배 비율 20%~40%, 용리 시간 12분)로 정제하여 표제 화합물(1.80mg)을 얻었다.

[0656] MS m/z (ESI): 520.1[M+H]$^+$.

[0657] **^{1}H NMR (400MHz, DMSO-d_6)** δ = 8.34 (t, *J* = 5.7 Hz, 1H), 8.15 (d, *J* = 9.9 Hz, 1H), 7.36 (s, 1H), 6.57 (s, 1H), 5.59 (d, *J* = 5.0 Hz, 1H), 5.51 (s, 2H), 5.45 (s, 2H), 4.90 (s, 2H), 4.13-3.89 (m, 1H), 1.95-1.77 (m, 2H), 1.21 (d, *J* =6.8 Hz, 3H), 0.87 (t, *J* = 7.3 Hz, 3H).

[0658] **실시예 26. (*S*)-*N*-(((*S*)-9-클로로-4-에틸-8,10-디플루오로-4-하이드록시-3,14-디옥소-3,4,12,14-테트라하이드로-1*H*-피라노[3',4':6,7]인돌리지노[1,2-*b*]퀴놀린-11-일)메틸)-2-하이드록시프로판아미드(화합물 26)**



16-4 26

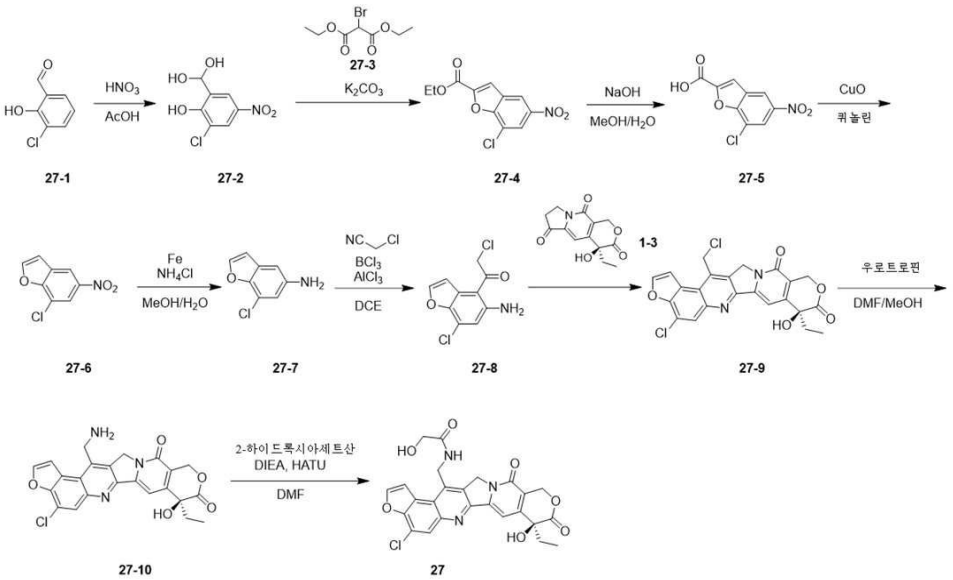
[0659]

[0660] **화합물 16-4**(6mg, 13.40μmol) 및 **중간체 26-1**(2.41mg, 26.80μmol)을 무수 *N*,*N*-디메틸포름아미드(0.5mL)에 용해시키고, 여기에 HATU(10.09mg, 26.80μmol) 및 *N*,*N*-디이소프로필에틸아민(1.73mg, 13.49μmol)을 첨가하고, 반응액을 25℃에서 1시간 동안 교반하였다. 반응이 끝난 후, 반응액을 여과하고, 분취용 고성능 액체 크로마토그래피(Waters Xbridge C18 컬럼 5μm, 직경 25mm, 길이 100mm; 용리액으로서 물(0.05%의 포름산 함유)과 아세토니트릴의 극성이 점차적으로 감소하는 혼합물을 사용하고; 아세토니트릴 구배 비율 20%~40%, 용리 시간 12분)로 정제하여 표제 화합물(1.60mg)을 얻었다.

[0661] MS m/z (ESI): 520.1 [M+H]$^+$.

[0662] **^{1}H NMR (400MHz, DMSO-d_6)** δ = 8.34 (t, *J* = 5.7 Hz, 1H), 8.23-8.03 (m, 1H), 7.36 (s, 1H), 6.57 (s, 1H), 5.59 (d, *J* = 5.0 Hz, 1H), 5.51 (s, 2H), 5.45 (s, 2H), 4.90 (s, 2H), 4.07-3.96 (m, 1H), 1.93-1.81 (m, 2H), 1.21 (d, *J* = 6.8 Hz, 3H), 0.87 (t, *J* = 7.3 Hz, 3H).

[0663] **실시예 27. (*S*)-*N*-((4-클로로-8-에틸-8-하이드록시-9,12-디옥소-8,9,12,14-테트라하이드로-11*H*-푸라노[3,2-*f*]피라노[3',4':6,7]인돌리지노[1,2-*b*]퀴놀린-15-일)메틸)-2-하이드록시아세트아미드(화합물 27)**



[0664]

[0665] **단계 1: (3-클로로-2-하이드록시-5-니트로페닐)메틸렌 글리콜(중간체 27-2)의 합성**

[0666] **중간체 27-1**(6g)을 아세트산(25mL)에 용해시키고 반응액을 0℃로 냉각시키고 여기에 질산(9.64g)을 천천히 첨가하였다. 반응액을 25℃에서 4시간 동안 교반하였다. 반응이 끝난 후, 반응액을 얼음물에 천천히 드롭방식으로 첨가한 후, 에틸 아세테이트(60mL)로 3회 추출하고, 유기상을 무수 황산나트륨으로 건조시키고, 여과한 후, 건조될 때까지 감압 농축하여 표제 화합물(5.88g)을 얻었다.

[0667] ^{1}**H NMR (400MHz, METHANOL-*d*4)** δ = 8.16 (d, *J* =1.4, 2.4 Hz, 1H), 8.07-8.01 (m, 1H), 5.68 (s, 1H)

[0668] **단계 2: 에틸 7-클로로-5-니트로벤조푸란-2-포르메이트(중간체 27-4)의 합성**

[0669] **중간체 27-2**(5.88g), **중간체 27-3**(7.69g) 및 탄산칼륨(7.41g)을 아세톤(60mL)에 용해시키고, 반응액을 70℃에서 6시간 동안 교반하였다. 반응이 끝난 후, 여기에 물(50mL)을 첨가하고 에틸 아세테이트(50mL)로 3회 추출한 후, 유기상을 무수 황산나트륨으로 건조시키고, 여과한 후, 건조될 때까지 감압 농축하여 표제 화합물(4.5g)을 얻었다.

[0670] ^{1}**H NMR(400MHz, 클로로포름-*d*)** δ = 8.55(d, *J* = 2.1Hz, 1H), 8.39(d, *J* = 2.1Hz, 1H), 7.68(s, 1H), 4.49(q, *J* = 7.1 Hz, 2H), 1.46(t, *J* = 7.1Hz, 3H)

[0671] **단계 3: 7-클로로-5-니트로벤조푸란-2-카르복실산(중간체 27-5)의 합성**

[0672] **중간체 27-4**(4.5g)를 메탄올(50mL)에 용해시키고, 여기에 수산화나트륨 수용액(25mL의 H_2O 중 2g)을 천천히 드롭방식으로 첨가하고 반응액을 25℃에서 3시간 동안 교반하였다. 반응이 끝난 후, 여기에 물(120mL)을 첨가한 후, 에틸 아세테이트(50mL)로 2회 추출하였다. 수상을 희염산으로 pH를 1로 조절한 후, 에틸 아세테이트(50mL)로 3회 추출하고, 유기상을 무수 황산나트륨으로 건조시키고, 여과한 후, 건조될 때까지 감압 농축하여 표제 화합물(4.0g)을 얻었다.

[0673] ^{1}**H NMR(400MHz, 클로로포름-*d*)** δ = 8.45(d, *J* = 2.1Hz, 1H), 8.25(d, *J* = 2.1Hz, 1H), 7.58(s, 1H)

[0674] **단계 4: 7-클로로-5-니트로벤조푸란(중간체 27-6)의 합성**

[0675] **중간체 27-5**(4g) 및 산화구리(1.05g)를 퀴놀린(28mL)에 용해시키고, 반응액에 질소를 주입하고 200℃에서 0.5시간 동안 교반하였다. 반응이 끝난 후, 온도를 0℃로 냉각시키고, 여기에 희염산(80mL)을 천천히 드롭방식으로 첨가한 후, 물(30mL)을 첨가하고 에틸 아세테이트(30mL)로 3회 추출하였다. 유기상을 무수 황산나트륨으로 건조시키고, 여과한 후, 건조될 때까지 감압 농축하여 표제 화합물(2.4g)을 얻었다.

[0676] ^{1}**H NMR(400MHz, 클로로포름-*d*)** δ = 8.49(d, *J* = 2.1Hz, 1H), 8.31(d, *J* = 2.1Hz, 1H), 7.88(d, *J* = 2.3Hz, 1H), 7.02(d, *J* = 2.3Hz, 1H)

[0677] **단계 5: 7-클로로벤조푸란-5-아민(중간체 27-7)의 합성**

[0678] **중간체 27-6**(2.4g) 및 철분(1.55g)을 메탄올(5mL)에 용해시키고, 여기에 염화암모늄 수용액(148.91mg, 5mL)을 드롭방식으로 첨가하고 반응액에 질소를 주입하고 80℃에서 0.5시간 동안 교반하였다. 반응이 끝난 후, 온도를 25℃로 냉각시키고 여기에 물(10mL)을 첨가하고 에틸 아세테이트(10mL)로 3회 추출하였다. 유기상을 무수 황산나트륨으로 건조시키고, 여과한 후, 건조될 때까지 감압 농축하여 표제 화합물(1.2g)을 얻었다.

[0679] MS m/z (ESI): 167.8[M+H]$^+$.

[0680] **단계 6: 1-(5-아미노-7-클로로벤조푸란-4-일)-2-클로로에탄-1-온(중간체 27-8)의 합성**

[0681] 삼염화붕소(671.17mg)를 1,2-디클로로에탄(8mL)에 용해시키고 반응액을 0℃로 냉각시키고, 여기에 **중간체 27-7**(1.2g) 및 클로로아세토니트릴(702.75mg)을 첨가하고, 반응액을 0℃에서 10분 동안 교반하고, 여기에 삼염화알루미늄(1.24g)을 첨가하였다. 이어서, 질소 보호 하에 반응액의 온도를 25℃로 승온시키고 10분 동안 교반하였다. 반응액을 질소 보호 하에 90℃에서 18시간 동안 교반하였다. 반응이 끝난 후, 반응액을 실온으로 냉각시키고, 얼음물(5mL) 및 5%의 HCl(1mL)을 순차적으로 천천히 첨가하고 25℃에서 30분 동안 교반한 다음, 디클로로메탄(4mL)을 첨가하고, 유기상을 물(2mL*2)로 세척하고, 세척 후의 유기상을 적당량의 무수 황산나트륨으로 건조시켰다. 여과한 후 건조될 때까지 감압 농축하여 잔류물을 분취용 박층 크로마토그래피(실리카, 석유 에테르:(에틸 아세테이트와 에탄올의 3/1 혼합 용매)=9:1)를 거쳐 표제 화합물(500mg)을 얻었다.

[0682] MS m/z (ESI): 243.8 [M+H]$^+$.

[0683] **단계 7: (*S*)-4-클로로-15-(클로로메틸)-8-에틸-8-하이드록시-11,14-디하이드로-12*H*-푸라노[3,2-*f*]피라노[3',4':6,7]인돌리지노[1,2-*b*]퀴놀린-9,12(8*H*)-디온(중간체 27-9)의 합성**

[0684] **중간체 27-8**(450mg) 및 **중간체 1-3**(480.35mg)을 톨루엔(5mL)에 용해시키고, 여기에 피리디늄 p-톨루엔설폰산염(23.17mg)을 첨가하였다. 반응액을 90℃에서 18시간 동안 교반하였다. 반응이 끝난 후, 반응액을 실온으로 냉각시키고, 에탄올(1mL)을 첨가하고, 반응액을 25℃에서 0.5시간 동안 교반하였다. 반응액을 여과하고, 필터 케이크를 석유 에테르(2mL*2)로 세척하고 건조시킨 후 표제 화합물(500mg)을 얻었다.

[0685] MS m/z (ESI): 471.0 [M+H]$^+$.

[0686] **단계 8: (*S*)-15-(아미노메틸)-4-클로로-8-에틸-8-하이드록시-11,14-디하이드로-12*H*-푸라노[3,2-*f*]피라노[3',4':6,7]인돌리지노[1,2-*b*]퀴놀린-9,12(8*H*)-디온(중간체 27-10)의 합성**

[0687] **중간체 27-9**(450mg)를 메탄올(1mL)과 *N*,*N*-디메틸포름아미드(1mL)의 혼합 용액에 용해시키고, 여기에 우로트로핀(267.71mg)을 첨가하였다. 반응액을 50℃에서 4시간 동안 교반하였다. 반응이 끝난 후, 반응액을 실온으로 냉각시키고, 농염산(2mL)을 첨가하고 교반한 후, 건조될 때까지 감압 농축하여 잔류물을 분취용 고성능 액체 크로마토그래피(Waters Xbridge C18 컬럼 5μm, 직경 25mm, 길이 100mm; 용리액으로서 물(0.225%의 포름산 함유)과 아세토니트릴의 극성이 점차적으로 감소하는 혼합물을 사용하고; 아세토니트릴 구배 비율 13%~43%, 용리 시간 12분)로 정제하여 표제 화합물(60.0mg)을 얻었다.

[0688] MS m/z (ESI): 451.9 [M+H]$^+$.

[0689] **단계 9: (*S*)-*N*-((4-클로로-8-에틸-8-하이드록시-9,12-디옥소-8,9,12,14-테트라하이드로-11*H*-푸라노[3,2-*f*]피라노[3',4':6,7]인돌리지노[1,2-*b*]퀴놀린-15-일)메틸)-2-하이드록시아세트아미드(화합물 27)의 합성**

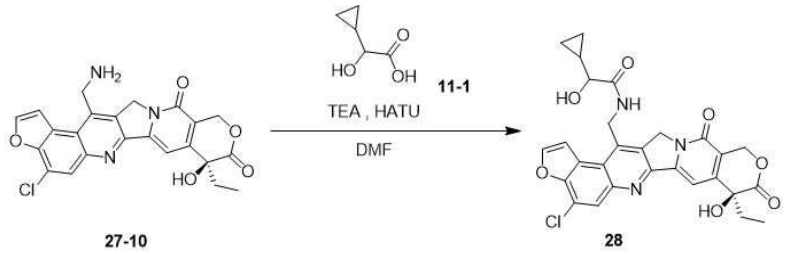
[0690] **중간체 27-10**(10mg) 및 2-하이드록시아세트산(5.05mg)을 무수 *N*,*N*-디메틸포름아미드(0.5mL)에 용해시키고, 여기에 HATU(16.83mg) 및 디이소프로필에틸아민(2.86mg)을 첨가하고, 반응액을 25℃에서 1시간 동안 교반하였다. 반응이 끝난 후, 반응액을 여과하고, 잔류물을 분취용 고성능 액체 크로마토그래피(Waters Xbridge C18 컬럼 5μm, 직경 25mm, 길이 100mm; 용리액으로서 물(0.05%의 포름산 함유)과 아세토니트릴의 극성이 점차적으로 감소하는 혼합물을 사용하고; 아세토니트릴 구배 비율 28%~48%, 용리 시간 12분)로 정제하여 표제 화합물(6.0mg)을 얻었다.

[0691] MS m/z (ESI):510.1 [M+H]$^+$.

[0692] **^{1}H NMR (400MHz, DMSO-d_6)** δ = 8.46 (s, 2H), 8.36-8.20 (m, 1H), 7.85 (s, 1H), 7.35 (s, 1H), 6.54 (s,

1H), 5.58 (t, *J* = 5.6 Hz, 1H), 5.49 (d, *J* = 2.9 Hz, 2H), 5.45 (s, 2H), 5.07 (s, 2H), 3.88 (d, *J* = 5.6 Hz, 2H), 2.02-1.75 (m, 2H), 0.89 (t, *J* = 7.3 Hz, 3H).

[0693] **실시예 28. *N*-(((*S*)-4-클로로-8-에틸-8-하이드록시-9,12-디옥소-8,9,12,14-테트라하이드로-11*H*-푸라노[3,2-*f*]피라노[3',4':6,7]인돌리지노[1,2-*b*]퀴놀린-15-일)메틸)-2-사이클로프로필-2-하이드록시아세트아미드(화합물 28)**



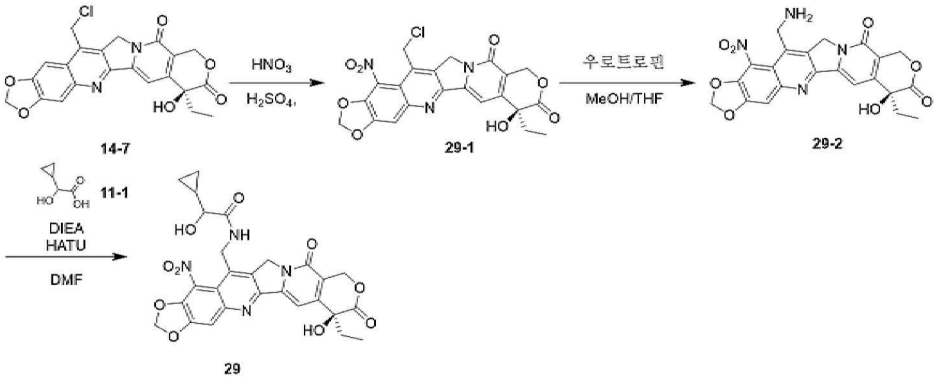
[0694]

[0695] **중간체 27-10**(10mg) 및 **중간체 11-1**(8.34mg)을 무수 *N*,*N*-디메틸포름아미드(0.5mL)에 용해시키고, 여기에 HATU(13.65mg) 및 디이소프로필에틸아민(3.10mg)을 첨가하고, 반응액을 25℃에서 1시간 동안 교반하였다. 반응이 끝난 후, 반응액을 여과하고, 여과액이 건조될 때까지 감압 농축하여, 잔류물을 분취용 고성능 액체 크로마토그래피(Waters Xbridge C18 컬럼 5μm, 직경 25mm, 길이 100mm; 용리액으로서 물(0.05%의 포름산 함유)과 아세토니트릴의 극성이 점차적으로 감소하는 혼합물을 사용하고; 아세토니트릴 구배 비율 34%~54%, 용리 시간 12분)로 정제하여 표제 화합물(6.2mg)을 얻었다.

[0696] MS m/z (ESI): 550.1[M+H]$^+$.

[0697] ^{1}**H NMR (400MHz, DMSO-d_6)** δ = 8.48-8.43 (m, 2H), 8.29 (s, 1H), 7.84 (s, 1H), 7.35 (s, 1H), 6.56 (s, 1H), 5.51 (s, 2H), 5.45 (s, 2H), 5.15-4.98 (m, 2H), 3.57 (d, *J* = 6.0 Hz, 1H), 1.95-1.80 (m, 2H), 1.10-1.00 (m, 1H), 0.89 (t, *J* =7.3 Hz, 3H), 0.41-0.32 (m, 2H), 0.32-0.24 (m, 2H).

[0698] **실시예 29. 2-사이클로프로필-*N*-(((*S*)-7-에틸-7-하이드록시-15-니트로-8,11-디옥소-7,8,11,13-테트라하이드로-10*H*-[1,3]디옥솔로[4,5-*g*]피라노[3',4':6,7]인돌리지노[1,2-*b*]퀴놀린-14-일)메틸)-2-하이드록시아세트아미드 (화합물 29)**



[0699]

[0700] **단계 1: (*S*)-14-(클로로메틸)-7-에틸-7-하이드록시-15-니트로-10,13-디하이드로-11*H*-[1,3]디옥솔로[4,5-*g*]피라노[3',4':6,7]인돌리지노[1,2-*b*]퀴놀린-8,11(7*H*)-디온(중간체 29-1)의 합성**

[0701] **중간체 14-7**(500.0mg)을 황산(15mL)에 용해시키고 반응액을 0℃로 냉각시켰다. 여기에 질산(357.35g, 순도 70%)을 천천히 첨가하고, 반응액을 25℃에서 1.5시간 동안 교반하고, 반응이 완료된 후, 얼음물(10mL), 디클로로메탄(30mL)을 순차적으로 천천히 첨가하고, 유기상을 40mL의 물(20mL*2)로 세척하고, 세척 후의 유기상을 적당량의 무수 황산나트륨으로 건조시켰다. 여과한 후, 여과액이 건조될 때까지 감압 농축하여 조생성물인 표제 화합물(280.0mg)을 얻었다.

[0702] MS m/z (ESI): 486.0 [M+H]$^+$.

[0703] **단계 2: (*S*)-14-(아미노메틸)-7-에틸-7-하이드록시-15-니트로-10,13-디하이드로-11*H*-[1,3]디옥솔로[4,5-*g*]피라**

노[3',4':6,7]인돌리지노[1,2-*b*]퀴놀린-8,11(7*H*)-디온(중간체 29-2)의 합성

[0704] **중간체 29-1**(270.0mg)을 메탄올(2mL) 및 테트라하이드로푸란(2mL)에 용해시키고, 여기에 우로트로핀(233.73mg)을 첨가하였다. 반응액을 60℃에서 16시간 동안 교반하였다. 반응이 완료된 후, 반응액을 실온으로 냉각시키고, 건조될 때까지 감압 농축하여, 잔류물을 분취용 고성능 액체 크로마토그래피(YMC-Pack CN C18 컬럼 5μm 실리카, 직경 30mm, 길이 150mm; 용리액으로서 물(0.225%의 FA 함유)과 메탄올의 극성이 점차적으로 감소하는 혼합물을 사용하고; 메탄올 구배 비율 9%~29%, 용리 시간 12분)로 정제하여 표제 화합물(15.0mg)을 얻었다.

[0705] MS m/z (ESI): 467.1 $[M+H]^+$.

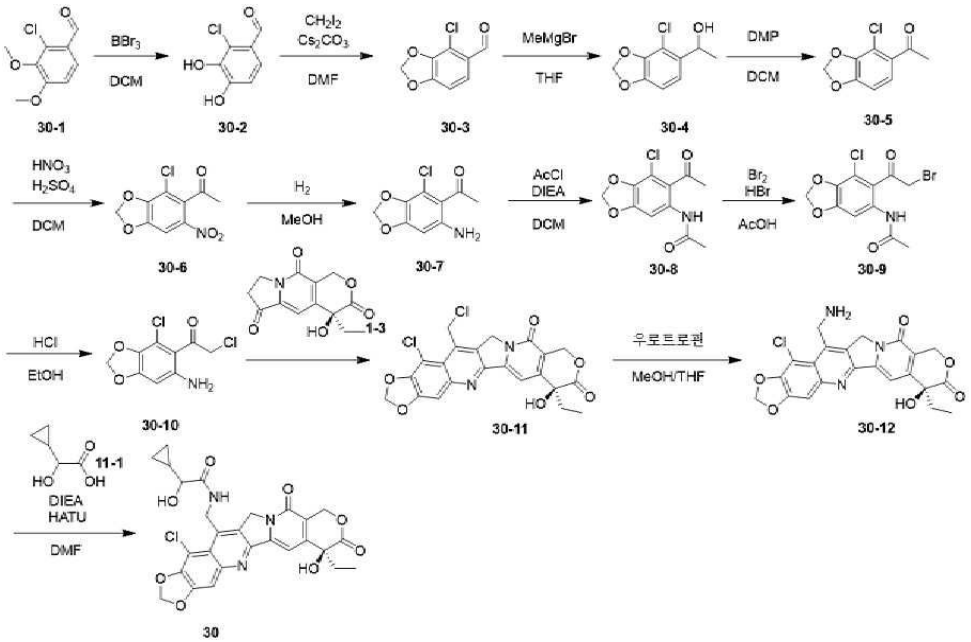
[0706] **단계 3: 2-사이클로프로필-*N*-(((*S*)-7-에틸-7-하이드록시-15-니트로-8,11-디옥소-7,8,11,13-테트라하이드로-10*H*-[1,3]디옥솔로[4,5-*g*]피라노[3',4':6,7]인돌리지노[1,2-*b*]퀴놀린-14-일)메틸)-2-하이드록시아세트아미드(화합물 29)의 합성**

[0707] **중간체 29-2**(12.00mg) 및 **중간체 11-1**(14.94mg)을 무수 *N*,*N*-디메틸포름아미드(1mL)에 용해시키고, 여기에 HATU(14.67mg) 및 *N*,*N*-디이소프로필에틸아민(9.98mg)을 첨가하고, 반응액을 25℃에서 1.5시간 동안 교반하였다. 반응이 완료된 후, 반응액을 여과하고, 여과액이 건조될 때까지 감압 농축하여, 잔류물을 분취용 고성능 액체 크로마토그래피(Boston Prime C18 컬럼 5μm 실리카, 직경 30mm, 길이 150mm; 용리액으로서 물(0.05%의 포름산 함유)과 아세토니트릴의 극성이 점차적으로 감소하는 혼합물을 사용하고; 아세토니트릴 구배 비율 15%~45%, 용리 시간 12분)로 정제하여 표제 화합물(5.20mg)을 얻었다.

[0708] MS m/z (ESI): 565.2 $[M+H]^+$.

[0709] **^{1}H NMR (400MHz, DMSO-d_6)** δ = 8.25 (t, *J* = 5.3 Hz, 1H), 7.81 (s, 1H), 7.28 (s, 1H), 6.52 (d, *J* = 2.6 Hz, 3H), 5.55 (d, *J* = 4.9 Hz, 1H), 5.43 (s, 2H), 5.36 (s, 2H), 4.48 (d, *J* = 5.1 Hz, 2H), 3.53 (t, *J* = 5.7 Hz, 1H), 1.91-1.83 (m, 2H), 1.10-0.98 (s, 1H), 0.87 (t, *J* = 7.3 Hz, 3H), 0.42-0.28 (m, 4H).

[0710] **실시예 30. *N*-(((*S*)-15-클로로-7-에틸-7-하이드록시-8,11-디옥소-7,8,11,13-테트라하이드로-10*H*-[1,3]디옥솔로[4,5-*g*]피라노[3',4':6,7]인돌리지노[1,2-*b*]퀴놀린-14-일)메틸)-2-사이클로프로필-2-하이드록시아세트아미드(화합물 30)**



[0711]

[0712] **단계 1: 2-클로로-3,4-디하이드록시벤즈알데하이드(중간체 30-2)의 합성**

[0713] **중간체 30-1**(20.0g)을 무수 디클로로메탄(100mL)에 용해시키고 반응액을 0℃로 냉각시키고, 여기에 삼브롬화붕소(87.41g)를 천천히 첨가하고, 반응액을 25℃에서 4시간 동안 교반하였다. 반응이 끝난 후, 반응액을 얼음물에 천천히 부은 후, 에틸 아세테이트(200mL)를 첨가하고, 유기상을 물(100mL*2)로 세척하고, 세척 후의 유기상을 적당량의 무수 황산나트륨으로 건조시키고, 여과한 후, 여과액이 건조될 때까지 감압 농축하여, 잔류물을 에틸

아세테이트:석유 에테르=1:4의 용액으로 교반하면서 세척하고, 여과한 후 표제 화합물(14g)을 얻었다.

[0714] MS m/z (ESI): 173.1 $[M+H]^+$.

[0715] **단계 2: 4-클로로벤조[*d*][1,3]디옥솔로-5-포름알데하이드(중간체 30-3)의 합성**

[0716] **중간체 30-2**(10.0g)를 무수 *N*,*N*-디메틸포름아미드(100mL)에 용해시키고, 여기에 탄산세슘(28.32g) 및 디요오도메탄(23.28g)을 첨가하였다. 반응액을 100℃에서 1시간 동안 교반하였다. 반응이 완료된 후, 반응액을 실온으로 냉각시키고, 물(100mL) 및 에틸 아세테이트(150mL)를 순차적으로 천천히 첨가하고, 유기상을 물(50mL*2)로 세척하고, 세척 후의 유기상을 적당량의 무수 황산나트륨으로 건조시키고 여과한 후, 여과액이 건조될 때까지 감압 농축하여 표제 화합물(5.2g)을 얻었다.

[0717] MS m/z (ESI):185.4 $[M+H]^+$.

[0718] **단계 3: 1-(4-클로로벤조[*d*][1,3]디옥솔로-5-일)에탄-1-올(중간체 30-4)의 합성**

[0719] **중간체 30-3**(5.0g)을 무수 테트라하이드로푸란(100mL)에 용해시키고, 반응액을 -78℃로 냉각시키고, 여기에 메틸마그네슘 브로마이드(4.85g, 3M)를 천천히 첨가하였다. 반응액을 질소 보호 하에 25℃에서 4시간 동안 교반하였다. 반응이 끝난 후, 물(50mL), 에틸 아세테이트(100mL)를 순차적으로 천천히 첨가하고, 유기상을 물(50mL*2)로 세척하고, 세척 후의 유기상을 적당량의 무수 황산나트륨으로 건조시키고, 여과한 후, 여과액이 건조될 때까지 감압 농축하여, 잔류물을 분취용 컬럼 크로마토그래피(석유 에테르:에틸 아세테이트=2:1)로 정제하여 표제 화합물(5.3g)을 얻었다.

[0720] **^{1}H NMR(400MHz, 클로로포름-*d*)** δ = 6.99(d, *J* = 8.3Hz, 1H), 6.69(d, *J* = 8.1Hz, 1H), 5.97(s, 2H), 5.13(q, *J* = 6.4 Hz, 1H), 1.41(d, *J* = 6.4Hz, 3H)

[0721] **단계 4: 1-(4-클로로벤조[*d*][1,3]디옥솔로-5-일)에탄-1-온(중간체 30-5)의 합성**

[0722] **중간체 30-4**(5.2g)를 무수 디클로로메탄(100mL)에 용해시키고, 반응액을 0℃로 냉각시키고, 여기에 데스-마틴 시약(DMP)(16.49g)을 천천히 첨가하였다. 반응액을 질소 보호 하에 25℃에서 2시간 동안 교반하였다. 반응이 끝난 후, 물(50mL), 에틸 아세테이트(100mL)를 순차적으로 천천히 첨가하고 유기상을 물(50mL*2)로 세척하고, 세척 후의 유기상을 적당량의 무수 황산나트륨으로 건조시켰다. 여과한 후, 여과액이 건조될 때까지 감압 농축하여, 잔류물을 분취용 컬럼 크로마토그래피(석유 에테르:에틸 아세테이트=3:1)로 정제하여 표제 화합물(3.0g)을 얻었다.

[0723] MS m/z (ESI): 199.2 $[M+H]^+$.

[0724] **단계 5: 1-(4-클로로-6-니트로벤조[*d*][1,3]디옥솔로-5-일)에탄-1-온(중간체 30-6)의 합성**

[0725] **중간체 30-5**(2.50g)을 무수 디클로로메탄(20mL)에 용해시키고, 여기에 농황산(1.23g) 및 질산(5.67g)을 천천히 첨가하였다. 반응액을 25℃에서 3시간 동안 교반하였다. 반응이 끝난 후, 반응액을 얼음물에 천천히 부은 후, 에틸 아세테이트(150mL)를 첨가하고, 유기상을 물(50mL*2)로 세척하고, 세척 후의 유기상을 적당양의 무수 황산나트륨으로 건조시키고, 여과한 후, 여과액이 건조될 때까지 감압 농축하여, 잔류물을 분취용 컬럼 크로마토그래피(석유 에테르:에틸 아세테이트=2:1)로 정제하여 표제 화합물(1.8g)을 얻었다.

[0726] MS m/z (ESI): 244.1 $[M+H]^+$.

[0727] **단계 6: 1-(6-아미노-4-클로로벤조[*d*][1,3]디옥솔로-5-일)에탄-1-온(중간체 30-7)의 합성**

[0728] **중간체 30-6**(0.80g)을 무수 메탄올(6mL)에 용해시키고, 여기에 레이니 니켈(Raney Ni)(400.0mg)을 첨가하였다. 반응액을 수소 분위기 하에 25℃에서 16시간 동안 교반하였다. 반응이 끝난 후, 반응액을 여과하고, 여과액이 건조될 때까지 감압 농축하여 표제 화합물(510.0mg)을 얻었다.

[0729] MS m/z (ESI): 214.2 $[M+H]^+$.

[0730] **단계 7: *N*-(6-아세틸-7-클로로벤조[*d*][1,3]디옥솔로-5-일)아세트아미드(중간체 30-8)의 합성**

[0731] **중간체 30-7**(260.0mg)을 무수 디클로로메탄(5mL)에 용해시키고, 반응액을 0℃로 냉각시키고, 여기에 *N*,*N*-디이소프로필에틸아민(235.95mg) 및 클로로아세틸(143.32mg)을 첨가하였다. 반응액을 25℃에서 1.5시간 동안 교반하였

다. 반응이 끝난 후, 반응액이 건조될 때까지 감압 농축하여, 잔류물을 분취용 크로마토그래피(석유 에테르:에틸 아세테이트=5:1)로 정제하여 표제 화합물(140.0mg)을 얻었다.

[0732] MS m/z (ESI): 256.0 $[M+H]^+$.

[0733] **단계 8: *N*-(6-(2-브로모아세틸)-7-클로로벤조[*d*][1,3]디옥솔로-5-일)아세트아미드(중간체 30-9)의 합성**

[0734] **중간체 30-8**(110.00mg)을 아세트산(2mL)에 용해시키고, 여기에 브롬화수소의 아세트산 용액(158.24mg, 함량 33%)을 첨가하고, 여기에 액체 브로민(72.20mg)을 천천히 첨가하고, 반응액을 25℃에서 1시간 동안 교반하였다. 반응이 끝난 후, 반응액을 얼음물에 천천히 부은 후, 에틸 아세테이트(30mL)를 첨가하고, 유기상을 물(20mL*2)로 세척하고 세척 후의 유기상을 적당량의 무수 황산나트륨으로 건조시켰다. 유기상이 건조될 때까지 감압 농축하여 표제 화합물(110.0mg)을 얻었다.

[0735] MS m/z (ESI): 334.0 $[M+H]^+$.

[0736] **단계 9: 1-(6-아미노-4-클로로벤조[*d*][1,3]디옥솔로-5-일)-2-클로로에탄-1-온(중간체 30-10)의 합성**

[0737] **중간체 30-9**(110.00mg)을 무수 에탄올(1mL) 및 농염산(1mL)에 용해시키고, 반응액을 60℃에서 16시간 동안 교반하였다. 반응이 끝난 후, 반응액을 실온으로 냉각시키고, 얼음물(10mL) 및 포화 탄산수소나트륨(10mL)을 순차적으로 천천히 첨가한 다음, 디클로로메탄(30mL)을 첨가하고, 유기상을 물(20mL*2)로 세척하고, 세척 후의 유기상을 적당량의 무수 황산나트륨으로 건조시켰다. 여과한 후, 여과액이 건조될 때까지 감압 농축하여, 잔류물을 분취용 박층 크로마토그래피(석유 에테르:에틸 아세테이트=3:1)로 정제하여 표제 화합물(75mg)을 얻었다.

[0738] MS m/z (ESI): 248.0 $[M+H]^+$.

[0739] **단계 10: (*S*)-15-클로로-14-(클로로메틸)-7-에틸-7-하이드록시-10,13-디하이드로-1*H*-[1,3]디옥솔로[4,5-*g*]피라노[3',4':6,7]인돌리지노[1,2-*b*]퀴놀린-8,11(7*H*)-디온(중간체 30-11)의 합성**

[0740] **중간체 30-10**(75.00mg) 및 **중간체 1-3**(83.57mg)을 톨루엔(3mL)에 용해시키고, 여기에 피리디늄 p-톨루엔설폰산염(PPTS)(11.4mg)을 첨가하였다. 반응액을 90℃에서 16시간 동안 교반하였다. 반응이 끝난 후, 반응액을 실온으로 냉각시키고, 에탄올(1mL)을 첨가하고, 반응액을 25℃에서 0.5시간 동안 교반하였다. 반응액을 여과하고, 필터 케이크를 에탄올(2mL*2)로 세척하고 건조시킨 후 표제 화합물(75.0mg)을 얻었다.

[0741] MS m/z (ESI): 475.1 $[M+H]^+$.

[0742] **단계 11: (*S*)-14-(아미노메틸)-15-클로로-7-에틸-7-하이드록시-10,13-디하이드로-1*H*-[1,3]디옥솔로[4,5-*g*]피라노[3',4':6,7]인돌리지노[1,2-*b*]퀴놀린-8,11(7*H*)-디온(중간체 30-12)의 합성**

[0743] **중간체 30-11**(70.00mg)을 무수 메탄올(2mL) 및 무수 테트라하이드로푸란(1mL)에 용해시키고, 여기에 우로트로핀(61.94mg)을 첨가하였다. 반응액을 80℃에서 2시간 동안 교반하였다. 반응이 끝난 후, 반응액을 실온으로 냉각시키고, 건조될 때까지 감압 농축하여, 잔류물을 분취용 고성능 액체 크로마토그래피(Boston Prime C18 컬럼 5 μm 실리카, 직경 30mm, 길이 150mm; 용리액으로 물(0.225%의 포름산 함유)과 아세토니트릴의 극성이 점차적으로 감소하는 혼합물을 사용하고; 아세토니트릴 구배 비율 5%~25%, 용리 시간 12분)로 정제하여 표제 화합물(16.0mg)을 얻었다.

[0744] MS m/z (ESI): 456.1 $[M+H]^+$.

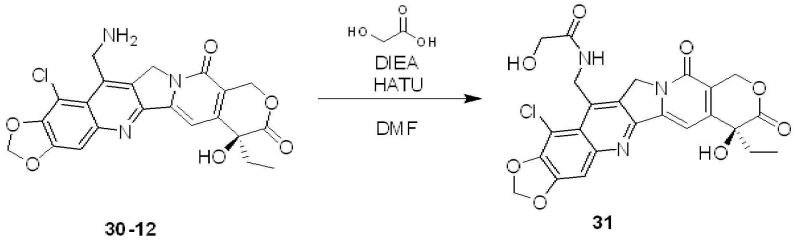
[0745] **단계 12: *N*-(((*S*)-15-클로로-7-에틸-7-하이드록시-8,11-디옥소-7,8,11,13-테트라하이드로-10*H*-[1,3]디옥솔로[4,5-*g*]피라노[3',4':6,7]인돌리지노[1,2-*b*]퀴놀린-14-일)메틸)-2-사이클로프로필-2-하이드록시아세트아미드(화합물 30)의 합성**

[0746] **중간체 30-12**(5.00mg) 및 **중간체 11-1**(6.37mg)을 무수 *N*,*N*-디메틸포름아미드(0.5mL)에 용해시키고, 여기에 HATU(6.26mg) 및 *N*,*N*-디이소프로필에틸아민(4.25mg)을 첨가하고, 반응액을 25℃에서 1시간 동안 교반하였다. 반응이 끝난 후, 반응액을 여과하고, 여과액이 건조될 때까지 감압 농축하여, 잔류물을 분취용 고성능 액체 크로마토그래피(Boston Prime C18 컬럼 5μm 실리카, 직경 30mm, 길이 150mm; 용리액으로서 물(0.05%의 포름산 함유)과 아세토니트릴의 극성이 점차적으로 감소하는 혼합물을 사용하고; 아세토니트릴 구배 비율 31%~51%, 용리 시간 12분)로 정제하여 표제 화합물(2.30mg)을 얻었다.

[0747] MS m/z (ESI): 554.2 $[M+H]^+$.

[0748] **^{1}H NMR (400MHz, DMSO-d_6)** δ = 7.78 (t, *J* = 5.4 Hz, 1H), 7.35 (s, 1H), 7.01 (s, 1H), 6.30-6.25 (m, 1H), 6.16 (d, *J* = 1.5 Hz, 2H), 5.27-5.21 (m, 2H), 5.19 (s, 2H), 4.93-4.78 (m, 2H), 3.29 (dd, *J* = 2.4, 6.1 Hz, 1H), 1.68-1.56 (m, 2H), 0.81-0.72 (m, 1H), 0.63 (t, *J* = 7.3 Hz, 3H), 0.14-0.06 (m, 2H), 0.05-0.03 (m, 2H).

[0749] **실시예 31. (*S*)-*N*-((15-클로로-7-에틸-7-하이드록시-8,11-디옥소-7,8,11,13-테트라하이드로-10*H*-[1,3]디옥솔로[4,5-*g*]피라노[3',4':6,7]인돌리지노[1,2-*b*]퀴놀린-14-일)메틸)-2-하이드록시아세트아미드(화합물 31)**



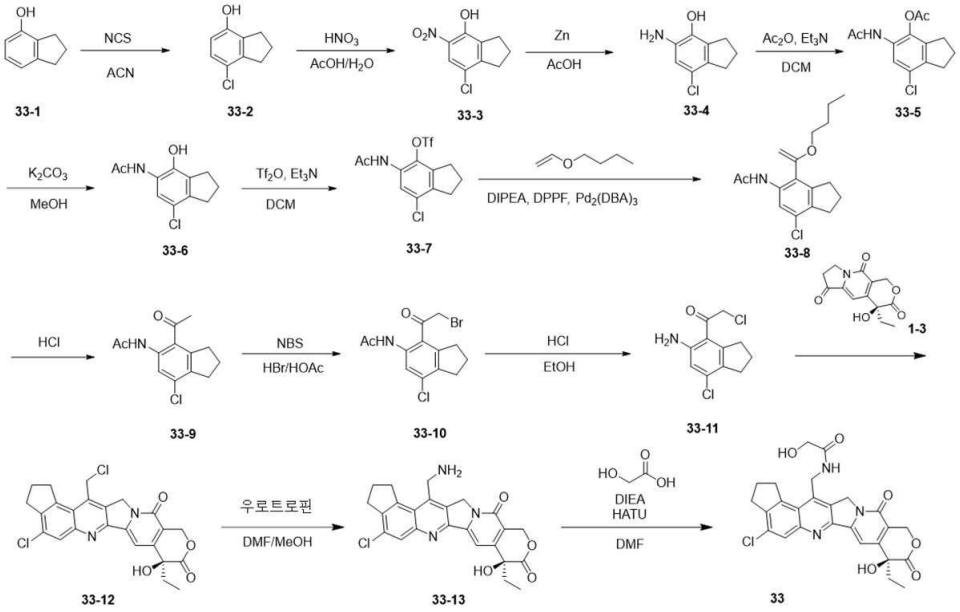
[0750]

[0751] **중간체 30-12**(5mg) 및 하이드록시아세트산(4.17mg)을 *N*,*N*-디메틸포름아미드(0.5mL)에 용해시키고, 여기에 HATU(6.26mg) 및 *N*,*N*-디이소프로필에틸아민(4.25mg)을 첨가하고, 반응액을 25℃에서 1시간 동안 교반하였다. 반응이 끝난 후, 반응액을 여과하고, 여과액이 건조될 때까지 감압 농축하여, 잔류물을 분취용 고성능 액체 크로마토그래피(Boston Prime C18 컬럼 5μm 실리카, 직경 30mm, 길이 150mm; 용리액으로서 물(0.225%의 포름산 함유)과 아세토니트릴의 극성이 점차적으로 감소하는 혼합물을 사용하고; 아세토니트릴 구배 비율 20%~40%, 용리 시간 12분)로 정제하여 표제 화합물(2.50mg)을 얻었다.

[0752] MS m/z (ESI): 514.2 $[M+H]^+$.

[0753] **^{1}H NMR (400MHz, DMSO-d_6)** δ = 8.03 (t, *J* = 5.8 Hz, 1H), 7.60 (s, 1H), 7.25 (s, 1H), 6.54-6.48 (m, 1H), 6.41 (s, 2H), 5.48 (s, 2H), 5.43 (s, 2H), 5.12 (d, *J* = 6.0 Hz, 2H), 3.82 (s, 2H), 1.93-1.78 (m, 2H), 0.87 (t, *J* = 7.4 Hz, 3H)

[0754] **실시예 33. (*S*)-*N*-((4-클로로-8-에틸-8-하이드록시-9,12-디옥소-2,3,8,9,12,14-헥사하이드로-1*H*,11*H*-사이클로펜타[*f*]피라노[3',4':6,7]인돌리지노[1,2-*b*]퀴놀린-15-일)메틸)-2-하이드록시아세트아미드(화합물 33)**



[0755]

[0756] **단계 1: 7-클로로-2,3-디하이드로-1*H*-인덴-4-올(중간체 33-2)의 합성**

[0757] **중간체 33-1**(500mg)을 무수 아세토니트릴(5mL)에 용해시키고, 여기에 NCS(547mg)를 첨가하고, 첨가가 완료된 후 25℃에서 2시간 동안 교반하였다. 반응이 끝난 후, 반응액에 물(10mL)을 첨가하고 에틸 아세테이트(10mL* 3회)로 추출하고, 유기층을 포화 식염수(30mL)로 세척하고 무수 황산나트륨으로 건조시켰다. 여과한 후, 유기상을 감압 농축하여 용매를 제거하고, 잔류물을 실리카겔 컬럼 크로마토그래피(석유 에테르:에틸 아세테이트=100:1~10:1)로 정제하여 표제 화합물(600mg)을 얻었다.

[0758] MS m/z (ESI): 169.0 $[M+H]^+$.

[0759] **단계 2: 7-클로로-5-니트로-2,3-디하이드로-1*H*-인덴-4-올(중간체 33-3)의 합성**

[0760] **중간체 33-2**(10g)를 AcOH(50mL) 및 H_2O(10mL)에 용해시키고, 0℃에서 여기에 HNO_3(8.62g, 65% 질량 분율)을 첨가하였다. 반응액을 0℃에서 2시간 동안 교반하였다. 반응이 완료된 후, 반응액에 얼음물(200mL)을 천천히 첨가하였다. 여과한 후, 감압 농축하여 용매를 제거하고 표제 화합물(10g)을 얻었다.

[0761] MS m/z (ESI): 214.0 $[M+H]^+$.

[0762] **단계 3: 5-아미노-7-클로로-2,3-디하이드로-1*H*-인덴-4-올(중간체 33-4)의 합성**

[0763] **중간체 33-3**(5g)을 무수 DCM(50mL)에 용해시키고, 여기에 AcOH(14.04g) 및 Zn(7.61g)을 첨가하고, 반응액을 25℃에서 12시간 동안 교반하였다. 반응이 완료된 후, 물(200mL) 및 에틸 아세테이트(200mL)를 순차적으로 첨가하고 유기상을 포화 탄산수소나트륨 수용액(50mL*2)으로 세척하고, 세척 후의 유기상을 적당량의 무수 황산나트륨으로 건조시켰다. 유기상을 감압 농축하여 용매를 제거하고 표제 화합물(4g)을 얻었다.

[0764] MS m/z (ESI): 184.0 $[M+H]^+$.

[0765] **단계 4: 5-아세트아미노-7-클로로-2,3-디하이드로-1*H*-인덴-4-일 아세테이트(중간체 33-5)의 합성**

[0766] **중간체 33-4**(4g)을 무수 디클로로메탄(40mL)에 용해시키고, 여기에 아세트산 무수물(Ac_2O)(6.67g) 및 트리에틸아민(TEA)(6.61g)을 첨가하고 반응액을 25℃에서 12시간 동안 교반하였다. 반응이 완료된 후, 물(200mL) 및 에틸 아세테이트(200mL)를 순차적으로 첨가하고 유기상을 포화 NaCl 수용액(50mL*2)으로 세척하고, 세척 후의 유기상을 적당량의 무수 황산나트륨으로 건조시켰다. 유기상을 감압 농축하여 용매를 제거하고 잔류물을 실리카겔 컬럼 크로마토그래피(석유 에테르:에틸 아세테이트=20:1~5:1)로 정제하여 표제 화합물(4g)을 얻었다.

[0767] MS m/z (ESI): 268.0 $[M+H]^+$.

[0768] **단계 5: *N*-(7-클로로-4-하이드록시-2,3-디하이드로-1*H*-인덴-5-일)아세트아미드(중간체 33-6)의 합성**

[0769] **중간체 33-5**(4g)을 무수 메탄올(20mL)에 용해시키고, 여기에 K_2CO_3(6.19g)을 첨가하고 반응액을 25℃에서 12시간 동안 교반하였다. 반응이 완료된 후, 물(200mL) 및 에틸 아세테이트(200mL)를 순차적으로 첨가하고 유기상을 포화 NaCl 수용액(50mL*2)으로 세척하고, 세척 후의 유기상을 적당량의 무수 황산나트륨으로 건조시켰다. 유기상을 감압 농축하여 용매를 제거하고 잔류물을 실리카겔 컬럼 크로마토그래피(석유 에테르:에틸 아세테이트=20:1~1:1)로 정제하여 표제 화합물(2.8g)을 얻었다.

[0770] MS m/z (ESI): 226.0 $[M+H]^+$.

[0771] **단계 6: 5-아세트아미노-7-클로로-2,3-디하이드로-1*H*-인덴-4-일 트리플루오로메탄설포네이트(중간체 33-7)의 합성**

[0772] **중간체 33-6**(500mg)을 디클로로메탄(5mL)에 용해시키고, 여기에 트리플루오로메탄설폰산 무수물(Tf_2O)(749mg) 및 트리에틸아민(TEA)(672mg)을 첨가하고, 반응액을 25℃에서 12시간 동안 교반하였다. 반응이 완료된 후, 물(50mL) 및 에틸 아세테이트(50mL)를 순차적으로 첨가하고 유기상을 포화 NaCl 수용액(50mL*2)으로 세척하고, 세척 후의 유기상을 적당량의 무수 황산나트륨으로 건조시켰다. 유기상을 감압 농축하여 용매를 제거하고 잔류물을 실리카겔 컬럼 크로마토그래피(석유 에테르:에틸 아세테이트=20:1~1:1)로 정제하여 표제 화합물(580mg)을 얻었다.

[0773] MS m/z (ESI): 358.0 $[M+H]^+$.

[0774] **단계 7: *N*-(4-(1-부톡시비닐)-7-클로로-2,3-디하이드로-1*H*-인덴-5-일)아세트아미드(중간체 33-8)의 합성**

[0775] **중간체 33-7**(430mg) 및 비닐 n-부틸에테르(360.60mg)를 디옥산(20mL)에 용해시키고 디이소프로필에틸아민(DIEA)(466mg), 1,1'-비스(디페닐포스핀)페로센(DPPF)(66mg) 및 트리스(디벤질리덴아세톤)디팔라듐($Pd_2(dba)_3$)(110mg)을 첨가하고, 반응액을 80℃에서 질소 보호 하에 16시간 동안 교반하면서 반응시켰다. 반응이 끝난 후, 반응액을 물(50mL)로 희석하고 에틸 아세테이트(50mL*3회)로 추출하고, 유기상을 합하여 무수 황산나트륨으로 건조시켰다. 여과한 후, 유기상을 감압 농축하여 용매를 제거하고, 잔류물을 실리카겔 컬럼 크로마토그래피(석유 에테르:에틸 아세테이트=20:1~1:1)로 정제하여 표제 화합물(300mg)을 얻었다.

[0776] MS m/z (ESI): 308.0 $[M+H]^+$.

[0777] **단계 8: *N*-(4-아세틸-7-클로로-2,3-디하이드로-1*H*-인덴-5-일)아세트아미드(중간체 33-9)의 합성**

[0778] **중간체 33-8**(200mg)을 디옥산(5mL)에 용해시키고, 1N HCl(5mL)을 첨가하고, 25℃에서 2시간 동안 교반하면서 반응시켰다. 반응이 끝난 후, 유기상을 감압 농축하여 용매를 제거하고 표제 화합물(150mg)을 얻었다.

[0779] MS m/z (ESI): 252.0 $[M+H]^+$.

[0780] **단계 9: *N*-(4-(2-브로모아세틸)-7-클로로-2,3-디하이드로-1*H*-인덴-5-일)아세트아미드(중간체 33-10)의 합성**

[0781] **중간체 33-9**(300mg)를 HBr/AcOH(4mL, 33% 질량 분율)에 용해시키고, NBS(318.20mg)를 첨가하고, 반응액을 25℃에서 2시간 동안 교반하면서 반응시켰다. 반응이 완료된 후, 반응액을 감압 농축하여 용매를 제거하고 표제 화합물(390mg)을 얻었다.

[0782] MS m/z (ESI): 330.0 $[M+H]^+$.

[0783] **단계 10: 1-(5-아미노-7-클로로-2,3-디하이드로-1*H*-인덴-4-일)-2-클로로에탄-1-온(중간체 33-11)의 합성**

[0784] **중간체 33-10**(300mg)을 무수 에탄올에 용해시키고 HCl(12M, 8.00mL)을 첨가하고 반응액을 80℃에서 2시간 동안 교반하면서 반응시켰다. 반응이 완료된 후, 반응액을 감압 농축하여 용매를 제거하고 잔류물을 분취용 고성능 액체 크로마토그래피(크로마토그래피 컬럼: Gemini NX C18 5μm*10*150mm; 이동상: A: 물(0.225% 포름산 v/v), B: 아세토니트릴; B%: 30%~70%)로 정제하여 표제 화합물(64mg)을 얻었다.

[0785] MS m/z (ESI): 244.0 $[M+H]^+$.

[0786] **단계 11: (*S*)-4-클로로-15-(클로로메틸)-8-에틸-1,2,3,8,11,14-헥사하이드로-9*H*,12*H*-사이클로펜타[*f*]피라노[3',4':6,7]인돌리지노[1,2-*b*]퀴놀린-9,12-디온(중간체 33-12)의 합성**

[0787] **중간체 33-11**(45.00mg) 및 **중간체 1-3**(48.53mg)을 톨루엔(1mL)에 용해시키고, 여기에 피리디늄 p-톨루엔설폰산염(4.63mg)을 첨가하였다. 반응액을 90℃에서 16시간 동안 교반하였다. 반응이 완료된 후, 실온으로 냉각시키고 에탄올(1mL)을 첨가하고, 반응액을 25℃에서 0.5시간 동안 교반하였다. 반응액을 여과하고, 필터 케이크를 에탄올(2mL*2)로 세척하고, 건조시켜 표제 화합물(80.0mg)을 얻었다.

[0788] MS m/z (ESI): 471.1 $[M+H]^+$.

[0789] **단계 12: (*S*)-15-(아미노메틸)-4-클로로-8-에틸-8-하이드록시-1,2,3,8,11,14-헥사하이드로-9*H*,12*H*-사이클로펜타[*f*]피라노[3',4':6,7]인돌리지노[1,2-*b*]퀴놀린-9,12-디온(중간체 33-13)의 합성**

[0790] **중간체 33-12**(40.00mg)를 무수 메탄올(1mL) 및 무수 *N*,*N*-디메틸포름아미드(0.5mL)에 용해시키고, 여기에 우로트로핀(35.69mg)을 첨가하였다. 반응액을 50℃에서 16시간 동안 교반하였다. 반응이 완료된 후, 실온으로 냉각시키고, 반응액이 건조될 때까지 감압 농축하여, 잔류물을 분취용 고성능 액체 크로마토그래피(Boston Prime C18 컬럼 5μm 실리카, 직경 30mm, 길이 150mm; 용리액으로서 물(0.225%의 FA 함유)과 아세토니트릴의 극성이 점차적으로 감소하는 혼합물을 사용하고; 아세토니트릴 구배 비율 35%~55%, 용리 시간 12분)로 정제하여 표제 화합물(15.0mg)을 얻었다.

[0791] MS m/z (ESI): 452.1 $[M+H]^+$.

[0792] **단계 13: (*S*)-*N*-((4-클로로-8-에틸-8-하이드록시-9,12-디옥소-2,3,8,9,12,14-헥사하이드로-1*H*,11*H*-사이클로펜

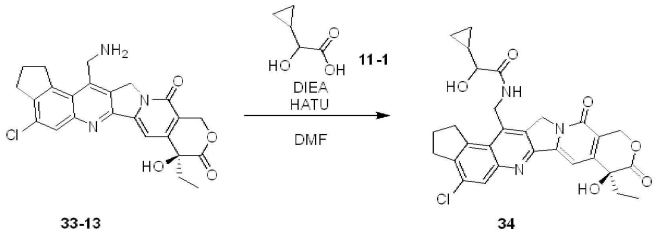
타[*f*]피라노[3',4':6,7]인돌리지노[1,2-*b*]퀴놀린-15-일)메틸)-2-하이드록시아세트아미드(화합물 33)의 합성

[0793] **중간체 33-13**(5.00mg) 및 하이드록시아세트산(4.21mg, 55.30 μmol)을 무수 *N*,*N*-디메틸포름아미드(0.5mL)에 용해시키고, 여기에 HATU(6.31mg) 및 *N*,*N*-디이소프로필에틸아민(4.29mg)을 첨가하고, 반응액을 25℃에서 1시간 동안 교반하였다. 반응이 완료된 후, 반응액을 여과하고, 분취용 고성능 액체 크로마토그래피(Boston Green ODS C18 컬럼 5 μm 실리카, 직경 30mm, 길이 150mm; 용리액으로서 물(0.05%의 FA 함유)과 아세토니트릴의 극성이 점차적으로 감소하는 혼합물을 사용하고; 아세토니트릴 구배 비율 32%~52%, 용리 시간 12분)로 정제하여 표제 화합물(2.0mg)을 얻었다.

[0794] MS m/z (ESI): 510.3 $[M+H]^+$.

[0795] ^{1}**H NMR (400MHz, DMSO-d_6)** δ = 8.36-8.30 (m, 1H), 8.14 (s, 1H), 7.31 (s, 1H), 6.55 (s, 1H), 5.44 (s, 2H), 5.38 (s, 2H), 4.96 (d, *J* = 5.3 Hz, 2H), 3.88 (s, 2H), 3.74-3.66 (m, 2H), 3.14 (t, *J* = 7.6 Hz, 2H), 2.27-2.19 (m, 2H), 1.92-1.82 (m, 2H), 0.88 (t, *J* = 7.3 Hz, 3H).

[0796] **실시예 34. *N*-(((*S*)-4-클로로-8-에틸-8-하이드록시-9,12-디옥소-2,3,8,9,12,14-헥사하이드로-1*H*,11*H*-사이클로펜타[*f*]피라노[3',4':6,7]인돌리지노[1,2-*b*]퀴놀린-15-일)메틸)-2-사이클로프로필-2-하이드록시아세트아미드 (화합물 34)**



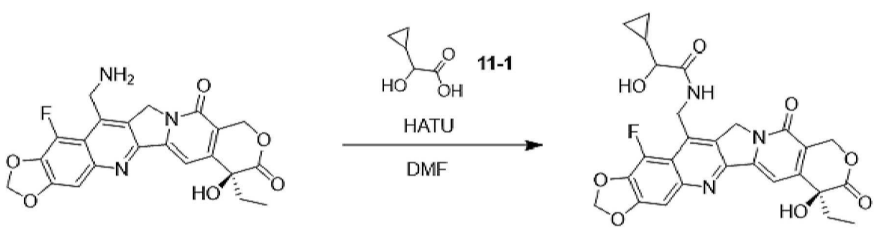
[0797]

[0798] **중간체 33-13**(5.00mg) 및 **중간체 11-1**(6.42mg)을 무수 *N*,*N*-디메틸포름아미드(0.5mL)에 용해시키고, 여기에 HATU(6.31mg) 및 디이소프로필에틸아민(4.29mg)을 첨가하고, 반응액을 25℃에서 1시간 동안 교반하였다. 반응이 완료된 후, 반응액을 여과하고, 분취용 고성능 액체 크로마토그래피(Boston Prime C18 컬럼 5 μm 실리카, 직경 30mm, 길이 150mm; 용리액으로서 물(0.05%의 FA 함유)과 아세토니트릴의 극성이 점차적으로 감소하는 혼합물을 사용하고; 아세토니트릴 구배 비율 35%~55%, 용리 시간 12분)로 정제하여 표제 화합물(2.0mg)을 얻었다.

[0799] MS m/z (ESI): 550.3 $[M+H]^+$.

[0800] ^{1}**H NMR (400MHz, DMSO-d_6)** δ = 8.36-8.31 (m, 1H), 8.14 (s, 1H), 7.31 (s, 1H), 6.54 (s, 1H), 5.47-5.41 (m, 3H), 5.38 (s, 2H), 4.96-4.90 (m, 2H), 3.69 (t, *J* = 7.1 Hz, 2H), 3.56 (t, *J* = 5.8 Hz, 1H), 3.14 (t, *J* = 7.4 Hz, 2H), 2.27-2.18 (m, 2H), 1.93-1.81 (m, 2H), 1.09-1.03 (m, 1H), 0.88 (t, *J* = 7.2 Hz, 3H), 0.41-0.26 (m, 4H).

[0801] **실시예 35. 2-사이클로프로필-*N*-(((*S*)-7-에틸-15-플루오로-7-하이드록시-8,11-디옥소-7,8,11,13-테트라하이드로-10*H*-[1,3]디옥솔로[4,5-*g*]피라노[3',4':6,7]인돌리지노[1,2-*b*]퀴놀린-14-일)메틸)-2-하이드록시아세트아미드 (화합물 35)**



12-11 화합물 35

[0802]

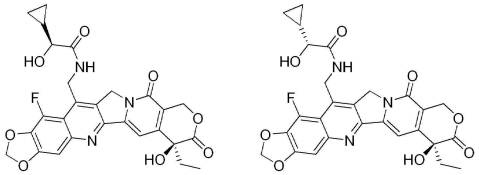
[0803] **중간체 12-11**(6mg) 및 **중간체 11-1**(7.93mg)을 *N*,*N*-디메틸포름아미드(0.5mL)에 용해시키고, 여기에 2-(7-아자벤조트리아졸)-*N*,*N*,*N*',*N*'-테트라메틸우로늄 헥사플루오로포스페이트(7.79mg) 및 *N*,*N*-디메틸디이소프로필아민

(5.29mg)을 첨가하고, 반응액을 25℃에서 1시간 동안 교반하였다. 반응이 끝난 후, 반응액이 건조될 때까지 감압 농축하여, 잔류물을 분취용 고성능 액체 크로마토그래피(Boston Prime C18 컬럼 5μm 실리카, 직경 30mm, 길이 150mm; 용리액으로서 물(0.225%의 포름산 함유)과 아세토니트릴의 극성이 점차적으로 감소하는 혼합물을 사용하고; (아세토니트릴 구배 비율 15%~45%, 용리 시간 12분))로 정제하여 표제 화합물(6.50mg)을 얻었다.

[0804] MS m/z (ESI): 538.1 $[M+H]^+$.

[0805] **^{1}H NMR (400MHz, DMSO-d_6)** δ = 8.21 (t, *J* = 6.0 Hz, 1H), 7.51 (s, 1H), 7.26 (s, 1H), 6.53 (s, 1H), 6.40 (s, 2H), 5.47 (s, 2H), 5.43 (s, 2H), 4.84 (d, *J* = 3.8 Hz, 2H), 3.53 (d, *J* = 6.3 Hz, 1H), 1.90-1.81 (m, 2H), 1.01 (d, *J* = 5.5 Hz, 1H), 0.89-0.85 (m, 3H), 0.33 (d, *J* = 6.0 Hz, 2H), 0.30-0.25 (m, 2H).

[0806] **화합물 35-P1 및 35-P2의 합성**

[0807] 

[0808] **중간체 12-11**(6mg) 및 **중간체 14-10-P1**(7.93mg)을 *N*,*N*-디메틸포름아미드(1mL)에 용해시키고, 여기에 2-(7-아자벤조트리아졸)-*N*,*N*,*N*',*N*'-테트라메틸우로늄 헥사플루오로포스페이트(7.79mg) 및 *N*,*N*-디메틸디이소프로필아민(5.29mg)을 첨가하고, 반응액을 25℃에서 1시간 동안 교반하였다. 반응이 끝난 후, 반응액이 건조될 때까지 감압 농축하여, 잔류물을 분취용 고성능 액체 크로마토그래피(Boston Green ODS C18 컬럼 5μm 실리카, 직경 30mm, 길이 150mm; 용리액으로서 물(0.225%의 포름산 함유)과 아세토니트릴의 극성이 점차적으로 감소하는 혼합물을 사용하고; 아세토니트릴 구배 비율 17%~47%, 용리 시간 12분)로 정제하여 화합물 35-P1(2.87mg)을 얻었다.

[0809] MS m/z (ESI): 538.1 $[M+H]^+$.

[0810] **^{1}H NMR (400MHz, DMSO-d_6)** δ = 8.19 (t, *J* = 5.9 Hz, 1H), 7.51 (s, 1H), 7.26 (s, 1H), 6.51 (s, 1H), 6.40 (s, 2H), 5.47 (s, 2H), 5.43 (s, 2H), 4.84 (d, *J* = 4.6 Hz, 2H), 3.53 (d, *J* = 6.4 Hz, 1H), 1.91-1.80 (m, 2H), 1.06-0.97 (m, 1H), 0.87 (t, *J* = 7.3 Hz, 3H), 0.38-0.31 (m, 2H), 0.31-0.24 (m, 2H).

[0811] **중간체 12-11**(6mg) 및 **중간체 14-10-P2**(4.76mg)를 *N*,*N*-디메틸포름아미드(1mL)에 용해시키고, 여기에 2-(7-아자벤조트리아졸)-*N*,*N*,*N*',*N*'-테트라메틸우로늄 헥사플루오로포스페이트(10.38mg) 및 *N*,*N*-디메틸디이소프로필아민(1.76mg)을 첨가하고, 반응액을 25℃에서 1시간 동안 교반하였다. 반응이 끝난 후, 반응액이 건조될 때까지 감압 농축하여, 잔류물을 분취용 고성능 액체 크로마토그래피(Boston Green ODS C18 컬럼 5μm 실리카, 직경 30mm, 길이 150mm; 용리액으로서 물(0.225%의 포름산 함유)과 아세토니트릴의 극성이 점차적으로 감소하는 혼합물을 사용하고; 아세토니트릴 구배 비율 17%~47%, 용리 시간 12분)로 정제하여 화합물 35-P2(2.01mg)를 얻었다.

[0812] MS m/z (ESI): 538.1 $[M+H]^+$.

[0813] **^{1}H NMR (400MHz, DMSO-d_6)** δ = 8.26-8.16 (m, 1H), 7.51 (s, 1H), 7.26 (s, 1H), 6.51 (s, 1H), 6.40 (s, 2H), 5.46 (s, 2H), 5.43 (s, 2H), 4.87-4.82 (m, 2H), 3.53 (d, *J* = 6.2 Hz, 1H), 1.94-1.80 (m, 2H), 1.05-0.96 (m, 1H), 0.87 (t, *J* = 7.3 Hz, 3H), 0.39-0.30 (m, 2H), 0.31-0.20 (m, 2H).

[0814] 두 가지 이성질체는 각각 하기 키랄 초임계 유체 크로마토그래피 분석 방법에 의해 추가로 분석하였다.

[0815]

컬럼	Chiralcel OJ-3 100A 4.6mm I.D., 3μm
이동상	A: 이산화탄소
	B: 에탄올(0.05% 디에틸아민)
유속	2.8mL/분
파장	PDA 220nm
컬럼 온도	35℃
컬럼 압력	1500Psi
기기 모델	Waters UPCC with PDA Detector

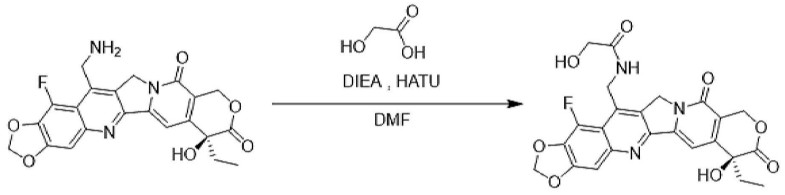
[0816] **화합물 35-P1:**

[0817] 상술한 키랄 고성능 액체 크로마토그래피 조건에서, 이의 머무름 시간은 3.519분이며;

[0818] **화합물 35-P2:**

[0819] 상술한 키랄 고성능 액체 크로마토그래피 조건에서, 이의 머무름 시간은 3.573분이다.

[0820] **실시예 36. (*S*)-*N*-((7-에틸-15-플루오로-7-하이드록시-8,11-디옥소-7,8,11,13-테트라하이드로-10*H*-[1,3]디옥솔로[4,5-*g*]피라노[3',4':6,7]인돌리지노[1,2-*b*]퀴놀린-14-일)메틸)-2-하이드록시아세트아미드(화합물 36)**

[0821] 

12-11 화합물 36

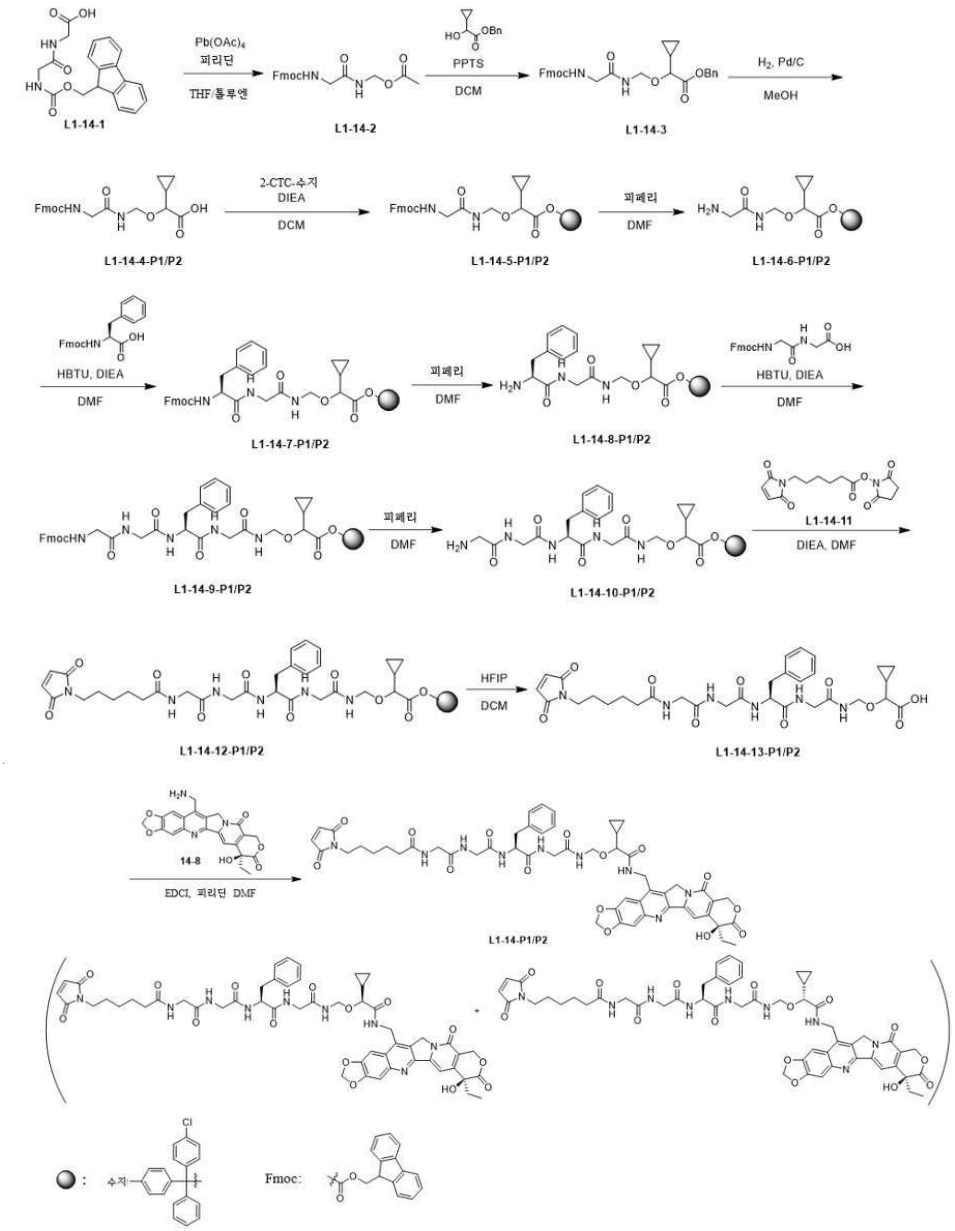
[0822] **중간체 12-11**(6mg) 및 하이드록시아세트산(3.21mg)을 무수 *N*,*N*-디메틸포름아미드(0.5mL)에 용해시키고, 여기에 2-(7-아자벤조트리아졸)-*N*,*N*,*N*',*N*'-테트라메틸우로늄 헥사플루오로포스페이트(10.38mg) 및 디이소프로필에틸아민(1.76mg)을 첨가하고, 반응액을 25℃에서 1시간 동안 교반하였다. 반응이 끝난 후, 반응액이 건조될 때까지 감압 농축하여, 잔류물을 분취용 고성능 액체 크로마토그래피(Waters Xbridge C18 컬럼 5μm, 직경 25mm, 길이 100mm; 용리액으로서 물(0.05%의 포름산 함유)과 아세토니트릴의 극성이 점차적으로 감소하는 혼합물을 사용하고; (아세토니트릴 구배 비율 18%~48%, 용리 시간 12분))로 정제하여 표제 화합물(2.40mg)을 얻었다.

[0823] MS m/z (ESI): 498.1[M+H]$^+$.

[0824] ^{1}**H NMR (400MHz, DMSO-*d*6)** δ = 8.20 (t, *J* = 5.9 Hz, 1H), 7.51 (s, 1H), 7.26 (s, 1H), 6.39 (s, 2H), 5.46 (s, 2H), 5.43 (s, 2H), 4.85 (d, *J* = 4.3 Hz, 2H), 3.83 (s, 2H), 1.92-1.80 (m, 2H), 0.87 (t, *J* = 7.3 Hz, 3H).

[0825] **실시예 37. *N*-((12*S*)-12-벤질-4-사이클로프로필-1-((*S*)-7-에틸-7-하이드록시-8,11-디옥소-7,8,11,13-테트라하이드로-10*H*-[1,3]디옥솔로[4,5-*g*]피라노[3',4':6,7]인돌리지노[1,2-*b*]퀴놀린-14-일)-3,8,11,14,17-펜타옥소-5-옥시-2,7,10,13,16-펜타아자옥타데칸-18-일)-6-(2,5-디옥소-2,5-디하이드로-1*H*-피롤-1-일)헥산아미드(화합물 L1-14), 이성질체 L1-14-P1 및 L1-14-P2의 합성**

[0826]



[0827] **단계 1: 중간체 L1-14-2의 합성**

[0828] **출발 물질 L1-14-1**(25g), 초산납(43.79g) 및 피리딘(6.98g)을 테트라하이드로푸란(600mL)과 톨루엔(200mL)의 혼합 용매에 용해시키고, 질소 분위기 하에 85℃로 가열하고, 18시간 동안 교반하면서 반응시켰다. 반응이 끝난 후, 실온으로 냉각시키고, 반응액을 여과하고, 여과액이 건조될 때까지 감압 농축하여, 잔류물을 컬럼 크로마토그래피(크로마토그래피 컬럼: ISCO®; 330g SepaFlash® Silica Flash Column, 이동상 구배 0~75% 에틸 아세테이트/석유 에테르, 유속 100mL/분)로 정제하여 표제 화합물(18g)을 얻었다.

[0829] ^{1}**H NMR (400MHz, METHANOL-d_4)** δ = 7.82 (d, *J* = 7.5 Hz, 2H), 7.69 (d, *J* = 7.3 Hz, 2H), 7.44-7.38 (m, 2H), 7.36-7.31 (m, 2H), 5.22 (s, 2H), 4.39 (d, *J* = 6.8 Hz, 2H), 4.28-4.22 (m, 1H), 3.81 (s, 2H), 2.03 (s, 3H).

[0830] MS m/z (ESI): 391.1 $[M+Na]^+$.

[0831] **단계 2: 중간체 L1-14-3의 합성**

[0832] **중간체 L1-14-2**(5g), 벤질 2-사이클로프로필-2-하이드록시아세테이트(8.40g), 피리디늄 p-톨루엔설폰산염(PPTS, 341.09mg)을 디클로로메탄(150mL)에 용해시키고, 반응액을 질소 분위기 하에 65℃로 가열하고, 48시간 동안 교반하면서 반응시켰다. 반응이 끝난 후, 실온으로 냉각시키고, 반응액을 여과하고, 여과액이 건조될 때까지 감압

농축하여, 잔류물을 컬럼 크로마토그래피(크로마토그래피 컬럼: ISCO®; 120g SepaFlash® Silica Flash Column, 이동상 구배 0~45% 에틸 아세테이트/석유 에테르, 유속 80mL/분)로 정제하고, 이어서 고성능 액체 크로마토그래피(크로마토그래피 컬럼: Boston Prime C18 150*30mm*5μm; 이동상: [A: 물(0.225%의 포름산), B: 아세토니트릴]; B%: 42%~82%, 13분)로 정제하여 표제 화합물(1.4g)을 얻었다.

[0833] MS m/z (ESI): 537.2 $[M+Na]^+$.

[0834] **단계 3: 중간체 L1-14-4-P1 및 L1-14-4-P2의 합성**

[0835] **중간체 L1-14-3**(1.4g)을 메탄올(15mL)과 물(15mL)의 혼합 용매에 용해시키고, 함수 팔라듐 탄소(10% 질량 함량, 0.15g)를 첨가하고, 반응액을 수소 분위기 하에 25℃에서 16시간 동안 교반하면서 반응시켰다. 반응이 끝난 후, 반응액을 여과하고 여과액이 건조될 때까지 감압 농축하여, 잔류물을 고성능 액체 크로마토그래피(크로마토그래피 컬럼: Boston Prime C18 150*30mm*5μm; 이동상: [A: 물(0.225% 포름산), B: 아세토니트릴]; B%: 24%~64%, 13분)로 정제하고, 이어서 초임계 유체 크로마토그래피(크로마토그래피 컬럼: DAICEL CHIRALPAK IC 컬럼, 10μm 실리카, 직경 30mm, 길이 250mm; 용리액으로서 이소프로판올(0.1% 암모니아수 함유)을 사용)로 추가로 정제하여, **중간체 L1-14-4-P1**(130mg) 및 **중간체 L1-14-4-P2**(130mg)를 얻었다.

[0836] 두 가지 이성질체는 각각 하기 키랄 고성능 액체 크로마토그래피 분석 방법에 의해 추가로 분석하였다.

[0837] 키랄 고성능 액체 크로마토그래피 조건은 다음과 같다:

[0838]

크로마토그래피 컬럼	Chiralpak IC-3 100A, 4.6mm I.D., 3um
이동상	A: 이산화탄소
	B: 이소프로판올(0.05% 디에틸아민)
유속	2.8mL/분
파장	PDA 220nm
컬럼 온도	35℃
컬럼 압력	1500Psi
기기 모델	Waters UPCC with PDA Detector and QDa Detector

[0839] **중간체 L1-14-4-P1**:

[0840] 상술한 키랄 고성능 액체 크로마토그래피 조건에서, 이의 머무름 시간은 4.471분이며;

[0841] MS m/z (ESI): 447.5 $[M+Na]^+$.

[0842] **중간체 L1-14-4-P2**:

[0843] 상술한 키랄 고성능 액체 크로마토그래피 조건에서, 이의 머무름 시간은 5.692분이며;

[0844] MS m/z (ESI): 447.3 $[M+Na]^+$.

[0845] **단계 4: 중간체 L1-14-5-P1 및 L1-14-5-P2의 합성**

[0846] 2-클로로트리틸 클로라이드 수지(2-CTC-resin)(규격: 약 1.19mmol/g)(257mg)을 디클로로메탄(3mL)에 첨가한 후, **중간체 L1-14-4-P1**(130mg) 및 디이소프로필에틸아민(59.37mg)을 첨가하였다. 반응액을 질소 분위기 하에 25℃에서 진탕기에서 16시간 동안 진탕하여 반응시켰다. 반응이 끝난 후, 수지를 메탄올(10mL) 및 디클로로메탄(10mL)으로 순차적으로 세척하고, 이 과정을 3회 반복하였다. 여과하고, 필터 케이크를 건조시켜 **중간체 L1-14-5-P1**(330mg)을 얻었다.

[0847] **중간체 L1-14-4-P2(130mg)**를 원료로 사용하여, 상술한 방법에 따라 **중간체 L1-14-5-P2**(350mg)를 제조하여 얻었다.

[0848] **단계 5: 중간체 L1-14-6-P1 및 L1-14-6-P2의 합성**

[0849] **중간체 L1-14-5-P1**(330mg)을 *N,N*-디메틸포름아미드(5mL)에 용해시키고, 피페리딘(1.08g)을 첨가하였다. 반응액을 25℃에서 진탕기에 넣고 1시간 동안 진탕하였다. 반응이 끝난 후, 수지를 메탄올(10mL) 및 디클로로메탄(10mL)으로 순차적으로 세척하고, 이 과정을 3회 반복하였다. 여과하고, 필터 케이크를 건조시켜 **L1-14-6-P1**(220mg)을 얻었다.

[0850] **중간체 L1-14-5-P2(350mg)**를 원료로 사용하여, 상술한 방법에 따라 **중간체 L1-14-6-P2**(220mg)를 제조하여 얻었

다.

[0851] **단계 6: 중간체 L1-14-7-P1 및 L1-14-7-P2의 합성**

[0852] **중간체 L1-14-6-P1**(220mg) 및 (((9H-플루오렌-9-일)메톡시)카르보닐)-*L*-페닐알라닌(230.17mg)을 *N*,*N*-디메틸포름아미드(5mL)에 용해시키고, 반응액에 벤조트리아졸-*N*,*N*,*N*',*N*'-테트라메틸우로늄 헥사플루오로포스페이트(HBTU)(225.31mg) 및 디이소프로필에틸아민(99.96mg)을 첨가하였다. 반응액을 25℃에서 진탕기에 넣고 1시간 동안 진탕하였다. 반응이 끝난 후, 수지를 메탄올(10mL) 및 디클로로메탄(10mL)으로 순차적으로 세척하고, 이 과정을 3회 반복하였다. 여과하고, 필터 케이크를 건조시켜 **L1-14-7-P1**(377mg)을 얻었다.

[0853] **중간체 L1-14-6-P2**(220mg)를 원료로 사용하여, 상술한 방법에 따라 **중간체 L1-14-7-P2**(361mg)를 제조하여 얻었다.

[0854] **단계 7: 중간체 L1-14-8-P1 및 L1-14-8-P2의 합성**

[0855] **중간체 L1-14-7-P1**(377mg)을 *N*,*N*-디메틸포름아미드(5mL)에 용해시키고, 피페리딘(37.22mg)을 첨가하였다. 반응액을 25℃에서 진탕기에 넣고 1시간 동안 진탕하였다. 반응이 끝난 후, 수지를 메탄올(10mL) 및 디클로로메탄(10mL)으로 순차적으로 세척하고, 이 과정을 3회 반복하였다. 여과하고, 필터 케이크를 건조시켜 **L1-14-8-P1**(270mg)을 얻었다.

[0856] **중간체 L1-14-7-P2**(361mg)를 원료로 사용하여, 상술한 방법에 따라 **중간체 L1-14-8-P2**(260mg)를 제조하여 얻었다.

[0857] **단계 8: 중간체 L1-14-9-P1 및 L1-14-9-P2의 합성**

[0858] **중간체 L1-14-8-P1**(270mg)을 *N*,*N*-디메틸포름아미드(5mL)에 용해시키고, *N*-((9*H*-플루오렌-9-일메톡시)카르보닐)글리실글리신(209.58mg) 및 벤조트리아졸-*N*,*N*,*N*',*N*'-테트라메틸우로늄 헥사플루오로포스페이트(224.29mg), 디이소프로필에틸아민(99.51mg)을 순차적으로 첨가하였다. 반응액을 25℃에서 진탕기에 넣고 1시간 동안 진탕하였다. 반응이 끝난 후, 수지를 메탄올(10mL) 및 디클로로메탄(10mL)으로 순차적으로 세척하고, 이 과정을 3회 반복하였다. 여과하고, 필터 케이크를 건조시켜 **중간체 L1-14-9-P1**(403mg)을 얻었다.

[0859] **중간체 L1-14-8-P2**(260mg)를 원료로 사용하여, 상술한 방법에 따라 **중간체 L1-14-9-P2**(420mg)를 제조하여 얻었다.

[0860] **단계 9: 중간체 L1-14-10-P1 및 L1-14-10-P2의 합성**

[0861] **중간체 L1-14-9-P1**(403mg)을 *N*,*N*-디메틸포름아미드(5mL)에 용해시키고, 피페리딘(1.08g)을 첨가하였다. 반응액을 25℃에서 진탕기에 넣고 1시간 동안 진탕하였다. 반응이 끝난 후, 수지를 메탄올(10mL) 및 디클로로메탄(10mL)으로 순차적으로 세척하고, 이 과정을 3회 반복하였다. 여과하고, 필터 케이크를 건조시켜 **L1-14-10-P1**(300mg)을 얻었다.

[0862] **중간체 L1-14-9-P2**(420mg)를 원료로 사용하여, 상술한 방법에 따라 **중간체 L1-14-10-P2**(320mg)를 제조하여 얻었다.

[0863] **단계 10: 중간체 L1-14-12-P1 및 L1-14-12-P2의 합성**

[0864] **중간체 L1-14-10-P1**(300mg)을 *N*,*N*-디메틸포름아미드(5mL)에 용해시키고, **화합물 L1-14-11**(182.13mg) 및 디이소프로필에틸아민(99.41mg)을 순차적으로 첨가하였다. 반응액을 25℃에서 진탕기에 넣고 16시간 동안 진탕하였다. 반응이 끝난 후, 수지를 메탄올(10mL) 및 디클로로메탄(10mL)으로 순차적으로 세척하고, 이 과정을 3회 반복하였다. 여과하고, 필터 케이크를 건조시켜 **L1-14-12-P1**(374mg)을 얻었다.

[0865] **중간체 L1-14-10-P2**(320mg) 및 **중간체 L1-14-11**(194.27mg)을 원료로 사용하여, 상술한 방법에 따라 **중간체 L1-14-12-P2**(387mg)를 제조하여 얻었다.

[0866] **단계 11: 중간체 L1-14-13-P1 및 L1-14-13-P2의 합성**

[0867] **중간체 L1-14-12-P1**(374mg)을 디클로로메탄(8mL)과 헥사플루오로이소프로판올(HFIP, 2mL)의 혼합 용매에 첨가하고, 반응액을 25℃에서 진탕기에 넣고 0.5시간 동안 진탕하여 반응시켰다. 반응이 끝난 후, 반응액을 여과하여 수지를 제거하고 여과액이 건조될 때까지 감압 농축하여, 잔류물을 고성능 액체 크로마토그래피(크로마토그래피 컬럼: Boston Prime C18 150*30mm*5μm; 이동상: [A: 물(0.225% 포름산), B: 아세토니트릴], B%: 15%~35%,

9분)로 정제하여 **중간체 L1-14-13-P1**(74mg)을 얻었다.

[0868] **^{1}H NMR (400MHz, METHANOL-d_4)** δ = 7.33-7.20 (m, 5H), 6.81 (s, 2H), 4.77-4.70 (m, 2H), 4.60-4.52 (m, 1H), 3.96-3.70 (m, 6H), 3.61 (d, *J* = 7.6 Hz, 1H), 3.55-3.47 (m, 2H), 3.27-3.23 (m, 1H), 3.05-2.98 (m, 1H), 2.30 (t, *J* = 7.4 Hz, 2H), 1.72-1.55 (m, 4H), 1.38-1.29 (m, 2H), 1.16-1.07 (m, 1H), 0.60-0.47 (m, 4H).

[0869] MS m/z (ESI): 679.7 $[M+Na]^+$.

[0870] **중간체 L1-14-12-P2**(387mg)를 원료로 사용하여, 상술한 방법에 따라 **중간체 L1-14-13-P2**(86mg)를 제조하여 얻었다.

[0871] **^{1}H NMR (400MHz, METHANOL-d_4)** δ = 7.40-7.21 (m, 5H), 6.82 (s, 2H), 4.81-4.67 (m, 2H), 4.60-4.50 (m, 1H), 3.97-3.70 (m, 6H), 3.66-3.57 (m, 1H), 3.56-3.47 (m, 2H), 3.27-3.22 (m, 1H), 3.08-2.97 (m, 1H), 2.35-2.26 (m, 2H), 1.75-1.55 (m, 4H), 1.41-1.32 (m, 2H), 1.16-1.06 (m, 1H), 0.60-0.45 (m, 4H).

[0872] MS m/z (ESI): 679.5 $[M+Na]^+$.

[0873] **단계 12: 화합물 L1-14-P1 및 L1-14-P2의 합성**

[0874] **중간체 L1-14-13-P1**(31.17mg), **중간체 14-8**(20mg), 1-(3-디메틸아미노프로필)-3-에틸카르보디이미드 염산염(EDCI)(18.20mg), 피리딘(11.26mg) 및 1-하이드록시벤조트리아졸(12.83mg)을 *N,N*-디메틸포름아미드(1mL)에 용해시키고, 반응액을 질소 분위기 하에 25℃에서 2시간 동안 교반하면서 반응시켰다. 반응이 끝난 후, 반응액을 고성능 액체 크로마토그래피(크로마토그래피 컬럼: Boston Green ODS 150*30mm*5μm; 이동상: [A: 물(0.225% 포름산), B: 아세토니트릴]; B%: 26%~46%, 12분)로 정제하여 **화합물 L1-14-P1**(12.3mg)을 얻었다.

[0875] **^{1}H NMR (400MHz, DMSO-d_6)** δ = 8.65 (t, *J* = 5.9 Hz, 1H), 8.58 (t, *J* = 6.6 Hz, 1H), 8.27 (t, *J* = 5.6 Hz, 1H), 8.17-8.02 (m, 2H), 7.99 (t, *J* = 5.6 Hz, 1H), 7.79 (s, 1H), 7.52 (s, 1H), 7.28-7.19 (m, 5H), 7.19-7.14 (m, 1H), 6.98 (s, 2H), 6.49 (s, 1H), 6.29 (d, *J* = 3.7 Hz, 2H), 5.48-5.37 (m, 4H), 4.85-4.70 (m, 2H), 4.70-4.65 (m, 1H), 4.52-4.45 (m, 1H), 4.43-4.37 (m, 1H), 3.79-3.54 (m, 7H), 3.49 (d, *J* = 7.1 Hz, 1H), 3.08-3.01 (m, 1H), 2.85-2.74 (m, 1H), 2.14-2.06 (m, 2H), 1.94-1.80 (m, 2H), 1.52-1.42 (m, 4H), 1.27-1.13 (m, 2H), 1.01-0.92 (m, 1H), 0.88 (t, *J* = 7.3 Hz, 3H), 0.41-0.28 (m, 4H).

[0876] MS m/z (ESI): 1060.3 $[M+H]^+$.

[0877] **중간체 L1-14-13-P2**(31.17mg) 및 **중간체 14-8**(20mg)을 원료로 사용하여, 상술한 방법에 따라 **화합물 L1-14-P2**(11.4mg)를 제조하여 얻었다.

[0878] **^{1}H NMR (400MHz, DMSO-d_6)** δ = 8.72-8.52 (m, 2H), 8.33-8.25 (m, 1H), 8.17-7.94 (m, 3H), 7.80 (s, 1H), 7.51 (s, 1H), 7.32-7.19 (m, 5H), 7.18-7.12 (m, 1H), 6.99 (s, 2H), 6.49 (s, 1H), 6.35-6.25 (m, 2H), 5.48-5.36 (m, 4H), 4.84-4.59 (m, 3H), 4.54-4.45 (m, 1H), 4.44-4.35 (m, 1H), 3.81-3.54 (m, 7H), 3.49 (d, *J* = 6.7 Hz, 1H), 3.08-3.01 (m, 1H), 2.87-2.73 (m, 1H), 2.14-2.05 (m, 2H), 1.95-1.77 (m, 2H), 1.53-1.39 (m, 4H), 1.25-1.13 (m, 2H), 1.03-0.82 (m, 4H), 0.43-0.25 (m, 4H)

[0879] MS m/z (ESI): 1060.3 $[M+H]^+$.

[0880] 두 가지 이성질체는 각각 하기 키랄 고성능 액체 크로마토그래피 방법에 의해 추가로 분석하였다.

[0881] 키랄 고성능 액체 크로마토그래피 조건은 다음과 같다:

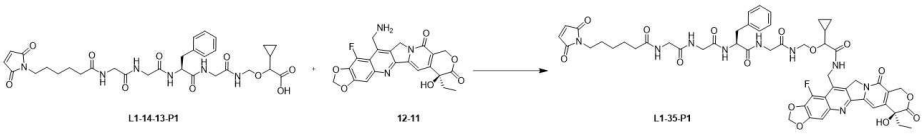
크로마토그래피 컬럼	Chiralcel OJ-3 100A, 4.6mm I.D., 3um
이동상	A: 이산화탄소
	B: 에탄올(0.05% 디에틸아민)
유속	2.8mL/분
파장	PDA 220nm
컬럼 온도	35°C
컬럼 압력	1500Psi
기기 모델	Waters UPCC with PDA Detector and QDa Detector

[0882]

[0883] 상술한 키랄 고성능 액체 크로마토그래피 조건에서, **화합물 L1-14-P1**의 머무름 시간은 3.735분이다.

[0884] 상술한 키랄 고성능 액체 크로마토그래피 조건에서, **화합물 L1-14-P2**의 머무름 시간은 3.901분이다.

[0885] **실시예 38: *N*-((12*S*)-12-벤질-4-사이클로프로필-1-((*S*)-7-에틸-15-플루오로-7-하이드록시-8,11-디옥소-7,8,11,13-테트라하이드로-10*H*-[1,3]디옥솔로[4,5-*g*]피라노[3',4':6,7]인돌리지노[1,2-*b*]퀴놀린-14-일)-3,8,11,14,17-펜타옥소-5-옥시-2,7,10,13,16-펜타아자옥타데칸-18-일)-6-(2,5-디옥소-2,5-디하이드로-1*H*-피롤-1-일)헥산아미드(화합물 L1-35-P1)**

[0886] 

[0887] **중간체 L1-14-13-P1**(8mg), **중간체 12-11**(5.89mg), 1-(3-디메틸아미노프로필)-3-에틸카르보디이미드 염산염(4.67mg), 피리딘(2.89mg) 및 1-하이드록시벤조트리아졸(3.29mg)을 *N*,*N*-디메틸포름아미드(1mL)에 용해시키고, 반응액을 질소 분위기 하에 25℃에서 2시간 동안 교반하면서 반응시켰다. 반응이 끝난 후, 반응액을 고성능 액체 크로마토그래피(컬럼: Boston Prime C18 150*30mm*5um; 이동상: [A: 물(0.225% 포름산), B: 아세토니트릴]; B%: 23%~45%, 10분)로 정제하여 **L1-35-P1**(2.3mg)을 얻었다.

[0888] **^{1}H NMR (400MHz, DMSO-d_6)** δ = 8.59 (t, *J* = 6.1 Hz, 1H), 8.36-8.31 (m, 1H), 8.28 (t, *J* = 5.6 Hz, 1H), 8.14-8.02 (m, 2H), 8.00 (t, *J* = 5.8 Hz, 1H), 7.49 (s, 1H), 7.27-7.16 (m, 6H), 6.99 (s, 2H), 6.52 (s, 1H), 6.38 (d, *J* = 2.0 Hz, 2H), 5.49-5.41 (m, 4H), 4.90-4.82 (m, 2H), 4.69-4.62 (m, 1H), 4.53-4.43 (m, 2H), 3.79-3.54 (m, 7H), 3.47 (d, *J* = 7.0 Hz, 1H), 3.06-3.00 (m, 1H), 2.80-2.74 (m, 1H), 2.10 (t, *J* = 7.3 Hz, 2H), 1.91-1.79 (m, 2H), 1.51-1.41 (m, 4H), 1.22-1.14 (m, 2H), 1.02-0.94 (m, 1H), 0.87 (t, *J* = 7.2 Hz, 3H), 0.40-0.27 (m, 4H).

[0889] MS m/z (ESI): 1078.2 $[M+H]^+$.

[0890] 하기 초임계 유체 크로마토그래피를 통해 추가 분석을 수행하였다.

[0891] 초임계 유체 크로마토그래피 조건은 다음과 같다:

컬럼	Chiralcel OJ-3 100A, 4.6mm I.D., 3um	
이동상	A: 이산화탄소	
	B: 에탄올(0.05% 디에틸아민)	
	시간(분)	B 상%
	0	5
	4	40
	2.5	40
	1.5	5
유속	2.8mL/분	
파장	PDA 220nm	
컬럼 온도	35°C	
컬럼 압력	1500Psi	
기기 모델	Waters UPCC with PDA Detector and QDa Detector	

[0892]

[0893] 상술한 초임계 유체 크로마토그래피 조건에서 **화합물 L1-35-P1**의 머무름 시간은 3.732분이다.

[0894] **실시예 39-1: *N*-((12*S*)-12-벤질-4-사이클로프로필-1-((*S*)-7-에틸-7-하이드록시-8,11-디옥소-7,8,11,13-테트라하이드로-10*H*-[1,3]디옥솔로[4,5-*g*]피라노[3',4':6,7]인돌리지노[1,2-*b*]퀴놀린-14-일-2,2-d_2)-3,8,11,14,17-펜타옥소-5-옥시-2,7,10,13,16-펜타아자옥타데칸-18-일)-6-(2,5-디옥소-2,5-디하이드로-1*H*-피롤-1-일)헥산아미드(화합물 L1-19-P1), 이성질체 L1-19-P2 및 라세미체 L1-19의 합성**

[0895] **중간체 L1-14-13-P1**(7.75mg), **중간체 19-8**(5.0mg), 1-(3-디메틸아미노프로필)-3-에틸카르보디이미드 염산염(4.53mg), 피리딘(2.80mg) 및 1-하이드록시벤조트리아졸(3.19mg)을 *N*,*N*-디메틸포름아미드(1mL)에 용해시키고, 반응액을 질소 분위기 하에 25℃에서 2시간 동안 교반하면서 반응시켰다. 반응이 끝난 후, 반응액을 고성능 액체 크로마토그래피(컬럼: Boston Green ODS 150*30mm*5um; 이동상: [A: 물(0.225% 포름산), B: 아세토니트릴]; B%: 22%~52%, 12분)로 정제하여 **L1-19-P1**(6.0mg)을 얻었다.

[0896] MS m/z (ESI): 1062.3 $[M+H]^+$.

[0897] **^{1}H NMR (400MHz, DMSO-d_6)** δ = 8.74-8.69 (m, 1H), 8.59 (t, *J* = 6.7 Hz, 1H), 8.32-8.26 (t, *J* = 5.6 Hz, 1H), 8.11 (d, *J* = 7.8 Hz, 1H), 8.06 (t, *J* = 5.3 Hz, 1H), 7.99-7.94 (m, 1H), 7.80 (s, 1H), 7.52 (s, 1H), 7.27-7.20 (m, 5H), 7.19-7.11 (m, 1H), 6.99 (s, 2H), 6.50 (s, 1H), 5.49-5.41 (m, 4H), 4.84-4.72 (m, 2H), 4.71-4.63 (m, 1H), 4.53-4.48 (m, 1H), 4.44-4.36 (m, 1H), 3.77-3.56 (m, 6H), 3.49 (d, *J* = 7.0 Hz, 1H), 3.06-3.02 (m, 1H), 2.83-2.74 (m, 1H), 2.10 (t, *J* = 7.6 Hz, 2H), 1.91-1.82 (m, 2H), 1.50-1.42 (m, 4H), 1.22-1.13 (m, 2H), 1.02-0.90 (s, 1H), 0.88 (t, *J* = 7.3 Hz, 3H), 0.38-0.29 (m, 4H).

[0898] **중간체 L1-14-13-P2**(30.0mg) 및 **중간체 19-8**(25.2mg)을 원료로 사용하여, 상술한 방법에 따라 **화합물 L1-19-P2**(19.0mg)를 제조하여 얻었다.

[0899] MS m/z (ESI): 1062.3 $[M+H]^+$.

[0900] **^{1}H NMR (400MHz, DMSO-d_6)** δ = 8.73-8.63 (m, 1H), 8.58 (t, *J* = 6.4 Hz, 1H), 8.30 (t, *J* = 5.7 Hz, 1H), 8.13 (d, *J* = 8.1 Hz, 1H), 8.07 (t, *J* = 5.8 Hz, 1H), 8.01 (t, *J* = 5.4 Hz, 1H), 7.81 (s, 1H), 7.52 (s, 1H), 7.28-7.19 (m, 5H), 7.19-7.12 (m, 1H), 7.00 (s, 2H), 6.50 (s, 1H), 5.48-5.39 (m, 4H), 4.84-4.71 (m, 2H), 4.68-4.55 (m, 1H), 4.53-4.43 (m, 1H), 4.42-4.35 (m, 1H), 3.77-3.54 (m, 6H), 3.49 (d, *J*=7.0 Hz, 1H), 3.08-3.02 (m, 1H), 2.85-2.76 (m, 1H), 2.09 (t, *J* = 7.5 Hz, 2H), 1.93-1.79 (m, 2H), 1.52-1.39 (m, 4H), 1.25-1.12 (m, 2H), 1.02-0.94 (m, 1H), 0.88 (t, *J* = 7.3 Hz, 3H), 0.44-0.24 (m, 4H).

[0901] 두 가지 이성질체는 각각 하기 키랄 고성능 액체 크로마토그래피 분석 방법에 의해 추가로 분석하였다.

[0902] 키랄 고성능 액체 크로마토그래피 조건은 다음과 같다:

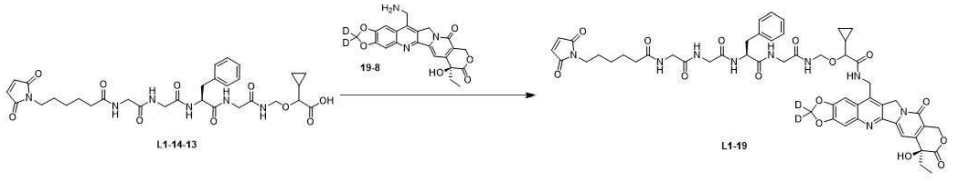
[0903]

크로마토그래피 컬럼	Chiralcel OJ-3 100A, 4.6mm I.D., 3um
이동상	A: 이산화탄소
	B: 에탄올(0.05% 디에틸아민)
유속	2.8mL/분
파장	PDA 220nm
컬럼 온도	35°C
컬럼 압력	1500Psi
기기 모델	Waters UPCC with PDA Detector and QDa Detector

[0904] 상술한 키랄 초임계 유체 크로마토그래피 조건에서, **L1-19-P1**의 머무름 시간은 3.775분이며;

[0905] 상술한 키랄 초임계 유체 크로마토그래피 조건에서, **L1-19-P2**의 머무름 시간은 3.973분이다.

[0906] **라세미 화합물 L1-19의 합성**

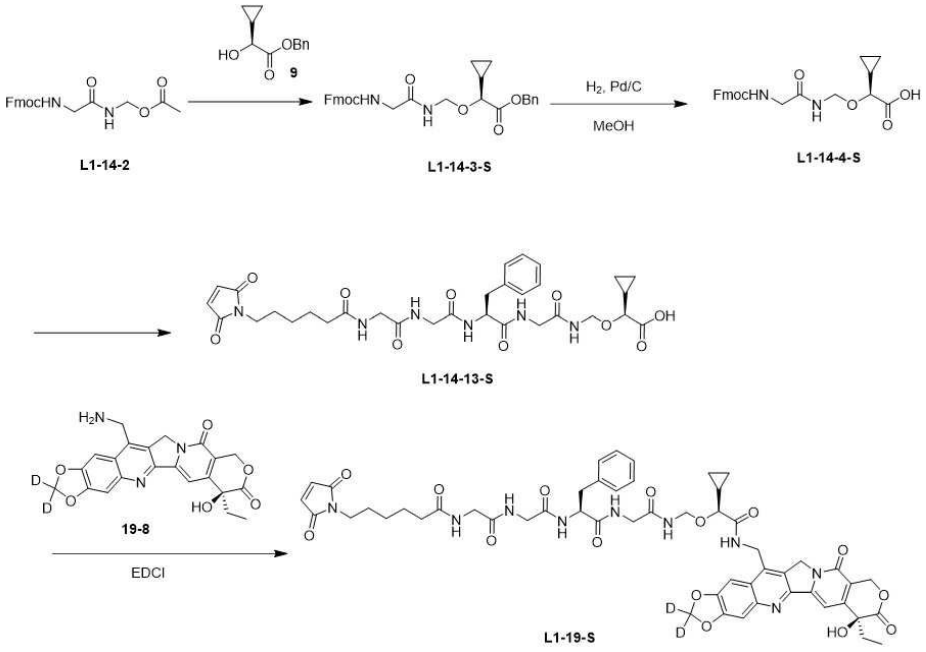
[0907] 

[0908] **중간체 L1-14-13**(30.00mg, 벤질 2-사이클로프로필-2-하이드록시아세테이트(라세미체)를 원료로 **L1-14-13-P1**의 합성 방법을 참조하여 합성), **중간체 19-8**(25.15mg), 1-(3-디메틸아미노프로필)-3-에틸카르보디이미드 염산염(17.52mg), 피리딘(10.84mg) 및 1-하이드록시벤조트리아졸(12.35mg)을 *N*,*N*-디메틸포름아미드(1mL)에 용해시키고, 반응액을 25℃에서 질소 보호 하에 2시간 동안 교반하면서 반응시켰다. 반응이 끝난 후, 반응액을 고성능 액체 크로마토그래피(컬럼: Boston Green ODS 150*30mm*5um; 이동상: [A: 물(포름산), B: 아세토니트릴]; B%: 33%~33%, 14분)로 정제하여 라세미 화합물 L1-19(15.4mg)를 얻었다.

[0909] **^{1}H NMR (400MHz, DMSO-d_6)** δ = 8.76-8.66 (m, 1H), 8.59 (t, *J* = 6.8 Hz, 1H), 8.36-8.27 (m, 1H), 8.12 (d, *J* = 6.6 Hz, 1H), 8.09-8.05 (m, 1H), 8.04-8.00 (m, 1H), 7.81 (s, 1H), 7.52 (s, 1H), 7.27-7.19 (m, 5H), 7.17-7.12 (m, 1H), 7.00 (s, 2H), 6.50 (s, 1H), 5.49-5.42 (m, 4H), 4.84-4.71 (m, 2H), 4.71-4.63 (m, 1H), 4.53-4.42 (m, 1H), 4.44-4.35 (m, 1H), 3.83-3.54 (m, 6H), 3.49 (d, *J* = 7.1 Hz, 1H), 3.08-3.02 (m, 1H), 2.86-2.73 (m, 1H), 2.10 (t, *J* = 7.3 Hz, 2H), 1.93-1.79 (m, 2H), 1.49-1.37 (m, 4H), 1.25-1.13 (m, 2H), 1.01-0.92 (m, 1H), 0.88 (t, *J* = 7.2 Hz, 3H), 0.43-0.25 (m, 4H).

[0910] MS m/z (ESI): 1062.4 $[M+H]^+$.

[0911] **실시예 39-2: *N*-((4*S*,12*S*)-12-벤질-4-사이클로프로필-1-((*S*)-7-에틸-7-하이드록시-8,11-디옥소-7,8,11,13-테트라하이드로-10*H*-[1,3]디옥솔로[4,5-*g*]피라노[3',4':6,7]인돌리지노[1,2-*b*]퀴놀린-14-일-2,2-d_2)-3,8,11,14,17-펜타옥소-5-옥시-2,7,10,13,16-펜타아자옥타데칸-18-일)-6-(2,5-디옥소-2,5-디하이드로-1*H*-피롤-1-일)헥산아미드(화합물 L1-19-S)**



[0912]

[0913] **단계 1: L1-14-3-S의 합성**

[0914] **중간체 L1-14-2**(28g) 및 **중간체 9**(23.5g, 실시예 14-2에서 제조하여 얻음)를 디클로로메탄(25mL)에 용해시키고, 반응액에 은 트리플루오로메탄설포네이트(139.50mg)를 첨가하고, 반응액을 질소 보호 하에 25℃에서 108시간 동안 교반하면서 반응시켰다. 반응이 끝난 후, 반응액을 여과하고 여과액이 건조될 때까지 감압 농축하여, 잔류물을 고속 실리카겔 컬럼(이동상 구배 테트라하이드로푸란/디클로로메탄울: 0~7%, 유속 70mL/분)으로 정제하여 표제 화합물(10.3g)을 얻었다.

[0915] MS m/z (ESI): 537.3 $[M+Na]^+$.

[0916] **단계 2: L1-14-4-S의 합성**

[0917] **중간체 L1-14-3-S**(10g)를 테트라하이드로푸란(100mL)에 용해시키고, 함수 팔라듐 탄소(10% 질량 함량, 1g)을 첨가하고, 반응액을 0℃에서 수소 분위기 하에 16시간 동안 교반하면서 반응시켰다. 반응이 끝난 후, 반응액을 여

과하고 여과액이 건조될 때까지 감압 농축하여, 잔류물에 석유 에테르/에틸 아세테이트(10mL/0.5mL)를 첨가하고 2시간 동안 교반하고, 여과한 후 표제 화합물(6g)을 얻었다.

[0918] MS m/z (ESI): 447.2 $[M+Na]^+$.

[0919] **L1-14-4-S는** 각각 하기 키랄 고성능 액체 크로마토그래피 분석 방법에 의해 추가로 분석하였다.

[0920] 키랄 고성능 액체 크로마토그래피 조건은 다음과 같다:

[0921]

크로마토그래피 컬럼	Chiralpak IC-3 100A, 4.6mm I.D., 3um
이동상	A: 이산화탄소
	B: 이소프로판올(0.05% 디에틸아민)
유속	2.8mL/분
파장	PDA 220nm
컬럼 온도	35°C
컬럼 압력	1500Psi
기기 모델	Waters UPCC with PDA Detector and QDa Detector

[0922] 상술한 키랄 초임계 유체 크로마토그래피 조건에서, **L1-14-4-S**의 머무름 시간은 4.385분이며; 이는 동일한 크로마토그래피 분석 조건에서 **화합물 L1-14-4-P1**의 머무름 시간(4.471분)과 대체로 일치하다. 따라서, **L1-14-4-S**와 **L1-14-4-P1**은 배열이 동일하며 동일한 화합물이다.

[0923] **단계 3: L1-19-S의 합성**

[0924] **중간체 L1-14-13-S**(600mg, **L1-14-4-S**를 원료로 사용하고, **L1-14-13-P1**의 합성 방법을 참조하여 제조하여 얻음), **중간체 19-8**(502.93mg), 1-(3-디메틸아미노프로필)-3-에틸카르보디이미드 염산염(EDCI)(350.31mg), 피리딘(216.82mg) 및 1-하이드록시벤조트리아졸(246.91mg)을 *N*,*N*-디메틸포름아미드(2mL)에 용해시키고, 반응액을 25℃에서 질소 보호 하에 2시간 동안 교반하면서 반응시켰다. 반응이 끝난 후, 반응액을 고성능 액체 크로마토그래피(컬럼: Boston Green ODS 150*30mm*5um; 이동상: [A: 물(0.05% 포름산), B: 아세토니트릴]; B%: 24%~54%, 12분)로 정제하여 표제 화합물(286mg)을 얻었다.

[0925] **^{1}H NMR (400MHz, DMSO-d_6)** δ = 8.72-8.63 (m, 1H), 8.62-8.52 (m, 1H), 8.34-8.26 (m, 1H), 8.16-7.94 (m, 3H), 7.78 (s, 1H), 7.51 (s, 1H), 7.26-7.13(m, 6H), 6.99 (s, 1H), 6.56-6.42 (m, 1H), 5.52-5.40 (m, 4H), 4.85-4.60 (m, 3H), 4.59-4.46 (m, 1H), 4.44-4.38 (m, 1H), 3.79-3.53 (m, 6H), 3.52-3.44 (m, 2H), 3.08-3.02 (m, 1H), 2.85-2.75 (m, 1H), 2.09 (t, *J*=7.8 Hz, 2H), 1.95-1.75 (m, 2H), 1.58-1.38 (m, 4H), 1.26-1.09 (m, 2H), 1.04-0.96 (m, 1H), 0.88 (t, *J* = 7.1 Hz, 3H), 0.42-0.26 (m, 4H).

[0926] MS m/z (ESI): 1062.5 $[M+H]^+$.

[0927] **L1-19-S**는 각각 하기 키랄 고성능 액체 크로마토그래피 방법에 의해 추가로 분석하였다.

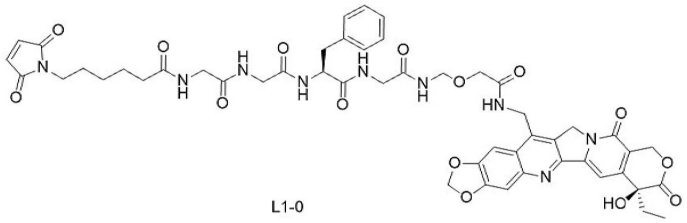
[0928] 키랄 고성능 액체 크로마토그래피 조건은 다음과 같다:

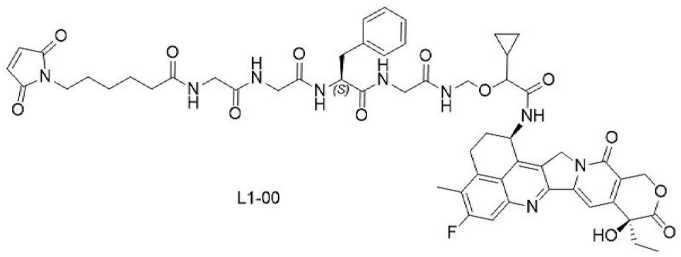
[0929]

크로마토그래피 컬럼	Chiralcel OJ-3 100A, 4.6mm I.D., 3um
이동상	A: 이산화탄소
	B: 에탄올(0.05% 디에틸아민)
유속	2.8mL/분
파장	PDA 220nm
컬럼 온도	35°C
컬럼 압력	1500Psi
기기 모델	Waters UPCC with PDA Detector and QDa Detector

[0930] 상술한 키랄 초임계 유체 크로마토그래피 조건에서, **L1-19-S**의 머무름 시간은 3.748분이고; 이는 동일한 크로마토그래피 분석 조건에서 실시예 39-1에서 제조하여 얻어진 **화합물 L1-19-P1**의 머무름 시간(3.775분)과 대체로 일치하다. 따라서, **L1-19-S**와 **L1-19-P1**은 배열이 동일하며, 동일한 화합물에 속하는 것으로 판단된다.

[0931] 화합물 LI-0 및 L1-00의 합성에 대해서는 특허 문헌 WO2019195665A1 및 WO2020063676A1을 각각 참조하였다.

[0932] 

[0933] 

[0934] **실시예 40: 항체-약물 접합체의 제조**

[0935] 40.1 항체:

[0936] 40.1.1 항-인간 HER2 단클론 항체의 구축 및 생산

[0937] 항-인간 HER2 단클론 항체의 서열은 아래 표 2에 나타난 바와 같고, 상기 항체의 VH 및 VL을 코딩하는 핵산 서열을 신호 펩티드와 중쇄 불변 영역/경쇄 불변 영역 서열을 구비하는 발현 벡터 pTT5에 재조합하여 VH-CH1-Fc/VL-CL를 발현하는 재조합 플라스미드를 얻었다. 시퀀싱 검증한 후, 플라스미드를 추출하여 숙주 세포를 형질 감염시켰다. 배양을 통해, 항체를 분비하는 세포의 배양 상청액을 얻었다.

표 2. 항-인간 HER2 항체의 서열 정보 및 이의 CDR 분석(Kabat에 따라 분류)

항체 명칭	번호	서열 정보
trastuzumab-VH	SEQ ID NO: 1	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFNIKDTYIHWVRQAPGKGLEW VARIYPTNGYTRYADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYY CSRWGGDGFYAMDYWGQGTLVTVSS
trastuzumab-VL	SEQ ID NO: 2	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDVNTAVAWYQQKPGKAPKLLI YSASFLYSGVPSRFSGSRSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQHYTTPPTF GQGTKVEIK
pertuzumab-VH	SEQ ID NO: 3	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFTDYTMDWVRQAPGKGLE WVADVNPNSGGSIYNQRFKGRFTLSVDRSKNTLYLQMNSLRAEDTAV YYCARNLGPSFYFDYWGQGTLVTVSS
pertuzumab-VL	SEQ ID NO: 4	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCKASQDVSIGVAWYQQKPGKAPKLLIY SASYRYTGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQYYIYPYTFG QGTKVEIK
human CH1-Fc	SEQ ID NO: 5	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSG VHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKV EPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVV DVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLH QDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEM TKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLY SKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
human CL	SEQ ID NO: 6	RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQ SGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSS PVTKSFNRGEC

항체 명칭	CDR1	CDR2	CDR3
trastuzumab-VH	DTYIH (SEQ ID NO: 7)	RIYPTNGYTRYADSVKG (SEQ ID NO: 8)	WGGDGFYAMDY (SEQ ID NO: 9)
trastuzumab-VL	RASQDVNTAVA (SEQ ID NO: 10)	SASFLYS (SEQ ID NO: 11)	QQHYTTPPT (SEQ ID NO: 12)
pertuzumab-VH	DYTMD (SEQ ID NO: 13)	DVNPNSGGSIYNQRFKG (SEQ ID NO: 14)	NLGPSFYFDY (SEQ ID NO: 15)
pertuzumab-VL	KASQDVSIGVA (SEQ ID NO: 16)	SASYRYT (SEQ ID NO: 17)	QQYYIYPYT (SEQ ID NO: 18)

[0938]

[0939] 40.1.2 항-인간 p95HER2 단클론 항체의 스크리닝

[0940] 항-인간 p95HER2 단클론 항체는 마우스를 면역화하여 생성되었다. 면역원은 hu p95HER2.ECD-Fc 단백질이고, 혈

청에서 항체 역가가 높고 역가가 정체되는 경향이 있는 마우스의 비장 림프구 세포를 선택하여 하이브리도마 세포를 제조하고, ELISA, FACS 등 당업계에서 일반적인 방법을 통해 스크리닝하여 양성 하이브리도마 클론을 얻고, 무혈청 세포 배양 방법으로 항체를 추가로 제조하고, 항체를 정제하여 시퀀싱하였다. 시퀀싱을 통해 마우스 유래 항-인간 p95HER2 항체를 얻었다.

[0941] IMGT(http://imgt.cines.fr) 인간 항체 중쇄 및 경쇄 가변 영역 생식계열 유전자 데이터베이스와 MOE(Molecular Operating Environment, 분자 작동 환경) 소프트웨어를 비교하여 각각 마우스 유래 항체와 상동성이 높은 중쇄 및 경쇄 가변 영역 생식계열 유전자를 탬플릿으로 선택하고, 마우스 유래 항체의 CDR을 상응하는 인간화 탬플릿에 각각 이식하여 FR1-CDR1-FR2-CDR2-FR3-CDR3-FR4의 순서로 가변 영역 서열을 형성하고, 이를 기반으로, 필요에 따라 원래의 친화력을 보장하기 위해 역 돌연변이를 수행하고/하거나 분자 변형의 위험을 없애기 위해 핫스팟 돌연변이를 수행하였다. 최종 최적화된 인간화 항체 및 대응하는 서열은 표 3에 나타난 바와 같다.

표 3. 최적화된 인간화 항체의 서열 정보 및 이의 CDR 분석(Kabat에 따라 분류)

항체 명칭	번호	서열 정보		
P95-Hab01-VH	SEQ ID NO: 19	EVTLRESGPALVKPTQTLTLTCTFSGFSLYTSGMGVSWIRQPPGKALEWLANIYWDNDKRYNPSLKSRLTISKDTSGNQVVLTMTNMDPVDTATYYCARSFLYYGNSHWYFDVWGQGTTVTVSS		
P95-Hab01-VL	SEQ ID NO: 20	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCSASSSVSYMYWYQQKPGQAPRLLIYRTSNLASGIPARFSGSGSGTDFTLTISSLEPEDFAVYYCQQYHSYPPTFGQGTKLEIK		
P95-Hab02-VH	SEQ ID NO: 21	EVTLKESGPALVKPTQTLTLTCTFSGFSLSTFGLGVGWIRQPPGKALEWLAHIWWDTAKNFNPVLKSRLTVSKDTSKNQVVLTMTNMDPVDTATYYCVRIGNYGSPYFDYWGQGTTVTVSS		
P95-Hab02-VL	SEQ ID NO: 22	LIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCLASQSIGTYLAWYQQKPGKAPKLLIYAATSLTDGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQVHSSPYSFGGGTKVEIK		
항체 명칭	CDR1		CDR2	CDR3
P95-Hab01-VH	TSGMGVS (SEQ ID NO: 23)		NIYWDNDKRYNPSLKS (SEQ ID NO: 24)	SFLYYGNSHWYFDV (SEQ ID NO: 25)
P95-Hab01-VL	SASSSVSYMY (SEQ ID NO: 26)		RTSNLAS (SEQ ID NO: 27)	QQYHSYPPT (SEQ ID NO: 28)
P95-Hab02-VH	TFGLGVG (SEQ ID NO: 29)		HIWWDTAKNFNPVLKS (SEQ ID NO: 30)	IGNYGSPYFDY (SEQ ID NO: 31)
P95-Hab02-VL	LASQSIGTYLA (SEQ ID NO: 32)		AATSLTD (SEQ ID NO: 33)	QQVHSSPYS (SEQ ID NO: 34)

[0942]

[0943] 40.1.3 p95HER2/HER2 이중 특이적 항체의 구축 및 생산

[0944] DVD-Ig 형태의 항체는 VH1-linker-VH2-CH1-Fc와 VL1-linker-VL2-CL로 구성되며, 여기서, VH1 및 VL1은 HER2를 표적으로 하고, VH2 및 VL2는 p95HER2를 표적으로 하며, linker는 생략될 수 있다. 이중 특이적 항체의 구체적인 서열은 표 4를 참조한다. 설계된 구조에 따라, 이중 특이적 항체 경쇄 및 중쇄 발현 플라스미드를 pTT5 벡터에 각각 구축하고 HEK293 세포에서 발현시켰다.

표 4. p95HER2/HER2 이중 특이적 항체의 서열 정보

항체 명칭	번호	서열 정보
BsAb02-P 중쇄 전장 서열	SEQ ID NO: 35	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFTDYTMDWVRQAPGKGLEWVADVNPNSGGSIYNQRFKGRFTLSVDRSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARNLGPSFYFDYWGQGTLVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSEVTLKESGPALVKPTQTLTLTCTFSGFSLSTFGLGVGWIRQPPGKALEWLAHIWWDTAKNFNPVLKSRLTVSKDTSKNQVVLTMTNMDPVDTATYYCVRIGNYGSPYFDYWGQGTTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
BsAb02-P 경쇄 전장 서열	SEQ ID NO: 36	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCKASQDVSIGVAWYQQKPGKAPKLLIYSASYRYTGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQYYIYPYTFGQGTKVEIKGGGGSGGGGSGGGGSLIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCLASQSIGTYLAWYQQKPGKAPKLLIYAATSLTDGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQVHSSPYSFGGGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

[0945]

[0946] 40.1.4 항-인간 CDH6 항체의 구축 및 생산

[0947] 항-인간 CDH6 단클론 항체 CDH6-Ab 및 CDH6-Ab-1의 서열은 아래 표 5에 나타난 바와 같다(항체 서열은 US20200171163A1로부터 유래됨).

표 5. 항-인간 CDH6 항체 CDH6-Ab 및 CDH6-Ab-1의 서열 정보 및 이의 CDR 분석 (Kabat에 따라 분류)

항체 명칭	번호	서열 정보
CDH6-Ab-VH	SEQ ID NO: 37	EVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTRNFMHWVRQAPGQGL EWMGWIYPGDGETEYAQKFQGRVTITADTSTSTAYMELSSLRSEDTA VYYCARGVYGGFAGGYFDFWGQGTLVTVSS
CDH6-Ab-VL	SEQ ID NO: 38	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCKASQNIYKNLAWYQQKPGKAPKLL IYDANTLQTGVPSRFSGSGSGSDFTLTISSLQPEDFATYFCQQYYSGW AFGQGTKVEIK
CDH6-Ab-1-VH	SEQ ID NO: 46	QVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSHGMHWVRQAPGKGLE WVSVISGSGSNTGYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAV YYCARQWGSYAFDSWGQGTLVTVSS
CDH6-Ab-1-VL	SEQ ID NO: 47	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSISSYLNWYQQKPGKAPKLLI YAVSTLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQSGTFPPT TFGQGTKVEIK
human CH1-Fc-1	SEQ ID NO: 39	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTS GVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDK RVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCV VVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLT VLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPS REEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSD GSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
human CL	SEQ ID NO: 6	RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNAL QSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGL SSPVTKSFNRGEC

항체 명칭	CDR1	CDR2	CDR3
CDH6-Ab-VH	RNFMH (SEQ ID NO: 40)	WIYPGDGETEYAQKFQG (SEQ ID NO: 41)	GVYGGFAGGYFDF (SEQ ID NO: 42)
CDH6-Ab-VL	KASQNIYKNLA (SEQ ID NO: 43)	DANTLQT (SEQ ID NO: 44)	QQYYSGWA (SEQ ID NO: 45)
CDH6-Ab-1-VH	SHGMH (SEQ ID NO: 48)	VISGSGSNTGYADSVKG (SEQ ID NO: 49)	QWGSYAFDS (SEQ ID NO: 50)
CDH6-Ab-1-VL	RASQSISSYLN (SEQ ID NO: 51)	AVSTLQS (SEQ ID NO: 52)	QQSGTFPPTT (SEQ ID NO: 53)

[0948]

[0949] CDH6-Ab-2 및 CDH6-Ab-3은 마우스를 면역화하여 생성되었다. 면역원은 인간 CDH6-hFc 단백질과 인간 CDH6을 과발현하는 HEK293T 세포이고, 혈청에서 항체 역가가 높은 마우스의 비장 림프구 세포를 선택하여 하이브리드 세포를 제조하고, ELISA 및 FACS 등 당업계에서 일반적인 방법을 통해 스크리닝하여 양성 하이브리도마 클론을 얻고, 무혈청 세포 배양 방법으로 항체를 추가로 제조하고, 항체를 정제하고 시퀀싱하여, 마우스 유래 항-인간 CDH6 항체 및 이의 가변 영역 서열을 얻었다. IMGT(http://imgt.cines.fr) 인간 항체 중쇄 및 경쇄 가변 영역 생식계열 유전자 데이터베이스와 MOE(Molecular Operating Environment) 소프트웨어를 비교하여 마우스 유래 항체와 상동성이 높은 중쇄 및 경쇄 가변 영역 생식계열 유전자를 각각 탬플릿으로 선택하고, 마우스 유래 항체의 CDR을 상응하는 인간 탬플릿에 각각 이식하여 FR1-CDR1-FR2-CDR2-FR3-CDR3-FR4의 순서로 가변 영역 서열을 형성하고, 이를 기반으로, 필요에 따라 원래의 친화력을 보장하기 위해 역 돌연변이를 수행하고/하거나 분자 변형의 위험을 없애기 위해 핫스팟 돌연변이를 수행하였다. 최종 최적화된 인간화 항체 CDH6-Ab-2 및 CDH6-Ab-3에 대응하는 VH와 VL, 및 Kabat 형식에 따라 분류된 CDR 서열은 표 6에 나타난 바와 같다.

표 6. 항-인간 CDH6 항체 CDH6-Ab-2 및 CDH6-Ab-3의 서열 정보 및 이의 CDR 분석 (Kabat에 따라 분류)

항체 명칭	번호	서열 정보
CDH6-Ab-2-VH	SEQ ID NO: 54	EVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTDNYINWVRQAPGQRLE WMGWIYPGTGNSYYNEKFKGRVTITVDTSASTAYMELSSLRSEDTAV YLCASSYGDSFDYWGQGTTVTVSS
CDH6-Ab-2-VL	SEQ ID NO: 55	DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCRASQDIRNYLNWYQQKPGQTPKLLI SYTSRLHSGVPDRFSGSGSGTDFTLTISSLQAEDVAVYYCQQYSQLPW TFGGGTKVEIK
CDH6-Ab-3-VH	SEQ ID NO: 56	EVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTDYYMAWVRQAPGQGL EWMGYIFPNSGGTDYSQKFKGRVTLTVDKSTSTVYMELSSLRSEDTA VYYCARELGADYGDYYAMDHWGQGTTVTVSS
CDH6-Ab-3-VL	SEQ ID NO: 57	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASENIDSYLAWYQQKPGKSPKLLV YSATLLADGVPSRFSGSGSGTDYTLTISSLQPEDFATYYCQHYYRTPPT FGQGTKLEIK
human CH1-Fc-1	SEQ ID NO: 5	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTS GVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDK KVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCV VVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLT VLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPS REEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSD GSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
human CL	SEQ ID NO: 6	RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNAL QSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGL SSPVTKSFNRGEC

항체 명칭	CDR1	CDR2	CDR3
CDH6-Ab-2-VH	DNYIN (SEQ ID NO: 58)	WIYPGTGNSYYNEKFKG (SEQ ID NO: 59)	SYGDSFDY (SEQ ID NO: 60)
CDH6-Ab-2-VL	RASQDIRNYLN (SEQ ID NO: 61)	YTSRLHS (SEQ ID NO: 62)	QQYSQLPWT (SEQ ID NO: 63)
CDH6-Ab-3-VH	DYYMA (SEQ ID NO: 64)	YIFPNSGGTDYSQKFKG (SEQ ID NO: 65)	ELGADYGDYYAMDH (SEQ ID NO: 66)
CDH6-Ab-3-VL	RASENIDSYLA (SEQ ID NO: 67)	SATLLAD (SEQ ID NO: 68)	QHYYRTPPT (SEQ ID NO: 69)

[0950]

[0951] 상기 항체의 VH 및 VL을 코딩하는 핵산 서열을 신호 펩티드(MGWSWILLFLLSVTAGVHS, SEQ ID NO: 70) 및 중쇄 불변 영역/경쇄 불변 영역 서열을 구비하는 발현 벡터 pTT5에 재조합하여 VH-CH1-Fc/VL-CL를 발현하는 재조합 플라스미드를 얻었다. 플라스미드 및 형질감염 시약 PEI(Polysciences, 카탈로그 번호: 24765-1)를 OPTI-MEM(Gibco, 카탈로그 번호: 11058021)에 첨가하고 고르게 혼합한 후 15분 동안 정치하여, Expi293F 세포(제조업체: Thermofisher, 카탈로그 번호: A14527)에 첨가하고, 5%의 CO_2를 넣고 120rpm, 37℃에서 진탕하면서 배양하였다. 형질감염의 2일째에 OPM-293 ProFeed(Shanghai OPM Biosciences Co., Ltd., 카탈로그 번호: F081918-001) 및 6g/L 글루코스(제조업체: Sigma, 카탈로그 번호: G7528)을 첨가하였다. 형질감염의 6일째에 항체를 분비하는 세포 배양 상청액을 얻었다.

[0952] 40.1.5 항-인간 LIV-1 단클론 항체의 구축 및 생산

[0953] 항-인간 LIV-1 단클론 항체 LIV1-Ab-1의 서열은 아래 표 7에 나타난 바와 같고(항체 서열은 US20200165335A로부터 유래됨), 상기 항체의 VH 및 VL을 코딩하는 핵산 서열을 신호 펩티드 및 중쇄 불변 영역(서열)/경쇄 불변 영역 서열을 구비하는 발현 벡터 pTT5에 재조합하여 LIV1-Ab-1을 발현는 재조합 플라스미드를 얻었다. 시퀀싱 검증한 후 플라스미드를 추출하였다. 플라스미드 및 형질감염 시약 PEI(Polysciences, 카탈로그 번호: 24765-1)를 OPTI-MEM(Gibco, 카탈로그 번호: 11058021)에 첨가하고 고르게 혼합한 후 15분 동안 정치하여, Expi293 세포(제조업체: Thermofisher, 카탈로그 번호: A14527)에 첨가하고, 5%의 CO_2를 넣고 120rpm, 37℃에서 진탕하면서 배양하였다. 형질감염의 2일째에 OPM-293 ProFeed(Shanghai OPM Biosciences Co., Ltd., 카탈로그 번호: F081918-001) 및 6g/L 글루코스(제조업체: Sigma, 카탈로그 번호: G7528)을 첨가하였다. 형질감염의 6일째에 세포 상청액을 수집하였다.

표 7. 항-인간 LIV-1 항체 서열의 정보 및 이의 CDR 분석(Kabat에 따라 분류)

서열 명칭	번호	서열 정보	
LIV1-Ab-1-VH	SEQ ID NO: 71	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGLTIEDYYMHWVRQAPGQGL EWMGWIDPENGDTEYGPKFQGRVTMTRDTSINTAYMELSRLRSDDT AVYYCAVHNAHYGTWFAYWGQGTLVTVSS	
LIV1-Ab-1-VL	SEQ ID NO: 72	DVVMTQSPLSLPVTLGQPASISCRSSQSLLHSSGNTYLEWYQQRPGQ SPRPLIYKISTRFSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCFQG SHVPYTFGGGTKVEIKR	
human CH1-Fc-2	SEQ ID NO: 73	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTS GVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDK KVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCV VVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLT VLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPS RDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSD GSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	
human CL	SEQ ID NO: 6	RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNAL QSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGL SSPVTKSFNRGEC	
서열 명칭	CDR1	CDR2	CDR3
LIV1-Ab-1-VH	DYYMH (SEQ ID NO: 74)	WIDPENGDTEYGPKFQG (SEQ ID NO: 75)	HNAHYGTWFAY (SEQ ID NO: 76)
LIV1-Ab-1-VL	RSSQSLLHSSGNTYLE (SEQ ID NO: 77)	KISTRFS (SEQ ID NO: 78)	FQGSHVPYT (SEQ ID NO: 79)

[0954]

[0955] 40.1.6 항-인간 ROR1 단클론 항체의 구축 및 생산

[0956] 항-인간 ROR1 단클론 항체 ROR1-Ab-1 가변 영역 서열은 특허 WO2020198531A2로부터 유래되고, ROR1-Ab-2 가변 영역 서열은 특허 CN113521300A로부터 유래되고, ROR1-Ab-3 가변 영역 서열은 특허 WO2020074724A1로부터 유래된다(표 8 참조). 상기 항체의 VH 및 VL을 코딩하는 핵산 서열을 인간 IgG1의 CH 및 CL을 갖는 pTT59 발현 벡터에 재조합하여, 각각 ROR1-Ab-1, ROR1-Ab-2 및 ROR1-Ab-3을 발현하는 재조합 플라스미드를 얻었다.

[0957] 플라스미드 및 형질감염 시약 PEI(Polysciences, 24765-1)를 OPTI-MEM(Gibco, 카탈로그 번호: 11058021)에 첨가하고 고르게 혼합한 후 15분 동안 정치하여, Expi293 세포(Thermofisher, A14527)에 첨가하고, 5%의 CO_2를 넣고, 120rpm, 37℃에서 진탕하면서 배양하였다. 형질감염의 2일째에 OPM-293 ProFeed(Shanghai OPM Biosciences Co., Ltd., F081918-001) 및 6g/L 글루코스(Sigma, G7528)을 첨가하였다. 형질감염의 6일째에 세포 상청액을 수집하였다.

표 8. 항-인간 ROR1 항체 서열의 정보 및 이의 CDR분석(Kabat에 따라 분류)

서열 명칭	서열 번호	아미노산 서열	
ROR1-Ab-1-VH	(SEQ ID NO: 80)	QVQLQESGPGLVKPSQTLSLTCTVSGYAFTAYNIHWVRQAPG QGLEWMGSFDPYDGGSSYNQKFKDRLTISKDTSKNQVVLTM TNMDPVDTATYYCARGWYYFDYWGHGTLVTVSS	
ROR1-Ab-1-VL	(SEQ ID NO: 81)	DIVMTQTPLSLPVTPGEPASISCRASKSISKYLAWYQQKPGQA PRLLIYSGSTLQSGIPPRFSGSGYGTDFTLTINNIESEDAAYYFC QQHDESPYTFGEGTKVEIK	
ROR1-Ab-2-VH	(SEQ ID NO: 82)	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSNYAMSWVRQAP GKGLEWVSSISHNSGSTYYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQM NSLRAEDTAVYYCAKFISARKSLGRSYSNGMDVWGQGTLVT VSS	
ROR1-Ab-2-VL	(SEQ ID NO: 83)	QSVLTQPPSASGTPGQRVTISCTGSSSNIGSNDVTWYQQLPGT APKLLIYADSKRPSGVPDRFSGSKSGTSASLAISGLRSEDEAD YYCGTWDYSLSGYVFGGGTKLTVL	
ROR1-Ab-3-VH	(SEQ ID NO: 84)	QVQLRESGPGLVKPSETLSLTCTVSGFDISSYYMSWVRQPPG KGLEWIGAIGISGNAYYASWAKSRVTISRDTSKNQFSLKLSSV TAADTAVYYCARDHPTYGMDLWGPGTLVTVSS	
ROR1-Ab-3-VL	(SEQ ID NO: 85)	SYELTQPPSVSVAPGKTARITCEGNNIGSKAVHWYQQKPGQA PVLVIYDDDERPSGIPERFSGSNSGNTATLTISRVEAGDEADYY CQVWDSSAYVFGGGTKLTVL	
human CH1-Fc	SEQ ID NO: 5	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWN SGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNV NHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPP KPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHN AKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNK ALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLV KGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTV DKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	
human CL	SEQ ID NO: 6	RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWK VDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKV YACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC	
서열 명칭	CDR1	CDR2	CDR3
ROR1-Ab-1-VH	AYNIH (SEQ ID NO: 86)	SFDPYDGGSSYNQKFKD (SEQ ID NO: 87)	GWYYFDY (SEQ ID NO: 88)
ROR1-Ab-1-VL	RASKSISKYLA (SEQ ID NO: 89)	SGSTLQS (SEQ ID NO: 90)	QQHDESPYT (SEQ ID NO: 91)
ROR1-Ab-2-VH	NYAMS (SEQ ID NO: 92)	SISHNSGSTYYADSVKG (SEQ ID NO: 93)	FISARKSLGRSYSNGMDV (SEQ ID NO: 94)
ROR1-Ab-2-VL	TGSSSNIGSNDVT (SEQ ID NO: 95)	ADSKRPS (SEQ ID NO: 96)	GTWDYSLSGYV (SEQ ID NO: 97)
ROR1-Ab-3-VH	SYYMS (SEQ ID NO: 98)	AIGISGNAYYASWAKS (SEQ ID NO: 99)	DHPTYGMDL (SEQ ID NO: 100)
ROR1-Ab-3-VL	EGNNIGSKAVH (SEQ ID NO: 101)	DDDERPS (SEQ ID NO: 102)	QVWDSSAYV (SEQ ID NO: 103)

[0958]

[0959] 40.2 항체 정제: ProteinA 친화성 크로마토그래피를 이용하여 세포 배양 상청액에서 상술한 항체를 정제하였다. Protein A 친화성 컬럼을 6M 구아니딘 염산으로 컬럼 부피의 3~5배로 세척한 다음 정제수로 컬럼 부피의 3~5배로 세척하였다. 1×PBS(pH 7.4)와 같은 완충 시스템을 균형 완충액으로 사용하여 컬럼 부피의 3~5배로 크로마토그래피 컬럼의 균형을 조정하였다. 세포 상청액의 경우 낮은 유속으로 샘플 로딩하여 결합하며, 머무름 시간이 약 1분 이상이 되도록 유속을 제어하고, 결합이 완료된 후 크로마토그래피 컬럼을 1×PBS(pH 7.4)로 자외선 흡수가 기준선으로 떨어질 때까지 컬럼 부피의 3~5배로 세척하였다. 0.1M 초산/초산나트륨(pH 3.0~3.5) 완충액을 이용하여 샘플을 용리하고, 자외선 모니터링에 따라 용리 피크를 수집하며, 용리된 생성물은 1M Tris-HCl(pH 8.0)을 이용하여 pH를 5~6으로 빠르게 조정하여 임시 보관하였다. 용리된 생성물의 경우, 한외여과관을 이용하여 한외여과 농축 및 원하는 완충 시스템으로의 용액 치환, 또는 G-25 탈염과 같은 분자 배제를 이용하여 원하는 완충 시스템으로의 대체 또는 샘플 순도를 향상시키기 위해 Superdex 200과 같은 고해상도 분자 배제 컬럼을 이용하여 용리 생성물에서 폴리머 성분을 제거함 등 당업자에게 잘 알려진 방법을 이용하여 용액 치환을 수행할 수 있다. 정제한 후 순도 요구 사항에 부합되는 단백질을 투석하고 용액을 치환한 다음, 후속 커플링 및 검출을 수행하였다.

[0960] 40.3 커플링: 상술한 항체를 한외여과관 Amicon-Ultra-30kD에 첨가하고, 50mM의 인산염, 150mM의 NaCl, 1mM의 EDTA, pH 6.5인 완충액으로 농축하여 용액을 치환하고, 항체 용액에 7~8배의 10mM 트리스(2-카르복시에틸)포스핀 용액(TCEP)을 첨가하고, 혼합 용액을 항온 금속 진탕기에 넣고 25℃에서 2~3시간 동안 항체를 환원시켰다. 반응 시스템에 15~20배(DMSO 용해)의 대응하는 약물-링커 화합물(실시예 37~39에서 제조하여 얻어지거나, 실시예 37~39의 방법을 참조하여 제조하여 얻어짐)을 첨가하고 반응액을 25℃에서 2~16시간 동안 커플링시켰다. 반

응 생성물을 한외여과로 농축하고 인산염(PBS) 완충액으로 용액을 치환하고 반응하지 않은 유리 소분자 독소를 제거하였다. ADC 생성물은 SEC 및 LC-MS 방법을 채택하여 순도와 DAR 값을 분석하였다.

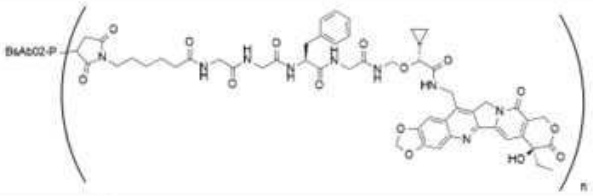
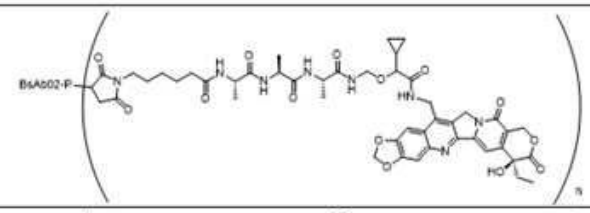
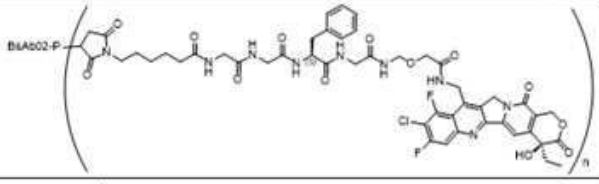
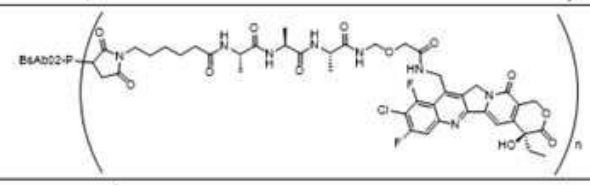
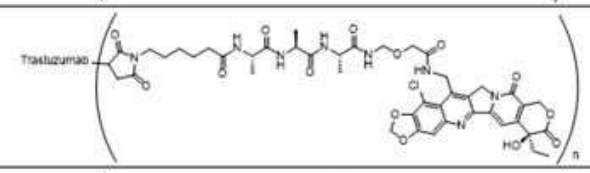
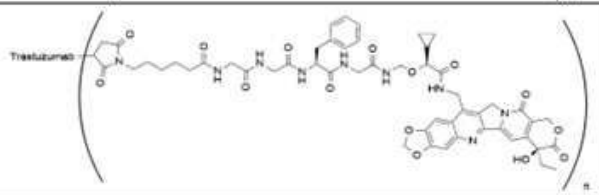
[0961] 40.4 SEC 순도 분석: SEC-HPLC 법을 응용하여 시험 대상 단백질 샘플을 분석하고, 재조합 단백질의 분자 크기 균일성을 특성화하고, 재조합 단백질의 순도를 측정하였다. 본 방법에 사용된 HPLC는 Agilent 1260이고, 크로마토그래피 컬럼은 TSKgel G3000SWXL(Tosoh Bioscience로부터 구입)이고, 이동상은 200mM의 인산 완충액이고, pH 7.0/이소프로판올(v/v 9:1), 검출 온도는 25℃이며, 유속은 0.5mL/분이고, 검출 파장은 280nm이며, 표적 단백질의 로딩량은 50μg이고, 분석 시간은 40분이다.

[0962] 40.5 DAR 값 측정: 초고성능 액체 크로마토그래피-질량 분석(UHPLC-MS) 병용 방법을 응용하여 ADC 분자의 DAR 값을 측정하였다. 시험 대상 ADC 분자를 먼저 PNGase F로 처리하여 N-글리칸 변형을 제거한 다음 디티오트레이톨(Dithiothreitol, DTT)로 처리하고, 37℃에서 1시간 동안 인큐베이션하여 경쇄와 중쇄로 환원한 다음, Thermo Vanquish UHPLC-Q Exactive Plus 질량 분석 시스템을 사용하여 분석하였는데, 2μg의 단백질을 Waters ACQUITY Protein BEH 분자 배제 크로마토그래피 컬럼에 주사하였고, 이동상은 0.1%의 포름산, 0.05%의 TFA 및 25%의 아세토니트릴을 함유하는 수용액이고, 유속은 0.2mL/분이며, 분석 시간은 30분이고, 질량 분석기는 Thermo Q Exactive Plus이고, 질량 분석의 주요 파라미터는 다음과 같고: 3.8kV 스프레이 전압, 300℃ 모세관 가열 온도, 35arb 시스 가스 유속, 800~3000 모 이온의 스캐닝 범위 등, 마지막으로 질량 분석 데이터 분석 소프트웨어인 Biopharma Finder 4.1을 응용하여 경쇄 및 중쇄 질량 스펙트럼 피크의 분자량 정보와 각 성분의 질량 스펙트럼 반응 신호를 Respect 알고리즘의 디컨볼루션을 통해 각각 계산하여, 시험 대상 ADC 샘플의 DAR 값을 계산하였다.

[0963] 상기와 동일한 방법을 사용하여 동형 대조 항체 Ab-ISO(anti-FITC-hIgG1 항체)를 제조하고, Linker+Payload 화합물에 커플링시켜 상응하는 ADC의 동형 대조 항체를 얻었다.

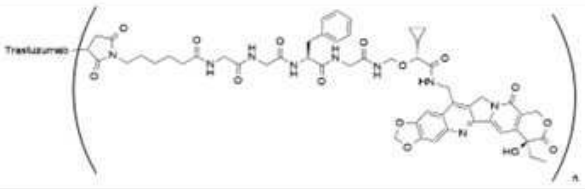
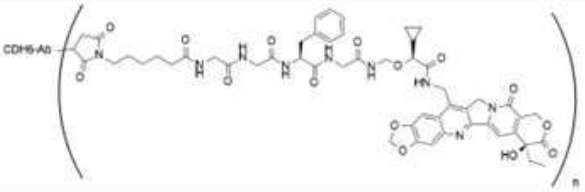
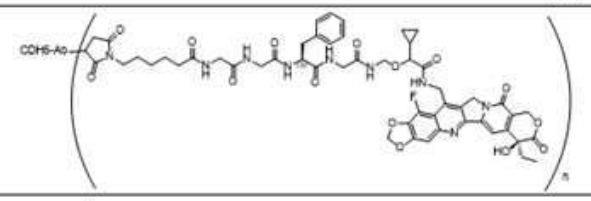
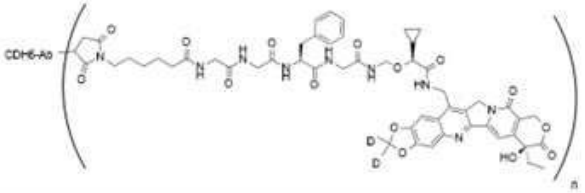
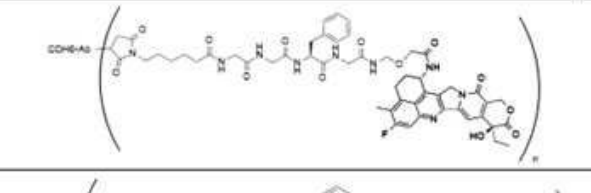
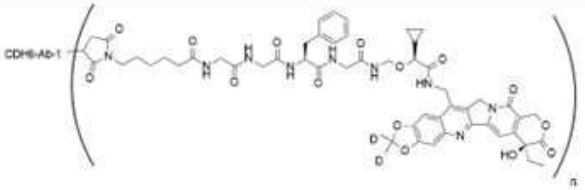
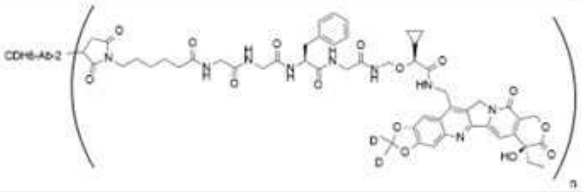
[0964] 상기와 동일한 방법을 사용하여, 항체 ROR1-Ab-1, ROR1-Ab-2 및 ROR1-Ab-3을 각각 화합물 L1-0에 커플링시켜, DAR 값이 각각 6.6, 5.5 및 7.5인 ADC-L1-0-8, ADC-L1-0-9 및 ADC-L1-0-10을 제조하여 얻고; 항체 LIV1-Ab-1을 화합물 L1-0에 커플링시켜 DAR 값이 6.7인 ADC-L1-0-7을 얻고; 항체 trastuzumab, pertuzumab을 각각 화합물 L1-00에 커플링시켜 DAR 값이 각각 6.8과 7.3인 ADC-L1-00-2 및 ADC-L1-00-11을 얻고; 항체 trastuzumab, pertuzumab을 각각 화합물 L1-0에 커플링시켜 DAR 값이 모두 7.3인 ADC-L1-0-2 및 ADC-L1-0-11을 얻으며; 항체 CDH6-Ab, CDH6-Ab-2, CDH6-Ab-3을 각각 화합물 L1-0에 커플링시켜 DAR 값이 각각 7.4, 7.4 및 7.2인 ADC-L1-0-3, ADC-L1-0-5 및 ADC-L1-0-6을 얻었다.

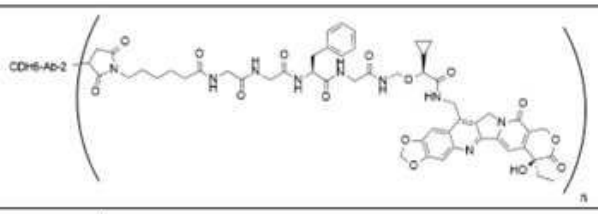
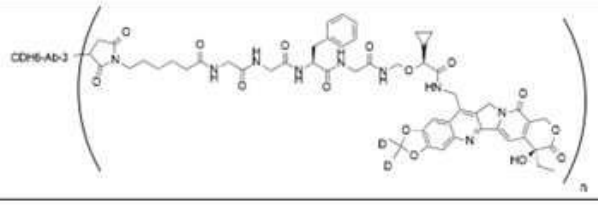
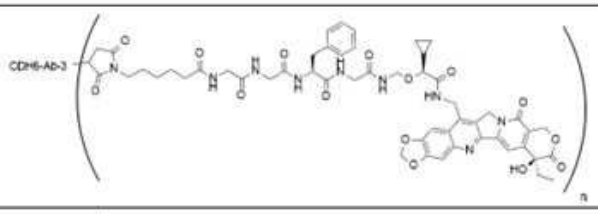
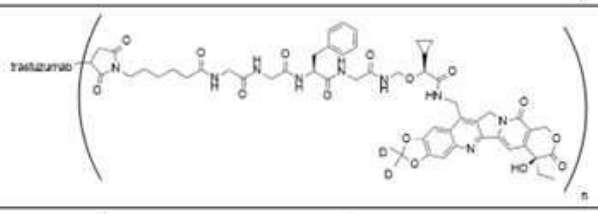
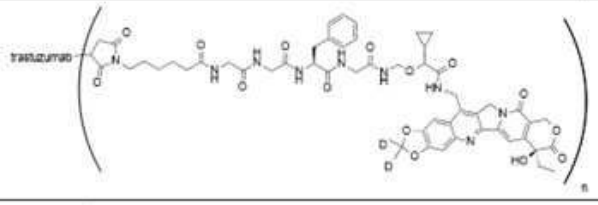
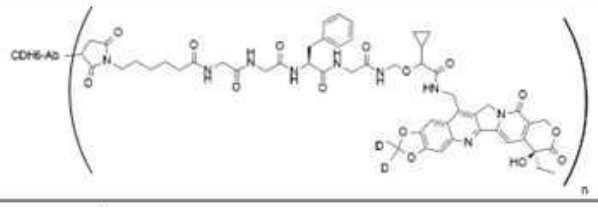
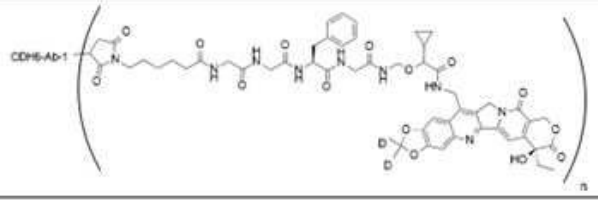
표 9. 항체-약물 접합체, 이의 DAR 값 및 SEC 순도

접합체 번호	ADC 구조	DAR	SEC 순도(단량체%)
ADC-L1-14-P2-1		8.0	95.7
ADC-L2-14-P2-1		8.4	97.0
ADC-L1-21-1		7.6	94.3
ADC-L2-21-1		6.7	92.3
ADC-L2-31-2		7.4	91.4
ADC-L1-14-P1-2		7.0	90.1

[0965]

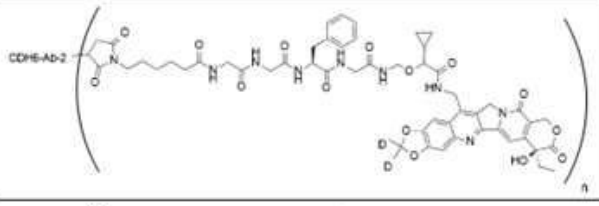
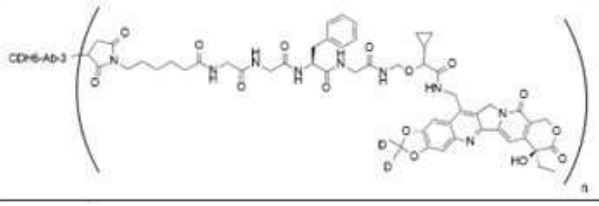
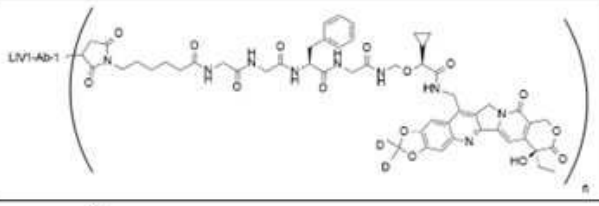
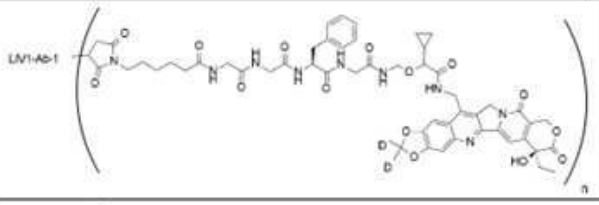
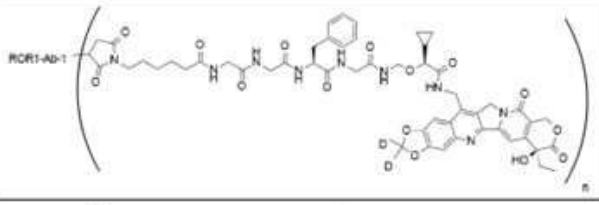
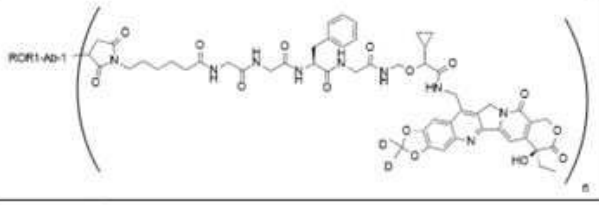
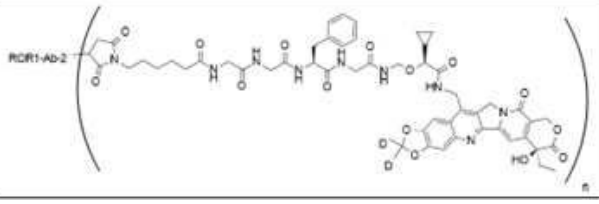
[0966]

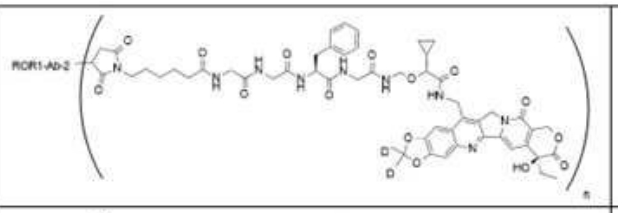
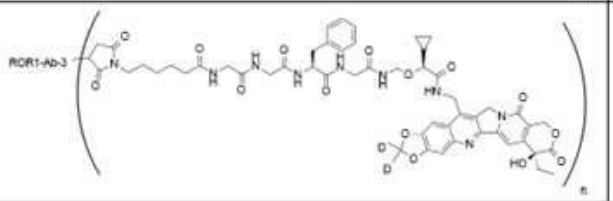
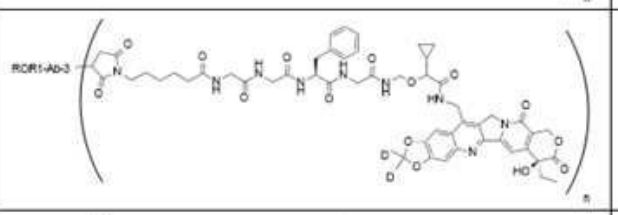
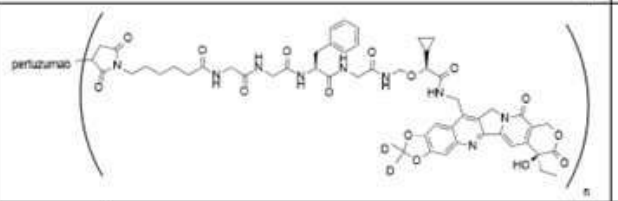
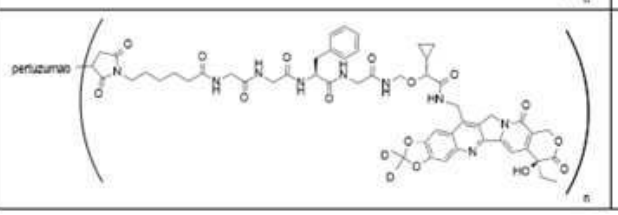
ADC-L1-14-P2-2		7.4	83.7
ADC-L1-14-P1-3		8.5	93.1
ADC-L1-35-P1-3		8.0	93.1
ADC-L1-19-P1-3		7.2	93.7
ADC-DS		7.5	92.83
ADC-L1-19-P1-4		6.9	95.25
ADC-L1-19-P1-5		8.2	96.03

ADC-L1-14-P1-5		7.8	97.05
ADC-L1-19-P1-6		8.0	92.86
ADC-L1-14-P1-6		7.6	92.89
ADC-L1-19-P1-2		7.6	83.33
ADC-L1-19-2		7.0	88.3
ADC-L1-19-3		7.1	94.09
ADC-L1-19 -4		6.3	94.25

[0967]

[0968]

ADC-L1-19 -5		6.8	93.95
ADC-L1-19 -6		7.4	91.92
ADC-L1-19-P1-7		8.3	95.2
ADC-L1-19 -7		6.5	90.1
ADC-L1-19-P1-8		7.7	93.7
ADC-L1-19 -8		7.1	91.38
ADC-L1-19-P1-9		7.7	98.96

ADC-L1-19 -9		7.3	94.62
ADC-L1-19-P1-10		8.0	93.9
ADC-L1-19 -10		7.2	88.1
ADC-L1-19-P1-11		7.3	90.71
ADC-L1-19 -11		7.0	90.04

[0969]

[0970] **실시예 41: 생물학적 활성 및 관련 특성 시험**

[0971] 하기 시험예의 화합물은 모두 본 개시의 상술한 실시예의 방법에 따라 제조하여 얻었다.

[0972] **시험예 1. 식 (D-H) 화합물의 항종양 세포의 증식 활성 시험**

[0973] **세포 및 재료:** 인간 결장직장암 세포계 HCT116은 Kyinno로부터 구입하고, 인간 유방암 세포계 SKBR3은 ATCC로부터 구입하고, 인간 난소암 세포계 OVCAR3은 ATCC로부터 구입하고, 소 혈청(Gibco#10099-141C), McCoy's 5a 배지(Gibco#16600-082), 1640 배지(Gibco#A10491-01), 페니실린-스트렙토마이신(Gibco#15140-122) 및 0.25% Trypsin-EDTA(Gibco#25200-056)는 Gibco 회사(미국)로부터 구입하고, 소 인슐린(Solarbio#I8040)은 Solarbio 회사로부터 구입하고, 96웰 플레이트(Greiner Bio-one#655098)는 Corning 회사(미국)로부터 구입하며, Cell-Titer Glo 시약(Promega#G7568)은 Promega 회사(미국)로부터 구입하였다.

[0974] **세포 배양:** HCT116 세포 및 SKBR3 세포를 모두 37℃, 5%의 CO_2 조건에서, 10%의 소태아 혈청+1%의 페니실린-스트렙토마이신을 함유하는 McCoy's 5a 배양액으로 배양하고, OVCAR3 세포를 37℃, 5%의 CO_2 조건에서, 20%의 소태아 혈청+2μg/mL의 소 인슐린+1%의 페니실린-스트렙토마이신을 함유하는 1640 배양액으로 배양하였다. 로그 성장기에 처한 세포만 실험에 사용할 수 있다.

[0975] **세포 증식 활성 검출:** Cell-Titer Glo 시약을 이용하여 HCT116, SKBR3 및 OVCAR3 세 가지 세포주의 증식에 대한 화합물의 억제 활성을 검출하였다. HCT116 세포(웰당 1500개), SKBR3 세포(웰당 3000개) 및 OVCAR3 세포(웰당 5000개)를 96웰 플레이트에 접종하고 37℃, 5%의 CO_2 조건에서 24시간 동안 배양하였다. 시험 대상 화합물 용액을 첨가한 후(화합물의 농도가 1mM이 되도록 DMSO로 용해시킨 다음, DMSO를 이용하여 화합물을 3μM까지 희석하고, 총 9개 농도로 3배 희석하여, 최종 농도가 0~300nM이 되도록 배합된 화합물 용액 10μL를 96웰 플레이트에 옮김), 37℃, 5%의 CO_2 조건에서 계속 배양하였다. HCT116 세포는 3일 동안 배양하고, SKBR3 세포와 OVCAR3 세포는 5일 동안 배양하였다. Cell-Titer Glo 시약을 첨가하고 세포 활성을 검출하였다.

[0976] 음성 대조군과 양성 대조군을 각각 Bottom과 Top으로 설정하였다. 음성 대조군은 세포를 첨가하지 않고 동일한 부피의 배지만 첨가하며, 기타 조작은 실험군과 일치하며; 양성 대조군은 시험 약물을 첨가하지 않고 기타 조작은 실험군과 일치하다.

[0977] **데이터 분석:** 억제율(% Inhibition)을 계산하고 화합물 IC_{50}을 피팅하였다.

[0978] 억제율(% Inhibition)=1-100%*(Signal-Bottom)/(Top-Bottom)

[0979] Signal은 실험군의 신호 값을 가리키며, Bottom은 음성 대조군의 평균 신호 값을 가리키고, Top은 양성 대조군의 평균 신호 값을 가리킨다.

[0980] **실험 결과:**

[0981] 본 실험 조건에서, 본 개시의 화합물은 HCT116 세포, SKBR3 세포 및 OVCAR3 세포에 대해 모두 강력한 증식 억제 활성을 나타냈다. 본 개시 화합물의 상응하는 항세포 증식 활성에 대한 구체적인 내용은 표 10을 참조한다.

표 10. 식 (D-H) 화합물의 항종양 세포 증식 활성

화합물	HCT116 항증식 활성 IC_{50} (nM)	SKBR3 항증식 활성 IC_{50} (nM)	OVCAR3 항증식 활성 IC_{50} (nM)
화합물 1	N/A	8.5	N/A
화합물 3	N/A	3.6	N/A
화합물 5	N/A	3.3	N/A
화합물 6	N/A	4.8	2.1
화합물 7	++	N/A	N/A
화합물 9	+++	2.1	N/A
화합물 10	+++	2.3	N/A
화합물 11	N/A	3.2	N/A
화합물 13	+++	N/A	0.7
화합물 14	+++	2.2	0.9
화합물 14-P1	+++	2.1	0.6
화합물 14-P2	++	3.5	1.0
화합물 15	++	N/A	N/A
화합물 16	+++	2.3	N/A
화합물 17	+++	2.7	N/A
화합물 18	++	5.1	N/A
화합물 19	+++	2.9	1.0
화합물 19-P1	+++	1.9	0.6
화합물 19-P2	+++	2.9	1.0
화합물 20	++	10.5	N/A
화합물 21	+++	4.0	1.7
화합물 22	+++	3.5	1.4
화합물 23	+++	5.3	3.9
화합물 25	+++	3.7	2.0
화합물 26	+++	4.2	1.6
화합물 27	++	N/A	N/A
화합물 28	+++	N/A	N/A
화합물 29	++	N/A	N/A
화합물 30	+++	N/A	0.4
화합물 31	+++	N/A	0.2
화합물 33	+++	N/A	0.8
화합물 34	+++	N/A	0.6
화합물 35	+++	3.5	1.2
화합물 35-P1	+++	2.1	0.5
화합물 35-P2	N/A	3.6	1.8

[0982]

[0983] 위의 표에서 결합 활성을 나타내는 데 사용되는 부호가 나타내는 의미는 다음과 같다:

[0984] "+++"는 시험 대상 화합물의 세포 증식에 대한 억제 활성 IC_{50} 범위가 <10nM임을 나타냄.

[0985] "++"는 시험 대상 화합물의 세포 증식에 대한 억제 활성 IC_{50} 범위가 10~100nM임을 나타냄.

[0986] "N/A"는 시험되지 않았음을 나타냄.

[0987] **시험예 2. 항-p95HER2/HER2 이중 항체 BsAb02-P의 Biacore 측정**

[0988] 상기 실험은 Biacore 8K(GE) 기기를 사용하고, 다중 순환 동역학을 채택하여 시험 대상 항체 BsAb02-P의 인간 p95HER2(hu p95HER2.ECD-Fc, SEQ ID NO: 104, 이탤릭체는 인간 p95HER2 세포외 영역이고, 밑줄부분은 Fc 태그이며: *MPIWKFPDEEGACQPCPINCTHSCV*

[0989] *DLDDKGCPAEQRASPLT*EPKSSDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK, 이 단백질을 자체적으로 발현하여 제조함) 및 HER2(Acro로부터 구입, HE2-H5225)와의 친화력을 측정하였다.

[0990] 실험의 러닝 완충액은 1×HBS-EP+완충액(10mM의 HEPES, 150mM의 NaCl, 3mM의 EDTA, 0.05%의 surfactant P20)(Cat. # BR-1006-69, GE)이며, 유동 셀 온도는 25℃로 설정하고 샘플 챔버 온도는 16℃로 설정하였다. 양자는 모두 러닝 완충액으로 전처리하였다. 일정량의 시험 대상 항체를 Protein A 바이오센서 칩(Cat. # 29127556, GE)으로 친화력에 의해 포획한 후, 일정 농도의 인간 p95HER2 항원 또는 인간 HER2 항원을 칩 표면에 흐르게 하고, Biacore 8K 기기(GE)를 이용하여 반응 신호를 실시간으로 검출하여 결합 및 해리 곡선을 얻었다. 각 해리 주기가 완료된 후, pH 1.5의 글리신-염산 재생 용액(Cat. # BR-1003-54, GE)으로 항원-항체 복합체를 세척하고 재생시켰다. 구체적으로, 용액에 다양한 농도의 인간 p95HER2 및 인간 HER2 항원, 30μL/분의 유속으로 240초 동안 주사하며 50nM부터 시작하여 1:1로 희석하고 일련의 농도 구배를 설정하여 이들의 결합 과정을 검출하고; 해리 시간은 최대 900초이며, 마지막으로 30μL/분의 유속으로 30초 동안 10mM 글리신-염산 용액(pH 1.5)으로 세척하여 칩 표면의 재생을 완료하였다.

[0991] GE Biacore 8K Evaluation version 2.0 소프트웨어를 사용하여 (1:1) Langmuir 모델에 의해 실험에서 얻은 데이터를 피팅하고, 결합 속도(Ka), 해리 속도(Kd) 및 친화력 값(KD)을 얻었으며, 구체적인 내용은 표 11~12를 참조한다. 실험 결과는, 본 개시의 p95HER2/HER2 이중 항체가 인간 p95HER2 및 HER2에 높은 친화력으로 결합할 수 있음을 나타낸다.

[0992] 표 11. p95HER2/HER2 이중 항체와 인간 p95HER2 단백질의 반응 친화력

항체	Ka (1/Ms)	Kd (1/s)	KD (M)
BsAb02-P	6.23E+04	6.03E-05	9.68E-10

[0993] 표 12. p95HER2/HER2 이중 항체와 인간 HER2 단백질의 반응 친화력

항체	Ka (1/Ms)	Kd (1/s)	KD (M)
BsAb02-P	2.07E+05	6.11E-05	2.95E-10

[0994] **시험예 3-1. SKBR3 종양 세포에 대한 항-HER2 ADC 및 항체의 결합 활성을 검출하는 유세포 실험(FACS)**

[0995] SKBR3 세포(ATCC로부터 유래)를 수집한 후 계수하여, 96웰 플레이트(Corning, 3795)에 2×10^5개/웰로 플레이트하였다. 구배 희석된 시험 대상 샘플을 첨가하고 4℃에서 1시간 동안 인큐베이션하였다. 얼음처럼 차가운 PBS로 2회 세척한 후, Alexa Fluor-647 염소 항-인간 Fc 2차 항체(JacksonImmuno, 109-605-098)를 첨가하고 4℃에서 1시간 동안 인큐베이션하였다. 얼음처럼 차가운 PBS로 2회 세척한 후, 세포를 재현탁시키고 평균 형광 강도(MFI)를 유세포 분석기(BD FACSCanto™ II)를 사용하여 분석하였다. Graphpad Prism 소프트웨어를 사용하여 데이터에 대한 4-파라미터 곡선 피팅 분석을 수행하여 EC_{50} 값을 얻었으며, 결과는 표 13에 나타난 바와 같다.

[0996] 표 13. SKBR3 종양 세포에 대한 항-HER2 ADC 및 항체의 결합 반응의 FACS 검출

접합체/항체 번호	EC_{50} (nM)
ADC-L1-19-2	3.34
ADC-L1-19-P1-2	3.26
Trastuzumab	3.38
ADC-L1-19-11	4.75
ADC-L1-19-P1-11	4.51
Pertuzumab	3.73

[0997] **시험예 3-2. 안정적 형질감염 세포주 MCF7-hROR1 clone 2G2에 대한 항-ROR1 ADC 및 항체의 결합 활성 시험**

[0998] **안정적 형질감염 세포주 구축**

[0999] 인간 ROR1 아미노산 서열(SEQ ID NO: 105)을 코딩하는 뉴클레오티드 서열을 pLVX 렌티바이러스 벡터에 클로닝하고, HEK293T 세포에서 바이러스 입자를 제조하였다. MCF7 세포계(중국과학기술원으로부터 구입)를 렌티바이러스로 감염시킨 후, 5μg/mL 퓨로마이신(Gibco, 카탈로그 번호: A1113803)이 들어있는 10%(w/w)의 소태아 혈청(ExCell Bio, 카탈로그 번호: FND500)을 함유하는 DMEM(Gibco, 카탈로그 번호: 11995073) 배지에서 1주일 동안 선택적으로 배양하고, 유세포 분석기 FACS Aria III(BD Biosciences로부터 구입)에서 ROR1-Ab-1 및 염소 항 마우스 IgG(H+L) 항체(Jackson, 카탈로그 번호: 115605006)를 사용하여 발현 수준이 다른 양성 세포 집단을 96웰 플레이트에 선별하고, 37℃, 5%(v/v)의 CO_2에서 배양하여, 약 2주 후 일부 세포를 선택하여 증폭시키고, 더 나은 성장 추세, 더 높은 형광 강도, 더 나은 균일성을 갖는 양성 세포 집단을 선택하여 계속해서 확장 배양하고, 액체 질소에서 동결 보존하였다. 안정적 형질감염 단클론 세포주의 검정은 표 14를 참조한다.

표 14. 인간 ROR1 단백질에 대한 MCF7 안정적 형질감염 세포계의 FACS 검출 결과

번호	안정적 형질감염 양성 세포 집단	세포 평균 형광 밀도	
		IgG 하위 유형 대조	ROR1-Ab-1
1	MCF7-hROR1 clone 2G2	54.7	26497

[1000]

[1001] 전장 인간 ROR1 아미노산 서열(SEQ ID NO: 105):

[1002] QETELSVSAELVPTSSWNISSELNKDSYLTLDEPMNNITTSLGQTAELHCKVSGNPPPTIRWFKNDAPVVQEPRRLSFRSTIYGSRLRIRNLDTTDTGYFQC
VATNGKEVVSSTGVLFVKFGPPPTASPGYSDEYEEDGFCQPYRGIACARFIGNRTVYMESLHMQGEIENQITAAFTMIGTSSHLSDKCSQFAIPSLCHYAFP
YCDETSSVPKPRDLCRDECEILENVLCQTEYIFARSNPMILMRLKLPNCEDLPQPESPEAANCIRIGIPMADPINKNHKCYNSTGVDYRGTVSVTKSGRQCQ
PWNSQYPHTHTFTALRFPELNGGHSYCRNPGNQKEAPWCFTLDENFKSDLCDIPACDSKDSKEKNKMEILY

[1003] **안정적 형질감염 세포주 MCF7-hROR1 clone 2G2에 대한 항-ROR1 ADC 및 항체의 결합 활성을 검출하는 유세포 실험(FACS)**

[1004] 상술한 단계에서 구축된 안정적 형질감염 세포주 MCF7-hROR1 clone 2G2를 T-75 세포 배양 플라스크에서 로그 성장기까지 확장 배양하고, 원심분리하여 배지 상청액을 버리고, 세포 펠렛을 PBS로 2회 세척하고, 시험 대상 ADC와 항체를 첨가하고 시작 농도 100nM, 8개 포인트의 5배 구배 희석으로, 4℃에서 1시간 동안 인큐베이션하다. PBS로 2회 세척한 후 2차 항체: Alexa Fluor® 647 AffiniPure Goat Anti-Human IgG(H+L)(Jackson Immuno로부터 구입, 카탈로그 번호: 109-605-088)를 첨가하고 4℃에서 1시간 동안 인큐베이션하였다. PBS로 2회 세척한 후, 세포를 재현탁시키고 FACS(FACS CantoTM, BD 회사로부터 구입)로 검출 및 분석하였다. Graphpad Prism 소프트웨어를 사용하여 데이터에 대한 4-파라미터 곡선 피팅 분석을 수행하여 EC_{50} 값을 얻었으며, 결과는 표 15에 나타난 바와 같다.

표 15. MCF7-hROR1 clone 2G2 세포에 대한 항-ROR1 ADC 및 항체의 결합 활성의 FACS 검출

결합체/항체 번호	EC_{50} (nM)
ADC-L1-19-8	0.68
ADC-L1-19-P1-8	0.34
ADC-L1-0-8	0.75
ROR1-Ab-1	0.99
ADC-L1-19-9	0.42
ADC-L1-19-P1-9	0.50
ADC-L1-0-9	0.43
ROR1-Ab-2	0.98
ADC-L1-19-10	0.98
ADC-L1-19-P1-10	0.57
ADC-L1-0-10	1.25
ROR1-Ab-3	0.91

[1005]

[1006] **시험예 3-3. OVCAR3 종양 세포에 대한 항-LIV-1 ADC 및 항체의 결합 활성을 검출하는 유세포 실험(FACS)**

[1007] OVCAR3 세포(ATCC로부터 유래)는 LIV-1의 고발현 종양 모델에 속하며, OVCAR3 세포를 수집한 후 계수하여 96웰 플레이트에 2×10^5개/웰로 플레이트하였다(Corning, 3795). 구배 희석된 시험 대상 샘플을 첨가하고 4℃에서 1시간 동안 인큐베이션하였다. 얼음처럼 차가운 PBS로 2회 세척한 후, Alexa Fluor-647 Goat anti-human Fc 2차 항체(JacksonImmuno, 109-605-098)를 첨가하고 4℃에서 1시간 동안 인큐베이션하였다. 얼음처럼 차가운 PBS로 2

회 세척한 후, 세포를 재현탁시키고 평균 형광 강도(MFI)를 유세포 분석기(BD FACSCanto™ II)를 사용하여 분석하였다. Graphpad Prism 소프트웨어를 사용하여 데이터에 대한 4-파라미터 곡선 피팅 분석을 수행하여 EC_{50} 값을 얻었으며, 결과는 표 16에 나타난 바와 같다.

표 16. OVCAR3 종양 세포에 대한 항-LIV-1 ADC 및 항체의 결합 반응의 FACS 검출

접합체/항체 번호	EC_{50} (nM)
ADC-L1-19-7	0.83
ADC-L1-19-P1-7	0.67
ADC-L1-0-7	1.45
LIV1-Ab-1	0.53

[1008]

[1009] **시험예 4-1. 항-HER2-ADC 종양 세포 증식 활성 시험 1**

[1010] **세포 및 재료**: 인간 유방암 세포계 SKBR3은 ATCC로부터 구입하고, 인간 유방암 세포계 SKBR3-p95HER2는 Simcere Pharmaceutical에서 구축하고(구축 방법은 특허 출원 CN202210094806.6 참조), 인간 난소암 세포계 SKOV3은 ATCC로부터 구입하고, 소 혈청, McCoy's 5a 배지, 페니실린-스트렙토마이신 및 0.25%의 Trypsin-EDTA는 Gibco 회사(미국, 카탈로그 번호는 시험예 1과 동일함)로부터 구입하고, 96웰 플레이트는 Corning 회사(미국, 카탈로그 번호는 시험예 1과 동일함)로부터 구입하며, Cell-Titer Glo 시약은 Promega 회사(미국, 카탈로그 번호는 시험예 1과 동일함)로부터 구입하였다.

[1011] **세포 배양**: SKBR3 세포, SKBR3-p95HER2 세포 및 SKOV3 세포를 모두 37℃, 5%의 CO_2 조건에서, 10%의 소태아 혈청+1%의 페니실린-스트렙토마이신을 함유하는 McCoy's 5a 배양액으로 배양하고, 로그 성장기에 처한 세포만 실험에 사용할 수 있다.

[1012] **세포 증식 활성 검출**: Cell-Titer Glo 시약을 이용하여 SKBR3, SKBR3-p95HER2 및 SKOV3 세 가지 세포주의 증식에 대한 ADC의 억제 활성을 검출하였다. SKBR3 세포(웰당 3000개), SKBR3-p95HER2 세포(웰당 3000개) 및 SKOV3 세포(웰당 600개)를 96웰 플레이트에 접종하고 37℃, 5%의 CO_2 조건에서 24시간 동안 배양하였다. 시험 대상 ADC 용액을 첨가한 후(ADC를 세포에 대응하는 상술한 배지로 희석하고, ADC 농도를 20nM 또는 200nM으로 조정한 후, 배지로 총 8개의 농도로 3배 구배로 계속 희석하여, 시작 최종 농도가 실제로 2nM 또는 20nM이 되도록 배합된 ADC 용액 10μL를 96웰 플레이트에 옮김), 37℃, 5%의 CO_2 조건에서 계속 배양하였다. SKBR3 세포, SKBR3-p95HER2 세포 및 SKOV3 세포는 5일 동안 배양하였다. Cell-Titer Glo 시약을 첨가하고 세포 활성을 검출하였다.

[1013] 음성 대조군과 양성 대조군을 각각 Bottom과 Top으로 설정하였다. 음성 대조군은 세포를 첨가하지 않고 동일한 부피의 배지만 첨가하며, 기타 조작은 실험군과 일치하며; 양성 대조군은 시험 약물을 첨가하지 않고 기타 조작은 실험군과 일치하다.

[1014] **데이터 분석**: 억제율(% Inhibition)을 계산하고 화합물 IC_{50}을 피팅하였다.

[1015] 억제율(% Inhibition)=1-100%*(Signal-Bottom)/(Top-Bottom)

[1016] Signal은 실험군의 신호 값을 가리키며, Bottom은 음성 대조군의 평균 신호 값을 가리키고, Top은 양성 대조군의 평균 신호 값을 가리킨다.

[1017] **실험 결과**: 본 실험 조건에서, 본 개시의 ADC는 SKBR3 세포, SKBR3-p95HER2 세포 및 SKOV3 세포에 대해 모두 강력한 증식 억제 활성을 나타내었으며, 상세한 내용은 표 17을 참조한다.

표 17. ADC 항종양 세포 증식 활성

접합체 번호	SKBR3/p95 항증식 활성 (IC_{50}, nM)	SKBR3 항증식 활성 (IC_{50}, nM)	SKOV3 항증식 활성 (IC_{50}, nM)
ADC-L1-14-P2-1	0.05187	N/A	N/A
ADC-L2-14-P2-1	0.03691	N/A	N/A
ADC-L1-21-1	0.1428	N/A	N/A
ADC-L2-21-1	0.1694	N/A	N/A
ADC-L2-31-2	N/A	0.04567	0.2052
ADC-L1-14-P1-2	N/A	0.03227	0.1249
ADC-L1-14-P2-2	N/A	0.03108	0.116

[1018] "N/A"는 시험되지 않았음을 나타냄.

[1019] **시험예 4-2. 항-HER2-ADC 종양 세포 증식 활성 시험 2**

[1020] **세포 및 재료:** 인간 유방도관암 세포계 T47D(중발현 세포계)는 ATCC로부터 구입하고, 인간 유방암 세포계 SKBR3은 ATCC로부터 구입하고, McCoy's 5a 배지(Gibco#16600-082), 1640 배지(Gibco#A10491-01), 페니실린-스트렙토마이신(Gibco#15140-122) 및 0.25%의 Trypsin-EDTA(Gibco#25200-056)는 Gibco 회사(미국)로부터 구입하고, 96웰 플레이트(Greiner Bio-one#655098)는 Corning 회사(미국)로부터 구입하며, Cell-Titer Glo 시약(Promega#G7568)은 Promega 회사(미국)로부터 구입하였다.

[1021] **세포 배양:** SKBR3 세포를 10%의 소태아 혈청+1%의 페니실린-스트렙토마이신을 함유하는 McCoy's 5a 배양액으로, T47D 세포를 10%의 소태아 혈청+1%의 페니실린-스트렙토마이신을 함유하는 1640 배양액으로, 두 세포주를 모두 37℃, 5%의 CO_2 조건에서 배양하였고, 로그 성장기에 처한 세포만 실험에 사용할 수 있다.

[1022] **세포 증식 활성 검출:** Cell-Titer Glo 시약을 이용하여 SKBR3 및 T47D 두 가지 세포주의 증식에 대한 ADC의 억제 활성을 검출하였다. SKBR3 및 T47D 세포를 세포 배양 플라스크에서 소화 및 분산 처리하고, 대응하는 신선한 배지로 재현탁시키고, 세포 밀도를 조정하였다. T47D 세포를 2000개 세포/90μL/웰로 96웰 플레이트에 접종하고 37℃, 5%의 CO_2 조건에서 밤새 배양하였다. ADC 농도를 완전 배지로 1000nM까지 희석하고, 총 8개의 농도 구배로 3배 구배 희석한 후, 10μL의 ADC 희석 용액을 96웰 플레이트에 옮기고, 즉 ADC 시작 농도는 100nM이었다. 96웰 플레이트를 37℃, 5%의 CO_2 조건에서 7일 동안 배양하였다. Cell-Titer Glo 시약을 첨가하고 세포 활성을 검출하였다.

[1023] SKBR3 세포를 5000개 세포/90μL/웰로 96웰 플레이트에 접종하고 37℃, 5%의 CO_2 조건에서 밤새 배양하였다. ADC 농도를 완전 배지로 1000nM까지 희석하고, 총 9개의 농도 구배로 5배 구배 희석한 후, 10μL의 ADC 희석 용액을 96웰 플레이트에 옮기고, 즉, ADC 시작 농도 100nM이었다. 96웰 플레이트를 37℃, 5%의 CO_2 조건에서 3일 동안 배양하였다. Cell-Titer Glo 시약을 첨가하고 세포 활성을 검출하였다.

[1024] 음성 대조군과 양성 대조군을 각각 Bottom과 Top으로 설정하였다. 음성 대조군은 세포를 첨가하지 않고 동일한 부피의 배지만 첨가하며, 기타 조작은 실험군과 일치하며; 양성 대조군은 시험 약물을 첨가하지 않고 기타 조작은 실험군과 일치하다.

[1025] **데이터 분석:**

[1026] 억제율(% Inhibition)을 계산하고 화합물의 IC_{50}을 피팅하여 도출하였다.

[1027] 억제율(% Inhibition)=1-100%*(Signal-Bottom)/(Top-Bottom).

[1028] Signal은 실험군의 신호 값을 가리키며, Bottom은 음성 대조군의 평균 신호 값을 가리키고, Top은 양성 대조군의 평균 신호 값을 가리킨다.

[1029] **실험 결과:**

[1030] 표 18을 **참조하면**, 본 실험 조건에서, 본 개시의 항-HER2-ADC는 인간 유방도관암 세포계 T47D 및 인간 유방암 세포계 SKBR3에 대해 강력한 증식 억제 활성을 나타내었다.

표 18. ADC 항종양 세포 증식 활성

접합체 번호	T47D		SKBR3	
	IC_{50}(nM)	최대 억제율(%)	IC_{50}(nM)	최대 억제율(%)
ADC-L1-19-11	5.329	89.4	0.0005041	64.5
ADC-L1-19-P1-11	1.671	88.9	0.01225	55.4
ADC-L1-00-11	12.16	90.8	1.413	35.4
ADC-L1-19-2	6.93	90.6	0.0832	54.0
ADC-L1-19-P1-2	3.552	92.5	0.0852	54.3
ADC-L1-00-2	13.97	90.5	0.4424	41.7

[1031]

[1032] **시험예 5. 항-CDH6 항체 및 대응하는 ADC의 세포 결합 활성**

[1033] OVCAR3 세포를 수집한 후 계수하여, 96웰 플레이트(Corning, 3795)에 2×10^5 개/웰로 플레이트하였다. 구배 희석된 시험 대상 샘플을 첨가하고 4℃에서 1시간 동안 인큐베이션하였다. 얼음처럼 차가운 PBS로 2회 세척한 후, Alexa Fluor-647 Goat anti-human Fc 2차 항체(JacksonImmuno, 109-605-098)를 첨가하고 4℃에서 1시간 동안

인큐베이션하였다. 얼음처럼 차가운 PBS로 2회 세척한 후, 세포를 재현탁시키고 평균 형광 강도(MFI)를 유세포 분석기(BD FACSCanto™ II)를 사용하여 분석하였다. Graphpad Prism 소프트웨어를 사용하여 데이터에 대한 4-파라미터 곡선 피팅 분석을 수행하여 EC_{50} 값을 얻었으며, 결과는 표 19에 나타난 바와 같다.

표 19. OVCAR3 세포에 대한 CDH6 항체 및 CDH6-ADC의 결합 활성

접합체/항체 번호	EC_{50} (nM)
ADC-L1-14-P1-3	0.49
ADC-L1-19-3	0.34
ADC-L1-19-P1-3	0.36
CDH6-Ab	0.71
ADC-L1-19-5	0.51
ADC-L1-19-P1-5	0.53
CDH6-Ab-2	0.63
ADC-L1-19-6	0.85
ADC-L1-19-P1-6	0.80
CDH6-Ab-3	0.78

[1034]

[1035] **시험예 6-1. 항-CDH6-ADC 항종양 세포 증식 활성 시험**

[1036] **세포 및 재료:** 인간 난소암 세포계 OVCAR3(CDH6 고발현 세포계)은 ATCC로부터 구입하고, 인간 난소 기형종 세포계 PA-1은 ATCC로부터 구입하고, 소혈청, 1640 배지(Gibco#A10491-01), MEM 배지(Gibco#11095-080), MEM NEAA(Gibco#11140-050), 피루브산나트륨(Gibco#11360-070), 페니실린-스트렙토마이신 및 0.25%의 Trypsin-EDTA(Gibco#25200-056)는 Gibco 회사로부터 구입하고, 소 인슐린은 Solarbio 회사로부터 구입하고, 96웰 플레이트는 Corning 회사(미국)로부터 구입하며, Cell-Titer Glo 시약은 Promega 회사(미국)로부터 구입하였다.

[1037] **세포 배양:** OVCAR3 세포를 37℃, 5%의 CO_2 조건에서, 20%의 소태아 혈청+2 μg/mL의 소 인슐린+1%의 페니실린-스트렙토마이신을 함유하는 1640 배양액으로 배양하고, PA-1 세포를 모두 37℃, 5%의 CO_2 조건에서, 10%의 소태아 혈청+1%의 MEM NEAA+1%의 피루브산나트륨+1%의 페니실린-스트렙토마이신을 함유하는 MEM 배양액으로 배양하였다. 로그 성장기에 처한 세포만 실험에 사용할 수 있다.

[1038] **세포 증식 활성 검출:** Cell-Titer Glo 시약을 이용하여 OVCAR3 및 PA-1 두 가지 세포주의 증식에 대한 ADC의 억제 활성을 검출하였다. OVCAR3 및 PA-1 세포를 세포 배양 플라스크에서 소화 및 분산 처리하고, 대응하는 신선한 배지로 재현탁시키고, 세포 밀도를 조정하고, OVCAR3 세포(웰당 5000개) 및 PA-1 세포(웰당 800개)를 96웰 플레이트에 접종하고 37℃, 5%의 CO_2 조건에서 24시간 동안 배양하였다. 시험 대상 ADC 용액을 첨가한 후(ADC를 세포에 대응하는 상술한 배지로 희석하고, ADC 농도를 100nM으로 조정한 후, 배지로 총 8개의 농도로 3배 구배로 계속 희석하여, 최종 농도가 0~10nM이 되도록 배합된 ADC 용액 10 μL를 96웰 플레이트에 옮김), 37℃, 5%의 CO_2 조건에서 계속 배양하였다. OVCAR3 세포와 PA-1 세포는 5일 동안 배양하였다. Cell-Titer Glo 시약을 첨가하고 세포 활성을 검출하였다.

[1039] 음성 대조군과 양성 대조군을 각각 Bottom과 Top으로 설정하였다. 음성 대조군은 세포를 첨가하지 않고 동일한 부피의 배지만 첨가하며, 기타 조작은 실험군과 일치하며; 양성 대조군은 시험 약물을 첨가하지 않고 기타 조작은 실험군과 일치하다.

[1040] **데이터 분석**: 억제율(% Inhibition)을 계산하고 화합물 IC_{50}을 피팅하였다.

[1041] 억제율(% Inhibition)=1-100%*(Signal-Bottom)/(Top-Bottom)

[1042] Signal은 실험군의 신호 값을 가리키며, Bottom은 음성 대조군의 평균 신호 값을 가리키고, Top은 양성 대조군의 평균 신호 값을 가리킨다.

[1043] **실험 결과**: 본 실험의 조건에서, 본 개시의 항-CDH6-ADC는 인간 난소암 세포계 OVCAR3 및 인간 난소 기형종 세포계 PA-1 세포에 대해 모두 강력한 증식 억제 활성을 나타내었으며, 상세한 내용은 표 20을 참조한다.

표 20. ADC 항종양 세포 증식 활성

접합체 번호	OVCAR3	PA-1
	IC_{50} (nM)	IC_{50} (nM)
ADC-L1-14-P1-3	0.012	0.063
ADC-L1-35-P1-3	0.018	0.043
ADC-L1-19-P1-3	0.015	0.018
ADC-L1-19-3	0.015	0.0094
ADC-L1-14-P1-6	0.031	0.070
ADC-L1-19-P1-6	0.015	0.017
ADC-L1-19-6	0.022	0.023
ADC-L1-14-P1-5	0.028	0.030
ADC-L1-19-P1-5	0.019	0.018
ADC-L1-19-5	0.021	0.017

[1044]

[1045] **시험예 6-2. 항-LIV-1-ADC 항종양 세포 증식 활성 시험**

[1046] **세포 및 재료:** 인간 난소암 세포계 OVCAR3 및 인간 비소세포폐암 세포계 H838은 ATCC로부터 구입하고, 1640 배지(Gibco#A10491-01), 페니실린-스트렙토마이신(Gibco#15140-122) 및 0.25%의 Trypsin-EDTA(Gibco#25200-056)는 Gibco 회사(미국)로부터 구입하고, 소 인슐린(Solarbio#I8040)은 Solarbio 회사로부터 구입하고, 96웰 플레이트(Greiner Bio-one#655098)는 Corning 회사(미국)로부터 구입하며, Cell-Titer Glo 시약(Promega#G7568)은 Promega 회사(미국)로부터 구입하였다.

[1047] **세포 배양:** OVCAR3 세포를 37℃, 5%의 CO_2 조건에서, 20%의 소태아 혈청+2 μg/mL의 소 인슐린+1%의 페니실린-스트렙토마이신을 함유하는 1640 배양액으로 배양하고, H838 세포를 37℃, 5%의 CO_2 조건에서, 10%의 소태아 혈청+1%의 페니실린-스트렙토마이신을 함유하는 1640 배양액으로 배양하고, 로그 성장기에 처한 세포만 실험에 사용할 수 있다.

[1048] **세포 증식 활성 검출:** Cell-Titer Glo 시약을 이용하여 OVCAR3 및 H838 세포주의 증식에 대한 ADC의 억제 활성을 검출하였다. OVCAR3 또는 H838 세포를 세포 배양 플라스크에서 소화 및 분산 처리하고, 대응하는 신선한 배지로 재현탁시키고, 세포 밀도를 조정하고, OVCAR3 세포의 경우 1500개 세포/90 μL/웰, H838 세포의 경우 450개 세포/90 μL/웰로 96웰 플레이트에 접종하고 37℃, 5%의 CO_2 조건에서 밤새 배양하였다. ADC 농도를 완전 배지로 5000nM까지 희석하고, 총 8개의 농도 구배로 3배 구배 희석한 후, 10 μL의 ADC 희석 용액을 96웰 플레이트에 옮기고, 즉 ADC 시작 농도는 500nM이었다. 96웰 플레이트를 37℃, 5%의 CO_2 조건에서 5일 동안 배양하였다. Cell-Titer Glo 시약을 첨가하고 세포 활성을 검출하였다.

[1049] 음성 대조군과 양성 대조군을 각각 Bottom과 Top으로 설정하였다. 음성 대조군은 세포를 첨가하지 않고 동일한 부피의 배지만 첨가하며, 기타 조작은 실험군과 일치하며; 양성 대조군은 시험 약물을 첨가하지 않고 기타 조작은 실험군과 일치하다.

[1050] **데이터 분석:**

[1051] 억제율(% Inhibition)을 계산하고 화합물의 IC_{50}을 피팅하여 도출하였다.

[1052] 억제율(% Inhibition)=1-100%*(Signal-Bottom)/(Top-Bottom).

[1053] Signal은 실험군의 신호 값을 가리키며, Bottom은 음성 대조군의 평균 신호 값을 가리키고, Top은 양성 대조군의 평균 신호 값을 가리킨다.

[1054] **실험 결과:**

[1055] 본 실험 조건에서, 본 개시의 항-LIV-1-ADC는 인간 난소암 세포계 OVCAR3 및 인간 비소세포폐암 세포계 H838에 대해 강력한 증식 억제 활성을 나타내었으며, 상세한 내용은 표 21을 참조한다.

표 21. ADC 항종양 세포 증식 활성

접합체 번호	H838		OVCAR3	
	IC_{50} (nM)	최대 억제율(%)	IC_{50} (nM)	최대 억제율(%)
ADC-L1-19-7	21.8	97.5	5.126	90.7
ADC-L1-19-P1-7	17.3	96.6	3.195	91.6
ADC-L1-0-7	127.8	90.9	10.5	85.3

[1056]

[1057] **시험예 6-3. 항-ROR1-ADC 항종양 세포 증식 활성 시험**

[1058] **세포 및 재료:** 인간 유방암 세포계 hROR1-MCF7은 Simcere Zaiming에서 구축하고, DMEM 배지(Gibco#11995-065), 페니실린-스트렙토마이신(Gibco#15140-122) 및 0.25%의 Trypsin-EDTA(Gibco #25200-056)은 Gibco 회사(미국)로부터 구입하고, 96웰 플레이트(Greiner Bio-one#655098)는 Corning 회사(미국)로부터 구입하며, Cell-Titer Glo 시약(Promega#G7568)은 Promega 회사(미국)로부터 구입하였다.

[1059] **세포 배양:** hROR1-MCF7 세포를 37℃, 5%의 CO_2 조건에서, 10%의 소태아 혈청+1%의 페니실린-스트렙토마이신을 함유하는 DMEM 배양액으로 배양하고, 로그 성장기에 처한 세포만 실험에 사용할 수 있다.

[1060] **세포 증식 활성 검출:** Cell-Titer Glo 시약을 이용하여 hROR1-MCF7 세포주의 증식에 대한 ADC의 억제 활성을 검출하였다. hROR1-MCF7 세포를 세포 배양 플라스크에서 소화 및 분산 처리하고, 대응하는 신선한 배지로 재현탁시키고, 세포 밀도를 조정하고, hROR1-MCF7 세포의 경우 1700개 세포/90μL/웰로 96웰 플레이트에 접종하고, 37℃, 5%의 CO_2 조건에서 밤새 배양하였다. ADC 농도를 완전 배지로 500nM까지 희석하고, 총 9개의 농도 구배로 4배 구배 희석한 후, 10μL의 ADC 희석 용액을 96웰 플레이트에 옮기고, 즉 ADC 시작 농도는 50nM이었다. 96웰 플레이트를 37℃, 5%의 CO_2 조건에서 5일 동안 배양하였다. Cell-Titer Glo 시약을 첨가하고 세포 활성을 검출하였다.

[1061] 음성 대조군과 양성 대조군을 각각 Bottom과 Top으로 설정하였다. 음성 대조군은 세포를 첨가하지 않고 동일한 부피의 배지만 첨가하고, 기타 조작은 실험군과 일치하며; 양성 대조군은 시험 약물을 첨가하지 않으며 기타 조작은 실험군과 일치하다.

[1062] **데이터 분석:**

[1063] 억제율(% Inhibition)을 계산하고 화합물의 IC_{50}을 피팅하여 도출하였다.

[1064] 억제율(% Inhibition)=1-100%*(Signal-Bottom)/(Top-Bottom).

[1065] Signal은 실험군의 신호 값을 가리키며, Bottom은 음성 대조군의 평균 신호 값을 가리키고, Top은 양성 대조군의 평균 신호 값을 가리킨다.

[1066] **실험 결과:**

[1067] 본 실험 조건에서, 본 개시의 항-ROR1-ADC는 인간 난소암 세포계 hROR1-MCF7에 대해 강력한 증식 억제 활성을 나타내었으며, 상세한 내용은 표 22를 참조한다.

표 22.ADC 항종양 세포 증식 활성

접합체 번호	hROR1-MCF7	
	IC_{50} (nM)	최대 억제율(%)
ADC-L1-19-8	0.18	39.88
ADC-L1-19-P1-8	0.10	38.61
ADC-L1-19-9	0.31	42.34
ADC-L1-19-P1-9	0.22	44.73
ADC-L1-19-10	0.04	37.45
ADC-L1-19-P1-10	0.03	44.77

[1068]

[1069] **시험예 7. OVCAR3 피하 종양 모델의 약효 평가-1**

[1070] **실험 시약:** 인간 난소암 OVCAR3 세포는 ATCC로부터 구입하고, RPMI-1640 배지는 Gibco(카탈로그 번호 A10491 0)로부터 구입하고, 소태아 혈청은 Excell(카탈로그 번호 FND500)로부터 구입하고, 페니실린-스트렙토마이신은 Gibco(카탈로그 번호15140122)로부터 구입하고, 소 인슐린은 Yeasen(카탈로그 번호 40107ES60)로부터 구입하고, 0.25%의 트립신-EDTA는 Gibco(카탈로그 번호 25200-072)로부터 구입하고, D-PBS(칼슘 및 마그네슘 이온이 없는 인산염 완충액)는 Hyclone(카탈로그 번호 SH30256.01)로부터 구입하며, Matrigel(기질겔)은 Corning(카탈로그 번호 356237)로부터 구입하였다.

[1071] **실험 방법:**

[1072] 동물 정보: Balb/c 누드 마우스, 암컷, 5~6주령, 체중 약 14~20g, 동물은 Beijing Vital River Laboratory Animal Technology Co., Ltd.로부터 구입하며, SPF 등급 환경에서 마우스를 사육하고, 각 케이지는 단독적으로

환기되며 모든 동물은 공시적으로 인증받은 상업용 실험실 사료와 물에 자유롭게 접근할 수 있다.

[1073] 세포 배양: 인간 난소암 OVCAR3 세포주는, RPMI-1640에 20%의 소태아 혈청, 1%의 페니실린-스트렙토마이신, 10 μg/mL의 소 인슐린을 첨가하고, 37℃, 5%의 CO_2 인큐베이터의 배양 조건에서 체외 배양하였다. 주 1회 0.25%의 트립신-EDTA 소화 용액으로 일상적인 소화 처리 및 계대를 수행하였다. 세포 포화도가 80%~90%이고 수량이 요구 사항에 부합하는 경우 세포를 수집하고 계수하였다.

[1074] 세포 접종: 0.1mL의 OVCAR3 세포 현탁액(1×10^7개 세포 함유, RPMI-1640:Matrigel의 부피비는 1:1임)을 각 마우스의 겨드랑이에 피하 접종하였다. 세포를 접종한 후 26일째에, 종양의 부피에 따라 무작위로 그룹을 나누고 투약하였으며, 그룹을 나눈 당일을 Day 0으로 하였다.

[1075] **종양 측정 및 실험 지표:**

[1076] 종양 직경은 버니어 캘리퍼스를 사용하여 주 2회 측정하였다. 종양 부피의 계산 공식은 $V=0.5a\times b^2$이고, a와 b는 각각 종양의 장경과 단경을 나타낸다. 마우스 체중은 주 2회 측정하였다.

[1077] 시험 약물의 항종양 치료 효과는 종양 성장 억제율 TGI(%)로 평가하였다. TGI(%)=[(1-(특정 처리군의 투약 종료 시 평균 종양 부피-해당 처리군의 투약 시작 시 평균 종양 부피)/(용매 대조군의 치료 종료 시 평균 종양 부피-용매 대조군의 치료 시작 시 평균 종양 부피)]x100%.

[1078] **실험 결과:**

[1079] 마우스 피하 이식 종양 OVCAR3 모델에서, ADC-L1-14-P1-5는 3mg/kg의 용량으로 1회 정맥 투약한 후, 모두 종양 성장에 대해 유의한 억제 효과를 갖는다(P<0.0001). 결과는 표 23 및 도 2를 참조한다.

표 23. OVCAR3 피하 종양 모델의 종양 부피

시험 약물	투약 용량 (mg/kg)	투약 방법	투약 빈도	평균 종양 부피(mm^3)									TGI (%)
				Day0	Day4	Day7	Day11	Day14	Day18	Day22	Day25	Day28	Day28
용매 대조군	/	정맥 주사 (IV)	1회	154.3	247.1	297.8	335.8	420.3	568.8	598.1	734.3	873.7	/
ADC-DS	3			154.4	211.3	194.1	159.5	131.5	95.5	73.6	66.0	77.8	110.6
ADC-L1-14-P1-5	3			151.4	207.0	183.5	143.4	113.3	71.3	64.1	69.7	66.9	111.7

[1080]

[1081] 마우스 피하 이식 종양 OVCAR3 모델에서, ADC-L1-19-P1-5는 3mg/kg의 용량으로 1회 정맥 투약한 후, 모두 종양 성장에 대해 유의한 억제 효과를 갖는다(P<0.0001). 결과는 표 24 및 도 3을 참조한다.

표 24. OVCAR3 피하 종양 모델의 종양 부피

시험 약물	투약 용량 (mg/kg)	투약 방법	투약 빈도	평균 종양 부피(mm^3)								TGI (%)
				Day0	Day5	Day8	Day12	Day16	Day19	Day22	Day27	Day27
용매 대조군	/	정맥 주사 (IV)	1회	151.7	223.8	246.0	299.3	370.5	409.4	462.8	506.9	/
ADC-DS	3			145.0	165.9	153.4	91.4	56.2	41.2	28.9	23.4	134.2
ADC-L1-19-P1-5	3			153.4	165.0	149.3	97.3	68.7	56.6	49.4	27.3	135.5

[1082]

[1083] **시험예 8. ADC 혈장 안정성 시험**

[1084] ADC 분자(최종 농도는 100 μg/mL임)를 각각 인간 혈장(AoNeng Biotechnology Co., Ltd., PB021-C) 및 원숭이 혈장(shinuoda Biological Technology Co., Ltd., SND-X0107)과 함께 37℃ 인큐베이터에서 인큐베이션하였다. 인큐베이션한 당일을 0일째로 표지하고, 나중에 7일째, 14일째, 28일째에 각각 샘플을 꺼내어 유리 소분자를 검출하였다.

[1085] 20 μL의 샘플을 취하고 300 μL의 내부 표준 작업 용액(아세토니트릴 배합)을 첨가하고, 5분 동안 보텍스 처리하고 고르게 혼합하여, 5분 동안 원심분리(14000rpm)하고, 4 μL의 상청액 LC-MS/MS(API 6500+)으로 샘플링하여 분석하였고, 분석 결과는 표 25를 참조한다. 결과는 시험된 ADC 분자가 인간과 원숭이 혈장에서 모두 상대적으로 안정적인 것으로 나타난다.

표 25. CDH6-ADC의 혈장 안정성

혈장 유형	인큐베이션 시간 (일)	유리 소분자%	
		ADC-DS	ADC-L1-19-P1-5
인간 혈장	0	0.59	N/A
	7	0.72	0.32
	14	1.21	0.54
	28	1.90	0.99
원숭이 혈장	0	0.64	N/A
	7	2.28	0.34
	14	4.03	0.75
	28	9.66	1.53

[1086] N/A는 유리 소분자가 검출되지 않아 유리 소분자%를 계산할 수 없음을 나타냄.

[1087] **시험예 9. OVCAR3 피하 종양 모델의 약효 평가-2**

[1088] **실험 시약:**

[1089] 인간 난소암 OVCAR3 세포: ATCC

[1090] RPMI-1640 배양액: Gbico 카탈로그 번호: A104910

[1091] 소태아 혈청: Excell, FND500

[1092] 소 인슐린: Yeasen, 40107ES60

[1093] 0.25%의 트립신-EDTA: Gibco, 카탈로그 번호: 25200-072

[1094] D-PBS(칼슘 및 마그네슘 이온이 없는 인산염 완충액): Hyclone, 카탈로그 번호: SH30256.01

[1095] Matrigel: Corning, 카탈로그 번호: 356237

[1096] **실험 방법:**

[1097] 동물 정보: Balb/c 누드 마우스, 암컷, 5~6주령, 체중 약 14~20g, 동물은 Beijing Vital River Laboratory Animal Technology Co., Ltd.로부터 구입하며, SPF 등급 환경에서 마우스를 사육하고, 각 케이지는 단독적으로 환기되며 모든 동물은 공시적으로 인증받은 상업용 실험실 사료와 물에 자유롭게 접근할 수 있다.

[1098] 세포 배양: 인간 난소암 OVCAR3 세포주는, RPMI-1640(세포 배양액)에 20%의 소태아 혈청, 1%의 Pen Strep, 10 μg/mL의 소 인슐린을 첨가하고, 37℃, 5%의 CO_2 인큐베이터의 배양 조건에서 체외 배양하였다. 주 1회 0.25%의 트립신-EDTA 소화 용액으로 일상적인 소화 처리 및 계대를 수행하였다. 세포 포화도가 80%~90%이고 수량이 요구 사항에 부합하는 경우 세포를 수집하고 계수하였다.

[1099] 세포 접종: 0.1mL/(1×10^7개 세포 함유) OVCAR3 세포 현탁액(RPMI-1640:Matrigel, 부피비는 1:1임)을 각 마우스의 겨드랑이에 피하 접종하였다. 세포를 접종한 후 23일째에, 종양의 부피에 따라 무작위로 그룹을 나누고 투약하였으며, 그룹을 나눈 당일을 Day 0으로 하였다.

[1100] 투약: ADC-L1-19-P1-7 및 동형 대조 ADC-L1-19-P1-ISO의 투약 용량은 모두 3mg/kg이며 복강내 투약하였다(Q4D). 그룹당 6마리의 마우스가 있다.

[1101] **종양 측정 및 실험 지표:**

[1102] 종양 직경은 버니어 캘리퍼스를 사용하여 주 2회 측정하였다. 종양 부피의 계산 공식은 $V=0.5a\times b^2$이고, a와 b는 각각 종양의 장경과 단경을 나타낸다. 마우스 체중은 주 2회 측정하였다.

[1103] 화합물의 종양 억제 치료 효과는 종양 성장 억제율 TGI(%)로 평가하였다. TGI(%)=[(1-(특정 처리군의 투약 종료 시 평균 종양 부피-해당 처리군의 투약 시작 시 평균 종양 부피)/(용매 대조군의 치료 종료 시 평균 종양 부피-용매 대조군의 치료 시작 시 평균 종양 부피)]x100%.

[1104] **실험 결과:**

[1105] 표 26, 도 4 및 도 5를 참조한다.

표 26. OVCAR3 피하 종양 모델의 종양 부피

시험 약물	투약 용량 (mg/kg)	투약 방법	투약 빈도	평균 종양 부피(mm^3)								TGI (%)
				0일	4일	7일	11일	14일	26일	33일	40일	
용매 대조군	/	복강내 주사	4일에 1회	129	175	229	287	319	597	778	912	/
ADC-L1-19-P1-ISO	3			124	171	174	183	182	155	175	248	84.2
ADC-L1-19-P1-7	3			126	161	140	108	79	55	63	65	107.93

[1106]

[1107] **실험 결론:**

[1108] 마우스 피하 이식 종양 OVCAR3 모델에서, 본 개시의 화합물 ADC-L1-19-P1-7 및 동형 대조 ADC-L1-19-P1-ISO는 3mg/kg로 4일에 1회 복강내 투약 시 종양 성장에 대해 유의한 억제 효과($P<0.0001$)를 갖지만; 동형 대조 ADC-L1-19-P1-ISO의 종양 억제 효과는 ADC-L1-19-P1-7에 비해 유의하게 약하다($P<0.001$). 본 실시예에서, 시도된 용량에서 화합물이 마우스의 체중에 영향을 미치지 않는 동시에, 마우스의 사망도 유발하지 않아, 마우스가 일정한 내성을 보일 수 있다.

[1109] **시험예 10. NCI-H838 피하 종양 모델의 약효 평가**

[1110] **실험 시약:**

[1111] 인간 폐암 NCI-H838 세포: Kebai

[1112] RPMI-1640 배양액: Gbico; 카탈로그 번호: 61870-036

[1113] 소태아 혈청: Gibco; 카탈로그 번호: 10099-141C

[1114] 0.25%의 트립신-EDTA: Gibco, 카탈로그 번호: 25200-072

[1115] D-PBS(칼슘 및 마그네슘 이온이 없는 인산염 완충액): Hyclone, 카탈로그 번호: SH30256.01

[1116] Matrigel: Corning, 카탈로그 번호: 356237

[1117] **실험 방법:**

[1118] 동물 정보: B-NDG 마우스, 암컷, 5~6주령, 체중 약 14~20g, 동물은 Biocytogen로부터 구입하며, SPF 등급 환경에서 사육하고, 각 케이지는 단독적으로 환기되며 모든 동물은 공시적으로 인증받은 상업용 실험실 사료와 물에 자유롭게 접근할 수 있다.

[1119] 세포 배양: 인간 폐암 NCI-H838 세포주는, RPMI-1640(세포 배양액)에 10%의 소태아 혈청, 1%의 Pen Strep을 첨가하고, 37℃, 5%의 CO_2 인큐베이터의 배양 조건에서 체외 배양하였다. 주 2회 0.25%의 트립신-EDTA 소화 용액으로 일상적인 소화 처리 및 계대를 수행하였다. 세포 포화도가 80%~90%이고 수량이 요구 사항에 부합하는 경우 세포를 수집하고 계수하였다.

[1120] 세포 접종: 0.1mL/(1×10^7개 세포 함유) NCI-H838 세포 현탁액(RPMI-1640:Matrigel, 부피비는 1:1임)을 각 마우스의 겨드랑이에 피하 접종하였다. 세포를 접종한 후 23일째에, 종양의 부피에 따라 무작위로 그룹을 나누고 투약하였으며, 그룹을 나눈 당일을 Day 0으로 하였다.

[1121] 투약: ADC-L1-19-P1-7 및 동형 대조 ADC-L1-19-P1-ISO의 투약 용량은 모두 3mg/kg이며 다 복강내 투약하였다(Q4D). 그룹당 6마리의 마우스가 있다.

[1122] **종양 측정 및 실험 지표:**

[1123] 종양 직경은 버니어 캘리퍼스를 사용하여 주 2회 측정하였다. 종양 부피의 계산 공식은 $V=0.5a\times b^2$이고, a와 b는 각각 종양의 장경과 단경을 나타낸다. 마우스 체중은 주 2회 측정하였다.

[1124] 화합물의 종양 억제 치료 효과는 종양 성장 억제율 TGI(%)로 평가하였다. TGI(%)=[(1-(특정 처리군의 투약 종료 시 평균 종양 부피-해당 처리군의 투약 시작 시 평균 종양 부피)/(용매 대조군의 치료 종료 시 평균 종양 부피-용매 대조군의 치료 시작 시 평균 종양 부피)]x100%.

[1125] **실험 결과:**

[1126] 표 27, 도 6 및 도 7을 참조한다.

표 27. H838 피하 종양 모델의 종양 부피

시험 약물	투약 용량 (mg/kg)	투약 방법	투약 빈도	평균 종양 부피(mm^3)							TGI (%)
				0일	3일	8일	11일	14일	17일	21일	
용매 대조군	/	복강 내 주사	4일에 1회	99	137	322	449	758	959	1444	/
ADC-L1-19-P1-ISO	3			98	126	202	240	315	461	707	54.8
ADC-L1-19-P1-7	3			99	138	149	163	163	200	290	85.8

[1127]

[1128] **실험 결론:**

[1129] 마우스 피하 이식 종양 NCI-H838 모델에서, 본 개시의 화합물 ADC-L1-19-P1-7 및 동형 대조 ADC-L1-19-P1-ISO는 3mg/kg로 4일에 1회 복강내 투약 시, 종양 성장에 대해 유의한 억제 효과($P<0.0001$)를 갖지만; 동형 대조 ADC-L1-19-P1-ISO의 종양 억제 효과는 ADC-L1-19-P1-7에 비해 유의하게 약하다($P<0.001$). 본 실시예에서, 시도된 용량에서 화합물이 마우스의 체중에 영향을 미치지 않는 동시에, 마우스의 사망도 유발하지 않아, 마우스가 일정한 내성을 보일 수 있다.

[1130] **시험예 11. 항-LIV-1-ADC의 방관자 효과 시험**

[1131] **세포 및 재료:** 인간 난소암 세포계 OVCAR3은 ATCC로부터 구입하고, 인간 비소세포폐암 세포계 NCI-H838-hLIV1-KO는 자체적으로 구축하고, 소 혈청(Gibco#10099-141C), 1640 배지(Gibco#A10491-01), 페니실린-스트렙토마이신(Gibco#15140-122) 및 0.25%의 Trypsin-EDTA(Gibco#25200-056)는 Gibco 회사(미국)로부터 구입하고, 소 인슐린(Solarbio#I8040)은 Solarbio 회사로부터 구입하고, 96웰 플레이트(Greiner Bio-one#655098)는 Corning 회사(미국)로부터 구입하며, Cell-Titer Glo 시약(Promega #G7568)은 Promega 회사(미국)로부터 구입하였다.

[1132] NCI-H838-hLIV1-KO의 구축 방법: 인간 LIV1 유전자에 대해 6가지 sgRNA를 설계한 후, sgRNA를 pLVX 렌티바이러스 벡터에 클로닝하고, HEK293T 세포(중국과학기술원으로부터 구입)에서 바이러스 입자를 제조하였다. NCI-H838(ATCC로부터 구입) 세포계를 렌티바이러스로 감염시킨 후, 1.5μg/mL의 퓨로마이신(Gibco로부터 구입, 카탈로그 번호: A1113802)이 들어있는 10%(w/w)의 소태아 혈청을 함유하는 RPMI 1640 배지에서 2주 동안 선택적으로 배양하여 H838-LIV1 KO pool 세포주를 얻었다. 인간 항-LIV1 항체(Ladiratuzumab, 자체적으로 생산) 및 염소 항-인간 IgG(H+L) 항체(Jackson, 카탈로그 번호: 109605088)로 표지하고 유세포 분석기 FACSAriaII(BD Biosciences로부터 구입)에서 H838-LIV1 KO 단클론 세포를 선별하여 96웰 플레이트에 접종하고 37℃, 5%(v/v)의 CO_2에서 배양하고, 약 2주 후에 일부 단클론 웰을 선택하여 확장시켰다. 확장된 클론을 유세포 분석법으로 스크리닝하였다. 성장 추세가 좋고 형광 강도가 낮은 단클론 세포계를 선택하여 계속해서 확장 배양하고, 액체 질소에서 동결 보존하였다.

[1133] **세포 배양:** OVCAR3 세포를 20%의 소태아 혈청+2μg/mL의 소 인슐린+1%의 페니실린-스트렙토마이신을 함유하는 1640 배양액으로, NCI-H838-hLIV1-KO 세포를 10%의 소태아 혈청+1%의 페니실린-스트렙토마이신을 함유하는 1640 배양액으로, 두 세포주를 모두 37℃, 5%의 CO_2 조건에서 배양하고, 로그 성장기에 처한 세포만 실험에 사용할 수 있다.

[1134] **방관자 효과 검출:** 시험 대상 ADC를 LIV-1 양성 세포 OVCAR3과 함께 인큐베이션한 후의 상청액을 LIV-1 음성 세포 NCI-H838-hLIV1-KO에 옮겨 계속 인큐베이션하고, Cell-Titer Glo 시약을 이용하여 해당 상청액이 NCI-H838-hLIV1-KO 세포의 증식 활성에 대한 영향을 검출하여 ADC의 방관자 효과를 반영하였다. OVCAR3 세포를 세포 배양 플라스크에서 소화 및 분산 처리하고, 대응하는 신선한 배지로 재현탁시키고, 세포 밀도를 10000개 세포/180μL/웰로 조정하여 96웰 플레이트에 접종하고, 37℃, 5%의 CO_2 조건에서 밤새 배양하였다. ADC 농도를 완전 배지로 5000nM까지 희석하고, 총 8개의 농도 구배로 5배 구배 희석한 후, 20μL의 ADC 희석 용액을 96웰 플레이트에 옮기고, 즉 ADC 시작 농도는 500nM이었다. 96웰 플레이트를 37℃, 5%의 CO_2 조건에서 5일 동안 배양하였다. OVCAR3 세포 배양 플레이트에서 상청액 150μL를 흡취하여 하루 전에 접종한 NCI-H838-hLIV1-KO 세포 플레이트에 옮기고(450개 세포/50μL/웰), 37℃, 5%의 CO_2 조건에서 5일 동안 배양하였다. Cell-Titer Glo 시약을 첨가하고 세포 활성을 검출하였다.

[1135] 음성 대조군과 양성 대조군을 각각 Bottom과 Top으로 설정하였다. 음성 대조군은 세포를 첨가하지 않고 동일한

부피의 배지만 첨가하며, 기타 조작은 실험군과 일치하며; 양성 대조군은 시험 약물을 첨가하지 않고 기타 조작은 실험군과 일치하다.

[1136] **데이터 분석:**

[1137] 억제율(% Inhibition)을 계산하고 화합물의 IC_{50}을 피팅하여 도출하였다.

[1138] 억제율(% Inhibition)=1-100%*(Signal-Bottom)/(Top-Bottom).

[1139] Signal은 실험군의 신호 값을 가리키며, Bottom은 음성 대조군의 평균 신호 값을 가리키고, Top은 양성 대조군의 평균 신호 값을 가리킨다.

[1140] **실험 결과:**

[1141] 본 실험의 조건에서, 시험 대상 ADC를 LIV-1 양성 세포 OVCAR3과 함께 인큐베이션한 후의 상청액을 LIV-1 음성 세포 NCI-H838-hLIV1-KO와 함께 계속 인큐베이션하고, Cell-Titer Glo 시약을 첨가하여 이의 음성 세포에 대한 살상을 검출하고, 결과는 표 28에 나타난 바와 같으며, 이는 본 개시의 항-LIV1-ADC는 나은 방관자 효과가 있음을 나타낸다.

표 28. 항-LIV1-ADC 방관자 효과

[1142]

접합체 번호	IC_{50} (NCI-H838-hLIV1-KO 음성 세포, nM)	최대 억제율(%)
ADC-L1-19-7	13.7	95.3
ADC-L1-19-P1-7	4.351	97.0
ADC-L1-0-7	48.64	88.0

[1143] **시험예 12. 항-ROR1-ADC의 방관자 효과 시험**

[1144] **세포 및 재료:** 인간 유방암 세포계 hROR1-MCF7은 Simcere Zaiming에서 구축하고, 인간 유방암 세포계 MCF7은 ATCC로부터 구입하고, 소 혈청(Gibco#10099-141C), DMEM 배지(Gibco#11995-065), 페니실린-스트렙토마이신(Gibco#15140-122) 및 0.25%의 Trypsin-EDTA(Gibco#25200-056)는 Gibco 회사(미국)로부터 구입하고, 96웰 플레이트(Greiner Bio-one#655098)는 Corning 회사(미국)로부터 구입하며, Cell-Titer Glo 시약(Promega#G7568)은 Promega 회사(미국)로부터 구입하였다.

[1145] **세포 배양:** hROR1-MCF7 세포 및 MCF7 세포를 37℃, 5%의 CO_2 조건에서, 10%의 소태아 혈청+1%의 페니실린-스트렙토마이신을 함유하는 DMEM 배양액에서 배양하고, 로그 성장기에 처한 세포만 실험에 사용할 수 있다.

[1146] **방관자 효과 검출:** 시험 대상 ADC를 ROR1 양성 세포 hROR1-MCF7과 함께 인큐베이션한 후의 상청액을 ROR1 음성 세포 MCF7에 옮겨 계속 인큐베이션하고, Cell-Titer Glo 시약을 이용하여 해당 상청액이 MCF7 세포의 증식 활성에 대한 영향을 검출하여, ADC의 방관자 효과를 반영하였다. hROR1-MCF7 세포를 세포 배양 플라스크에서 소화 및 분산 처리하고, 대응하는 신선한 배지로 재현탁시키고, 세포 밀도를 20000개 세포/180μL/웰로 조정하여 96웰 플레이트에 접종하고, 37℃, 5%의 CO_2 조건에서 밤새 배양하였다. ADC 농도를 완전 배지로 5000nM까지 희석하고, 총 8개의 농도 구배로 3배 구배 희석한 후, 20μL의 ADC 희석 용액을 96웰 플레이트에 옮기고, 즉 ADC 시작 농도는 500nM이었다. 96웰 플레이트를 37℃, 5%의 CO_2 조건에서 5일 동안 배양하였다. hROR1-MCF7 세포 배양 플레이트의 상청액 150μL를 흡취하여 하루 전에 접종한 MCF7 세포 플레이트에 옮기고(1500개 세포/50μL/웰), 37℃, 5%의 CO_2 조건에서 5일 동안 배양하였다. Cell-Titer Glo 시약을 첨가하고 세포 활성을 검출하였다.

[1147] 음성 대조군과 양성 대조군을 각각 Bottom과 Top으로 설정하였다. 음성 대조군은 세포를 첨가하지 않고 동일한 부피의 배지만 첨가하며, 기타 조작은 실험군과 일치하며; 양성 대조군은 시험 약물을 첨가하지 않고 기타 조작은 실험군과 일치하다.

[1148] **데이터 분석:**

[1149] 억제율(% Inhibition)을 계산하고 화합물의 IC_{50}을 피팅하여 도출하였다.

[1150] 억제율(% Inhibition)=1-100%*(Signal-Bottom)/(Top-Bottom).

[1151] Signal은 실험군의 신호 값을 가리키며, Bottom은 음성 대조군의 평균 신호 값을 가리키고, Top은 양성 대조군의 평균 신호 값을 가리킨다.

[1152] **실험 결과:**

[1153] 본 실험 조건에서, 시험 대상 ADC를 ROR1 양성 세포 hROR1-MCF7과 함께 인큐베이션한 후의 상청액을 ROR1 음성 세포 MCF7과 함께 계속 인큐베이션하고, Cell-Titer Glo 시약을 첨가하여 이의 음성 세포에 대한 살상을 검출하고, 결과는 표 29에 나타난 바와 같으며, 이는 본 개시의 항-ROR1-ADC는 나은 방관자 효과가 있음을 나타낸다.

표 29. 항-ROR1-ADC 방관자 효과

접합체 번호	IC_{50} (음성 세포, nM)	최대 억제율(%)
ADC-L1-19-8	0.03	56.83
ADC-L1-19-P1-8	0.05	53.62
ADC-L1-19-9	0.10	57.76
ADC-L1-19-P1-9	0.07	53.70
ADC-L1-19-10	0.02	61.37
ADC-L1-19-P1-10	0.03	57.86

[1154]

[1155] **시험예 13. 항-HER2-ADC의 방관자 효과 시험**

[1156] **세포 및 재료:** 인간 유방암 세포계 SKBR3은 ATCC로부터 구입하고, 인간 소세포폐암 세포계 NCI-H2171은 ATCC로부터 구입하고, 소 혈청(Gibco#10099-141C), McCoy's 5a 배지(Gibco#16600-082), 1640 배지(Gibco#A10491-01), 페니실린-스트렙토마이신(Gibco#15140-122) 및 0.25%의 Trypsin-EDTA(Gibco#25200-056)는 Gibco 회사(미국)로부터 구입하고, 96웰 플레이트(Greiner Bio-one#655098)는 Corning 회사(미국)로부터 구입하며, Cell-Titer Glo 시약(Promega#G7568)은 Promega 회사(미국)로부터 구입하였다.

[1157] **세포 배양:** SKBR3 세포를 10%의 소태아 혈청+1%의 페니실린-스트렙토마이신을 함유하는 McCoy's 5a 배양액으로, NCI-H2171 세포를 10%의 소태아 혈청+1%의 페니실린-스트렙토마이신을 함유하는 1640 배양액으로, 두 세포주를 모두 37℃, 5%의 CO_2 조건에서 배양하였고, 로그 성장기에 처한 세포만 실험에 사용할 수 있다.

[1158] **방관자 효과 검출:** ADC를 HER2 양성 세포 SKBR3과 함께 인큐베이션한 후의 상청액을 HER2 음성 세포 NCI-H2171에 옮겨 계속 인큐베이션하고, Cell-Titer Glo 시약을 이용하여 해당 상청액이 NCI-H2171 세포 증식 활성에 대한 영향을 검출하여, ADC의 방관자 효과를 반영하였다. SKBR3 세포를 세포 배양 플라스크에서 소화 및 분산 처리하고, 대응하는 신선한 배지로 재현탁시키고, 세포 밀도를 10000개 세포/180μL/웰로 조정하여 96웰 플레이트에 접종하고, 37℃, 5%의 CO_2 조건에서 밤새 배양하였다. ADC 농도를 완전 배지로 5000nM까지 희석하고, 총 8개의 농도 구배로 3배 구배 희석한 후, 20μL의 ADC 희석 용액을 96웰 플레이트에 옮기고, 즉 ADC 시작 농도는 500nM이었다. 96웰 플레이트를 37℃, 5%의 CO_2 조건에서 3일 동안 배양하였다. SKBR3 세포 배양 플레이트의 상청액 150μL를 흡취하여 하루 전에 접종한 NCI-H2171 세포 플레이트에 옮기고(6000개 세포/50μL/웰) 37℃, 5%의 CO_2 조건에서 5일 동안 배양하였다. Cell-Titer Glo 시약을 첨가하고 세포 활성을 검출하였다.

[1159] 음성 대조군과 양성 대조군을 각각 Bottom과 Top으로 설정하였다. 음성 대조군은 세포를 첨가하지 않고 동일한 부피의 배지만 첨가하며, 기타 조작은 실험군과 일치하며; 양성 대조군은 시험 약물을 첨가하지 않고 기타 조작은 실험군과 일치하다.

[1160] **데이터 분석:**

[1161] 억제율(% Inhibition)을 계산하고 화합물의 IC_{50}을 피팅하여 도출하였다.

[1162] 억제율(% Inhibition)=1-100%*(Signal-Bottom)/(Top-Bottom).

[1163] Signal은 실험군의 신호 값을 가리키며, Bottom은 음성 대조군의 평균 신호 값을 가리키고, Top은 양성 대조군의 평균 신호 값을 가리킨다.

[1164] **실험 결과:**

[1165] 본 실험 조건에서, 시험 대상 ADC를 HER2 양성 세포 SKBR3과 함께 인큐베이션한 후의 상청액을 HER2 음성 세포 NCI-H2171과 함께 계속 인큐베이션하고, Cell-Titer Glo 시약을 첨가하여 이의 음성 세포에 대한 살상을 검출하고, 결과는 표 30에 나타난 바와 같으며, 이는 본 개시의 항-HER2-ADC는 나은 방관자 효과가 있음을 나타낸다.

표 30. 항-HER2-ADC 방관자 효과

접합체 번호	IC_{50}(음성 세포, nM)	최대 억제율(%)
ADC-L1-0-11	1.90	89.17
ADC-L1-19-11	0.16	81.43
ADC-L1-19-P1-11	0.12	84.55
ADC-L1-0-2	3.42	99.14
ADC-L1-19-2	0.15	81.33
ADC-L1-19-P1-2	0.17	86.51

[1166]

[1167] **시험예 14. 항-CDH6-ADC의 방관자 효과 시험**

[1168] **세포 및 재료:** 인간 난소암 세포계 OVCAR3은 ATCC로부터 구입하고, 인간 난소암 세포계 SKOV3은 ATCC로부터 구입하고, 소 혈청(Gibco#10099-141C), 1640 배지(Gibco#A10491-01), McCoy's 5a 배지(Gibco#16600-082), 페니실린-스트렙토마이신(Gibco#15140-122) 및 0.25%의 Trypsin-EDTA(Gibco#25200-056)는 Gibco 회사(미국)로부터 구입하고, 소 인슐린(Solarbio#I8040)은 Solarbio 회사로부터 구입하고, 96웰 플레이트(Greiner Bio-one#655098)는 Corning 회사(미국)로부터 구입하며, Cell-Titer Glo 시약(Promega#G7568)은 Promega 회사(미국)로부터 구입하였다.

[1169] **세포 배양:** OVCAR3 세포를 20%의 소태아 혈청+2 μg/mL의 소 인슐린+1%의 페니실린-스트렙토마이신을 함유하는 1640 배양액으로, SKOV3 세포를 10%의 소태아 혈청+1%의 페니실린-스트렙토마이신을 함유하는 McCoy's 5a 배양액으로, 두 세포주는 모두 37℃, 5%의 CO_2 조건에서 배양하고, 로그 성장기에 처한 세포만 실험에 사용할 수 있다.

[1170] **방관자 효과 검출:** ADC를 CDH6 양성 세포 OVCAR3과 함께 인큐베이션한 후의 상청액을 CDH6 음성 세포 SKOV3에 옮겨 계속 인큐베이션하고, Cell-Titer Glo 시약을 이용하여 해당 상청액이 SKOV3 세포 증식 활성에 대한 영향을 검출하여, ADC의 방관자 효과를 반영하였다. OVCAR3 세포를 세포 배양 플라스크에서 소화 및 분산 처리하고, 대응하는 신선한 배지로 재현탁시키고, 세포 밀도를 20000개 세포/180 μL/웰로 조정하여 96웰 플레이트에 접종하고, 37℃, 5%의 CO_2 조건에서 밤새 배양하였다. ADC 농도를 완전 배지로 4500nM까지 희석하고, 총 8개의 농도 구배로 3배 구배 희석한 후, 20 μL의 ADC 희석 용액을 96웰 플레이트에 옮기고, 즉 ADC 시작 농도는 450nM이었다. 96웰 플레이트를 37℃, 5%의 CO_2 조건에서 5일 동안 배양하였다. OVCAR3 세포 배양 플레이트의 상청액 150 μL를 흡취하여 하루 전에 접종한 SKOV3 세포 플레이트에 옮기고(700개 세포/50 μL/웰) 37℃, 5%의 CO_2 조건에서 7일 동안 배양하였다. Cell-Titer Glo 시약을 첨가하고 세포 활성을 검출하였다.

[1171] 음성 대조군과 양성 대조군을 각각 Bottom과 Top으로 설정하였다. 음성 대조군은 세포를 첨가하지 않고 동일한 부피의 배지만 첨가하며, 기타 조작은 실험군과 일치하며; 양성 대조군은 시험 약물을 첨가하지 않고 기타 조작은 실험군과 일치하다.

[1172] **데이터 분석:**

[1173] 억제율(% Inhibition)을 계산하고 화합물의 IC_{50}을 피팅하여 도출하였다.

[1174] 억제율(% Inhibition)=1-100%*(Signal-Bottom)/(Top-Bottom).

[1175] Signal은 실험군의 신호 값을 가리키며, Bottom은 음성 대조군의 평균 신호 값을 가리키고, Top은 양성 대조군의 평균 신호 값을 가리킨다.

[1176] **실험 결과:**

[1177] 본 실험 조건에서, 시험 대상 ADC를 CDH6 양성 세포 OVCAR3과 함께 인큐베이션한 후의 상청액을 CDH6 음성 세포 SKOV3과 함께 계속 인큐베이션하고, Cell-Titer Glo 시약을 첨가하여 이의 음성 세포에 대한 살상을 검출하고, 결과는 표 31에 나타난 바와 같으며, 이는 본 개시의 항-CDH6-ADC는 나은 방관자 효과가 있음을 나타낸다.

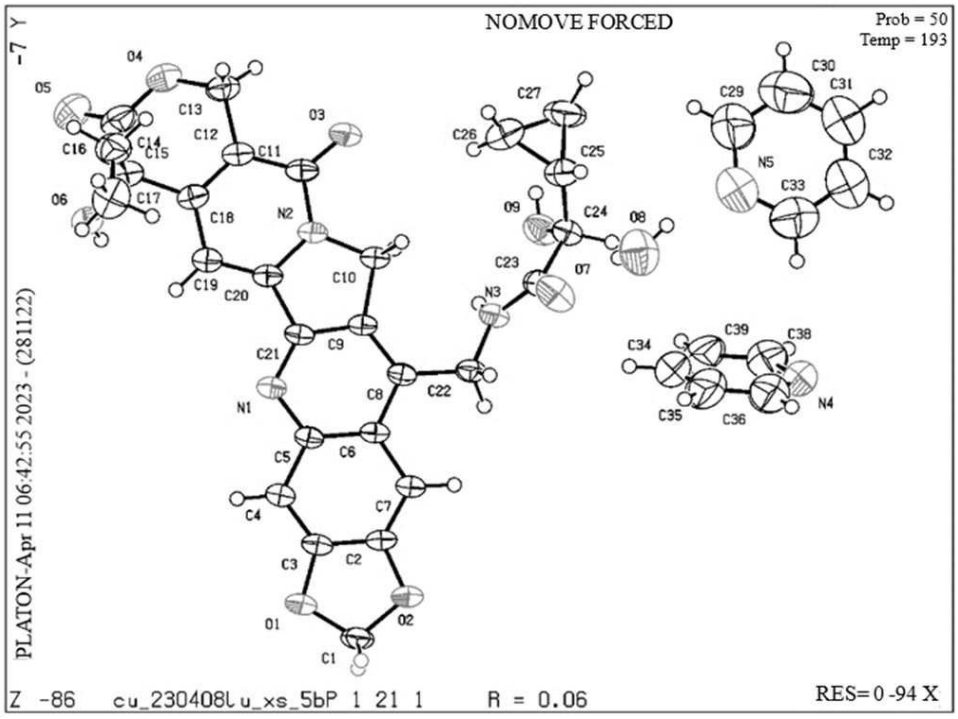
표 31. 항-CDH6-ADC 방관자 효과

접합체 번호	IC_{50}(음성 세포, nM)	최대 억제율(%)
ADC-L1-0-3	4.70	99.76
ADC-L1-19-3	1.39	102.7
ADC-L1-19-P1-3	1.37	105.4
ADC-L1-0-6	3.76	100.9
ADC-L1-19-6	2.21	104
ADC-L1-19-P1-6	1.80	104.9
ADC-L1-0-5	12.74	100.9
ADC-L1-19-5	1.01	103.1

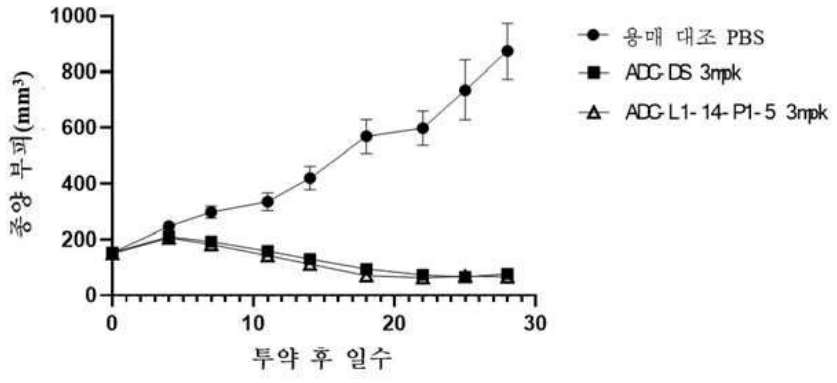
[1178]

도면

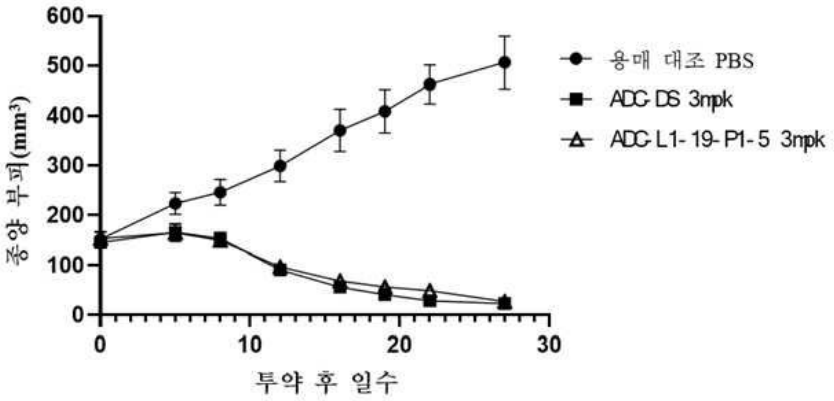
도면1



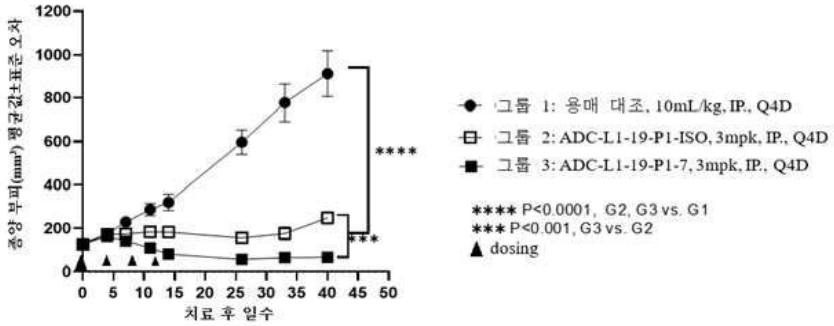
도면2



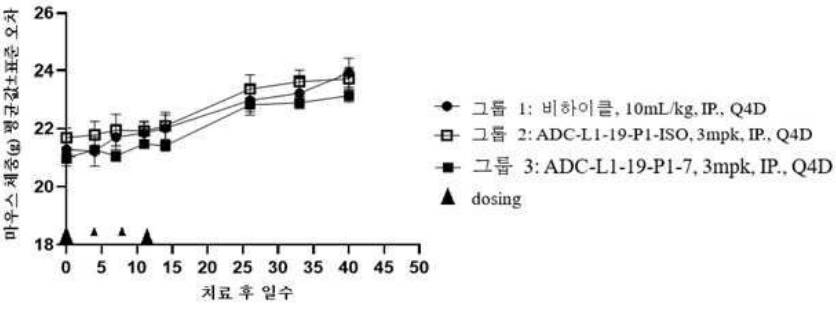
도면3



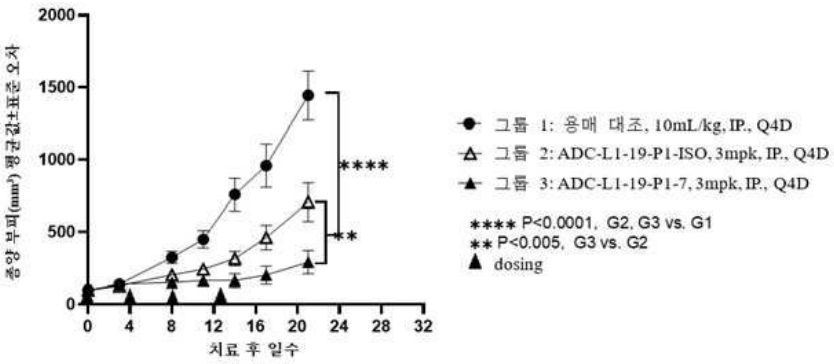
도면4



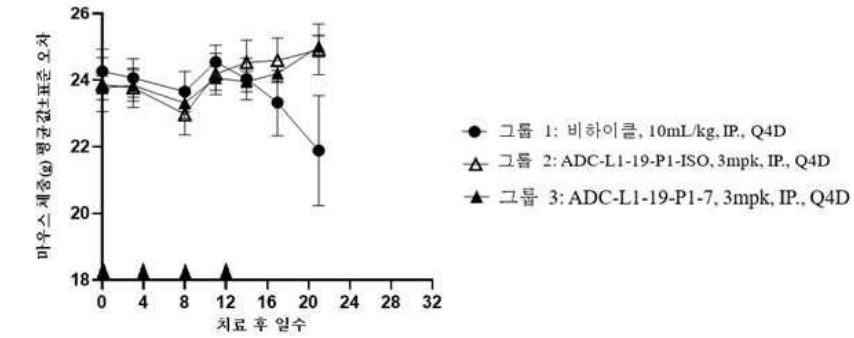
도면5



도면6



도면7


마우스 체중(g) 평균값±표준 오차
26
24
22
20
18
0
4
8
12
16
20
24
28
32
처료 후 일수
그룹 1: 비하이클, 10mL/kg, IP., Q4D
그룹 2: ADC-L1-19-P1-ISO, 3mpk, IP., Q4D
그룹 3: ADC-L1-19-P1-7, 3mpk, IP., Q4D

서 열 목 록 (첨부)

아이콘을 클릭하시면 서열목록 파일이 열립니다.

본 공보 PDF는 첨부파일을 가지고 있습니다. Acrobat Reader PDF뷰어를 제공하지 않는 브라우저(크롬, 파이어폭스, 사파리 등)의 경우 첨부파일 열기가 제한되어 있으므로 Acrobat Reader PDF뷰어 설치 후 공보 PDF를 다운로드 받아 해당 뷰어에서 조회해주시기 바랍니다.