(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2023-0042032
(43) 공개일자 2023년03월27일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 47/68 (2017.01) *A61P 35/00* (2006.01)
(52) CPC특허분류
A61K 47/6803 (2017.08)
A61P 35/00 (2018.01)
(21) 출원번호 10-2023-7003871
(22) 출원일자(국제) 2021년07월20일
심사청구일자 없음
(85) 번역문제출일자 2023년02월02일
(86) 국제출원번호 PCT/US2021/042280
(87) 국제공개번호 WO 2022/020288
국제공개일자 2022년01월27일
(30) 우선권주장
63/054,757 2020년07월21일 미국(US)

(71) 출원인
제넨테크, 인크.
미합중국 캘리포니아 (우편번호 94080-4990) 사우쓰샌프란시스코 디엔에이 웨이 1
(72) 발명자
드라고비치, 피터 스코트
미국 94080-4990 캘리포니아 사우쓰샌프란시스코 디엔에이 웨이 1 제넨테크, 인크. 내
베이커 도크리, 섬머 에이.
미국 94080-4990 캘리포니아 사우쓰샌프란시스코 디엔에이 웨이 1 제넨테크, 인크. 내
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
장덕순, 이귀동

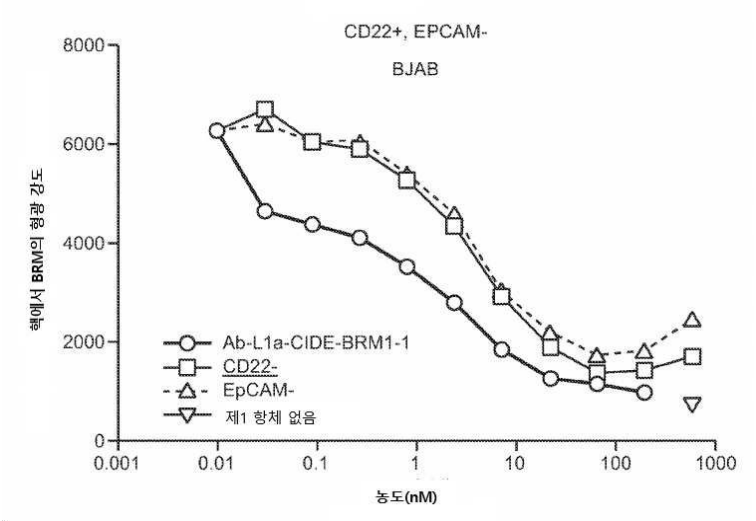
전체 청구항 수 : 총 72 항

(54) 발명의 명칭 **BRM 분해의 항체 접합 화학 유도제 및 이의 방법**

(57) 요 약

본원에 기재된 요지는 분해를 위해 BRM을 표적화하는 항체-CIDE 접합체(Ab-CIDE), 이를 함유하는 약학적 조성물, 및 BRM 분해가 유리한 질병 및 병태를 치료하기 위한 이들의 사용에 관한 것이다.

대 표 도 - 도1a



(72) 발명자

필로우, 토마스 하든

미국 94080-4990 캘리포니아 사우쓰샌프란시스코 디엔에이 웨이 1 제넨테크, 인크. 내

장, 동루

미국 94080-4990 캘리포니아 사우쓰샌프란시스코 디엔에이 웨이 1 제넨테크, 인크. 내

명 세 서

청구범위

청구항 1

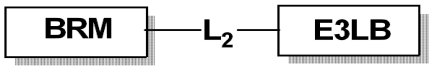
하기 구조를 갖는 접합체:

$Ab-(L1-D)_p$,

여기서,

Ab는 항체이고,

D는 하기 구조를 갖는 CIDE 또는 이의 전구약물이고:



여기서,

BRM은 BRM-결합 화합물의 잔기이고,

E3LB는 E3 리가아제-결합 화합물의 잔기이며,

L2는 BRM을 E3LB와 공유결합으로 연결하는 모이어티이고,

L1은 Ab를 BRM, E3LB 또는 L2 중 하나에 공유결합으로 연결하는 링커-1이며,

p는 1 또는 16이다.

청구항 2

제1항에 있어서, L1은 E3LB에 공유 결합되는 것인 접합체.

청구항 3

제2항에 있어서, 상기 전구약물은 BRM에 공유 결합된 인산염 모이어티를 갖는 CIDE인 접합체.

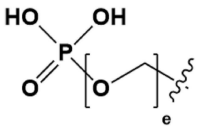
청구항 4

제1항에 있어서, L1은 BRM에 공유 결합되는 것인 접합체.

청구항 5

제4항에 있어서, 상기 전구약물은 E3LB에 공유 결합된 인산염 모이어티를 갖는 CIDE인 접합체.

청구항 6

제3항 또는 제5항에 있어서, 상기 인산염 모이어티는 

(이때 e는 0 또는 1임)의 구조를 갖는 것인 접합체.

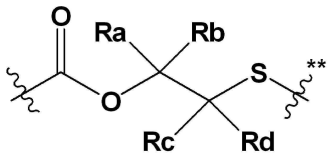
청구항 7

제1항에 있어서, L1은 L2에 공유 결합되는 것인 접합체.

청구항 8

제1항에 있어서, L1은 하기로 이루어진 군으로부터 선택되는 것인 접합체:

i) L1a

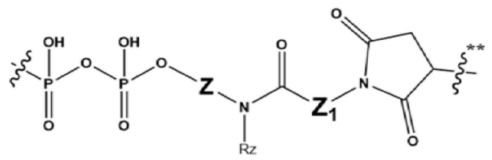


,

(여기서,

R^a, R^b, R^c, 및 R^d는 H, 임의적으로 치환된 분지쇄 또는 직쇄 C_1-C_5알킬, 및 임의적으로 치환된 C_3-C_6시클로알킬로 이루어진 군으로부터 독립적으로 선택되거나, 또는 R^a 및 R^b 또는 R^c 및 R^d는 그에 결합된 탄소 원자와 함께 임의적으로 치환된 C_3-C_6시클로알킬 고리 또는 3원 내지 6원 헤테로시클로알킬 고리를 형성함),

ii) L1b



,

(여기서,

Z 및 Z_1은 각각 독립적으로 C_{1-12}알킬렌 또는 $-[CH_2]_g-[-O-CH_2]_h-$이고,

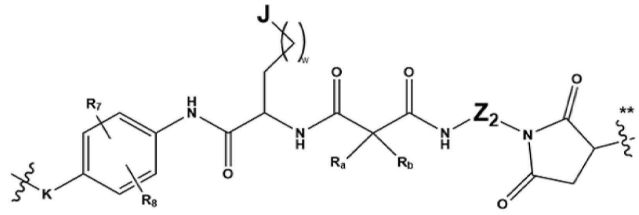
이때

g는 0, 1 또는 2이고,

h는 1-5이고,

R_Z는 H 또는 C_{1-3}알킬임),

iii) L1c



,

(여기서,

Z_2는 C_{1-12}알킬렌 또는 $-[CH_2]_g-[-O-CH_2]_h-$이고,

이때

g는 0, 1 또는 2이고,

h는 1-5이고,

w는 1, 2, 3, 4 또는 5이고,

J는 $-N(R_x)(R_y)$, $-C(O)NH_2$, $-NH-C(O)-NH_2$, $-NH-NH-NH_2$이고,

이때 R_x 및 R_y는 수소 및 C_{1-3}알킬로부터 각각 독립적으로 선택되고,

K는 $-CH_2-$, $-CH(R)-$, $-CH(R)-O-^$, $-C(O)-$, $^-C(O)-O-CH(R)-$, $-CH_2-O-C(O)-^$, $-CH_2-O-C(O)-NH-^$, $^-O-C(L1c)-C(O)-NR_xR_y-$, $^-C(L1c)-C(O)-NR_xR_y-$, $-CH_2-O-C(O)-NH-CH_2-$, $-CH_2-O-C(O)-R-[CH_2]_q-O-^$, $-CH_2-O-C(O)-R-[CH_2]_q-^$로부터 선택되고,

이때

^는 CIDE에 대한 부착을 나타내고,

R은 수소, C_{1-3}알킬, $N(R_x)(R_y)$, $-O-N(R_x)(R_y)$ 또는 $C(O)-N(R_x)(R_y)$이고,

q는 0, 1, 2, 또는 3이고,

R_x 및 R_y는 수소 및 C_{1-3}알킬로부터 각각 독립적으로 선택되거나, 또는 R_x 및 R_y는 각각이 그에 부착된 질소와 함께 임의적으로 치환된 5원 내지 7원 헤테로시클릴을 형성하고,

Ra 및 Rb는 수소 및 C_{1-3}알킬로부터 각각 독립적으로 선택되거나, 또는 Ra 및 Rb는 각각이 그에 부착된 질소와 함께 임의적으로 치환된 C_{3-6}시클로알킬을 형성하며,

R_7 및 R_8은 각각 독립적으로 수소, 할로, C_{1-5}알킬, C_{1-5}알콕시 또는 히드록실임).

청구항 9

제8항에 있어서, L1a는 E3LB에 공유 결합되는 것인 접합체.

청구항 10

제8항에 있어서, L1b는 E3LB 또는 BRM에 공유 결합되는 것인 접합체.

청구항 11

제8항에 있어서, L1c는 E3LB, BRM 또는 L2에 공유 결합되는 것인 접합체.

청구항 12

제8항에 있어서, L1b는 E3LB에 공유 결합되는 것인 접합체.

청구항 13

제8항에 있어서, L1b는 BRM에 공유 결합되는 것인 접합체.

청구항 14

제8항에 있어서, L1c는 E3LB에 공유 결합되는 것인 접합체.

청구항 15

제8항에 있어서, L1c는 BRM에 공유 결합되는 것인 접합체.

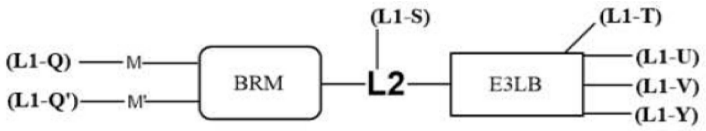
청구항 16

제8항에 있어서, L1c는 L2에 공유 결합되는 것인 접합체.

청구항 17

제1항에 있어서,

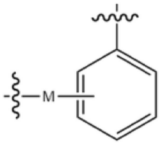
D는 하기 구조를 갖고:



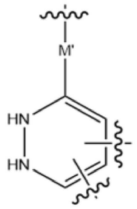
여기서,

L1은 L1-Q, L1-Q', L1-S, L1-T 및 존재하는 경우에는 임의적으로 L1-U, L1-V 및 L1-Y로부터 선택된 하나의 부착점에 부착되고,

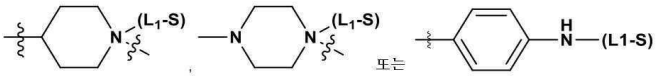
여기서,

L1Q는 BRM 상의 

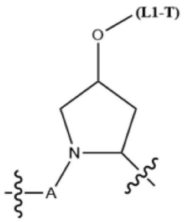
(이때 M은 O임)에 있고,

L1-Q'는 BRM 상의 

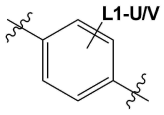
(이때 M'은 -NH임)에 있고,

L1-S는 L2 상의 

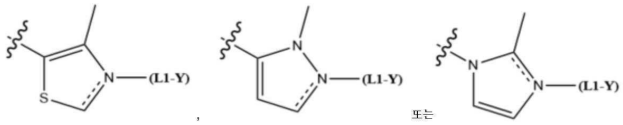
에 있고,

L1-T는 E3LB 상의 

(이때 A는 L2에 공유 결합된 기임)에 있고,

L1-U 및 L1-V는 E3LB 상의 

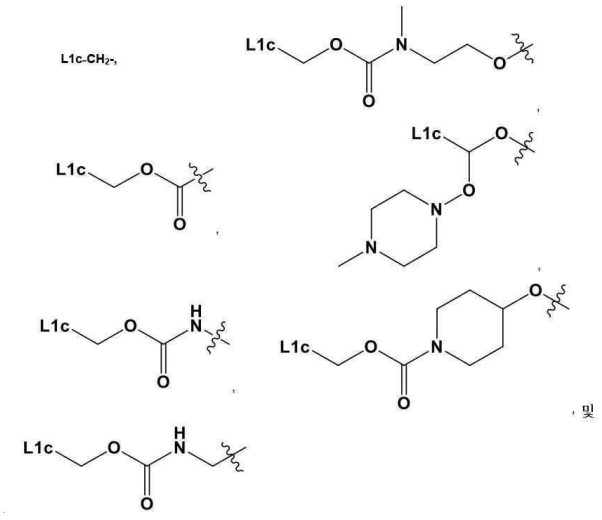
에 있으며,

L1-Y는 E3LB 상의 

(이때 ----는 단일 또는 이중 결합임)에 있는 것인 접합체.

청구항 18

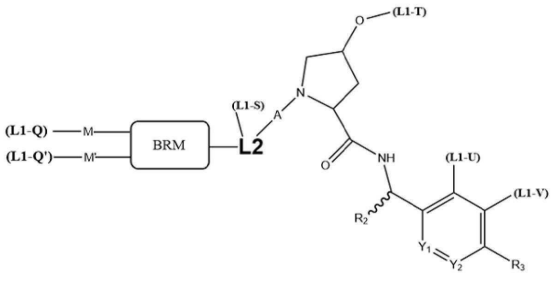
제8항에 있어서, L1c의 K는



로 이루어진 군으로부터 선택되는 것인 접합체.

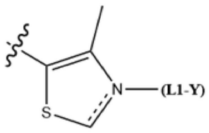
청구항 19

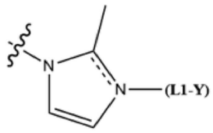
제17항에 있어서,



의 구조를 갖고,

여기서,

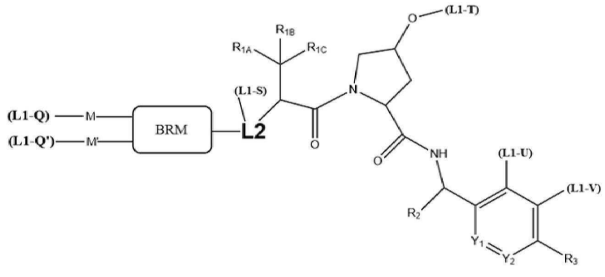
R_3은 시아노, 

, 또는 

(이때 ----는 단일 또는 이중 결합임)인 접합체.

청구항 20

제19항에 있어서,



의 구조를 갖고,

여기서,

R_{1A}, R_{1B} 및 R_{1C}는 각각 독립적으로 수소 또는 C_{1-5}알킬이거나, 또는

R_{1A}, R_{1B} 및 R_{1C} 중 2개는 각각이 그에 부착된 탄소와 함께 C_{1-5} 시클로알킬을 형성하는 것인 접합체.

청구항 21

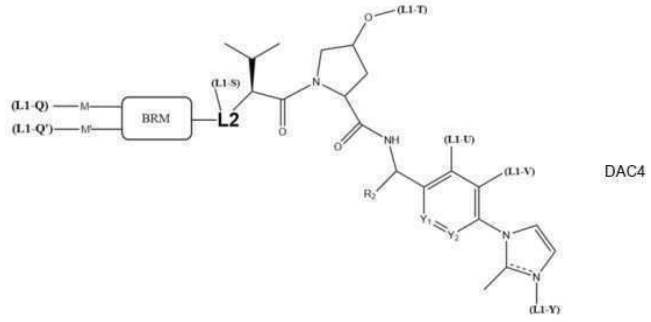
제20항에 있어서, R_{1A}, R_{1B} 및 R_{1C}는 각각 독립적으로 수소 또는 메틸인 접합체.

청구항 22

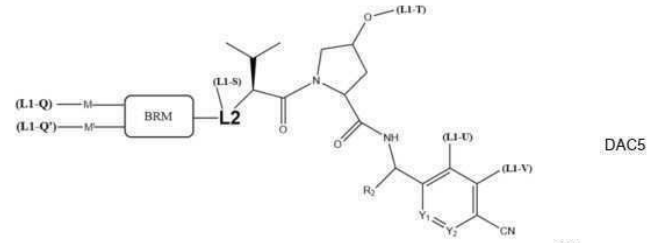
제21항에 있어서, R_{1A} 및 R_{1B}는 각각 메틸인 접합체.

청구항 23

제22항에 있어서,

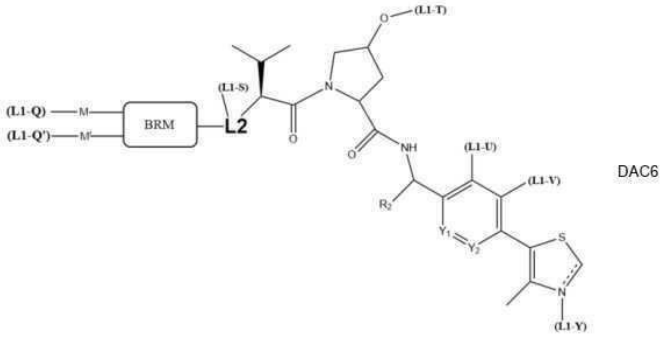


DAC4



DAC5

, 또는



DAC6

의 구조를 갖는 접합체.

청구항 24

제23항에 있어서, R_2는 수소, 메틸, 에틸 또는 프로필인 접합체.

청구항 25

제24항에 있어서, R_2는 메틸인 접합체.

청구항 26

제25항에 있어서, R_2는 

로서 E3LB에 결합되는 것인 접합체.

청구항 27

제23항에 있어서, Y_1 및 Y_2는 각각 -CH인 접합체.

청구항 28

제23항에 있어서, Y_1은 N이고, Y_2는 -CH인 접합체.

청구항 29

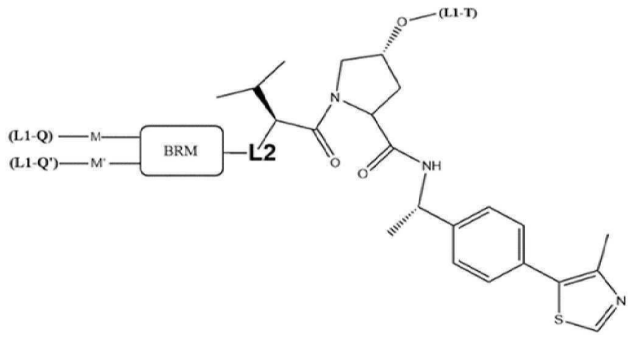
제23항에 있어서, Y_1은 -CH이고, Y_2는 N인 접합체.

청구항 30

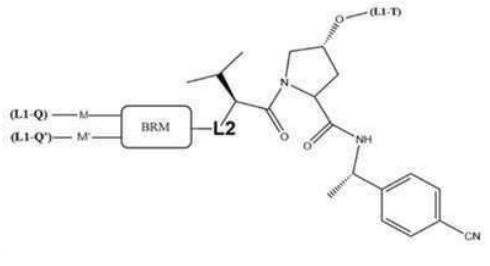
제23항에 있어서, L1은 L1-Q, L1-Q' 또는 L1-T에 부착되는 것인 접합체.

청구항 31

제30항에 있어서,



DAC7, 또는

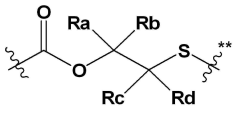


DAC8

의 구조를 갖는 접합체.

청구항 32

제17항에 있어서,

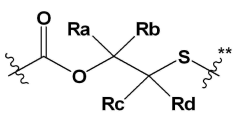
L1은 L1-T에 부착되고, 

이고,

여기서, Ra, Rb, Rc 및 Rd는 수소 및 C_{1-3}알킬로부터 각각 독립적으로 선택되는 것인 접합체.

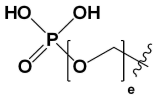
청구항 33

제17항에 있어서,

L1은 L1-T에 부착되고, 

이고,

여기서, Ra, Rb, Rc 및 Rd는 수소 및 C_{1-3}알킬로부터 각각 독립적으로 선택되며,



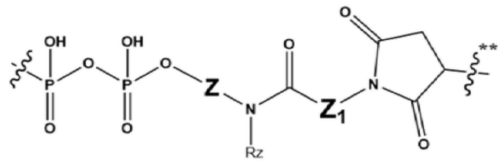
(이때 e는 0 또는 1임)의 구조를 갖는 인산염 모이어티는 BRM에 공유 결합되는 것인 접합체.

청구항 34

제17항에 있어서,

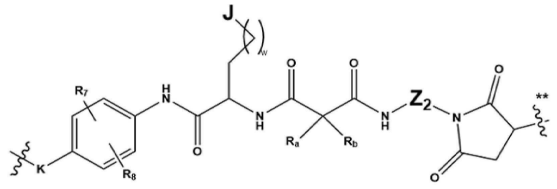
L1은 *L1-T에 부착되고, 하기로 이루어진 군으로부터 선택되는 것인 접합체:

ii) L1b



및

iii) L1c



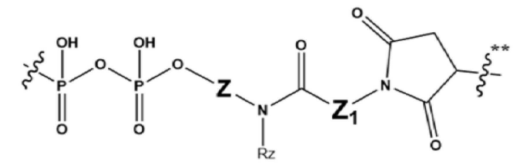
.

청구항 35

제17항에 있어서,

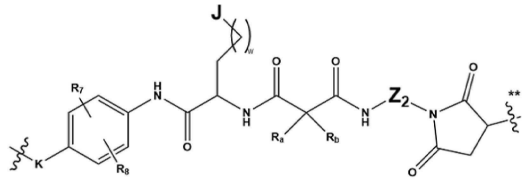
L1은 L1-T에 부착되고, 하기로 이루어진 군으로부터 선택되며:

ii) L1b

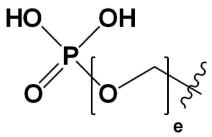


및

iii) L1c



,



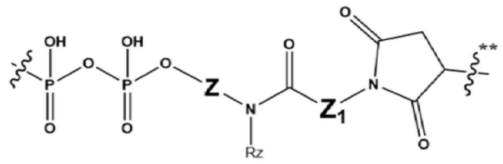
(이때 e는 0 또는 1임)의 구조를 갖는 인산염 모이어티는 BRM에 공유 결합되는 것인 접합체.

청구항 36

제17항에 있어서,

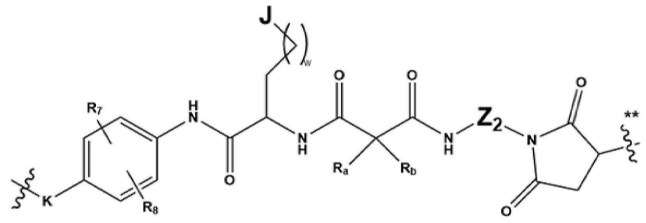
L1은 L1-Q에 부착되고, 하기로 이루어진 군으로부터 선택되는 것인 접합체:

ii) L1b



및

iii) L1c



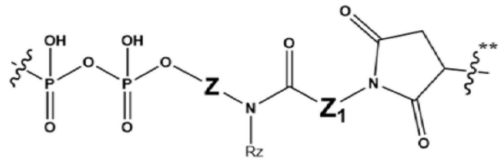
.

청구항 37

제17항에 있어서,

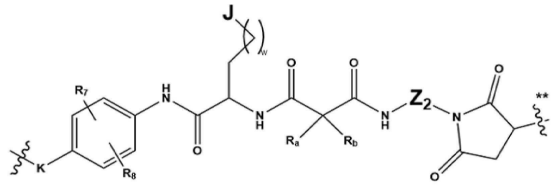
L1은 L1-Q에 부착되고, 하기로 이루어진 군으로부터 선택되며:

ii) L1b

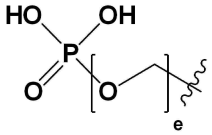


및

iii) L1c



,



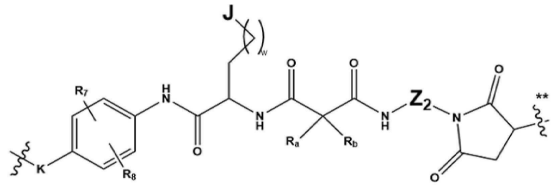
(이때 e는 0 또는 1임)의 구조를 갖는 인산염 모이어티는 BRM에 공유 결합되는 것인 접합체.

청구항 38

제17항에 있어서,

L1은 L1-Q'에 부착되고, 하기 구조를 갖는 것인 접합체:

iii) L1c



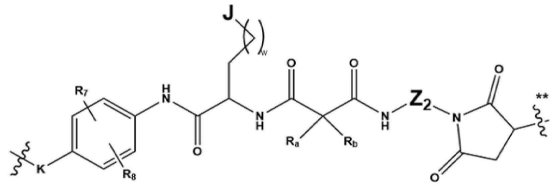
.

청구항 39

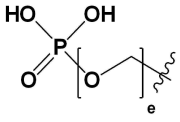
제17항에 있어서,

L1은 L1-Q'에 부착되고, 하기 구조를 가지며:

iii) L1c



,



(이때 e는 0 또는 1임)의 구조를 갖는 인산염 모이어티는 E3LB에 공유 결합되는 것인 접합체.

청구항 40

제8항에 있어서,

Z 및 Z_1은 $-(CH_2)_{1-6}-$ 및 $-[CH_2]_g-[-O-CH_2]_h-$로부터 각각 독립적으로 선택되고,

이때

g는 0, 1 또는 2이고,

h는 1-5인 접합체.

청구항 41

제8항에 있어서,

Z_2는 $-(CH_2)_{1-6}-$ 및 $-[CH_2]_g-[-O-CH_2]_h-$로부터 선택되고,

이때

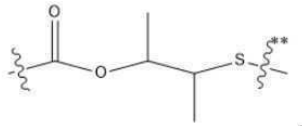
g는 0, 1 또는 2이고,

h는 1-5인 접합체.

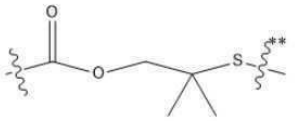
청구항 42

제8항에 있어서,

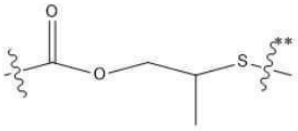
L1은



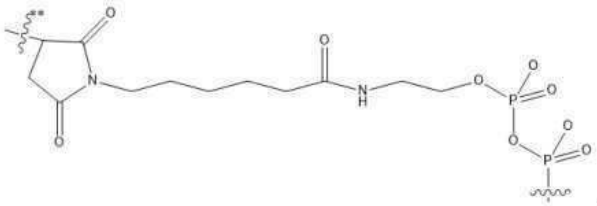
L1a-i) ;



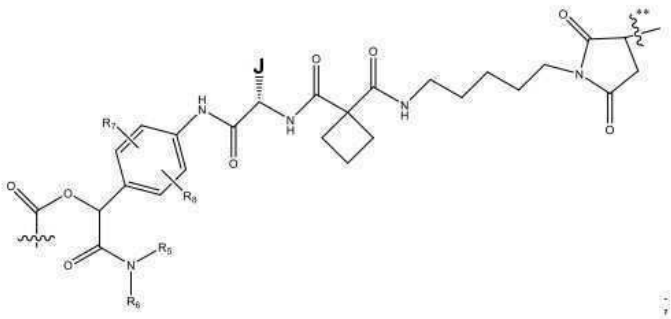
L1a-ii) ;



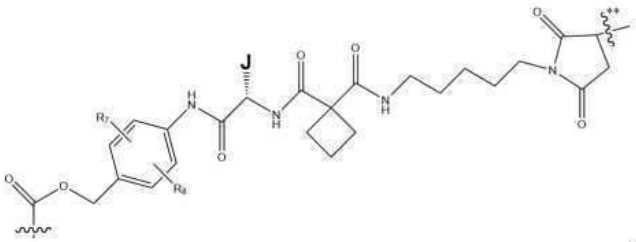
L1a-iii) ;



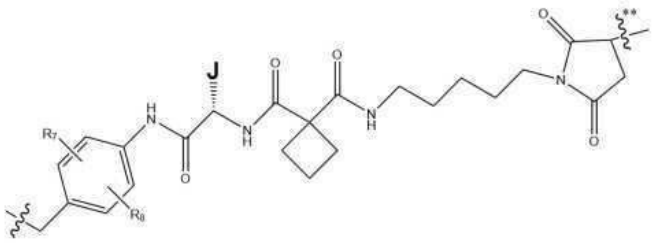
L1b-i) ;



L1c-i) ;



L1c-ii) ;



L1c-iii)

로 이루어진 군으로부터 선택되고,

여기서,

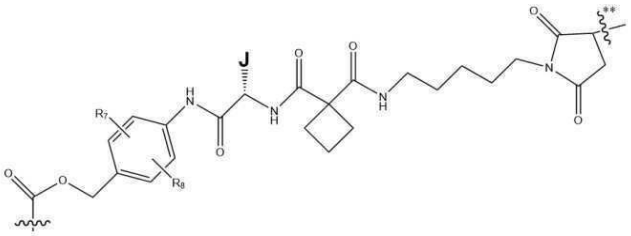
J는 $-CH_2-CH_2-CH_2-NH-C(O)-NH_2$, $-CH_2-CH_2-CH_2-CH_2-NH_2$, $-CH_2-CH_2-CH_2-CH_2-NH-CH_3$, 또는 $-CH_2-CH_2-CH_2-CH_2-N(CH_3)_2$이고,

R_5 및 R_6은 독립적으로 수소 또는 C_{1-5}알킬이거나, 또는 R_5 및 R_6은 각각이 그에 부착된 질소와 함께 임의적으로 치환된 5원 내지 7원 헤테로시클릴을 형성하며,

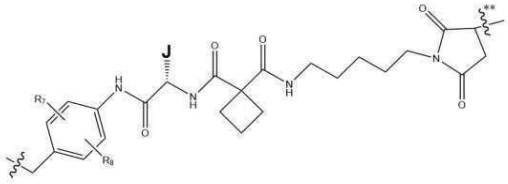
R_7 및 R_8은 각각 독립적으로 수소, 할로, C_{1-5}알킬, C_{1-5}알콕시 또는 히드록시인 접합체.

청구항 43

제42항에 있어서,



, 또는



L1은 로 이루어진 군으로부터 선택되고,

여기서,

J는 $-CH_2-CH_2-CH_2-NH-C(O)-NH_2$, $-CH_2-CH_2-CH_2-CH_2-NH_2$, $-CH_2-CH_2-CH_2-CH_2-NH-CH_3$, 또는 $-CH_2-CH_2-CH_2-CH_2-N(CH_3)_2$이며,

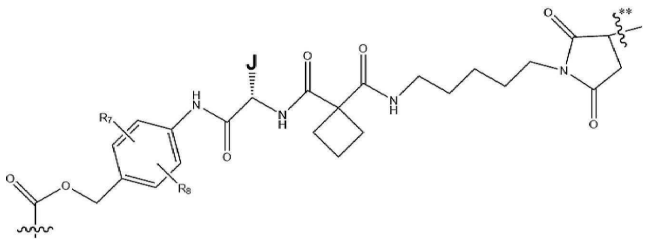
R_7 및 R_8은 각각 독립적으로 수소, 할로, C_{1-5}알킬, C_{1-5}알콕시 또는 히드록시인 접합체.

청구항 44

제43항에 있어서, J는 $-CH_2-CH_2-CH_2-NH-C(O)-NH_2$ 또는 $-CH_2-CH_2-CH_2-CH_2-N(CH_3)_2$인 접합체.

청구항 45

제43항에 있어서,



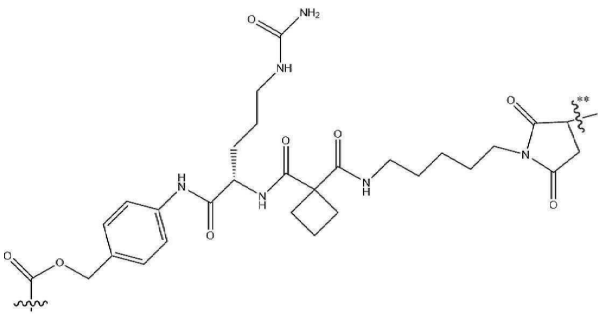
L1은 의 구조를 갖고,

여기서,

J는 $-CH_2-CH_2-CH_2-NH-C(O)-NH_2$, $-CH_2-CH_2-CH_2-CH_2-NH_2$, $-CH_2-CH_2-CH_2-CH_2-NH-CH_3$, 또는 $-CH_2-CH_2-CH_2-CH_2-N(CH_3)_2$이며,

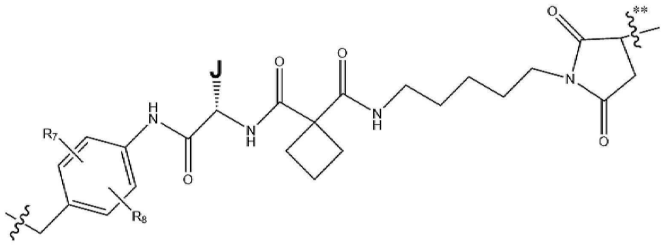
R_7 및 R_8은 각각 독립적으로 수소, 할로, C_{1-5}알킬, C_{1-5}알콕시 또는 히드록시인 접합체.

청구항 46

제45항에 있어서, L1은  의 구조를 갖는 것인 접합체.

청구항 47

제43항에 있어서,

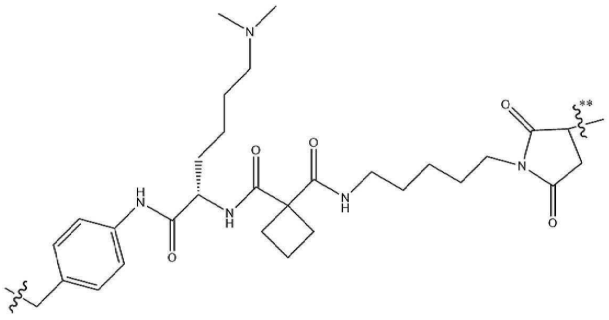
링커-1은  의 구조를 갖고,

여기서,

J는 $-CH_2-CH_2-CH_2-NH-C(O)-NH_2$, $-CH_2-CH_2-CH_2-CH_2-NH_2$, $-CH_2-CH_2-CH_2-CH_2-NH-CH_3$, 또는 $-CH_2-CH_2-CH_2-CH_2-N(CH_3)_2$이며,

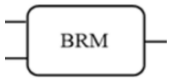
R_7 및 R_8은 각각 독립적으로 수소, 할로, C_{1-5}알킬, C_{1-5}알콕시 또는 히드록시인 접합체.

청구항 48

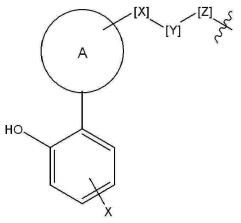
제47항에 있어서, L1은  의 구조를 갖는 것인 접합체.

청구항 49

제1항에 있어서,



는 하기 화학식 I의 구조를 갖는 BRM-결합 화합물의 잔기 또는 이의 입체이성질체 또는 호변이성질체, 또는 전술한 임의의 것의 약학적으로 허용 가능한 염이고:



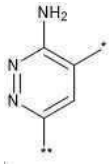
(I)

여기서,

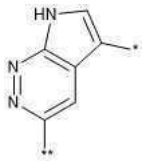
X는 수소 또는 할로겐이고,



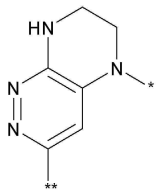
는



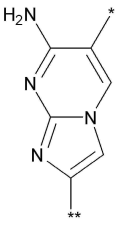
(a) ,



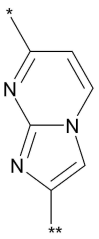
(b) ,



(c) ,



(d) , 및



(e)

로 이루어진 군으로부터 선택되고,

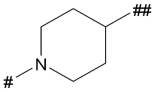
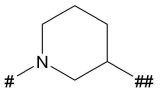
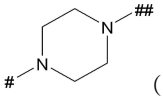
(a)-(e)의 경우,

*는 [X]에 대한 부착점을 나타내거나, 또는 [X]가 부재한 경우에는 *는 [Y]에 대한 부착점을 나타내며,

**는 페닐 고리에 대한 부착점을 나타내며,

여기서,

(i) [X]는 3-15원 헤테로시클릴 또는 5-20원 헤테로아릴이고,

단,  가 (a)인 경우에는 [X]는 , , 또는  (이때 #는 에 대한 부착점을 나타내고, ##는 L2에 대한 부착점을 나타냄)이 아니고,

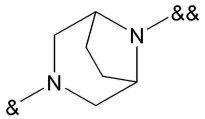
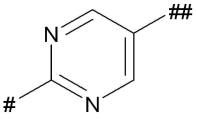
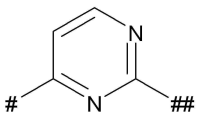
[Y]는 부재하며,

[Z]는 부재하거나, 또는

(ii) [X]는 3-15원 헤테로시클릴 또는 5-20원 헤테로아릴이고, 여기서 [X]의 3-15원 헤테로시클릴은 하나 이상의 -OH 또는 C_{1-6}알킬로 임의적으로 치환되고,

[Y]는 부재하며,

[Z]는 3-15원 헤테로시클릴 또는 5-20원 헤테로아릴이고,

단,  가 (a)이고 [X]가  (이때 &는 에 대한 부착점을 나타내고, &&는 [Z]에 대한 부착점을 나타냄)인 경우에는 [Z]는  또는  (이때 #는 [X]에 대한 부착점을 나타내고, ##는 L2에 대한 부착점을 나타냄)이 아니거나, 또는

(iii) [X]는 3-15원 헤테로시클릴 또는 5-20원 헤테로아릴이고,

[Y]는 메틸렌이고, 이때 [Y]의 메틸렌은 하나 이상의 메틸기로 임의적으로 치환되며,

[Z]는 3-15원 헤테로시클릴이거나, 또는

(iv) [X]는 부재하고,

[Y]는 에테닐렌이고, 이때 [Y]의 에테닐렌은 하나 이상의 할로로 임의적으로 치환되며,

[Z]는 5-20원 헤테로아릴이고,

단,  는 (a), (b), (d), 또는 (e)이거나, 또는

(v) [X]는 부재하고,

[Y]는 에티닐렌이며,

[Z]는 5-20원 헤테로아릴이고,

단,  는 (a), (b), (d), 또는 (e)이거나, 또는

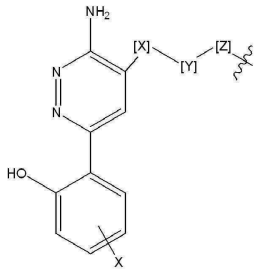
(vi) [X]는 부재하고,

[Y]는 시클로프로필 또는 시클로부틸이며,

[Z]는 5-20원 헤테로아릴이고,

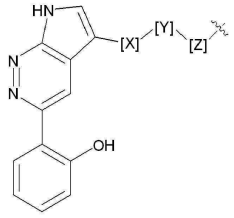
단,  는 (a), (b), (d), 또는 (e)인 접합체.

청구항 50



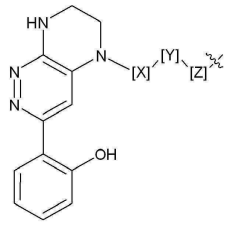
제49항에 있어서, BRM-결합 화합물의 잔기는 화학식 (I-A) (I-A)의 화합물 또는 이의 입체이성질체 또는 호변이성질체, 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염인 접합체.

청구항 51



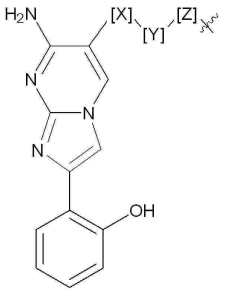
제49항에 있어서, BRM-결합 화합물의 잔기는 화학식 (I-B) (I-B)의 화합물 또는 이의 입체이성질체 또는 호변이성질체, 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염인 접합체.

청구항 52



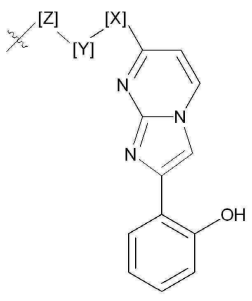
제49항에 있어서, BRM-결합 화합물의 잔기는 화학식 (I-C) (I-C)의 화합물 또는 이의 입체이성질체 또는 호변이성질체, 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염인 접합체.

청구항 53



제49항에 있어서, BRM-결합 화합물의 잔기는 화학식 (I-D) (I-D) (이때 X는 수소 또는 할로겐임)의 화합물 또는 이의 입체이성질체 또는 호변이성질체, 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염인 접합체.

청구항 54

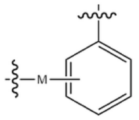
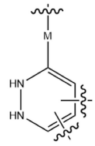


제49항에 있어서, BRM-결합 화합물의 잔기는 화학식 (I-E) (I-E)의 화합물 또는 이의 입

체이성질체 또는 호변이성질체, 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염인 접합체.

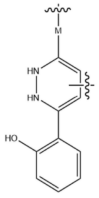
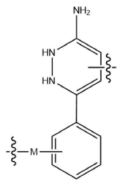
청구항 55

제49항에 있어서,

BRM-결합 화합물의 잔기는 , 및 로 이루어진 군으로부터 선택된 적어도 하나의 모이어티를 포함하고,

여기서, M은 -NH 또는 산소이고, L1-Q에 공유 결합되는 것인 접합체.

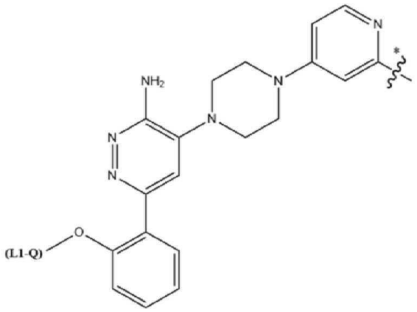
청구항 56

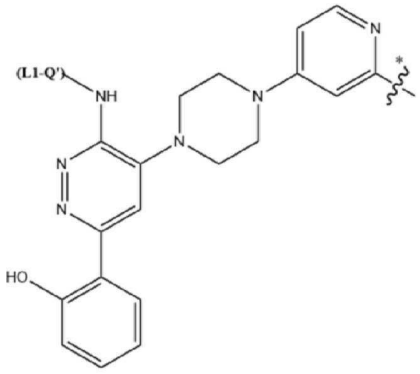
제55항에 있어서, BRM-결합 화합물의 잔기는 , 및 로 이루어진 군으로부터 선택된 모이어티를 포함하는 것인 접합체.

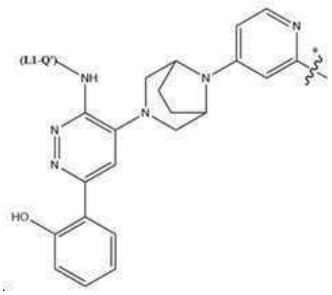
청구항 57

제56항에 있어서,

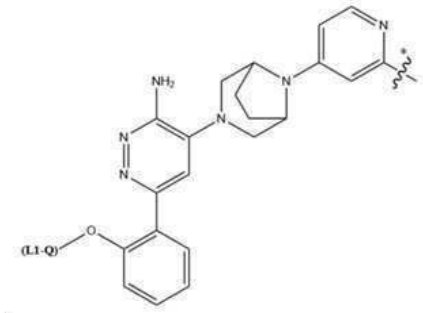
BRM은

,

,



, 및



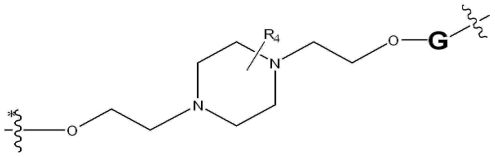
의 잔기이고,

여기서,  은 L2에 대한 부착점인 접합체.

청구항 58

제1항에 있어서,

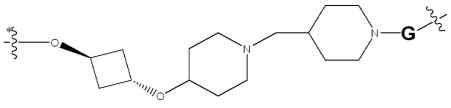
L2는 E3LB 및 BRM에 공유 결합된 링커-2이고, 상기 L2는 하기 화학식을 갖고:



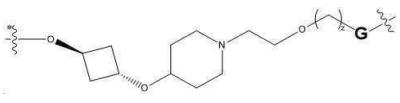
L2a,

여기서,

R_4는 수소 또는 메틸,



L2b, 또는

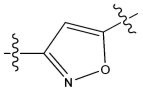


L2c

이고,

이때

z는 1 또는 0이고,

G는  또는 -C(O)NH-이며,


는 BRM에 대한 부착점인 접합체.

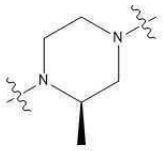
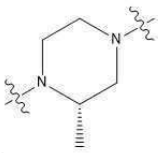
청구항 59

제58항에 있어서, R_4는 수소인 접합체.

청구항 60

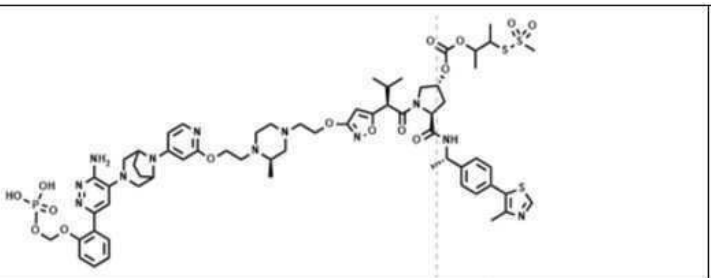
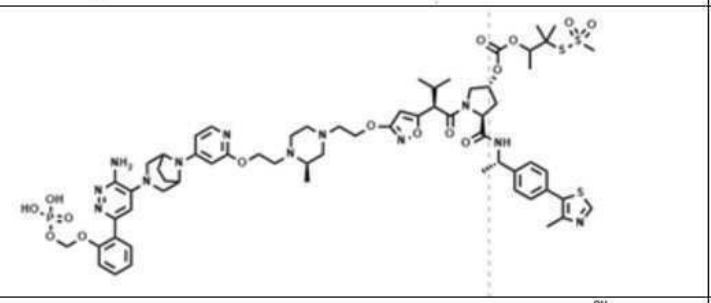
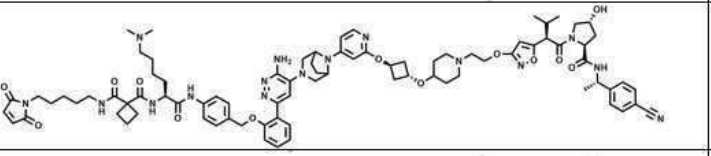
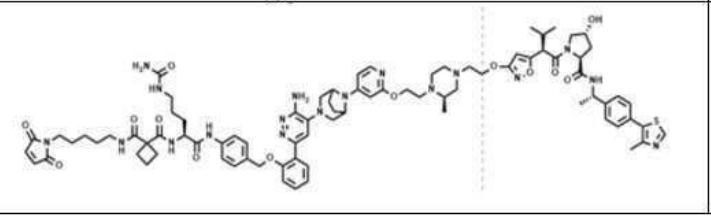
제58항에 있어서, R_4는 메틸인 접합체.

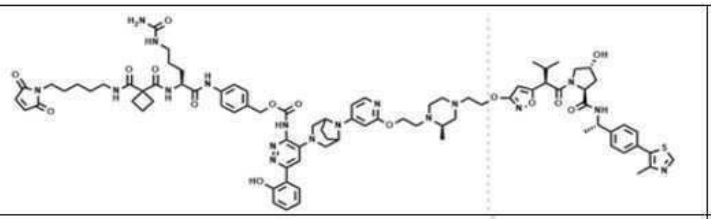
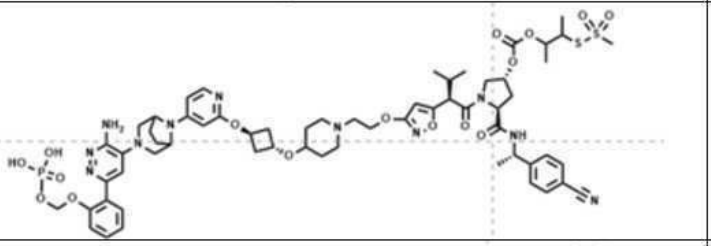
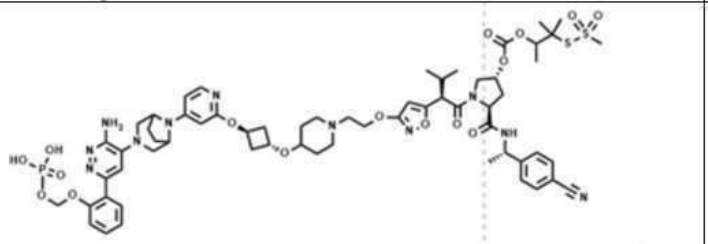
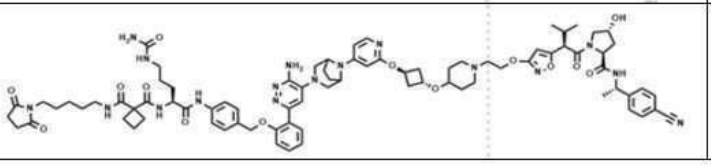
청구항 61

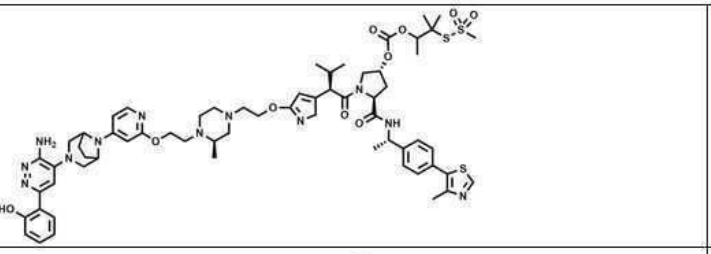
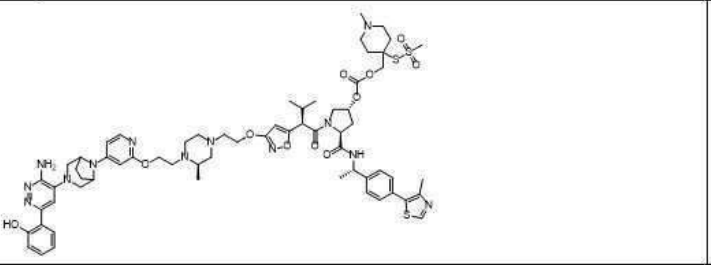
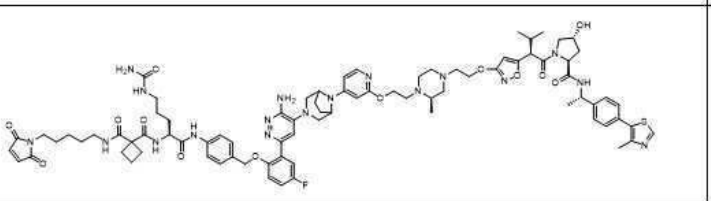
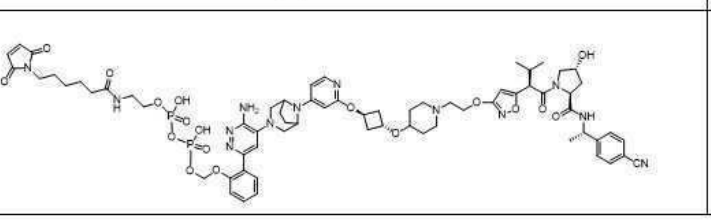
제60항에 있어서, R_4는  또는  와 같은 메틸인 접합체.

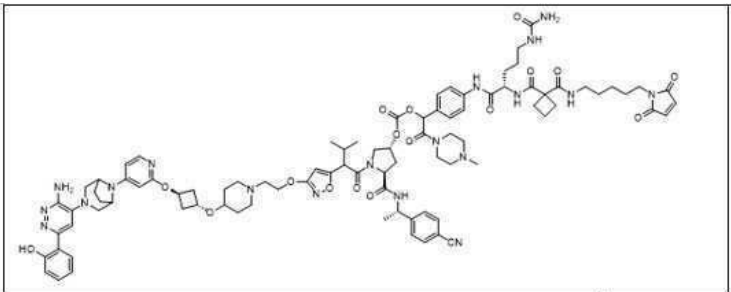
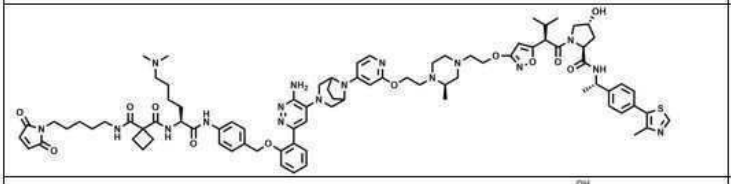
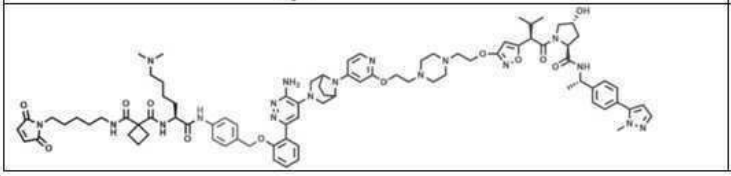
청구항 62

제1항에 있어서, 하기로 이루어진 군으로부터 선택되는 접합체:

	L1-CIDE-BRM1-10
	L1-CIDE-BRM1-9
	L1-CIDE-BRM1-19
	L1-CIDE-BRM1-13

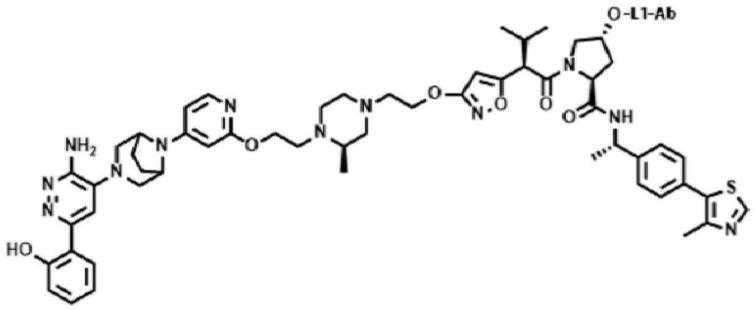
	L1-CIDE-BRM1-20
	L1-CIDE-BRM1-11
	L1-CIDE-BRM1-12
	L1-CIDE-BRM1-14

	L1-CIDE-BRM1-7
	L1-CIDE-BRM1-8
	L1-CIDE-BRM1-16
	L1-CIDE-BRM1-17

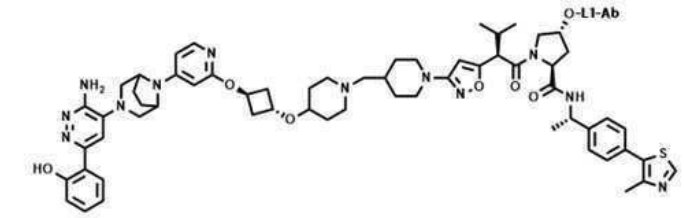
	L1-CIDE-BRM1-18
	L1-CIDE-BRM1-21
	L1-CIDE-BRM1-22

청구항 63

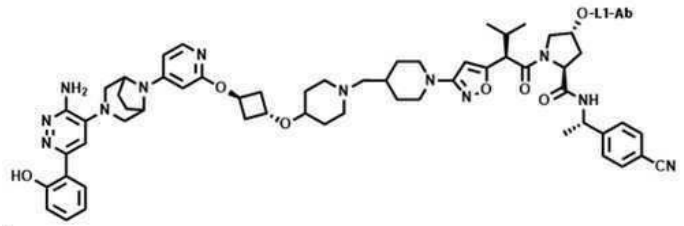
제1항에 있어서, 하기로 이루어진 군으로부터 선택되는 접합체:



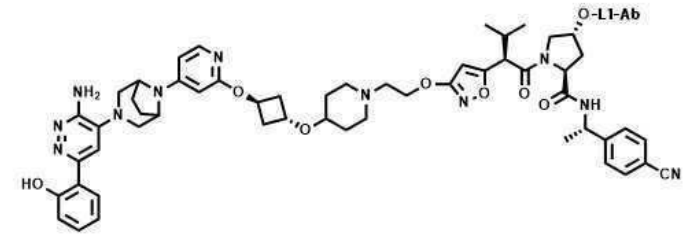
1-L2a,



2-L2b,



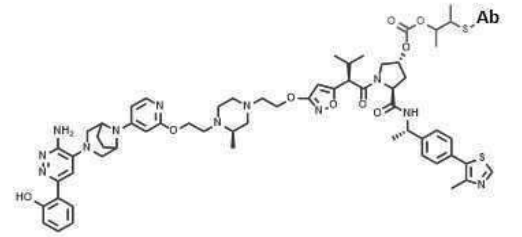
3-L2b, 및



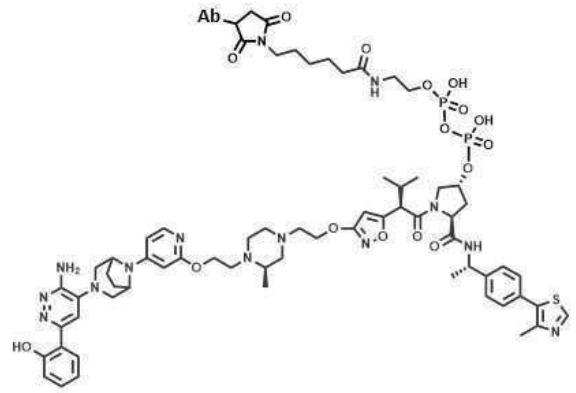
4-L2c.

청구항 64

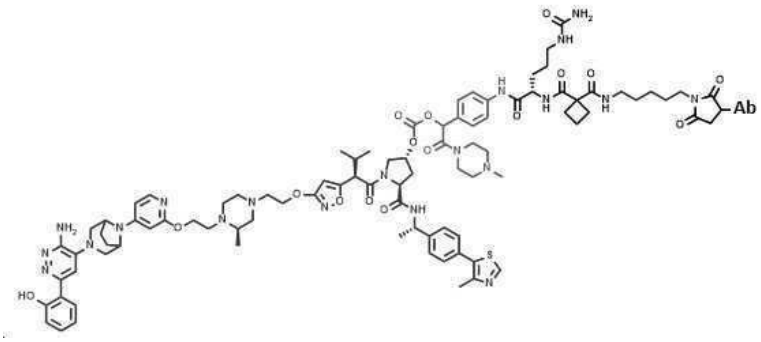
제1항에 있어서, 하기로 이루어진 군으로부터 선택되는 접합체:



,



, 및



.

청구항 65

제1항에 있어서, p는 약 5 내지 약 14의 값을 갖는 것인 접합체.

청구항 66

제1항에 있어서, p는 약 5 내지 약 10의 값을 갖는 것인 접합체.

청구항 67

제1항의 접합체 및

하나 이상의 약학적으로 허용 가능한 부형제

를 포함하는 약학적 조성물.

청구항 68

질병 치료를 필요로 하는 인간의 질병을 치료하는 방법이며,

제1항의 접합체 또는 제47항의 조성물의 유효량을 상기 인간에게 투여하는 단계를 포함하는 방법.

청구항 69

제68항에 있어서, 상기 질병은 암인 방법.

청구항 70

제68항에 있어서, 상기 암은 BRM 의존성인 방법.

청구항 71

제68항에 있어서, 상기 암은 비소세포 폐암인 방법.

청구항 72

대상체에서 표적 BRM 단백질의 수준을 감소시키는 방법이며,

제1항의 접합체 또는 제69항의 조성물을 상기 대상체에게 투여하는 단계를 포함하고,

상기 BRM 부분은 상기 표적 BRM 단백질에 결합하고,

유비퀴틴 리가아제는 상기 결합된 표적 BRM 단백질의 분해에 영향을 미치며,

상기 BRM 표적 단백질의 수준이 감소되는 방법.

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 관련 출원에 대한 상호 참조

[0002] 본 출원은 2020년 7월 21일에 출원한 미합중국 가출원 제63/054,757호의 우선권 이익을 주장하며, 이의 내용은 전체가 본원에 원용된다.

[0003] 서열 목록

[0004] 서열 목록의 공식 사본은 2021년 7월 20일에 생성되고 크기가 44,936 바이트인 P36010-WO_SL.txt 이름의 파일이 포함된 ASCII 형식의 서열 목록으로서 EFS-Web(웹)을 통해 전자적으로 제출되며, 명세서와 동시에 제출된다. 본 ASCII 형식의 문서에 포함된 서열 목록은 명세서의 일부이며 그 전체가 본원에 원용된다.

[0005] 본원에 기재된 요지는 일반적으로 표적 BRM 단백질의 세포내 분해를 촉진하기에 유용한 항체-단백질분해 표적화 키메라 분자를 포함하는 분해제 접합체에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0006] 세포 유지 및 정상적인 기능은 세포 단백질의 제어된 분해를 필요로 한다. 예를 들어, 조절 단백질의 분해는 DNA 복제, 염색체 분리 등과 같은 세포 주기의 사건을 유발한다. 이에 따라, 이러한 단백질의 분해는 세포의 증식, 분화 및 사멸에 영향을 미친다.

[0007] 단백질 억제제는 세포에서 단백질 활성을 차단하거나 감소시킬 수 있지만, 세포에서 단백질 분해는 또한 활성을 감소시키거나 표적 단백질을 완전히 제거할 수 있다. 따라서, 세포의 단백질 분해 경로를 활용하면 단백질 활동을 줄이거나 제거하기 위한 수단을 제공할 수 있다. 세포의 주요 분해 경로 중 하나는 유비퀴틴-프로테아좀 시스템으로 공지되어 있다. 상기 시스템에서, 단백질은 상기 단백질을 유비퀴틴화하여 프로테아좀에 의해 분해되도록 표시된다. 단백질의 유비퀴틴화는 단백질에 결합하고 상기 단백질에 유비퀴틴 분자를 추가하는 E3 유비퀴

틴 리가아제에 의해 실시된다. E3 유비퀴틴 리가아제는 유비퀴틴을 E3 유비퀴틴 리가아제가 단백질에 추가될 수 있도록 만드는 E1 및 E2 유비퀴틴 리가아제를 포함하는 경로의 일부이다.

[0008] 상기 분해 경로를 활용하기 위해, 화학적 분해 유도제(CIDE)로 공지된 분자 구조는 E3 유비퀴틴 리가아제를 분해에 표적화된 단백질과 함께 가져온다. 프로테아좀에 의한 단백질 분해를 촉진하기 위해, CIDE는 E3 유비퀴틴 리가아제에 결합하는 기 및 단백질 표적에 결합하여 분해하는 기로 구성된다. 이러한 기들은 일반적으로 링커와 연결된다. 상기 CIDE는 E3 유비퀴틴 리가아제를 단백질에 근접하게 하여 단백질이 유비퀴틴화되고 분해되도록 표시할 수 있다. 하지만, CIDE의 상대적으로 큰 크기는 표적화된 전달에 문제가 될 수 있을 뿐만 아니라, 빠른 대사/제거, 짧은 반감기, 및 낮은 생체 이용률과 같은 바람직하지 않은 특성에 기여할 수 있다.

[0009] 단백질 표적을 함유하는 세포로의 CIDE의 표적화된 전달을 향상시키는 것을 포함하여, CIDE를 개선하기 위한 당업계의 지속적인 요구가 있다. 본원에 기재된 요지는 이러한 단점 및 당업계의 다른 단점을 해결한다.

발명의 내용

[0010] 일 양태에서, 본원에 기재된 요지는 접합되거나 공유결합으로 연결된 Ab-CIDE에 관한 것이며, 여기서 Ab-CIDE의 구성요소: 항체(Ab), 링커 1 (L1), 링커 2(L2), 단백질 결합기(PB) 및 E3 리가아제 결합기(E3LB)를 연결하는 공유 결합의 위치는 역가, 생체내 약동학, 안정성 및 용해도와 같은 바람직한 특성을 갖는 Ab-CIDE를 제조하기 위해 원하는 대로 맞춤화될 수 있다.

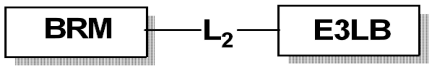
[0011] 일 양태에서, 본원에 기재된 요지는 하기의 화학 구조를 갖는 Ab-CIDE에 관한 것으로서:

[0012] $Ab-(L1-D)_p$,

[0013] 여기서,

[0014] Ab는 항체이고;

[0015] D는 하기의 구조를 갖는 CIDE 또는 이의 전구 약물이고:

[0016] 

[0017] 여기서,

[0018] BRM은 BRM-결합 화합물의 잔기이고,

[0019] E3LB는 E3 리가아제-결합 화합물의 잔기이며, 그리고

[0020] L2는 BRM을 E3LB와 공유결합으로 연결하는 모이어티이고;

[0021] L1은 Ab를 BRM, E3LB 또는 L2 중 하나에 공유결합으로 연결하는 링커-1이며; 그리고

[0022] p는 1 또는 16이다.

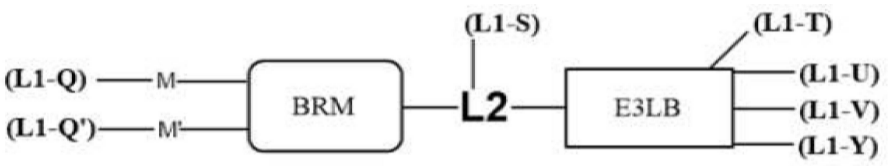
[0023] 다른 양태에서, 본원에 기재된 요지는 하기의 화학 구조를 갖는 Ab-CIDE에 관한 것으로서:

[0024] $Ab-(L1-D)_p$,

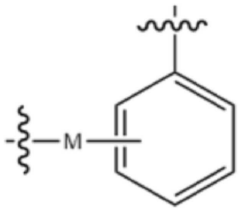
[0025] 여기서,

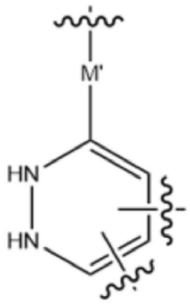
[0026] Ab는 항체이고;

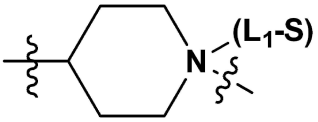
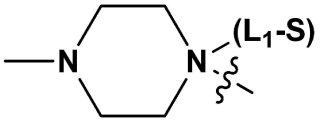
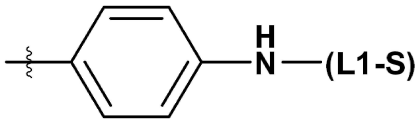
[0027] D는 하기의 구조를 갖는 CIDE 또는 이의 전구 약물이고:

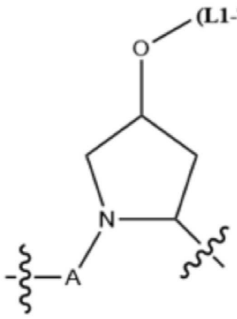
[0028] 

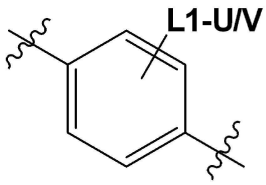
[0029] 여기서 L1은 L1-Q, L1-Q', L1-S, L1-T 및, 존재하는 경우 임의적으로 L1-U, L1-V 및 L1-Y로부터 선택된 하나의 부착점에 부착되고, 여기서

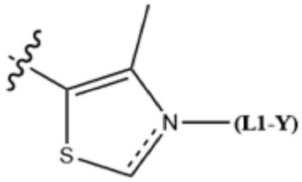
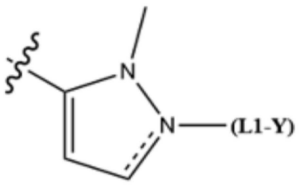
[0030] L1Q는 BRM 상의  에 있고, 여기서 M은 O이고;

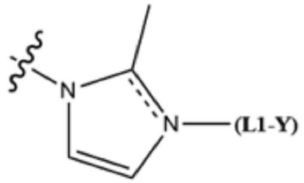
[0031] L1-Q' 는 BRM 상의  에 있고, 여기서 M' 은 -NH이고;

[0032] L1-S는 L2 상의  ,  또는  에 있고;

[0033] L1-T는 E3LB 상의  에 있고, 여기서 A는 L2에 공유 결합된 기이고;

[0034] L1-U 및 L1-V는 E3LB 상의  에 있으며; 그리고

[0035] L1-Y는 E3LB 상의  ,  또는



에 있고, 여기서 ----는 단일 또는 이중 결합이다.

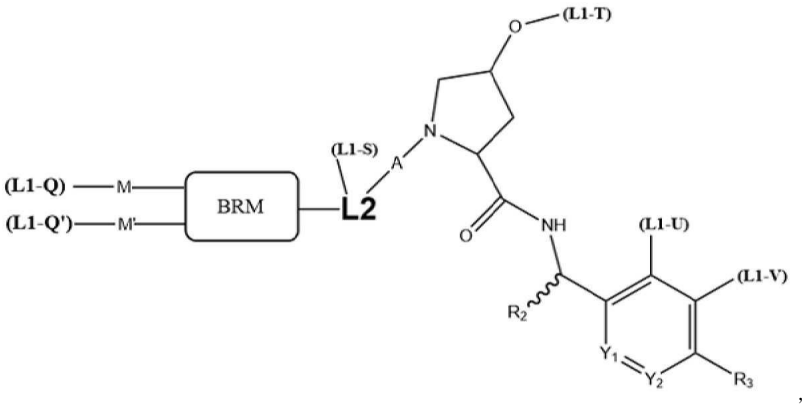
[0036] 다른 양태에서, 본원에 기재된 요지는 하기의 화학 구조를 갖는 Ab-CIDE에 관한 것으로서:

[0037] $Ab-(L1-D)_p$,

[0038] 여기서,

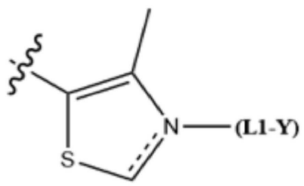
[0039] Ab는 항체이고;

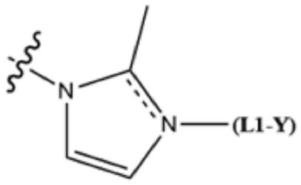
[0040] D는 하기의 구조를 갖는 CIDE 또는 이의 전구 약물이고:

[0041] 

,

[0042] 여기서:

[0043] R_3은 시아노, 

, 또는 

이고,

[0044] 여기서 ----는 단일 또는 이중 결합이다.

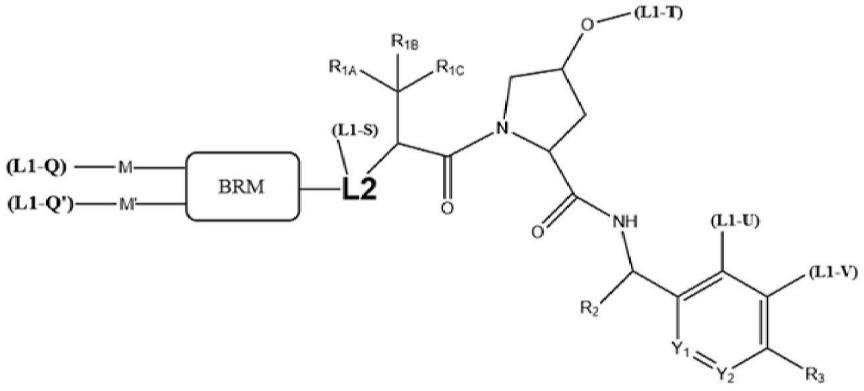
[0045] 다른 양태에서, 본원에 기재된 요지는 하기의 화학 구조를 갖는 Ab-CIDE에 관한 것으로서:

[0046] $Ab-(L1-D)_p$,

[0047] 여기서,

[0048] Ab는 항체이고;

[0049] D는 하기의 구조를 갖는 CIDE 또는 이의 전구 약물이고:



[0050] ,

[0051] 여기서 R_{1A}, R_{1B} 및 R_{1C}는 각각 독립적으로 수소 또는 C_{1-5}알킬이거나; 또는 R_{1A}, R_{1B} 및 R_{1C} 중 2개는 각각이 그에 부착된 탄소와 함께 C_{1-5}시클로알킬을 형성한다.

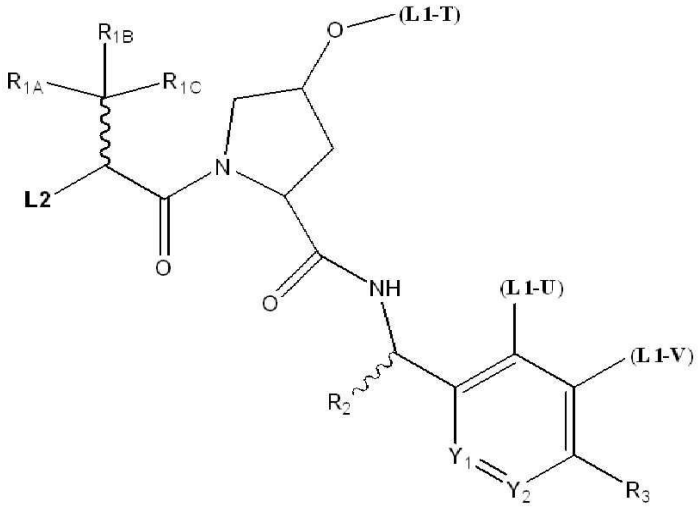
[0052] 다른 양태에서, 본원에 기재된 요지는 하기의 화학 구조를 갖는 Ab-CIDE에 관한 것으로서:

[0053] $Ab-(L1-D)_p$,

[0054] 여기서,

[0055] D는 구조 E3LB-L2-PB를 갖는 CIDE이고;

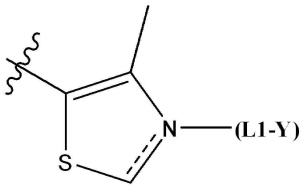
[0056] E3LB는 L2에 공유 결합되고, 상기 E3LB는 하기의:

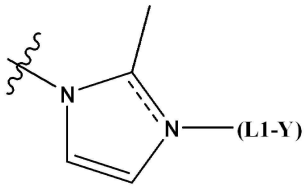


[0057] E3LB

[0058] 화학식을 갖고, 여기서,R_{1A}, R_{1B} 및 R_{1C}는 각각 독립적으로 수소 또는 C_{1-5}알킬이거나; 또는 R_{1A}, R_{1B} 및 R_{1C} 중 2개는 각각이 그에 부착된 탄소와 함께 C_{1-5}시클로알킬을 형성하고;

[0059] R_2는 C_{1-5}알킬이고;

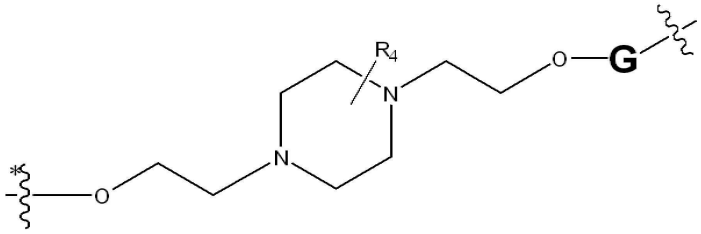
[0060] R_3은 시아노, 

, 및 

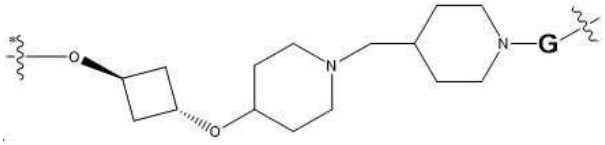
으로 이루어진 군으로부터 선택되고, 여기서 ----은 단일 또는 이중 결합이고;

[0061] Y_1 및 Y_2 중 하나는 -CH이고, Y_1 및 Y_2 중 다른 하나는 -CH 또는 N이고;

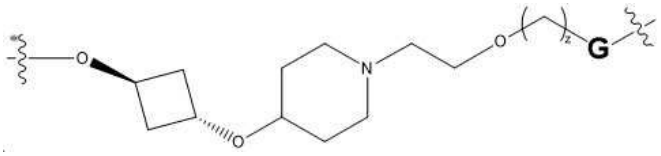
[0062] L2는 E3LB 및 PB에 공유 결합된 링커이고, 상기 L2는 하기의 화학식을 가지고:

[0063]  L2a 이고,

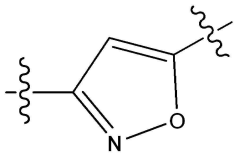
[0064] 여기서, R_4는 수소 또는 메틸,

[0065]  , L2b

[0066] 또는

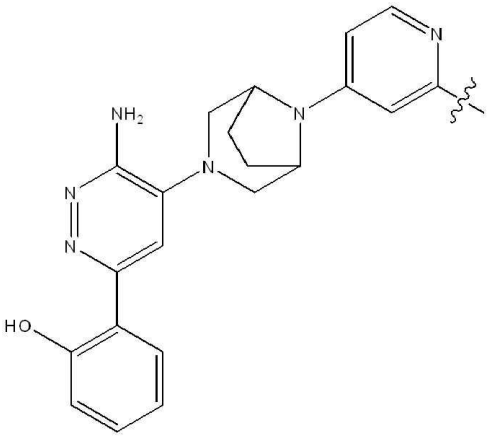
[0067]  L2c

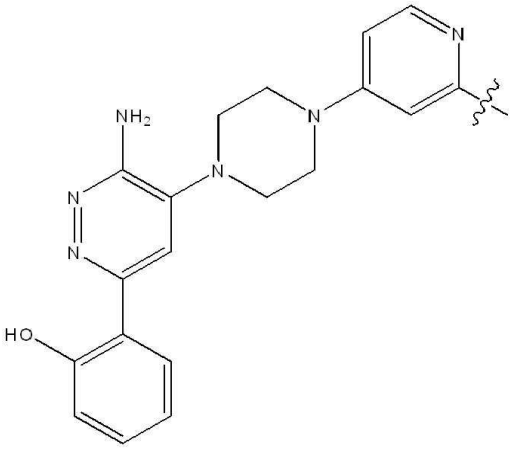
[0068] 이고, 여기서, z는 1 또는 0이고,

[0069] G는  또는 -C(O)NH- 이며; 그리고,

[0070]  는 PB에 대한 부착점이고;

[0071] PB는 L2에 공유 결합된 단백질 결합기이고, 하기의 구조를 가지고:

[0072]  , 또는

[0073]  ;

[0074] Ab는 링커인 적어도 하나의 L1에 공유 결합된 항체이고;

[0075] L1-T, L1-U 및 L1-V는 각각 독립적으로 수소, 또는 Ab 및 D에 공유 결합된 L1 링커이고;

[0076] L1-Y는 수소, 또는 Ab 및 D에 공유 결합된 L1 링커이고;

[0077] q는 1 또는 0이며;

[0078] 그리고,

[0079] p는 약 1 내지 약 8의 값을 가진다.

[0080] 본원에 기재된 요지의 다른 양태는 Ab-CIDE, 및 하나 이상의 약학적으로 허용 가능한 부형제를 포함하는 약학적 조성물이다.

[0081] 본원에 기재된 요지의 다른 양태는 Ab-CIDE를 포함하는 약학적 조성물을 대상체에게 투여함으로써 병태 및 질병을 치료하는 방법에서 Ab-CIDE의 사용이다.

[0082] 본원에 기재된 요지의 다른 양태는 Ab-CIDE를 제조하는 방법이다.

[0083] 본원에 기재된 요지의 다른 양태는 Ab-CIDE를 포함하는 약학적 조성물을 포함하는 제조품, 용기, 및 상기 약학적 조성물이 질병 또는 병태를 치료하는 데 사용될 수 있음을 나타내는 패키지 삽입물 또는 표지이다.

[0084] 또 다른 구현예들이 또한 본원에서 상세하게 설명된다.

도면의 간단한 설명

[0085] 도 1a 및 도 1b는 예시적인 Ab-CIDE Ab-L1a-CIDE-BRM1-1이 세포 기반 분석에서 활성임을 도시한다.

도 2a 및 도 2b는 예시적인 Ab-CIDE Ab-L1a-CIDE-BRM1-3이 세포 기반 분석에서 활성임을 도시한다.

도 3a-도 3l은 예시적인 Ab-CIDE Ab-L1a-CIDE-BRM1-1의 용량 및 항원 의존성 항종양 활성을 도시한다.

도 4a-도 4l은 예시적인 Ab-CIDE Ab-L1a-CIDE-BRM1-3의 용량 및 항원 의존성 항종양 활성을 도시한다. 데이터는 Ab-CIDE Ab-L1a-CIDE-BRM1-1의 데이터와 상대적으로 대조된다.

도 5는 BRM 및 BRG1 분해가 예시적인 Ab-CIDE Ab-L1a-CIDE-BRM1-1의 항종양 활성과 상관관계가 있음을 도시한다.

도 6은 예시적인 Ab-CIDE Ab-L1a-CIDE-BRM1-3의 항종양 활성을 갖는 BRM 및 BRG1 분해가 덜 상관관계가 있음을 도시한다. 모든 레인은 Ab-CIDE Ab-L1a-CIDE-BRM1-3을 위한 것이고, 단, **는 Ab-CIDE-L1a-BRM1-1에 대한 레인을 나타낸다.

도 7은 항체 연결 전략이 CIDE의 활성을 조절할 수 있음을 도시한다. 데이터는 예시적인 Ab-CIDE Ab-L1a-CIDE-BRM1-1이 비접합된 CIDE-BRM1-3보다 더 강력한 BRM 분해를 제공하지만, CIDE-BRM1-3은 일반적으로 CIDE-BRM1-1보다 더 강력함을 도시한다. 모든 레인은 Ab-CIDE Ab-L1a-CIDE-BRM1-1을 위한 것이고, 단, **는 Ab-CIDE-L1a-BRM1-3에 대한 레인을 나타낸다.

도 8-도 12는 본원에 기재된 항체 연결 전략의 일부를 도시한다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0086] SMARCA2로도 공지된 BRM의 표적 단백질 분해 및 관련 질병 및 장애의 치료에 유용한, 본원에서 "Ab-CIDE"로 지칭되는 항체-화학 분해 유도제("CIDE") 접합체가 본원에 개시된다. 특히, 본 개시는 한쪽 말단에 본히펠린다우(Von Hippel-Lindau) E3 유비퀴틴 리가아제에 결합하는 리간드를 함유하고 다른 말단에 BRM(표적 단백질)에 결합하는 모이어티를 함유하는 항체 접합된 CIDES에 관한 것으로서, 상기 표적 단백질은 유비퀴틴 리가아제에 근접하여 분해를 일으켜 BRM을 조절한다. 본원에 기재된 바와 같이, 연결 전략 및 링커의 유형이 조절되었고, 상기 조절이 BRM에 대한 CIDE의 활성에 유리한 효과를 가질 수 있음을 보여주는 데이터가 보고되었다.

[0087] 본원에 기재된 요지는 CIDE를 표적 세포 또는 조직으로 유도하기 위해 표적화하는 항체를 이용한다. 본원에 기재된 바와 같이, 항체를 CIDE에 연결하여 Ab-CIDE를 형성하는 것은 표적 세포 또는 조직에 상기 CIDE를 전달하는 것으로 나타났다. 본원에 나타낸 바와 같이, 예컨대, 실시예에서, 항원을 발현하는 세포는 항원 특이적 Ab-CIDE에 의해 표적화될 수 있으며, 이로써 Ab-CIDE의 CIDE 부분이 상기 표적 세포에 세포내 전달된다. 상기 세포에서 발견되지 않는 항원에 대한 항체를 포함하는 CIDE는 CIDE를 세포로 유의적으로 세포내 전달하지 않는다.

[0088] 이에 따라, 본원에 기재된 요지는 표적 단백질의 유비퀴틴화 및 후속 단백질 분해를 발생시키는 Ab-CIDE 조성물에 관한 것이다. 상기 조성물은 CIDE에 대한 임의의 이용가능한 부착점에서 공유결합으로 연결된 링커 1(L1)에 공유결합으로 연결된 항체를 포함하고, 여기서 상기 CIDE는 E3 유비퀴틴 리가아제 결합(E3LB) 모이어티를 포함하고, 여기서 상기 E3LB 모이어티는 E3LB 모이어티를 BRM 또는 SMARCA2인 표적 단백질을 인식하는 모이어티인 단백질 결합 모이어티(PB)에 공유결합으로 연결하는 링커 2(L2)인 VHL인 E3 유비퀴틴 리가아제 단백질을 인식한다. 본원에 기재된 요지는 단백질 활성을 분해하여 조절하고 단백질 활성과 관련된 질병 및 병태 치료에 유용하다.

[0089] 현재 개시된 요지는 본원의 하기에서 보다 완전하게 설명될 것이다. 하지만, 본원에 기재된 현재 개시된 요지의 많은 변형 및 다른 구현예들이 전술한 설명에서 제시된 교시의 이점을 가지면서 현재 개시된 요지가 속한 기술 분야의 숙련자에게 떠오를 것이다. 따라서, 현재 개시된 요지는 개시된 특정 구현예들에 제한되지 않으며 변형 및 기타 구현예들은 첨부된 청구범위에 속하는 것으로 의도됨을 이해하여야 한다. 즉, 본원에 기재된 요지는 모든 대안, 변형 및 등가물을 포함한다. 원용된 문헌, 특허 및 유사한 자료들 중에서 하나 이상이 정의된 용어, 용어 용례 또는 기재된 기술 등을 포함하지만 이에 제한되지 않는 본 출원과 상이하거나 상충되는 경우, 본 출원이 우선한다. 달리 정의되지 않는 한, 본원에서 사용하는 모든 기술 및 과학 용어는 해당 분야의 기술자에 의해 일반적으로 이해되는 바와 동일한 의미를 가진다. 본원에 언급된 모든 간행물, 특허 출원, 특허 및 기타 참조문헌은 그 전체가 본원에 원용된다.

[0090] **I. 정의**

[0091] 용어 "CIDE"는 일반적으로 3개의 구성요소, 즉, E3 유비퀴틴 리가아제 결합기(E3LB), 링커 L2 및 단백질 결합기(PB)를 갖는 단백질분해 표적 키메라 분자인 화학적 분해 유도제를 지칭한다.

[0092] "잔기", "모이어티", "부분" 또는 "기"라는 용어는 다른 구성요소에 공유 결합되거나 공유결합으로 연결된 구성요소를 의미한다. 용어 "구성요소"는 또한 이러한 잔기, 모이어티, 부분 기를 설명하기 위해 본원에서 사용된다. 예로써, 화합물의 잔기는 공유 결합으로 대체된 수소 또는 히드록시와 같은 화합물의 원자 또는 원자들을 가짐으로써, 상기 잔기를 CIDE, L1-CIDE 또는 Ab- CIDE의 다른 구성요소에 결합한다. 예를 들어 "CIDE의 잔기"는 그 자체가 임의적으로 항체에 추가로 연결될 수 있는 링커 L2와 같은 하나 이상의 기에 공유결합으로 연결되는 CIDE를 의미한다.

[0093] "공유 결합된" 또는 "공유결합으로 연결된"이라는 용어는 하나 이상의 전자쌍을 공유함으로써 형성된 화학 결합을 의미한다.

[0094] 본원에서 사용되는 용어 "펩티드 모방체" 또는 PM은 비펩티드 화학적 모이어티를 의미한다. 펩티드는 한 아미노산의 카르복실기가 다른 아미노산의 아미노기와 반응할 때 형성되는 공유 화학 결합인 펩티드(아미드) 결합으로 연결되는 아미노산 단량체의 짧은 사슬이다. 가장 짧은 펩티드는 단일 펩티드 결합에 의해 결합된 2개의 아미노산으로 구성된 디펩티드이며, 트리펩티드, 테트라펩티드 등이 뒤따른다. 펩티드 모방체 화학 모이어티는 비아미노산 화학 모이어티를 포함한다. 펩티드 모방체 화학 모이어티는 또한 하나 이상의 비아미노산 화학 단위에 의해 분리된 하나 이상의 아미노산을 포함할 수 있다. 펩티드 모방체 화학 모이어티는 이의 화학 구조의 임의의

부분에서 펩티드 결합으로 연결된 2개 이상의 인접 아미노산을 함유하지 않는다.

[0095] 본원에서 용어 “항체”는 가장 광범위한 의미로 사용되고 구체적으로 단일결합 항체, 다중결합 항체, 이량체, 다량체, 다중특이적 항체(예컨대, 이중특이적 항체) 및 이들이 원하는 생물학적 특성을 나타내는 한 이의 항원 결합 항체 단편을 포함한다(Miller et al (2003) *Jour. of Immunology* 170:4854-4861을 참조). 항체는 쥐, 인간, 인간화된, 키메라일 수 있거나 다른 종으로부터 유래될 수 있다. 항체는 특이적 항원을 인지하고 이에 결합할 수 있는 면역계에 의해 생성되는 단백질이다. (Janeway, C., Travers, P., Walport, M., Shlomchik (2001) *Immuno Biology*, 5th Ed., Garland Publishing, New York). 표적 항원은 일반적으로 다중 항체 상에서 CDR(상보적 결정 영역)에 의해 인지되는 에피토프로 불리우는 다수의 결합부위를 가진다. 상이한 에피토프에 특이적으로 결합하는 각각의 항체는 상이한 구조를 가진다. 따라서, 하나의 항원은 하나 초과의 상응하는 항체를 가질 수 있다. 항체는 전장 면역글로불린 분자, 또는 전장 면역글로불린 분자의 면역학적 활성 부분, 즉, 관심 표적의 항원 또는 이의 일부에 면역특이적으로 결합하는 항원 결합 부위를 함유하는 분자를 포함하고, 상기 표적은 암 세포 또는 자가면역 질환과 관련된 자가면역 항체를 생성하는 세포를 포함하지만, 이에 제한되지는 않는다. 본원에 개시된 면역글로불린은 임의의 유형(예컨대, IgG, IgE, IgM, IgD 및 IgA), 부류(예컨대, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1 및 IgA2) 또는 면역글로불린 분자의 하위부류일 수 있다. 면역글로불린은 임의의 종으로부터 유래할 수 있다. 하지만, 일 양태에서, 면역글로불린은 인간, 쥐 또는 토끼 기원이다.

[0096] 본원에서 사용되는 용어 "항체 단편(들)"은 전장 항체의 일부, 일반적으로 이의 항원 결합 또는 가변 영역을 포함한다. 항체 단편의 예는 Fab, Fab', $F(ab')_2$ 및 Fv 단편; 디아바디; 선형 항체; 미니바디(Olafsen et al (2004) *Protein Eng. Design & Sel.* 17(4):315-323), Fab 발현 라이브러리에 의해 생성된 단편, 반유전형(항Id) 항체, CDR(상보적 결정 영역) 및 암 세포 항원, 바이러스 항원 또는 미생물 항원에 면역특이적으로 결합하는 상기의 것들 중 임의의 것의 에피토프 결합 단편, 단일 사슬 항체 분자; 및 항체 단편으로부터 형성된 다중특이적 항체를 포함한다.

[0097] 본원에서 사용된 바와 같이, 용어 “단일클론 항체”는 실질적으로 균질한 항체의 개체군으로부터 수득된 항체를 지칭한다. 다시 말하면, 상기 개체군을 포함하는 개별 항체는 소량으로 존재할 수 있는 가능한 자연발생 돌연변이를 제외하고 동일하다. 단일클론 항체는 고도로 특이적이고 단일 항원성 부위에 대해 지향된다. 또한, 상이한 결정인자(에피토프)에 대해 지향된 상이한 항체를 포함하는 다중클론 항체 제조물과 대조적으로, 각 단일클론 항체는 항원 상에서 단일 결정인자에 대해 지향된다. 단일클론 항체는, 이들의 특이성에 더하여, 다른 항체에 의한 오염 없이 합성될 수 있다는 점에서 유리하다. 수식어 “단일클론”은 항체의 실질적으로 균질한 모집단으로부터 획득되는 것으로서 항체의 특징을 표시하고, 임의의 특정 방법에 의한 항체가 생성될 것을 필요로 하는 것으로 해석되지 않는다. 예를 들어, 본원에 제공된 방법에 따라 사용되는 단일클론 항체는 Kohler et al (1975) *Nature*, 256:495에 의해 처음 기재된 하이브리도마 방법에 의해 제조될 수 있거나, 또는 재조합 DNA 방법에 의해 제조될 수 있다(예를 들어, US 4816567; US 5807715를 참조). “단일클론 항체”는 또한, 예를 들어 Clackson et al (1991) *Nature*, 352:624-628; Marks et al (1991) *J. Mol. Biol.*, 222:581-597에 기재된 기술을 사용하여 파지 항체 라이브러리로부터 단리될 수 있다.

[0098] 본원의 단일클론 항체는 구체적으로 “키메라” 항체를 포함하고, 중쇄 및/또는 경쇄 부분은 특정 종으로부터 유래되거나 특정 항체 부류 또는 하위부류에 속하는 항체 내 상응하는 서열과 동일하거나 상동성인 반면, 상기 쇄(들)의 나머지는 다른 종으로부터 유래되거나 다른 항체 부류 또는 하위부류에 속하는 항체 뿐만 아니라 이들이 목적하는 생물학적 활성을 나타내는 한 상기 항체의 단편 내에서 상응하는 서열과 동일하거나 상동성이다(US 4816567; and Morrison et al (1984) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA,* 81:6851-6855). 본원에서 관심이 되는 키메라 항체는 비인간 영장류(예컨대, 긴꼬리원숭이, 유인원 등)로부터 유래된 가변 도메인 항원 결합 서열 및 인간 불변 영역 서열을 포함하는 “영장류화” 항체를 포함한다.

[0099] 용어 “키메라” 항체는 중쇄 및/또는 경쇄의 일부가 특정 출처 또는 종으로부터 유래되지만, 중쇄 및/또는 경쇄의 잔부는 상이한 출처 또는 종들로부터 유래한 항체를 지칭한다.

[0100] 항체의 "부류(class)"란 항체의 중쇄가 보유하는 불변 도메인 또는 불변 영역의 유형을 지칭한다. 항체에는 5가지 주요 부류가 있으며: IgA, IgD, IgE, IgG, 및 IgM, 그리고 이들 중 몇몇은 하위부류(동형), 예컨대, IgG_1, IgG_2, IgG_3, IgG_4, IgA_1, 및 IgA_2로 추가로 세분화될 수 있다. 상이한 부류의 면역글로불린에 해당하는 중쇄 불변 도메인들은 각각 a, d, e, g, 및 m로 불린다.

[0101] 본원에서 사용되는 용어 "원형 항체"는 VL 및 VH 도메인뿐만 아니라 경쇄 불변 도메인(CL) 및 중쇄 불변

도메인, CH1, CH2 및 CH3을 포함하는 것이다. 불변 도메인은 선천적 서열 불변 도메인(예컨대, 인간 선천적 서열 불변 도메인) 또는 이의 아미노산 서열 변이체일 수 있다. 원형 항체는 항체의 Fc 불변 영역(천연 서열 Fc 영역 또는 아미노산 서열 변이체 Fc 영역)에 기인하는 생물학적 활성을 나타내는 하나 이상의 "작동체 기능"을 가질 수 있다. 항체 작동체 기능의 예는 C1q 결합; 보체 의존성 세포독성; Fc 수용체 결합; 항체 의존성 세포 매개된 세포독성(ADCC); 식균작용; 및 세포 표면 수용체, 예컨대, B 세포 수용체 및 BCR의 하향조절을 포함한다.

[0102] 본원에서 사용된 용어 "Fc 영역"은 불변 영역의 적어도 일부를 함유하는 면역글로불린 중쇄의 C 말단 영역을 의미한다. 상기 용어는 천연 서열 Fc 영역 및 변이체 Fc 영역을 포함한다. 일 구현예에서, 인간 IgG 중쇄 Fc 영역은 Cys226, 또는 Pro230에서 중쇄의 카르복실 말단까지 연장된다. 하지만, Fc 영역의 C 말단 리신(Lys447)은 존재하거나 존재하지 않을 수 있다. 본원에서 다르게 명시되지 않는 한, Fc 영역 또는 불변 영역에서 아미노산 잔기의 넘버링은 Kabat et al., *Sequences of Proteins of Immunological Interest,* 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD, 1991에 기재된 바와 같이 EU 인덱스라고도 하는 EU 넘버링 시스템에 따른다.

[0103] 본원에 사용된 용어 “프레임워크” 또는 “FR”은 초가변 영역(HVR) 잔기 이외의 가변 도메인 잔기를 지칭한다. 가변 도메인의 FR은 일반적으로 4개의 FR 도메인들로 구성된다: FR1, FR2, FR3, 및 FR4. 이에 따라, HVR 및 FR 서열들은 일반적으로 VH(또는 VL)에서 하기의 순서로 나타난다: FR1-H1(L1)-FR2-H2(L2)-FR3-H3(L3)-FR4.

[0104] 용어 “전장 항체", “원형 항체", 및 “전체 항체”는 본원에서 함께 사용되어 선천적 항체 구조와 실질적으로 유사한 구조를 갖거나 또는 본원에서 정의된 Fc 영역을 함유하는 중쇄를 갖는 항체를 지칭한다.

[0105] "인간 항체"는 인간 또는 인간 세포에 의해 생성되거나 인간 항체 레퍼토리 또는 다른 인간 항체 부호화 서열을 이용하는 비인간 출처로부터 유래된 항체의 아미노산 서열에 상응하는 아미노산 서열을 갖는 항체이다. 이러한 인간 항체의 정의는 비인간 항원 결합 잔기를 포함하는 인간화 항체를 구체적으로 배제시킨다.

[0106] “인간화” 항체는 비인간 HVR로부터 아미노산 잔기 및 인간 FR로부터 아미노산 잔기를 포함하는 키메라 항체를 지칭한다. 특정한 구현예들에서, 인간화 항체는 적어도 1개, 및 전형적으로 2개의 가변 도메인을 실질적으로 모두 포함하고, 여기서 HVR(예컨대, CDR)의 전부 또는 실질으로 전부가 비인간 항체의 것들에 상응하고, FR의 전부 또는 실질적으로 전부가 인간 항체의 것들에 상응한다. 인간화 항체는 임의적으로 인간 항체로부터 유래된 항체 불변 영역의 적어도 일부를 포함할 수 있다. 항체, 예컨대, 비인간 항체의 “인간화 형태”는 인간화를 겪은 항체를 지칭한다.

[0107] “단리된 항체”는 이의 천연 환경의 구성요소로부터 분리되어 있는 항체이다. 일부 구현예들에서, 항체는 예를 들어, 전기영동(예컨대, SDS-PAGE, 등전점(IEF), 모세관 전기영동) 또는 크로마토그래피(예컨대, 이온 교환 또는 역상 HPLC)로 결정하였을 때 95% 또는 99% 초과의 순도로 정제된다. 항체 순도를 평가하는 방법들을 검토하려면, 예컨대, Flatman et al., *J. Chromatogr. B* 848:79-87 (2007)을 참조한다.

[0108] “단리된 핵산”은 이의 천연 환경의 구성요소로부터 분리된 핵산 분자를 지칭한다. 단리된 핵산은 핵산 분자를 보통 포함하는 세포 안에 있는 핵산 분자를 포함하지만, 상기 핵산 분자는 이의 자연 염색체 위치와 상이한 염색체 위치에 존재하거나 또는 염색체 외부에 존재한다.

[0109] “항체를 부호화하는 단리된 핵산”은 항체 중쇄 및 경쇄(또는 이들의 단편)를 부호화하는 하나 이상의 핵산 분자, 예컨대, 단일 벡터 또는 별개의 벡터에서 이러한 핵산 분자(들), 및 숙주 세포 내에 하나 이상의 위치에서 존재하는 이러한 핵산 분자(들)를 지칭한다.

[0110] “네이키드(naked) 항체”는 이질성 모이어티(예컨대, 세포독성 모이어티) 또는 방사능표지에 접합되지 않은 항체를 말한다. 네이키드 항체는 약학적 제제 내에 존재할 수 있다.

[0111] “선천적 항체”는 변화하는 구조를 갖는 자연 발생 면역글로불린 분자를 지칭한다. 예를 들어, 선천적 IgG 항체는 이종사량체 당단백질로써, 약 150,000 달톤이며, 2개의 동일한 경쇄 및 2개의 동일한 중쇄로 구성되며, 이들은 이황화 결합에 의해 연결되어 있다. N 말단으로부터 C 말단에 이르기까지, 각각의 중쇄는 가변 중쇄 도메인 또는 중쇄 가변 도메인이라고도 불리는 가변 영역(VH)에 이어서 3개의 불변 도메인(CH1, CH2 및 CH3)을 갖는다. 유사하게, N 말단으로부터 C 말단에 이르기까지, 각 경쇄는 가변 경쇄 도메인 또는 경쇄 가변 도메인으로 또한 불리는 가변 영역(VL)에 이어서 불변 경쇄(CL) 도메인을 갖는다. 항체의 경쇄는 이의 불변 도메인의 아미

노산 서열에 따라 카파(κ) 및 람다(λ)라고 하는 두 가지 유형 중 하나로 지정될 수 있다.

[0112] 기준 폴리펩티드 서열에 대한 "퍼센트(%) 아미노산 서열 동일성"은 기준 폴리펩티드 서열의 아미노산 잔기와 동일한 후보 서열의 아미노산 잔기들의 백분율로 정의되며, 이때 서열을 정렬시킨 후 최대 서열 동일성 백분율을 달성하기 위하여 필요하다면 갭을 도입하며, 임의의 보존적 치환은 상기 서열의 동일성의 일부로서 간주하지 않는다. 아미노산 서열 동일성 퍼센트를 결정하기 위한 정렬은 예를 들어 BLAST, BLAST-2, ALIGN 또는 Megalign(DNASTAR) 소프트웨어와 같은 공개적으로 이용가능한 컴퓨터 소프트웨어를 사용하여 해당 업계의 기술 범위에 속하는 다양한 방법으로 구현될 수 있다. 당업자는 비교되는 서열들의 전체 길이에 걸쳐 최대 정렬을 구현하는 데 필요한 임의의 알고리즘을 포함하여 서열들을 정렬하기 위한 적절한 매개변수를 결정할 수 있다. 그러나, 본 발명의 목적을 위하여, 아미노산 서열 동일성 % 값은 서열 비교 컴퓨터 프로그램 ALIGN-2을 이용하여 생성된다. ALIGN-2 서열 비교 컴퓨터 프로그램은 Genentech, Inc.에서 제작되었으며 소스 코드는 미국 워싱턴 D.C., 20559에 소재한 미국 저작권청에 사용자 문서와 함께 제출되었으며, 미국 저작권 등록 번호 TXU510087로 등록되었다. ALIGN-2 프로그램은 캘리포니아주 사우스 샌프란시스코에 소재한 Genentech, Inc.사로부터 공개적으로 이용가능하거나 소스 코드로부터 컴파일될 수 있다. ALIGN-2 프로그램은 디지털 UNIX V4.0D를 포함한 UNIX 운영 체제에서 사용되도록 컴파일해야 한다. 모든 서열 비교 파라미터는 ALIGN-2 프로그램에 의해 설정되며 가변적이지 않다.

[0113] ALIGN-2가 아미노산 서열 비교에 사용되는 상황에서, 주어진 아미노산 서열 B에 대해, 상기 서열 B와 비교해 또는 상기 서열 B에 대비해, 주어진 아미노산 서열 A의 % 아미노산 서열 동일성(양자택일적으로, 주어진 아미노산 서열 B에 대해, 상기 서열 B와 비교해 또는 상기 서열 B에 대비해 특정 % 아미노산 서열 동일성을 가지거나 포함하는 주어진 아미노산 서열 A로서 표현될수 있다)은 다음과 같이 산출된다:

[0114] 100 x 분율 X/Y

[0115] 이때, X는 A와 B의 상기 프로그램의 정렬에서 서열 정렬 프로그램 ALIGN-2에 의해 동일한 매치로 기록된 아미노산 잔기의 수이며, Y는 B 중의 아미노산 잔기의 총 수이다. 아미노산 서열 A의 길이가 아미노산 서열 B의 길이와 동일하지 않은 경우, B에 대한 A의 % 아미노산 서열 동일성은 A에 대한 B의 % 아미노산 서열 동일성과 같지 않을 것임이 인지될 것이다. 특별히 달리 언급되지 않는 한, 본원에 사용된 모든 % 아미노산 서열 동일성 값은 ALIGN-2 컴퓨터 프로그램을 사용하여 바로 앞 단락에서 기술된 바와 같이 수득된다.

[0116] 중쇄의 불변 도메인의 아미노산 서열에 따라서, 원형 항체는 상이한 "부류"에 배정될 수 있다. 원형 면역글로불린 항체에는 5가지 주요 부류가 있다: IgA, IgD, IgE, IgG, 및 IgM이며, 이들 중 몇몇은 하위부류(동형), 예컨대 IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1, 및 IgA2로 추가 분류될 수 있다. 항체의 상이한 부류에 상응하는 중쇄 불변 도메인은 각각, α, δ, ε, γ 및 μ로 불린다. 상이한 부류의 면역글로불린의 하위단위 및 3차원 구성은 당업계에 일반적으로 공지되어 있다. Ig 형태에는 힌지 변형 또는 힌지 없는 형태가 포함된다(Roux et al (1998) *J. Immunol*. 161:4083-4090; Lund et al (2000) *Eur. J. Biochem*. 267:7246-7256; US 2005/0048572; US 2004/0229310).

[0117] 본원에 사용되는 용어 "인간 공통 프레임워크"는 인간 면역글로불린 VL 또는 VH 프레임워크 서열의 선택에서 가장 흔히 발생하는 아미노산 잔기를 나타내는 프레임워크이다. 일반적으로, 인간 면역글로불린 VL 또는 VH 서열의 선택은 가변 도메인 서열의 하위군으로부터 유래된다. 일반적으로, 서열들의 하위군들은 Kabat et al., *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, Fifth Edition, NIH Publication 91-3242, Bethesda MD (1991), vols. 1-3에서와 같은 하위군이다. 일 구현예에서, VL에 대해, 상기 하위군은 상기 Kabat et al.에서와 같은 하위군 카파 I이다. 일 구현예에서, VH에 대해, 상기 하위군은 상기 Kabat et al.에서와 같은 하위군 카파 III이다.

[0118] "수용체(acceptor) 인간 프레임워크"는, 하기에 정의되는 바와 같이, 인간 면역글로불린 프레임워크 또는 인간 공통 프레임워크로부터 유도된 경쇄 가변 도메인(VL) 프레임워크 또는 중쇄 가변 도메인(VH) 프레임워크의 아미노산 서열을 포함하는 프레임워크이다. 인간 면역글로불린 프레임워크 또는 인간 공통 프레임워크로부터 "유래된" 수용체 인간 프레임워크는 이의 동일한 아미노산 서열을 포함할 수 있거나, 아미노산 서열 변화를 함유할 수 있다. 일부 구현예들에서, 아미노산 변화의 수는 10개 이하, 9개 이하, 8개 이하, 7개 이하, 6개 이하, 5개 이하, 4개 이하, 3개 이하, 또는 2개 이하이다. 일부 구현예들에서, VL 수용체 인간 프레임워크는 VL 인간 면역글로불린 프레임워크 서열 또는 인간 공통 프레임워크 서열과 서열에서 동일하다.

[0119] 본원에 사용된 용어 "가변 영역" 또는 "가변 도메인"은 항체가 항원에 결합하는 것에 관여하는 항체 중쇄

또는 경쇄의 도메인을 지칭한다. 천연 항체의 중쇄 및 경쇄의 가변 도메인(각각 VH 및 VL)은 일반적으로 유사한 구조를 가지며, 이때 각각의 도메인은 4개의 보존된 프레임워크 영역(framework region, FR) 및 3개의 초가변 영역(hypervariable region, HVR)을 포함한다. (예컨대, Kindt et al. *Kuby Immunology*, 6th ed., W.H. Freeman and Co., page 91 (2007)을 참조.) 단일 VH 또는 VL 도메인은 항원 결합 특이성을 부여하기에 충분할 수 있다. 또한, 특정 항원에 결합하는 항체는 각각, 상보성 VL 또는 VH 도메인의 라이브러리를 선별검사하기 위해, 항원에 결합하는 항체로부터 VH 또는 VL 도메인을 이용하여 단리될 수 있다. 예컨대, Portolano et al., *J. Immunol.* 150:880-887 (1993); Clarkson et al., *Nature* 352:624-628 (1991)을 참조한다.

[0120] 본원에서 사용되는 용어 "초가변 영역" 또는 "HVR"은 서열이 초가변이고 및/또는 구조적으로 정의된 루프("초가변 루프")를 형성하는 항체 가변 도메인의 영역들 각각을 지칭한다. 일반적으로, 천연 4쇄 항체는 6개의 HVR(VH에 3개(H1, H2, H3) 및 VL에 3개(L1, L2, L3))을 포함한다. HVR은 일반적으로 초가변 루프로부터 및/또는 "상보성 결정 영역"(CDR)으로부터의 아미노산 잔기를 포함하며, 상기 상보성 결정 영역은 최고 서열 가변성을 가지고/가지거나 항원 인식에 수반된다. 예시적인 초가변 루프는 아미노산 잔기 26-32(L1), 50-52(L2), 91-96(L3), 26-32(H1), 53-55(H2), 및 96-101(H3)에서 발생한다. (Chothia and Lesk, *J. Mol. Biol.* 196:901-917 (1987).) 예시적인 CDR들(CDR-L1, CDR-L2, CDR-L3, CDR-H1, CDR-H2, 및 CDR-H3)은 L1의 아미노산 잔기 24-34, L2의 50-56, L3의 89-97, H1의 31-35B, H2의 50-65, 및 H3의 95-102에서 나타난다. (Kabat et al., *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD (1991).) VH에서의 CDR1은 제외하고, CDR은 일반적으로 초가변 루프를 형성하는 아미노산 잔기를 포함한다. CDR은 또한 항원과 접촉하는 잔기인 "특이성 결정 잔기" 또는 "SDR"을 포함한다. SDR은 단축 CDR 또는 a-CDR로 불리는 CDR의 영역들 내에 함유된다. 예시적인 a-CDR들(a-CDR-L1, a-CDR-L2, a-CDR-L3, a-CDR-H1, a-CDR-H2, 및 a-CDR-H3)은 L1의 아미노산 잔기 31-34, L2의 50-55, L3의 89-96, H1의 31-35B, H2의 50-58, 및 H3의 95-102에서 발생한다. (Almagro and Fransson, *Front. Biosci.* 13:1619-1633 (2008)을 참조) 달리 언급이 없는 한, HVR 잔기들 및 가변 도메인 내 다른 잔기들 (예컨대, FR 잔기)은 상기 Kabat et al.에 따라 본원에서 넘버링된다.

[0121] "작동체 기능"은 항체의 Fc 영역에 기인한 생물학적 활성을 지칭하고, 이는 항체 동형에 따라서 가변된다. 항체 작동체 기능의 예는 하기를 포함한다: C1q 결합 및 보체 의존적 세포독성(CDC); Fc 수용체 결합; 항체 의존적 세포 매개된 세포독성(ADCC); 식세포작용; 세포 표면 수용체의 하향 조절(예컨대, B 세포 수용체); 및 B 세포 활성화.

[0122] 용어 "에피토프"는 항체가 결합하는 항원 분자 상의 특정 부위를 지칭한다.

[0123] "친화성"은 분자(예컨대, 항체)의 단일 결합 부위 및 이의 결합 상대(예컨대, 항원) 사이에 비공유 상호작용의 총계의 강도를 지칭한다. 달리 나타내지 않는 한, 본원에서 사용된 바와 같이, "결합 친화도"는 결합 쌍의 구성원들(예컨대, 항체 및 항원) 사이의 1:1 상호작용을 반영하는 고유 결합 친화도를 말한다. 이의 상대 Y에 대한 분자 X의 친화도는 일반적으로 해리 상수(Kd)로 나타낼 수 있다. 친화도는 본원에 기재된 것을 포함하여 당업계에 공지된 일반적인 방법에 의해 측정될 수 있다. 결합 친화도를 측정하기 위한 구체적인 설명적 및 예시적 구현예는 하기에 기재되어 있다. 특정 구현예들에서, 본원에 제공된 항체는 해리 상수(Kd)가 ≤ 1 μM, ≤ 100 nM, ≤ 10 nM, ≤ 5 nm, ≤ 4 nM, ≤ 3 nM, ≤ 2 nM, ≤ 1 nM, ≤ 0.1 nM, ≤ 0.01 nM, 또는 ≤ 0.001 nM(예컨대, 10^{-8} M 이하, 예컨대, 10^{-8} M 내지 10^{-13} M, 예컨대, 10^{-9} M 내지 10^{-13} M)이다.

[0124] "친화성 성숙된" 항체는 변경을 갖지 않는 부모 항체와 비교하여, 하나 이상의 초가변 영역(HVR)에서 한 가지 이상의 변경을 갖는 항체를 지칭하되, 이러한 변경은 항원에 대한 항체의 친화성에서 향상을 유발한다.

[0125] 본원에 사용된 용어 "벡터"는 이것이 연결되는 다른 핵산을 증식시킬 수 있는 핵산 분자를 지칭한다. 상기 용어에는 자가 복제 핵산 구조체로서의 벡터 그리고 그것이 도입되는 숙주 세포의 게놈에 통합된 벡터가 포함된다. 특정 벡터는 작동가능하게 연결된 핵산의 발현을 지시할 수 있다. 이러한 벡터는 본원에서 "발현 벡터"로 지칭된다.

[0126] 본원에서 사용되는 용어 "유리 시스테인 아미노산"은 모 항체 내로 조작되고, 티올 작용기(-SH)를 가지며, 분자 내 또는 분자간 이황화 가교로서 쌍을 이루지 않는 시스테인 아미노산 잔기를 지칭한다. 본원에서 사용되는 용어 "아미노산"은 글리신, 알라닌, 발린, 류신, 이소류신, 페닐알라닌, 프롤린, 세린, 트레오닌, 티로신, 시스테인, 메티오닌, 리신, 아르기닌, 히스티딘, 트립토판, 아스파르트산, 글루탐산, 아스파라긴, 글루타민 또는 시트룰린을 의미한다.

[0127] 본원에서 사용되는 용어 "링커", "링커 단위" 또는 "링크"는 CIDE 모이어티를 항체, 또는 CIDE의 잔기, 부분, 모이어티, 군 또는 구성요소를 CIDE의 다른 잔기, 부분, 모이어티, 군 또는 구성요소에 공유결합으로 부착하는 원자 사슬을 포함하는 화학적 모이어티를 의미한다. 다양한 구현예들에서, 링커는 링커 1, 링커 2, L1 또는 L2로 명시된 2가 라디칼이다.

[0128] "환자" 또는 "개체" 또는 "대상체"는 포유류이다. 포유동물에는 가축(예컨대, 소, 양, 고양이, 개 및 말), 영장류(예컨대, 인간 및 비인간 영장류, 컨대, 원숭이), 토끼 및 설치류(예컨대, 마우스 및 랫트)가 포함되지만, 이에 제한되지는 않는다. 특정 구현예들에서, 상기 환자, 개체 또는 대상체는 인간이다. 일부 구현예들에서, 상기 환자는 "암 환자", 즉 하나 이상의 암 증상을 가지고 있거나 가질 위험이 있는 환자일 수 있다.

[0129] “환자 개체군”은 암 환자의 군을 지칭한다. 이러한 개체군은 약물의 통계학적으로 유의한 효능 및/또는 안전성을 증명하는 데 이용될 수 있다.

[0130] 용어 "암" 및 "암성"은 전형적으로 조절 해제된 세포 성장/증식을 특징으로 하는 포유류에서의 생리적 조건을 지칭하거나 또는 이를 기재한다. “종양”은 한 가지 이상의 암성 세포를 포함한다. 암의 예는 본원의 다른 곳에서 제공된다.

[0131] 본원에서 사용된 바와 같이, “치료”(및 이의 문법적 변이, 예컨대 “치료한다” 또는 “치료하는”)는 치료되는 개체의 자연 경과를 변경하려는 시도에서 임상적 개입을 지칭하고, 임상 병리의 예방을 위해 또는 임상 병리의 경과 동안 실시될 수 있다. 치료의 바람직한 효과에는 질병의 발생 또는 재발 방지, 증상의 완화, 상기 질병의 임의의 직접 또는 간접적인 병리학적 결과의 감소, 전이 방지, 질병 진행 속도의 감소, 상기 질병 상태의 개선 또는 경감, 그리고 관해 또는 개선된 예후가 포함되지만, 이에 제한되지는 않는다. 일부 구현예들에서, 본원에 기재된 요지의 항체는 질병의 발병을 지연시키거나 질병의 진행을 늦추는 데 사용된다.

[0132] 하나 이상의 다른 약물과 “동시에” 투여되는 약물은 동일한 치료 주기 동안, 하나 이상의 다른 약물과 동일한 치료 일자에, 그리고 임의적으로 상기 하나 이상의 다른 약물과 동일한 시간에 투여된다. 예를 들어, 3주마다 제공되는 암 요법의 경우에, 동시에 투여되는 약물은 각각 3주 주기의 1일 자에 투여된다.

[0133] 제제, 예컨대, 약학적 제제의 "유효량"은 원하는 치료 또는 예방 결과를 달성하기 위해 필요한 투여량으로 및 기간 동안 효과적인 양을 지칭한다. 예를 들어, 암을 치료하기 위한 약물의 유효량은 암 세포의 숫자를 감소시키고; 종양 크기를 감소시키고; 주변 장기 내로 암 세포 침윤을 저해하고(즉, 얼마간 늦추고, 바람직하게는 중단시키고); 종양 전이를 저해하고(즉, 얼마간 늦추고, 바람직하게는 중단시키고); 종양 성장을 얼마간 저해하고; 및/또는 암과 연관된 증상 중에서 한 가지 이상을 얼마간 완화할 수 있다. 약물이 기존의 암 세포를 증식 및/또는 사멸시키는 것을 막을 수 있는 정도일 경우, 이는 세포 증식 억제 및/또는 세포독성이라 할 수 있다. 유효량은 진행 없는 생존을 확장하고(예컨대, 고형 종양에 대한 반응 평가 기준, RECIST, 또는 CA-125 변화에 의해 측정될 때), 객관적인 반응(부분적인 반응, PR, 또는 완전 반응, CR을 포함)을 발생시키고, 전체 생존 시간을 증가시키고 및/또는 암의 한 가지 이상의 증상을 개선시킬 수 있다(예컨대, FOSI에 의해 평가될 때).

[0134] 본원에서 사용되는 바와 같이, 용어 "치료적 유효량"은 상기한 양을 투여받지 않은 해당 대상체와 비교하여 질병, 장애 또는 부작용의 치료 또는 질병 또는 장애의 진행 속도의 감소를 발생시키는 임의의 양을 의미한다. 상기 용어는 또한 정상적인 생리적 기능을 향상시키는 데 효과적인 양을 이의 범위 내에 포함한다. 요법에 사용하기 위해, 치료적 유효량의 Ab-CIDE 및 이의 염이 미가공 화학물질로서 투여될 수 있다. 또한, 활성 성분은 약학적 조성물로서 제공될 수 있다.

[0135] 용어 “약학적 제제”란 내부에 함유된 활성 성분의 생물학적 활성이 효과적이도록 하기 위한 형태의 제재를 지칭하며, 상기 제제가 투여되는 대상체에게 허용불가능한 독성을 주는 추가 성분을 포함하지 않는다.

[0136] “약학적으로 허용 가능한 부형제”는, 대상체에 비독성인, 활성 성분 외의, 약학적 제제 내에서의 성분을 지칭한다. 약학적으로 허용 가능한 부형제는 비제한적으로 완충제, 담체, 안정화제, 또는 보존제를 포함한다.

[0137] 본원에 사용된 문구 "약학적으로 허용 가능한 염"은 분자의 약학적으로 허용 가능한 유기 또는 무기 염을 지칭한다. 예시적인 염은 설페이트, 시트레이트, 아세테이트, 옥살레이트, 클로라이드, 브롬화물, 요오드화물, 니트레이트, 바이설페이트, 포스페이트, 산성 포스페이트, 아이소니코티네이트, 락테이트, 살리실레이트, 산성 시트레이트, 타르트레이트, 올리에이트, 탄네이트, 판토테네이트, 바이타르트레이트, 아스코르베이트, 숙시네이트, 말레에이트, 젠티시네이트, 푸마레이트, 글루코네이트, 글루쿠로네이트, 사카레이트, 포르메이트, 벤조에이트, 글루타메이트, 메탄설포네이트, 에탄설포네이트, 벤젠설포네이트, *p*-톨루엔설포네이트, 및 파모에이트(즉, 1,1

’-메틸렌-비스-(2-히드록시-3- 나프토에이트)) 염을 포함하지만, 이에 제한되지는 않는다. 약학적으로 허용 가능한 염은 아세테이트 이온, 숙시네이트 이온 또는 기타 반대 이온과 같은 다른 분자의 통합을 포함할 수 있다. 반대 이온은 모 화합물의 전하를 안정화시키는 임의의 유기 또는 무기 모이어티일 수 있다. 또한, 약학적으로 허용 가능한 염은 이의 구조에 하나 초과의 하전된 원자를 가질 수 있다. 여러 개의 하전된 원자가 약학적으로 허용 가능한 염의 일부인 경우는 여러 개의 반대 이온을 가질 수 있다. 따라서, 약학적으로 허용 가능한 염은 하나 이상의 하전된 원자 및/또는 하나 이상의 반대 이온을 가질 수 있다.

[0138] 약학적으로 허용 가능하지 않은 다른 염은 본원에 기재된 화합물의 제조에 유용할 수 있으며 이들은 요지의 추가 양태를 형성하는 것으로 간주되어야 한다. 옥살산 또는 트리플루오로아세테이트와 같은 이들 염은 그 자체로는 약학적으로 허용되지 않지만 본원에 기재된 화합물 및 이의 약학적으로 허용 가능한 염을 수득하기 위해 중간체로서 유용한 염의 제조에 유용할 수 있다.

[0139] 본원에 사용되는 용어 “알킬”은 1 내지 5개의 탄소원자(C_1-C_{12})의 임의의 길이를 갖는 포화된 직쇄 또는 분재쇄 1가 탄화수소 라디칼을 지칭하고, 여기서 임의적으로 상기 알킬 라디칼은 하기 기재된 하나 이상의 치환기로 독립적으로 치환될 수 있다.- 다른 구현예에서, 알킬 라디칼은 1, 2, 3, 4 또는 5개의 탄소 원자이다. 알킬의 예는 메틸(Me, $-CH_3$), 에틸(Et, $-CH_2CH_3$), 1-프로필(n-Pr, n-프로필, $-CH_2CH_2CH_3$), 2-프로필(i-Pr, i-프로필, $-CH(CH_3)_2$), 1-부틸(n-Bu, n-부틸, $-CH_2CH_2CH_2CH_3$), 2-메틸-1-프로필(i-Bu, i-부틸, $-CH_2CH(CH_3)_2$), 2-부틸(s-Bu, s-부틸, $-CH(CH_3)CH_2CH_3$), 2-메틸-2-프로필(t-Bu, t-부틸, $-C(CH_3)_3$), 1-펜틸(n-펜틸, $-CH_2CH_2CH_2CH_2CH_3$), 2-펜틸($-CH(CH_3)CH_2CH_2CH_3$), 3-펜틸($-CH(CH_2CH_3)_2$), 2-메틸-2-부틸($-C(CH_3)_2CH_2CH_3$), 3-메틸-2-부틸($-CH(CH_3)CH(CH_3)_2$), 3-메틸-1-부틸($-CH_2CH_2CH(CH_3)_2$), 2-메틸-1-부틸($-CH_2CH(CH_3)CH_2CH_3$), 등을 포함하지만, 이에 제한되지는 않는다.

[0140] 본원에 사용되는 용어 “알킬렌”은 1 내지 12개의 탄소원자(C_1-C_{12})의 임의의 길이를 갖는 포화된 직쇄 또는 분재쇄 2가 탄화수소 라디칼을 지칭하고, 여기서 임의적으로 상기 알킬렌 라디칼은 하기 기재된 하나 이상의 치환기로 독립적으로 치환될 수 있다.- 다른 구현예에서, 알킬렌 라이칼은 1개 내지 8개의 탄소 원자(C_1-C_8), 또는 1개 내지 6개의 탄소 원자(C_1-C_6)이다. 알킬렌기의 예는 메틸렌($-CH_2-$), 에틸렌($-CH_2CH_2-$), 및 프로필렌($-CH_2CH_2CH_2-$) 등을 포함하지만, 이에 제한되지는 않는다.

[0141] 용어 "탄소고리", "카보시클릴", "카보시클릭 고리" 및 "시클로알킬"은 모노시클릭 고리로서 3 내지 5개의 탄소 원자(C_3-C_5)를 갖는 1가 비방향족, 포화 또는 부분 불포화 고리를 지칭한다-. 모노시클릭 카보사이클의 예는 시클로프로필, 시클로부틸, 시클로펜틸, 1-시클로펜트-1-에닐, 1-시클로펜트-2-에닐, 1-시클로펜트-3-에닐 등을 포함하지만, 이에 제한되지는 않는다. 탄소고리기는 독립적으로 하나 이상의 알킬기로 임의적으로 치환될 수 있다.

[0142] "헤테로사이클", "헤테로시클릭", "헤테로시클로알킬" 또는 "헤테로시클릴"은 융합, 가교 또는 스피로 고리계를 포함하는 단일 고리 또는 다중 축합 고리를 갖고 1 내지 10개의 헤테로 원자를 포함하는 3 내지 20개의 고리 원자를 갖는 포화되거나 부분적으로 불포화된 기를 지칭한다. 상기 고리 원자는 탄소, 질소, 황 또는 산소로 이루어진 군으로부터 선택되고, 여기서 융합 고리계에서 하나 이상의 고리는 시클로알킬, 아릴 또는 헤테로아릴일 수 있다. 단, 부착점은 비방향족 고리를 통한 것이다. 특정 구현예들에서, 헤테로고리기의 질소 및/또는 황 원자(들)는 임의적으로 산화되어 N 산화물, -S(O)-, 또는 $-SO_2-$ 모이어티를 제공한다. 헤테로고리의 예는 아제티딘, 디히드로인돌, 인다졸, 퀴놀리진, 이미다졸리딘, 이미다졸린, 피페리딘, 피페라진, 인돌린, 1,2,3,4-테트라히드로이소퀴놀린, 티아졸리딘, 모르폴리닐, 티오모폴리닐(티아모폴리닐이라고도 함), 1,1-디옥소티오모폴리닐, 피페리디닐, 피롤리딘, 및 테트라히드로푸라닐 등을 포함하지만, 이에 제한되지는 않는다. 헤테로고리기는 WO2014/100762에 기재된 바와 같이 치환될 수 있다.

[0143] 용어 “키랄”은 거울상 짝의 비겹침능 성질을 갖는 분자를 언급하고, 용어 “비키랄”은 이의 거울상 짝 상에 겹칠수 있는 분자를 지칭한다.

[0144] 용어 “입체이성질체”는 동일한 화학적 구성을 갖지만 공간내 원자 또는 기의 배열에 있어서 상이한 화합물을 지칭한다.

[0145] “부분입체이성질체”는 키랄성의 2개 이상의 중심을 갖는 입체이성질체를 지칭하고 상기 분자는 서로 거울상이 아니다. 부분입체이성질체는 상이한 물리적 성질, 예컨대, 용융점, 비등점, 스펙트럼 성질 및 반응성을 가진다.

부분입체이성질체의 혼합물은 전기영동 및 크로마토그래피와 같은 고분리능 분석적 절차하에 분리할 수 있다.

[0146] “거울상이성질체”는 서로 비겹침성 거울상인 화합물의 2개의 입체이성질체를 지칭한다.

[0147] 본원에 사용된 입체화학적 정의 및 규약은 일반적으로 하기를 따른다: S. P. Parker, Ed., *McGraw-Hill Dictionary of Chemical Terms* (1984) McGraw-Hill Book Company, New York; 및 Eliel, E. and Wilen, S., *Stereochemistry of Organic Compounds* (1994) John Wiley & Sons, Inc., New York. 많은 유기 화합물은 광학적 활성 형태로 존재하고, 즉, 이들은 평면 편광의 평면을 회전시키는 능력을 가진다. 광학적 활성 화합물을 기재함에 있어서, 접두어 D 및 L, 또는 *R* 및 *S*는 이의 키랄 중심(들)에 대한 분자의 절대 배위를 지칭하기 위해 사용된다. 접두어 d 및 l 또는 (+) 및 (-)는 화합물의 평면 편광의 회전 징후를 지정하기 위해 사용되고, (-) 또는 l은 상기 화합물이 좌선성임을 의미한다. (+) 또는 d의 접두어를 갖는 화합물은 우선성이다. 소정의 화학적 구조에 대해, 이들 입체이성체는 이들이 서로 거울상인 것을 제외하고는 동일하다. 특정 입체이성질체는 또한 거울상이성질체로서 지칭될 수 있고, 상기 이성질체의 혼합물은 종종 거울상이성질체 혼합물로 불린다. 거울상이성질체의 50:50 혼합물은 라세미 혼합물 또는 라세미체로서 지칭되고, 이는 화학적 반응 또는 공정에서 입체선택성 또는 입체특이성이 없는 경우 발생할 수 있다. 용어 "라세미 혼합물 " 및 "라세미체"는 광학 활성이 없는 2개의 거울상이성질체 종의 등몰 혼합물을 지칭한다.

[0148] 본원의 기타 용어, 정의 및 약어는 하기를 포함한다: 야생형("WT"); 시스테인 조작된 돌연변이 항체("티오"); 경쇄("LC"); 중쇄("HC"); 6 말레이미도카프로일("MC"); 말레이미도프로파노일("MP"); 발린-시트룰린("val-cit" 또는 "vc"), 알라닌-페닐알라닌("ala-phe"), p-아미노벤질("PAB") 및 p-아미노벤질옥시카르보닐("PABC"); A118C(EU 넘버링) = A121C(순차적 넘버링) = 중쇄의 A114C(카바트 넘버링) 경쇄의 K149C(카바트 넘버링). 여전히 추가적인 정의 및 약어가 본원에 제공된다.

[0149] **II. 화학적 분해 유도제**

[0150] 화학적 분해 유도제(CIDE) 분자는 "Ab-CIDE" 접합체를 형성하기 위해 항체와 접합될 수 있다. 항체는 링커(L1)를 통해 CIDE("D")에 접합되며, 여기서 CIDE는 유비퀴틴 E3 리가아제 결합기("E3LB"), 링커("L2") 및 단백질 결합기("PB")를 포함한다. Ab-CIDE 분자의 일반식은 하기와 같고:

[0151] $Ab-(L1-D)_p$,

[0152] 여기서, D는 구조 E3LB-L2-PB를 갖는 CIDE이고; 여기서 E3LB는 L2에 공유 결합된 E3 리가아제 결합기이고; L2는 E3LB 및 PB에 공유 결합된 링커이고; PB는 L2에 공유 결합된 BRM 단백질 결합기이고; Ab는 L1에 공유 결합된 항체이고; L1은 Ab 및 D에 공유 결합된 링커이며; p는 약 1 내지 약 50의 값을 가진다. 변수 p는 항체가 하나 이상의 L1-D 기에 연결될 수 있음을 반영한다. 일 구현예에서, p는 약 1 내지 8이다. 다른 구현예에서, p는 약 2이다.

[0153] 하기의 섹션에서는 Ab-CIDE를 포함하는 구성 요소를 설명한다. 강력한 효능 및 바람직한 치료 지수를 갖는 ab-CIDE를 수득하기 위하여, 다음과 같은 구성요소가 제공된다.

[0154] 1. 항체(Ab)

[0155] 본원에 기재된 바와 같이, 항체, 예컨대, 단일클론 항체(mAB)는 표적 세포, 예컨대, 상기 항체에 의해 표적화된 특정 단백질을 발현하는 세포에 CIDE를 전달하기 위해 사용된다. Ab-CIDE의 항체 부분은 항원을 발현하는 세포를 표적으로 삼을 수 있으며, 이에 의해 항원 특이적 Ab-CIDE는 일반적으로 세포내이입(endocytosis)을 통해 표적 세포에 세포내로 전달된다. 세포 표면에서 발견되지 않는 항원에 대한 항체를 포함하는 Ab-CIDE는 세포 내로 CIDE 부분의 덜 특이적인 세포내 전달을 발생시킬 수 있지만, Ab-CIDE는 여전히 세포흡수작용(pinocytosis)을 겪을 수 있다. 본원에 기재된 Ab-CIDE 및 이의 사용 방법은 유리하게 세포 내부에 CIDE 부분을 전달하기 위해 세포 표면의 항체 인식 및/또는 Ab-CIDE의 세포내이입을 이용한다.

[0156] 특정 구현예들에서, 항체는 하기에 충분히 기재된 티오맙이다. 티오맙은 조절된 Fc 작동체, 예컨대, LALAPG 또는 NG2LH 돌연변이를 가질 수 있다. 또한, 임의의 항체 표적(CD71, Trop2, MSLN, NaPi2b, Ly6E, EpCAM 및 CD22)이 LALAPG 또는 NG2LH 돌연변이를 포함하는 임의의 Fc 작동체 조절과 티오맙 돌연변이의 임의의 적합한 조합과 조합될 수 있도록 조합이 고려된다.

[0157] a. 인간 항체

[0158] 특정 구현예들에서, 본원에서 제공된 항체는 인간 항체이다. 인간 항체는 당해 분야에서 공지된 다양한 기술을

이용하여 생성될 수 있다. 인간 항체는 van Dijk and van de Winkel, *Curr. Opin. Pharmacol.* 5: 368-74 (2001) 및 Lonberg, *Curr. Opin. Immunol.* 20:450-459 (2008)에 일반적으로 기재되어 있다.

[0159] 인간 항체는 항원 공격에 반응하여 원형 인간 항체 또는 인간 가변 영역을 갖는 원형 항체를 생성하도록 변형된 형질전환 동물에 면역원을 투여함으로써 제조될 수 있다. 이러한 동물은 일반적으로 내인성 면역글로불린 유전자좌를 대체하는, 또는 염색체외에 존재하거나 동물의 염색체에 무작위로 통합된, 인간 면역글로불린 유전자좌의 전체 또는 일부를 포함한다. 이러한 유전자삽입 마우스에서, 상기 내인성 면역글로불린 좌위는 일반적으로 비활성화 되어 있다. 형질전환 동물로부터 인간 항체를 수득하는 방법을 검토하려면, LLonberg, *Nat. Biotech.* 23:1117-1125 (2005)를 참조한다. 또한, 예컨대, 미국 특허 제6,075,181호 및 6,150,584호에서는 제노마우스(XENOMOUSE)™ 기술을 설명하고; 미국 특허 제5,770,429호에서는 휴맵(HuMab)® 기술을 설명하고; 미국 특허 제7,041,870호에서는 K-M 마우스(MOUSE)® 기술을 설명하고, 미국 공개특허출원 US 2007/0061900에서는 Velocimouse® 기술을 설명한다. 이러한 동물에 의해 생성된 원형 항체로부터 인간 가변 영역은, 예컨대, 상이한 인간 불변 영역과 조합함으로써 더욱 변형될 수 있다.

[0160] 인간 항체는 하이브리도마 기반 방법으로도 만들 수 있다. 인간 단일클론 항체를 제조하기 위한 인간 골수종 및 마우스-인간 이종골수종 세포주가 기재되어 있다. (예컨대, Kozbor *J. Immunol.*, 133: 3001 (1984); Brodeur et al., *Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications*, pp. 51-63 (Marcel Dekker, Inc., New York, 1987); and Boerner et al., *J. Immunol.*, 147: 86 (1991)을 참조) 인간 B 세포 하이브리도마 기술을 통해 생성된 인간 항체가 또한 Li et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 103:3557-3562 (2006)에 더 상세히 기재되어 있다. 추가 방법은, 예를 들어, 미국 특허 제7,189,826호(하이브리도마 세포주로부터 단일클론 인간 IgM 항체의 생성을 설명함) 및 Ni, *Xiandai Mianyixue*, 26(4):265-268 (2006)(인간-인간 하이브리도마를 설명함)에서 설명된 것들을 포함한다. 인간 하이브리도마 기법(트리오마 기술)이 또한 Vollmers and Brandlein, *Histology and Histopathology*, 20(3):927-937 (2005) 및 Vollmers and Brandlein, *Methods and Findings in Experimental and Clinical Pharmacology*, 27(3):185-91 (2005)에서 설명된다.

[0161] 인간 항체는 또한 인간 유래 파지 디스플레이 라이브러리로부터 선택된 Fv 클론 가변 도메인 서열을 단리함으로써 생성될 수 있다. 이후, 이러한 가변 도메인 서열은 원하는 인간 불변 도메인과 조합될 수 있다. 항체 라이브러리로부터 인간 항체를 선택하기 위한 기술은 하기에서 설명된다.

[0162] b. 라이브러리 유래 항체

[0163] Ab-CIDE에 사용하기 위한 항체는 원하는 활성 또는 활성들을 갖는 항체에 대해 조합 라이브러리를 선별검사함으로써 단리될 수 있다. 예를 들어, 파지 디스플레이 라이브러리들을 생성하고 이러한 라이브러리들을 원하는 결합 특성을 갖는 항체에 대해 스크리닝하기 위한 다양한 방법이 해당 분야에 공지되어 있다. 이러한 방법은, 예컨대, Hoogenboom et al. in *Methods in Molecular Biology* 178:1-37 (O'Brien et al., ed., Human Press, Totowa, NJ, 2001)에서 검토되고, 예컨대, McCafferty et al., *Nature* 348:552-554; Clackson et al., *Nature* 352: 624-628 (1991); Marks et al., *J. Mol. Biol.* 222: 581-597 (1992); Marks and Bradbury, in *Methods in Molecular Biology* 248:161-175 (Lo, ed., Human Press, Totowa, NJ, 2003); Sidhu et al., *J. Mol. Biol.* 338(2): 299-310 (2004); Lee et al., *J. Mol. Biol.* 340(5): 1073-1093 (2004); Fellouse, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 101(34): 12467-12472 (2004); and Lee et al., *J. Immunol. Methods* 284(1-2): 119-132(2004)에 추가로 기재되어 있다.

[0164] 특정 파아지 디스플레이 방법에서, VH 및 VL 유전자 레퍼토리는 중합효소 연쇄 반응(PCR)에 의해 별도로 복제되고 파아지 라이브러리에서 무작위로 재조합되며, Winter et al., *Ann. Rev. Immunol.*, 12: 433-455 (1994)에 기재된 바와 같이 항원 결합 파아지에 대해 스크리닝할 수 있다. 파아지는 일반적으로 항체 단편들을 단일 사슬 Fv(scFv) 단편 또는 Fab 단편으로 표시한다. 면역화된 공급원으로부터의 라이브러리는 하이브리도마를 제작할 필요없이 면역원에 대한 고친화도 항체를 제공한다. 대안적으로, 원형 레퍼토리는 Griffiths et al., *EMBO J*, 12: 725-734 (1993)에 기재된 바와 같이 임의의 면역화 없이 광범위한 비자기 및 자가 항원에 대한 단일 항체 공급원을 제공하기 위해 복제(예컨대, 인간으로부터)할 수 있다. 최종적으로, 원형 라이브러리는 또한 Hoogenboom and Winter, *J. Mol. Biol.*, 227: 381-388 (1992)에 기재된 바와 같이 또한 줄기 세포에서 재배열되지 않은 V 유전자 분절을 복제하고 매우 가변적인 CDR3 영역을 부호화하고 시험관 내에서 재배열을 실시하기 위해 무작위 서열을 함유하는 PCR 프라이머를 사용하여 합성적으로 만들 수 있다. 인간 항체 파지 라이브러리를 기재하는 특허 공보는, 예를 들어: 미국 특허 제5,750,373호, 및 미국 특허 공보 제2005/0079574호, 제2005/0119455호, 제2005/0266000호, 제2007/0117126호, 제2007/0160598호, 제2007/0237764호, 제2007/0292936

호, 및 제2009/0002360호를 포함한다.

[0165] 인간 항체 라이브러리로부터 단리된 항체 또는 항체 단편은 본원에서 인간 항체 또는 인간 항체 단편인 것으로 고려된다.

[0166] c. 키메라 및 인간화 항체

[0167] 특정 구현예들에서, 본원에서 제공된 항체는 키메라 항체이다. 특정 키메라 항체는, 예컨대 미국 특허 제4,816,567호; 및 Morrison et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 81:6851-6855 (1984))에 기재되어 있다. 일례에서, 키메라 항체는 비인간 가변 영역(예컨대, 마우스, 랫트, 햄스터, 토끼, 또는 비인간 영장류, 예컨대 원숭이로부터 유래된 가변 영역) 및 인간 불변 영역을 포함한다. 한 추가 예에서, 키메라 항체는 분류 또는 하위분류가 모 항체의 분류로부터 변화되어 있는 "분류 전환된" 항체이다. 키메라 항체는 이의 항원-결합 단편을 포함한다.

[0168] 특정 구현예들에서, 키메라 항체는 인간화 항체이다. 전형적으로, 비인간 항체는 비인간 모 항체의 특이성 및 친화도를 유지하면서 인간에 대한 면역원성을 감소시키기 위해 인간화된다. 일반적으로, 인간화 항체는 HVRs, 예를 들면, CDRs (또는 이들의 부분)가 비인간 항체로부터 유래되고, 그리고 FRs (또는 이들의 부분)가 인간 항체 서열로부터 유래되는 하나 또는 그 이상의 가변 도메인을 포함한다. 인간화 항체는 선택적으로 인간 불변 영역의 적어도 일부를 또한 포함할 것이다. 일부 구현예들에서, 인간화 항체에서 일부 FR 잔기는 예를 들면, 항체 특이성 또는 친화성을 복원하거나 또는 향상시키기 위해, 비인간 항체 (예를 들면, HVR 잔기가 유래되는 항체)로부터 상응하는 잔기로 치환된다.

[0169] 인간화 항체 및 이의 제조 방법은, 예컨대, Almagro and Fransson, *Front. Biosci.* 13:1619-1633 (2008)에서 검토되고, 예컨대, Riechmann et al., *Nature* 332:323-329 (1988); Queen et al., *Proc. Nat'l Acad. Sci. USA* 86:10029-10033 (1989); 미국 특허 제5,821,337호, 7,527,791호, 6,982,321호, 및 7,087,409호; Kashmiri *et al.*, *Methods* 36:25-34 (2005) (SDR(a-CDR) 이식을 기재함); Padlan, *Mol. Immunol.* 28:489-498 (1991)("표면 노출 잔기 변형(resurfacing)"을 기재함); Dall'Acqua et al., *Methods* 36:43-60 (2005)("FR 셔플링(shuffling)"을 기재함); 및 Osbourn et al., *Methods* 36:61-68 (2005) 및 Klimka et al., *Br. J. Cancer*, 83:252-260 (2000)(FR 셔플링에 대한 "유도된 선택" 접근법을 기재함)에 추가로 기재되어 있다.

[0170] 인간화에 사용할 수 있는 인간 프레임워크 영역은: "최적의" 방법을 사용하여 선택된 프레임워크 영역(예컨대, Sims et al. *J. Immunol.* 151:2296 (1993)을 참조); 특정 하위군의 경쇄 또는 중쇄 가변 영역의 인간 항체의 공통 서열로부터 유래된 프레임워크 영역(예컨대, Carter et al. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 89:4285 (1992); 및 Presta et al. *J. Immunol.*, 151:2623 (1993)을 참조); 인간 성숙(체세포적으로 돌연변이된) 프레임워크 영역 또는 인간 생식계열 프레임워크 영역(예컨대, Almagro and Fransson, *Front. Biosci.* 13:1619-1633 (2008)을 참조); 및 FR 라이브러리 선별로부터 유래된 프레임워크 영역(예컨대, *J. Biol. Chem.* 272:10678-10684 (1997) 및 Rosok et al., *J. Biol. Chem.* 271:22611-22618 (1996)을 참조)을 포함하지만, 이제 제한되지는 않는다.

[0171] d. 다중특이적 항체

[0172] 특정 구현예들에서, 본원에서 제공된 항체는 다중특이적 항체, 예컨대, 이중특이적 항체이다. 본원에서 사용된 용어 "다중특이적 항체"는 폴리에피토프 특이성을 갖는(즉, 하나의 분자 상에서 2개 또는 그 이상의 상이한 에피토프에 결합할 수 있거나 또는 2개 또는 그 이상의 상이한 분자 상에서 에피토프에 결합할 수 있는) 항원 결합 도메인을 포함하는 항체를 지칭한다.

[0173] 특정 구현예들에서, 다중특이적 항체는 적어도 2개의 상이한 항원 결합 부위에 대한 결합 특이성을 갖는 단일클론 항체(예컨대, 이중특이적 항체)이다. 특정 구현예들에서, 다중특이적 항체의 제1 항원 결합 도메인 및 제2 항원 결합 도메인은 하나의 동일한 분자 내에서(분자내 결합) 2개의 에피토프에 결합할 수 있다. 예를 들어, 다중특이적 항체의 제1 항원 결합 도메인 및 제2 항원 결합 도메인은 동일한 단백질 분자 상에서 2개의 상이한 에피토프에 결합할 수 있다. 특정 구현예들에서, 다중특이적 항체가 결합하는 2개의 상이한 에피토프는 하나의 단일특이적 항체, 예컨대, 예를 들어, 통상적인 항체 또는 하나의 면역글로불린 단일 가변 도메인에 의해 동시에 일반적으로 결합되지 않는 에피토프이다. 일부 구현예들에서, 다중특이적 항체의 제1 항원 결합 도메인 및 제2 항원 결합 도메인은 두 개의 별개의 분자 내에(분자간 결합) 위치한 에피토프에 결합할 수 있다. 예를 들어, 다중특이적 항체의 제1 항원 결합 도메인은 하나의 단백질 분자 상의 하나의 에피토프에 결합할 수 있는 반면, 다중특이적 항체의 제2 항원 결합 도메인은 상이한 단백질 분자 상의 다른 에피토프에 결합함으로써, 2개의 분자

를 교차 결합할 수 있다.

[0174] 일부 구현예들에서, 다중특이적 항체(예컨대, 이중특이적 항체)의 항원 결합 도메인은 2개의 VH/VL 단위를 포함하고, 여기서 제1 VH/VL 단위는 제1 에피토프에 결합하고 제2 VH/VL 단위는 제2 에피토프에 결합하고, 여기서 각 VH/VL 단위는 중쇄 가변 도메인(VH) 및 경쇄 가변 도메인(VL)을 포함한다. 이러한 다중특이적 항체는 전장 항체, 2개 이상의 VL 및 VH 도메인을 갖는 항체, 및 항체 단편(예컨대, Fab, Fv, dsFv, scFv, 디아바디, 이중특이적 디아바디와 트리아바디, 공유결합으로 또는 비공유결합으로 연결된 항체 단편)을 포함하지만, 이에 제한되지는 않는다. 중쇄 가변 영역의 적어도 일부 및/또는 경쇄 가변 영역의 적어도 일부를 추가로 포함하는 VH/VL 단위는 "팔" 또는 "헤미머(hemimer)" 또는 "반항체"로서 또한 지칭될 수 있다. 일부 구현예들에서, 헤미머는 분자내 이황화 결합이 제2 헤미머와 함께 형성되도록 허용하는 중쇄 가변 영역의 충분한 부분을 포함한다. 일부 구현예들에서, 헤미머는, 예를 들어, 상보적 구멍 돌연변이 또는 돌기 돌연변이를 포함하는 제2 헤미머 또는 반항체와의 이종이합체화를 허용하는 돌기 돌연변이 또는 구멍 돌연변이를 포함한다. 돌기 돌연변이 및 구멍 돌연변이는 하기에 추가로 논의된다.

[0175] 특정 구현예들에서, 본원에 제공된 다중특이적 항체는 이중특이적 항체를 포함할 수 있다. 용어 "이중특이적 항체"는 하나의 분자 상에서 2개의 상이한 에피토프에 결합할 수 있거나 또는 2개의 상이한 분자 상에서 에피토프에 결합할 수 있는 항원 결합 도메인을 포함하는 다중특이적 항체를 지칭한다. 이중특이적 항체는 또한 본원에서 "이중 특이성"을 갖거나 또는 "이중 특이적"인 것으로서 지칭될 수 있다. 예시적인 이중특이적 항체는 단백질 및 임의의 다른 항원 둘 모두에 결합할 수 있다. 특정 구현예들에서, 결합 특이성 중 하나는 단백질에 대한 것이고 다른 하나는 CD3에 대한 것이다. 예컨대, 미국 특허 제5,821,337호를 참조한다. 특정 구현예들에서, 이중특이적 항체는 동일한 항원 분자의 2개의 상이한 에피토프에 결합할 수 있다. 특정 구현예들에서, 이중특이적 항체는 2개의 상이한 단백질 분자 상의 2개의 상이한 에피토프에 결합할 수 있다. 이중특이적 항체는 또한 단백질을 발현하는 세포에 세포독성제를 국소화시키기 위해 사용할 수 있다. 이중특이적 항체는 전장 항체 또는 항체 단편으로서 제조할 수 있다.

[0176] 다중특이적 항체를 제조하기 위한 기술은 상이한 특이성을 갖는 2개의 면역글로불린 중쇄-경쇄 쌍의 재조합 동시 발현(Milstein and Cuello, *Nature* 305: 537 (1983), WO 93/08829, 및 Traunecker et al., *EMBO J.* 10: 3655 (1991)), 및 "구멍 내 돌기(knob-in-hole)" 조작 기술(예컨대, 미국 특허 제5,731,168호, WO2009/089004, US2009/0182127, US2011/0287009, Marvin and Zhu, Acta Pharmacol. Sin. (2005) 26(6):649-658, 및 Kontermann (2005) Acta Pharmacol. Sin., 26:1-9를 참조)을 포함하지만 이에 제한되지는 않는다. 본원에서 사용된 바와 같이, 용어 "구멍 내 돌기" 또는 "KnH" 기술은 2개의 폴리펩티드가 상호작용하는 경계면에서 융기(돌기)를 한 폴리펩티드 내로, 그리고 공동(구멍)을 다른 폴리펩티드 내로 도입함으로써, 시험관내에서 또는 생체내에서 상기 2개의 폴리펩티드의 형성을 주도하는 기술을 지칭한다. 예를 들어, KnH는 항체의 Fc:Fc 결합 경계면, CL:CH1 경계면 또는 VH/VL 경계면에서 도입되었다(예컨대, US 2011/0287009, US2007/0178552, WO 96/027011, WO 98/050431, Zhu et al., 1997, *Protein Science* 6:781-788, and WO2012/106587을 참조). 일부 구현예들에서, KnH는 다중특이적 항체의 제조 동안 함께 2개의 상이한 중쇄의 쌍형성을 주도한다. 예를 들면, 그들의 Fc 영역 내에 KnH를 갖는 다중특이적 항체는 각 Fc 영역에 연결된 단일 가변 도메인을 더욱 포함할 수 있거나, 또는 유사한 또는 상이한 경쇄 가변 도메인과 대합을 이루는 상이한 중쇄 가변 도메인을 더욱 포함할 수 있다. KnH 기술은 또한 함께 2개의 상이한 수용체 세포외 도메인의 쌍형성 또는 상이한 표적 인식 서열을 포함하는 임의의 다른 폴리펩티드 서열(예컨대, 아피바디, 펩티바디 및 다른 Fc 융합 포함)의 쌍형성을 이루는 데 이용될 수 있다.

[0177] 본원에서 사용된 바와 같이 용어 "돌기 돌연변이"는 한 폴리펩티드가 다른 폴리펩티드와 상호작용하는 경계면에서 융기(돌기)를 전자 폴리펩티드 내로 도입하는 돌연변이를 지칭한다. 일부 구현예들에서, 다른 폴리펩티드는 구멍 돌연변이를 가진다.

[0178] 본원에서 사용된 바와 같이, 용어 "구멍 돌연변이"는 한 폴리펩티드가 다른 폴리펩티드와 상호작용하는 경계면에서 공동(구멍)을 전자 폴리펩티드 내로 도입하는 돌연변이를 지칭한다. 일부 구현예들에서, 다른 폴리펩타이드는 돌기 돌연변이를 가진다.

[0179] "융기"는 제1 폴리펩티드의 경계면으로부터 돌출하고, 따라서 이형다합체를 안정시키고, 따라서, 예를 들어, 동종다합체 형성에 비하여 이형다합체 형성을 유리하게 하는, 인접한 경계면(즉, 제2 폴리펩티드의 경계면) 내에 상보적 공동 내에 위치 가능한 적어도 하나의 아미노산 측쇄를 지칭한다. 융기는 원래의 경계면에 존재할 수 있거나 합성적으로(예컨대, 경계면을 부호화하는 핵산을 변경함으로써) 도입될 수 있다. 일부 구현예들에서, 제

1 폴리펩티드의 경계면을 부호화하는 핵산은 융기를 부호화하도록 변경된다. 이를 구현하기 위해, 제1 폴리펩티드의 경계면에서 적어도 하나의 "원래" 아미노산 잔기를 부호화하는 핵산은 원래 아미노산 잔기보다 더 큰 측쇄 부피를 갖는 적어도 하나의 "외래(import)" 아미노산 잔기를 부호화하는 핵산으로 대체된다. 하나 초과의 원래 및 상응하는 외래 잔기가 있을 수 있음을 알 수 있다. 다양한 아미노 잔기의 측쇄 부피는, 예를 들어, US 2011/0287009의 표 1에서 도시된다. "융기"를 도입하는 돌연변이는 "돌기 돌연변이"로 지칭될 수 있다.

[0180] 일부 구현예들에서, 융기 형성을 위한 외래 잔기는 아르기닌(R), 페닐알라닌(F), 티로신(Y) 및 트립토판(W)으로부터 선택되는 천연 발생 아미노산 잔기이다. 일부 구현예들에서, 외래 잔기는 트립토판 또는 티로신이다. 일부 구현예들에서, 융기 형성을 위한 원래 잔기는 알라닌, 아스파라긴, 아스파르트산, 글리신, 세린, 트레오닌 또는 발린과 같이 작은 측쇄 부피를 갖는다.

[0181] “공동”은 제2 폴리펩티드의 경계면으로부터 함몰되고, 따라서 제1 폴리펩티드의 인접한 경계면 상에서 상응하는 융기를 수용하는 적어도 하나의 아미노산 측쇄를 지칭한다. 공동은 원래의 경계면에서 존재할 수 있거나 또는 합성적으로(예컨대, 상기 경계면을 부호화하는 핵산을 변경함으로써) 도입될 수 있다. 일부 구현예들에서, 제2 폴리펩티드의 경계면을 부호화하는 핵산은 공동을 부호화하도록 변경된다. 이를 구현하기 위해, 제2 폴리펩티드의 경계면에서 적어도 하나의 “원래의” 아미노산 잔기를 부호화하는 핵산은 원래의 아미노산 잔기보다 작은 측쇄 부피를 갖는 적어도 하나의 “외래” 아미노산 잔기를 부호화하는 DNA로 대체된다. 하나 초과의 원래 및 상응하는 외래 잔기가 있을 수 있음을 알 수 있다. 일부 구현예들에서, 공동의 형성을 위한 외래 잔기는 알라닌(A), 세린(S), 트레오닌(T) 및 발린(V)으로부터 선택되는 자연 발생 아미노산 잔기이다. 일부 구현예들에서, 외래 잔기는 세린, 알라닌, 또는 트레오닌이다. 일부 구현예들에서, 공동의 형성을 위한 원래의 잔기는 티로신, 아르기닌, 페닐알라닌 또는 트립토판과 같은 큰 측쇄 부피를 갖는다. "공동"을 도입하는 돌연변이는 "구멍 돌연변이"로 지칭될 수 있다.

[0182] 융기는 공동 내에서 “위치 가능”한데, 이는 제1 폴리펩티드와 제2 폴리펩티드 각각의 경계면 상에서 융기와 공동의 공간적 위치 및 융기와 공동의 크기는 융기가 경계면에서 제1 및 제2 폴리펩티드의 정상적인 연관을 유의적으로 섭동하지 않으면서 공동 내에서 위치될 수 있도록 하는 정도라는 것을 의미한다. 융기, 예컨대, Tyr, Phe 및 Trp는 전형적으로 경계면의 축으로부터 직각으로 연장되지 않고 바람직한 입체형태를 갖지 않기 때문에, 융기와 이에 상응하는 공동의 정렬은 일부 경우들에서 X선 결정학 또는 핵 자기 공명(NMR)에 의해 획득된 3차원 구조에 근거하여 융기/공동 쌍을 모델링하는 것에 의존할 수 있다. 이는 당업계에서 널리 허용되는 기술을 사용하여 달성될 수 있다.

[0183] 일부 구현예들에서, IgG1 불변 영역 내 돌기 돌연변이는 T366W이다(EU 넘버링). 일부 구현예들에서, IgG1 불변 영역 내 구멍 돌연변이는 T366S, L368A, 및 Y407V로부터 선택된 하나 이상의 돌연변이를 포함한다(EU 넘버링). 일부 구현예들에서, IgG1 불변 영역 내 구멍 돌연변이는 T366S, L368A, 및 Y407V를 포함한다(EU 넘버링).

[0184] 일부 구현예들에서, IgG4 불변 영역 내 돌기 돌연변이는 T366W이다(EU 넘버링). 일부 구현예들에서, IgG4 불변 영역 내 구멍 돌연변이는 T366S, L368A, 및 Y407V로부터 선택된 하나 이상의 돌연변이를 포함한다(EU 넘버링). 일부 구현예들에서, IgG4 불변 영역 내 구멍 돌연변이는 T366S, L368A, 및 Y407V를 포함한다(EU 넘버링).

[0185] 다중특이적 항체는 또한 항체 Fc-이종이량체 분자를 제조하기 위한 정전기 조정 효과를 가공하고(WO 2009/089004A1); 2개 이상의 항체 또는 단편을 가교 결합하고(예컨대, 미국 특허 제4,676,980호 및 Brennan et al., *Science*, 229: 81 (1985)을 참조); 이중특이적 항체를 생성하기 위한 류신 지퍼를 사용하고(예컨대, Kostelny et al., *J. Immunol.*, 148(5):1547-1553 (1992)을 참조); 이중특이적 항체 단편을 제조하기 위한 "디아바디" 기술을 사용하고(예컨대, Hollinger et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 90:6444-6448 (1993)을 참조); 및 단일쇄 Fv(sFv) 이량체를 사용하고(예컨대, Gruber et al., *J. Immunol.*, 152:5368 (1994)을 참조); 및, 예컨대, Tutt et al. *J. Immunol.* 147: 60 (1991)에 기재된 삼중특이적 항체를 제조함으로써 만들 수 있다.

[0186] “옥토퍼스 항체” 또는 이중 가변 도메인 면역글로불린”(DVD)을 포함하여 3개 이상의 기능적 항원 결합 부위를 갖는 가공된 항체가 또한 본원에 포함된다(예컨대, US 2006/0025576A1 및 Wu et al. *Nature Biotechnology* (2007)을 참조). 본원에서 항체 또는 단편은 또한 표적 단백질뿐만 아니라 다른 상이한 항원에 결합하는 항원 결합 부위를 포함하는 “이중 작용 FAb” 또는 “DAF”를 포함한다(예를 들어, US 2008/0069820을 참조).

[0187] e. 항체 단편

[0188] 특정 구현예들에서, 본원에서 제공된 항체는 항체 단편이다. 항체 단편은, Fab, Fab’, Fab’-SH, $F(ab')_2$,

Fv, 및 scFv 단편, 및 하기 기재된 기타 단편들을 포함하지만, 이에 제한되지는 않는다. 특정 항체 단편을 검토하려면, Hudson et al. *Nat. Med.* 9:129-134 (2003)를 참조한다. ScFv 단편의 검토를 위해, 예컨대, Pluckthün, in *The Pharmacology of Monoclonal Antibodies*, vol. 113, Rosenburg and Moore eds., (Springer-Verlag, New York), pp. 269--315 (1994)를 참조하고; 또한, WO 93/16185; 및 미국 특허 제5,571,894호 및 5,587,458호를 참조한다. 구제(salvage) 수용체 결합 에피토프 잔기를 포함하고 증가된 생체내 반감기를 갖는 Fab 및 $F(ab')_2$ 단편에 관한 논의를 위해, 미국 특허 제5,869,046호를 참조한다.

[0189] 디아바디는 2가 또는 이중 특이적일 수 있는 2개의 항원 결합 부위가 있는 항체 단편이다. 예를 들어, EP 404,097; WO 1993/01161; Hudson et al., *Nat. Med.* 9:129-134 (2003); 및 Hollinger et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90: 6444-6448 (1993)를 참조한다. 트리아바디 및 테트라바디가 또한 Hudson et al., *Nat. Med.* 9:129-134 (2003)를 참조한다.

[0190] 단일 도메인 항체는 항체의 중쇄 가변 도메인의 전부 또는 일부 또는 경쇄 가변 도메인의 전부 또는 일부를 포함하는 항체 단편이다. 특정 구현예들에서, 단일 도메인 항체는 인간 단일 도메인 항체이다(도만티스사(Domantis, Inc. 매사추세츠주 월섬 소재; 예컨대, 미국 특허 제6,248,516 B1호를 참조).

[0191] 항체 단편은 본원에 기재된 바와 같이 원형 항체의 단백질분해 소화뿐만 아니라 재조합 숙주 세포(예컨대, 대장균 또는 파아지)에 의한 생성을 포함한(하지만, 이에 제한되지는 않음) 다양한 기술에 의해 제조될 수 있다.

[0192] f. 항체 변이체

[0193] 특정 구현예들에서, 본원에 제공된 항체의 아미노산 서열 변이체가 고려된다. 예를 들어, 항체의 결합 친화도 및/또는 다른 생물학적 특성들을 개선하는 것이 바람직할 수 있다. 항체의 아미노산 서열 변이체들은 상기 항체를 부호화하는 뉴클레오티드 서열 내부에 적절한 변형을 도입시킴으로써, 또는 펩티드 합성에 의해 만들어질 수 있다. 이러한 변형은, 예를 들어, 항체의 아미노산 서열 내 잔기의 결실, 및/또는 삽입 및/또는 치환을 포함한다. 최종 구조체가 원하는 특징, 예컨대, 항원 결합을 보유한다면, 최종 구조체에 도달하기 위해 결실, 삽입 및 치환의 임의의 조합이 만들어질 수 있다.

[0194] g. 재조합 방법 및 조성물

[0195] 항체는, 예컨대, 어 미국 특허 제4,816,567호에 기재된 바와 같은 재조합 방법 및 조성물을 사용하여 생성될 수 있다. 일 구현예에서, 본원에 기재된 항체를 부호화하는 단리된 핵산가 제공된다. 상기 핵산은 항체의 VL을 포함하는 아미노산 서열 및/또는 VH를 포함하는 아미노산 서열(예컨대, 항체의 경쇄 및/또는 중쇄)를 부호화할 수 있다. 추가의 구현예에서, 이러한 핵산을 포함하는 하나 이상의 벡터(예컨대, 발현 벡터)가 제공된다. 추가의 구현예에서, 상기 핵산을 포함하는 숙주 세포가 제공된다. 상기 일 구현예에서, 숙주 세포는 하기를 포함한다(예컨대, 다음에 의해 형질전환되어 있다): (1) 항체의 VL을 포함하는 아미노산 서열 및 항체의 VH를 포함하는 아미노산 서열을 부호화하는 핵산을 포함하는 벡터, 또는 (2) 항체의 VL을 포함하는 아미노산 서열을 부호화하는 핵산을 포함하는 제1 벡터 및 항체의 VH를 포함하는 아미노산 서열을 부호화하는 핵산을 포함하는 제2 벡터를 포함한다(예컨대, 이로 변형된다). 일 구현예에서, 숙주 세포는 진핵생물, 예를 들어 중국 햄스터 난소(CHO) 세포 또는 림프구양 세포(예컨대, Y0, NS0, Sp20 세포)이다. 일 구현예에서, 항체를 제조하는 방법이 제공되고, 상기 방법은 항체의 발현에 적합한 조건 하에 상기 제공된 바대로 항체를 코딩하는 핵산을 포함하는 숙주 세포를 배양하는 단계, 및 임의로 숙주 세포(또는 숙주 세포 배양 배지)로부터 항체를 회수하는 단계를 포함한다.

[0196] 항체의 재조합 생성을 위하여, 예컨대, 상기 기재한 항체를 부호화하는 핵산이 단리되고, 숙주 세포 안에서 추가 복제 및/또는 발현을 위하여 하나 이상의 벡터 안으로 삽입된다. 이러한 핵산은 통상적인 절차를 이용하여(예컨대, 항체의 중쇄 및 경쇄를 부호화하는 유전자에 특이적으로 결합할 수 있는 올리고뉴클레오티드 프로브를 이용함으로써) 쉽게 단리되고 염기서열분석될 수 있다.

[0197] 항체 부호화 벡터의 복제 또는 발현에 적합한 숙주 세포는 본원에 기재된 원핵 또는 진핵 세포를 포함한다. 예를 들어, 항체는 특히 당화 및 Fc 작동체 기능이 필요하지 않은 경우 박테리아에서 생성될 수 있다. 박테리아에서 항체 단편 및 폴리펩티드의 발현에 관해서는, 예컨대, 미국 특허 제5,648,237호, 5,789,199호 및 5,840,523호를 참조한다. (또한, 대장균 내 항체 단편의 발현을 설명하는 Charlton, *Methods in Molecular Biology, Vol. 248* (B.K.C. Lo, ed., Humana Press, Totowa, NJ, 2003), pp. 245-254를 참조한다.) 발현 이후, 항체는 가용성 분획의 박테리아 세포 덩어리로부터 단리될 수 있고 추가로 정제될 수 있다.

[0198] 원핵세포 이외에도, 진핵 미생물, 예컨대, 섬유성 곰팡이 또는 효모는 항체 부호화 벡터의 적합한 복제 또는 발

현 숙주이며, 당화 경로가 "인간화되고", 결과적으로 부분적으로 또는 온전하게 인간 당화 패턴을 가진 항체가 생성되는 곰팡이 및 효모 균주가 포함된다. Gerngross, *Nat. Biotech.* 22:1409-1414 (2004), 및 Li et al., *Nat. Biotech.* 24:210-215 (2006)를 참조한다.

[0199] 당화된 항체의 발현에 적합한 숙주 세포들은 다세포 유기체(무척추동물 및 척추동물)로부터 또한 유도된다. 무척추동물 세포들의 예로는 식물 및 곤충 세포들이 포함된다. *스포도프테라 푸르기페르다(Spodoptera frugiperda)* 세포들의 형질감염을 위하여 곤충 세포들과 병용될 수 있는 많은 베큘로바이러스 균주들이 확인되었다.

[0200] 식물 세포 배양물 또한 숙주로 이용될 수 있다. 예컨대, 미국 특허 제5,959,177호, 6,040,498호, 6,420,548호, 7,125,978호 및 6,417,429호(유전자도입 식물에서 항체를 생성하기 위한 PLANTIBODIES™ 기술을 설명함).

[0201] 척추동물 세포들 또한 숙주로 이용될 수 있다. 예를 들어, 현탁액에서 성장하도록 개조시킨 포유동물 세포주들이 유용할 수 있다. 유용한 포유동물 숙주 세포주의 다른 예는 SV40(COS-7)에 의해 형질전환된 원숭이 신장 CV1 세포주; 인간 배아 신장 세포주(예컨대, Graham et al., *J. Gen Virol.* 36:59 (1977)에 기재된 바와 같은 293 또는 293 세포); 어린 햄스터 신장 세포(BHK); 마우스 세르톨리 세포(예컨대, Mather, *Biol. Reprod.* 23:243-251 (1980)에 기재된 바와 같은 TM4 세포); 원숭이 신장 세포(CV1); 아프리카 녹색 원숭이 신장 세포(VERO-76); 인간 자궁경부 암종 세포(HELA); 갯과 신장 세포(MDCK; 버팔로 랫트 간 세포(BRL 3A); 인간 폐 세포(W138); 인간 간 세포(Hep G2); 마우스 유선 종양(MMT 060562); 예컨대 Mather et al., *Annals N.Y. Acad.* Sci. 383:44-68 (1982)에 기재된 바와 같이 TRI 세포); MRC 5 세포; 및 FS4 세포이다. 다른 유용한 포유동물 숙주 세포주는 DHFR⁻ CHO 세포(Urlaub et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 77:4216 (1980))를 포함하는 중국 햄스터 난소(CHO) 세포; 및 골수종 세포주, 예컨대 Y0, NS0 및 Sp2/0을 포함한다. 항체 생성에 적합한 특정 포유류 숙주 세포주를 검토하려면, 예컨대 Yazaki and Wu, *Methods in Molecular Biology, Vol. 248* (B.K.C. Lo, ed., Humana Press, Totowa, NJ), pp. 255-268 (2003)를 참조한다.

[0202] 이제 항체 친화도를 참조하면, 구현예들에서, 항체는 하나 이상의 종양 관련 항원 또는 세포 표면 수용체에 결합한다. 구현예들에서, 종양 관련 항원 또는 세포 표면 수용체는 CD71, Trop2, MSLN, NaPi2b, Ly6E, EpCAM 및 CD22로부터 선택된다.

[0203] 본원에 기재된 바와 같이, Ab-CIDE는 항체, 예컨대, 하기로부터 선택된 항체를 포함할 수 있다:

[0204] i. 항 Ly6E 항체

[0205] Ly6E (림프구 항원 6 복합체, 유전자좌 E; Ly67,RIG-E,SCA-2,TSA-1); NP_002337.1; NM_002346.2; de Nooij-van Dalen, A.G. et al (2003) Int. J. Cancer 103 (6), 768-774; Zammit, D.J. et al (2002) Mol. Cell. Biol. 22 (3):946-952; WO 2013/17705.

[0206] 특정 구현예들에서, Ab-CIDE는 항 Ly6E 항체를 포함할 수 있다. 레티노산 유도 유전자 E(RIG-E) 및 줄기 세포 항원 2(SCA-2)로도 공지된 림프구 항원 6 복합체, 유전자좌 E(Ly6E). GPI 연결, 131개 아미노산 길이, 약 8.4 kDa 단백질로서 공지된 결합 짝이 없는 기능이 아직 공지되지 않은 단백질이다. 처음에는 마우스의 미성숙 흉선 세포, 흉선 수질 상피 세포에서 발현되는 전사물로서 확인되었다(Mao, et al. (1996) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 93:5910-5914). 일부 구현예들에서, 본원에 기재된 요지는 PCT 공보 제WO 2013/177055호에 기재된 항 Ly6E 항체를 포함하는 Ab-CIDE를 제공한다.

[0207] 일부 구현예들에서, 본원에 기재된 요지는 (a) 서열번호 4의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H1; (b) 서열번호 5의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H2; (c) 서열번호 6의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H3; (d) 서열번호 1의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L1; (e) 서열번호 2의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L2; 및 (f) 서열번호 3의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L3으로부터 선택된 적어도 1개, 2개, 3개, 4개, 5개, 또는 6개의 HVR을 포함하는 항 Ly6E 항체를 포함하는 Ab-CIDE를 제공한다.

[0208] 일 양태에서, 본원에 기재된 요지는 (a) 서열번호 4의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H1; (b) 서열번호 5의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H2; 및 (c) 서열번호 6의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H3으로부터 선택된 적어도 1개, 2개, 또는 3개 모두의 VH HVR 서열을 포함하는 항체를 포함하는 Ab-CIDE를 제공한다. 추가의 구현예에서, 상기 항체는 (a) 서열번호 4의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H1; (b) 서열번호 5의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H2; 및 (c) 서열번호 6의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H3을 포함한다.

[0209] 다른 양태에서, 본원에 기재된 요지는 (a) 서열번호 1의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L1; (b) 서열번호 2의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L2; 및 (c) 서열번호 3의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L3으로부터 선택된 적어도 1개, 2개, 또는 3개 모두의 VL HVR 서열을 포함하는 항체를 포함하는 Ab-CIDE를 제공한다.. 일 구현예에서, 상기 항체는 (a) 서열 번호 1의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L1; (b) 서열번호 2의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L2; 및 (c) 서열번호 3의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L3을 포함한다.

[0210] 다른 양태에서, Ab-CIDE는 (a) (i) 서열번호 4의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H1, (ii) 서열번호 5의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H2, 및 (iii) 서열번호 6의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H3으로부터 선택된 적어도 1개, 적어도 2개, 또는 3개 모두의 VH HVR 서열을 포함하는 VH 도메인; 및 (b) (i) 서열번호 1의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L1, (ii) 서열번호 2의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L2, 및 (c) 서열번호 3의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L3으로부터 선택된 적어도 1개, 적어도 2개, 또는 3개 모두의 VL HVR 서열을 포함하는 VL 도메인을 포함하는 항체를 포함한다.

[0211] 다른 양태에서, 본원에 기재된 요지는 (a) 서열번호 4의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H1; (b) 서열번호 5의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H2; (c) 서열번호 6의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H3; (d) 서열번호 1의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L1; (e) 서열번호 2의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L2; 및 (f) 서열번호 3의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L3을 포함하는 항체를 포함하는 Ab-CIDE를 제공한다.

[0212] 상기 구현예들 중 임의의 것에서, Ab-CIDE의 항 Ly6E 항체는 인간화된다. 일 구현예에서, 항 Ly6E 항체는 상기 구현예들 중 임의의 것에서와 같은 HVR을 포함하고, 인간 수용자 프레임워크, 예컨대, 인간 면역글로불린 프레임워크 또는 인간 공통 프레임워크를 추가로 포함한다.

[0213] 다른 양태에서, Ab-CIDE의 항 Ly6E 항체는 서열번호 8의 아미노산 서열과 적어도 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 또는 100% 서열 동일성을 갖는 중쇄 가변 도메인(VH)를 포함한다. 특정 구현예들에서, 서열번호 8의 아미노산 서열과 적어도 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 또는 99% 동일성을 갖는 VH 서열은 기준 서열에 비해 치환(예컨대, 보존적 치환), 삽입 또는 결실을 함유하지만, 상기 서열을 포함하는 항 Ly6E 항체는 Ly6E에 결합하는 능력을 보유한다. 특정 구현예들에서, 총 1 내지 10개의 아미노산은 서열번호 8에서 치환, 삽입 및/또는 결실되었다. 특정 구현예들에서, 총 1 내지 5개의 아미노산은 서열번호 8에서 치환, 삽입 및/또는 결실되었다. 특정 구현예들에서, 치환, 삽입 또는 결실은 HVR 외부의 영역에서(즉, FR에서) 발생한다. 임의적으로, 상기 항 Ly6E 항체는 상기 서열의 번역 후 변형을 포함하여 서열번호 8의 VH 서열을 포함한다. 특정 구현예에서, 상기 VH는 (a) 서열번호 4의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H1, (b) 서열번호 5의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H2, 및 (c) 서열번호 6의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H3으로부터 선택된 1개, 2개 또는 3개의 HVR을 포함한다.

[0214] 다른 양태에서, Ab-CIDE의 항 Ly6E 항체가 제공되고, 여기서 상기 항체는 서열번호 7의 아미노산 서열과 적어도 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 또는 100% 서열 동일성을 갖는 경쇄 가변 도메인(VL)을 포함한다. 특정 구현예들에서, 서열번호 7의 아미노산 서열과 적어도 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 또는 99% 동일성을 갖는 VL 서열은 기준 서열에 비해 치환(예컨대, 보존적 치환), 삽입 또는 결실을 함유하지만, 상기 서열을 포함하는 항 Ly6E 항체는 Ly6E에 결합하는 능력을 보유한다. 특정 구현예들에서, 총 1 내지 10개의 아미노산은 서열 번호 7에서 치환, 삽입 및/또는 결실되었다. 특정 구현예들에서, 총 1 내지 5개의 아미노산은 서열 번호 7에서 치환, 삽입 및/또는 결실되었다. 특정 구현예들에서, 상기 치환, 삽입 또는 결실은 HVR 외부의 영역에서(즉, FR에서) 발생한다. 임의적으로, 상기 항 Ly6E 항체는 상기 서열의 번역 후 변형을 포함하여 서열번호 7의 VL 서열을 포함한다. 특정 구현예에서, 상기 VL은 (a) 서열번호 1의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L1; (b) 서열번호 2의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L2; 및 (c) 서열번호 3의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L3으로부터 선택된 1개, 2개 또는 3개의 HVR 서열을 포함한다.

[0215] 다른 양태에서, 항 Ly6E 항체를 포함하는 Ab-CIDE가 제공되고, 여기서 상기 항체는 상기 제공된 구현예들 중 임의의 것에서와 같이 VH, 및 상기 제공된 구현예들 중 임의의 것에서와 같이 VL을 포함한다.

[0216] 일 구현예에서, Ab-CIDE가 제공되고, 여기서 상기 항체는 서열번호 8 및 서열번호 7에서 각각 상기 서열의 번역 후 변형을 포함하여 VH 및 VL 서열을 포함한다.

[0217] 추가의 양태에서, 본원에서는 본원에 제공된 항 Ly6E 항체와 동일한 에피토프에 결합하는 항체를 포함하는 Ab-CIDE가 제공된다. 예를 들어, 특정 구현예들에서, 서열번호 8의 VH 서열 및 서열번호 7의 VL 서열을 각각 포함하는 항 Ly6E 항체와 동일한 에피토프에 결합하는 항체를 포함하는 Ab-CIDE가 제공된다.

[0218] 추가의 양태에서, 상기 구현예들 중 임의의 것에 따른 Ab-CIDE의 항 Ly6E 항체는 인간 항체를 포함한 단일클론 항체이다. 일 구현예에서, Ab-CIDE의 항 Ly6E 항체는 항체 단편, 예컨대, Fv, Fab, Fab', scFv, 디아바디, 또는 $F(ab')_2$ 단편이다. 다른 구현예에서, 상기 항체는 실질적으로 전장 항체, 예컨대, IgG1 항체, IgG2a 항체, 또는 본원에 정의된 바와 같은 다른 항체 부류 또는 동형이다. 일부 구현예들에서, Ab-CIDE는 서열번호 10 및 서열번호 9의 아미노산 서열을 각각 포함하는 중쇄 및 경쇄를 포함하는 항 Ly6E를 포함한다.

[0219] ii. 항 NaPi2b 항체

[0220] Napi2b(Napi3b, NAPI-3B, NPTIIb, SLC34A2, 용질 운반체 계열 34(인산나트륨), 구성요소 2, 유형 II 나트륨 의존성 인산염 수송체 3b, Genbank 수탁 번호 NM_006424) J. Biol. Chem. 277 (22):19665-19672 (2002), Genomics 62 (2):281-284 (1999), Feild, J.A., et al (1999) Biochem. Biophys. Res. Commun. 258 (3):578-582); WO2004022778 (청구항 2); EP1394274 (실시예 11); WO2002102235 (청구항 13; 페이지 326); EP875569 (청구항 1; 페이지 17-19); WO200157188 (청구항 20; 페이지 329); WO2004032842 (실시예 IV); WO200175177 (청구항 24; 페이지 139-140); 상호 참조: MIM:604217; NP_006415.1; NM_006424_1.

[0221] 특정 구현예들에서, Ab-CIDE는 항 NaPi2b 항체를 포함한다.

[0222] 일부 구현예들에서, 본원에서는 (a) 서열번호 11의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H1; (b) 서열번호 12의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H2; (c) 서열번호 13의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H3; (d) 서열번호 14의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L1; (e) 서열번호 15의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L2; 및 (f) 서열번호 16의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L3으로부터 선택된 적어도 1개, 2개, 3개, 4개, 5개, 또는 6개의 HVR 서열을 포함하는 항 NaPi2b 항체를 포함하는 Ab-CIDE가 기재된다.

[0223] 일 양태에서, 본원에서는 (a) 서열번호 11의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H1; (b) 서열번호 12의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H2; (c) 서열번호 13의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H3으로부터 선택된 적어도 1개, 2개 또는 3개 모두의 VH HVR 서열을 포함하는 항체를 포함하는 Ab-CIDE가 기재된다. 추가의 구현예에서, 상기 항체는 (a) 서열번호 11의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H1; (b) 서열번호 12의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H2; (c) 서열번호 13의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H3을 포함한다.

[0224] 다른 양태에서, 본원에서는 (a) 서열번호 14의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L1; (b) 서열번호 15의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L2; 및 (c) 서열번호 16의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L3으로부터 선택된 적어도 1개, 적어도 2개, 또는 3개 모두의 VL HVR 서열을 포함하는 항체를 포함하는 Ab-CIDE가 기재된다. 일 구현예에서, 상기 항체는 (a) 서열번호 14의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L1; (b) 서열번호 15의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L2; 및 (c) 서열번호 16의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L3을 포함한다.

[0225] 다른 양태에서, Ab-CIDE는 (a) (i) 서열번호 11의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H1, (ii) 서열번호 12의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H2, 및 (iii) 서열번호 13의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H3으로부터 선택된 적어도 1개, 적어도 2개, 또는 3개 모두의 VH HVR 서열을 포함하는 VH 도메인; 및 (b) (i) 서열번호 14의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L1, (ii) 서열번호 15의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L2, 및 (c) 서열번호 16의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L3으로부터 선택된 적어도 1개, 적어도 2개, 또는 3개 모두의 VL HVR 서열을 포함하는 VL 도메인을 포함하는 항체를 포함한다.

[0226] 다른 양태에서, 본원에서는 (a) 서열번호 11의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H1, (b) 서열번호 12의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H2; (c) 서열번호 13의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H3; (d) 서열번호 14의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L1; (e) 서열번호 15의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L2; 및 (f) 서열번호 16의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L3을 포함하는 항체를 포함하는 Ab-CIDE가 기재된다.

[0227] 상기 구현예들 중 임의의 것에서, Ab-CIDE의 항 NaPi2b 항체는 인간화된다. 일 구현예에서, 항 NaPi2b 항체는 상기 구현예들 중 임의의 것에서와 같은 HVR을 포함하고, 인간 수용자 프레임워크, 예컨대, 인간 면역글로불린 프레임워크 또는 인간 공통 프레임워크를 추가로 포함한다.

[0228] 다른 양태에서, Ab-CIDE의 항 NaPi2b 항체는 서열번호 17의 아미노산 서열과 적어도 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 99%, 또는 100% 서열 동일성을 갖는 중쇄 가변 도메인(VH)을 포함한다. 특정 구현예들에서, 서열번호 54의 아미노산 서열과 적어도 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 또는 99% 동일성을 갖는 VH 서열은 기준 서열에 비해 치환(예컨대, 보존적 치환), 삽입 또는 결실을 함유하지만, 상기 서열을 포함하는 항 NaPi2b 항체는 NaPi2b에 결합하는 능력을 보유한다. 특정 구현예들에서, 총 1 내지 10개의 아미노

산은 서열번호 17에서 치환, 삽입 및/또는 결실되었다. 특정 구현예들에서, 총 1 내지 5개의 아미노산은 서열번호 17에서 치환, 삽입 및/또는 결실되었다. 특정 구현예들에서, 치환, 삽입 또는 결실은 HVR 외부의 영역에서(즉, FR에서) 발생한다. 임의적으로, 상기 항 NaPi2b 항체는 상기 서열의 번역 후 변형을 포함하여 서열번호 17의 VH 서열을 포함한다. 특정 구현예에서, 상기 VH는 (a) 서열번호 11의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H1, (b) 서열번호 12의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H2, 및 (c) 서열 번호 13의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H3으로부터 선택된 1개, 2개 또는 3개의 HVR을 포함한다.

[0229] 다른 양태에서, Ab-CIDE의 항 NaPi2b 항체가 제공되고, 여기서 상기 항체는 서열번호 18의 아미노산 서열과 적어도 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 또는 100% 서열 동일성을 갖는 경쇄 가변 도메인(VL)을 포함한다. 특정 구현예들에서, 서열번호 18의 아미노산 서열과 적어도 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 또는 99% 동일성을 갖는 VL 서열은 기준 서열에 비해 치환(예컨대, 보존적 치환), 삽입 또는 결실을 함유하지만, 상기 서열을 포함하는 항 NaPi2b 항체는 항 NaPi2b에 결합하는 능력을 보유한다. 특정 구현예들에서, 총 1 내지 10개의 아미노산은 서열번호 18에서 치환, 삽입 및/또는 결실되었다. 특정 구현예들에서, 총 1 내지 5개의 아미노산은 서열번호 18에서 치환, 삽입 및/또는 결실되었다. 특정 구현예들에서, 상기 치환, 삽입 또는 결실은 HVR 외부의 영역에서(즉, FR에서) 발생한다. 임의적으로, 상기 항 NaPi2b 항체는 상기 서열의 번역 후 변형을 포함하여 서열번호 18의 VL 서열을 포함한다. 특정 구현예에서, 상기 VL은 (a) 서열번호 14의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L1; (b) 서열번호 15의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L2; 및 (c) 서열번호 16의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L3으로부터 선택된 1개, 2개 또는 3개의 HVR을 포함한다.

[0230] 다른 양태에서, 항 NaPi2b 항체를 포함하는 Ab-CIDE가 제공되고, 여기서 상기 항체는 상기 제공된 구현예들 중 임의의 것에서와 같이 VH, 및 상기 제공된 구현예들 중 임의의 것에서와 같이 VL을 포함한다.

[0231] 일 구현예에서, Ab-CIDE가 제공되고, 여기서 상기 항체는 서열번호 17 및 서열번호 18에서 각각 상기 서열의 번역 후 변형을 포함하여 VH 및 VL 서열을 포함한다.

[0232] 추가의 양태에서, 본원에서는 본원에 제공된 항 NaPi2b 항체와 동일한 에피토프에 결합하는 항체를 포함하는 Ab-CIDE가 제공된다. 예를 들어, 특정 구현예들에서, 서열번호 17의 VH 서열 및 서열번호 18의 VL 서열을 각각 포함하는 항 NaPi2b 항체와 동일한 에피토프에 결합하는 항체를 포함하는 Ab-CIDE가 제공된다.

[0233] 추가의 양태에서, 상기 구현예들 중 임의의 것에 따른 Ab-CIDE의 항 NaPi2b 항체는 인간 항체를 포함한 단일클론 항체이다. 일 구현예에서, Ab-CIDE의 항 NaPi2b 항체는 항체 단편, 예컨대, Fv, Fab, Fab', scFv, 디아바디, 또는 $F(ab')_2$ 단편이다. 다른 구현예에서, 상기 항체는 실질적으로 전장 항체, 예컨대, IgG1 항체, IgG2a 항체, 또는 본원에 정의된 바와 같은 다른 항체 부류 또는 동형이다.

[0234] iii. 항 CD22 항체

[0235] CD22(B 세포 수용체 CD22-B 동형, BL-CAM, Lyb-8, Lyb8, SIGLEC-2, FLJ22814, Genbank 수탁 번호 AK026467); Wilson et al (1991) J. Exp. Med. 173:137-146; WO2003072036 (청구항 1; 도 1); 상호 참조: MIM:107266; NP_001762.1; NM_001771_1

[0236] 특정 구현예들에서, Ab-CIDE는 3개의 경쇄 초가변 영역(HVR-L1, HVR-L2 및 HVR-L3) 및 3개의 중쇄 초가변 영역(HVR-H1, HVR-H2 및 HVR-H3)을 포함하는 항 CD22 항체를 포함할 수 있다. 일 구현예에서, Ab-CIDE의 항 CD22 항체는 3개의 경쇄 초가변 영역 및 3개의 중쇄 초가변 영역(서열번호 19-24)을 포함하고, 이의 서열은 하기에 나타내었다. 일 구현예에서, Ab-CIDE의 항 CD22 항체는 서열번호 25의 가변 경쇄 서열 및 서열번호 26의 가변 중쇄 서열을 포함한다. 일 구현예에서, Ab-CIDE의 항 CD22 항체는 서열번호 27의 경쇄 서열 및 서열번호 28의 중쇄 서열을 포함한다.

[0237] iv. 항 CD71 항체

[0238] 특정 구현예들에서, Ab-CIDE는 항 CD71 항체를 포함할 수 있다. CD71(트랜스페린 수용체)은 철의 세포 흡수에 중요한 역할을 하는 통합 막 당단백질이다. 이는 세포 증식 및 활성화에 대한 표지로서 일반적으로 공지되어 있다. 하지만, 조혈계의 모든 증식 세포는 CD71을 발현함에도 불구하고, CD71은 유용한 적혈구 관련 항원으로 간주되어 왔다. 상기 구현예들 중 임의의 것에서, Ab-CIDE의 항 CD71 항체는 인간화된다.

[0239] 일 구현예에서, 상기 항 CD71 항체는 N297G 돌연변이와 IgG1 mAb 작동체 기능을 감소/제거하는 IgG2 하부 힌지 영역의 조합인 NG2LH 변형을 포함한다. 다른 구현예에서, 상기 항 CD71 항체는 링커에 대한 접합에 사용되는 조작된 Cys 잔기를 포함한다. 일 구현예에서, 이러한 모든 변화가 결여된 모 IgG1 mAb는 하기의: WO2016081643에

기재되고, 이는 그 전체가 본원에 원용된다.

[0240] 구현예들에서, 상기 항 CD71 항체는 항 huTfR1.hIgG1.LC.K149C.HC.L174C.Y373C.NG2LH ABP1AA25970(고친화성 DAR6)이다. 일 구현예에서, Ab-CIDE의 항 CD71 항체는 서열번호 30의 경쇄 서열 및 서열번호 29의 중쇄 서열을 포함한다.

[0241] 구현예들에서, 상기 항 CD71 항체는 항 huTfR2.hIgG1.LC.K149C.HC.L174C.Y373C.NG2LH ABP1AA25969(저친화성 DAR6)이다. 일 구현예에서, Ab-CIDE의 항 CD71 항체는 서열번호 32의 경쇄 서열 및 서열번호 31의 중쇄 서열을 포함한다.

[0242] 구현예들에서, 상기 항 CD71 항체는 항 huTfR1.hIgG1.LC.K149C.NG2LH ABP1AA30139(고친화성 DAR2)이다. 일 구현예에서, Ab-CIDE의 항 CD71 항체는 서열번호 34의 경쇄 서열 및 서열번호 33의 중쇄 서열을 포함한다.

[0243] 구현예들에서, 상기 항 CD71 항체는 항 huTfR2.hIgG1.LC.K149C.NG2LH ABP1AA30140(저친화성 DAR2)이다. 일 구현예에서, Ab-CIDE의 항 CD71 항체는 서열번호 36의 경쇄 서열 및 서열번호 35의 중쇄 서열을 포함한다.

[0244] v. 항 Trop2 항체

[0245] 특정 구현예들에서, Ab-CIDE는 항 Trop2 항체를 포함할 수 있다. Trop2(영양막 항원 2)는 많은 암에서 차등적으로 발현되는 세포내 칼슘 신호 변환기인 막관통 당단백질이다. 이는 자기 재생, 증식, 침입 및 생존을 위해 세포에 신호를 보낸다. Trop 2는 또한 세포 표면 당단백질 Trop-2/Trop2, 위장관 종양 관련 항원 GA7331, 췌장암 표지 단백질 GA733-1/GA733, 막 구성요소 염색체 1 표면 표지 1 M1S1, 상피 당단백질-1, EGP-1, CAA1, 젤라틴 방울형 각막 이영양증 GDLD 및 TTD2로서 공지되어 있다. 상기 구현예들 중 임의의 것에서, Ab-CIDE의 항 Trop2 항체는 인간화된다. 일 구현예들에서, 상기 항 Trop2 항체는 US-2014/0377287 및 US-2015/0366988에 기재되어 있으며, 이들 각각은 그 전체가 본원에 원용된다.

[0246] vi. 항 MSLN 항체

[0247] 특정 구현예들에서, Ab-CIDE는 항 MSLN 항체를 포함할 수 있다. MSLN(메조텔린)은 세포 부착 단백질로서 기능할 수 있는 글리코실포스파티딜이노시톨 고정 세포 표면 단백질이다. MSLN은 또한 CAK1 및 MPF로서 공지되어 있다. 상기 단백질은 상피 중피종, 난소암 및 특정 편평 세포 암종에서 과발현된다. 상기 구현예들 중 임의의 것에서, Ab-CIDE의 항 MSLN 항체는 인간화된다. 일 구현예에서, 상기 MSLN 항체는 Scales, S. J. et al., *Mol. Cancer Ther*. 2014, 13(11), 2630-2640에 기재된 h7D9.v3이고, 이는 그 전체가 본원에 원용된다.

[0248] vii. 항 EpCAM 항체

[0249] 특정 구현예들에서, Ab-CIDE는 항 EpCAM 항체를 포함할 수 있다. 한 양태에서, Ab-CIDE의 항체는 수많은 세포 또는 조직 유형에서 발견되는 단백질에 대한 항체일 수 있다. 상기 항체의 예는 EpCAM을 포함한다. 상피 세포 부착 분자(EpCAM)는 상피에서 Ca2+-독립적 동형 세포-세포 부착을 매개하는 막관통 당단백질이다(Litvinov, S. et al. (1994) Journal of Cell Biology 125(2):437-46). 또한, DIAR5, EGP-2, EGP314, EGP40, ESA, HNPCC8, KS1/4, KSA, M4S1, MIC18, MK-1, TACSTD1, TROP1로서도 공지된, EpCAM는 또한 세포 신호전달(Maetzel, D. et al. (2009) Nature Cell Biology 11(2):162-71), 이동(Osta, WA; et al. (2004) Cancer Res. 64(16):5818-24), 증식, 및 분화(Litvinov, S. et al. (1996) Am J Pathol. 148(3):865-75)에 관여한다. 추가적으로, EpCAM은 c-myc, e-fabp, 및 사이클린 A & E를 상향 조절하는 이의 능력을 통해 종양 형성 잠재력을 가진다(Munz, M. et al. (2004) Oncogene 23(34):5748-58). EpCAM은 상피 및 상피 유래 신생물에서만 발현되기 때문에 다양한 암의 진단 표지로서 사용할 수 있다. 즉, Ab-CIDE는 표적 항체를 사용하는 경우와 같이 특정 세포 또는 조직 유형이 아닌 많은 세포 또는 조직에 CIDE를 전달하는 데 사용할 수 있다.

[0250] 1. 항체 친화성

[0251] 특정 구현예들에서, 본원에 제공된 항체는 해리 상수(Kd)가 ≤ 1 μM, ≤ 100 nM, ≤ 50 nM, ≤ 10 nM, ≤ 5 nM, ≤ 1 nM, ≤ 0.1 nM, ≤ 0.01 nM, 또는 ≤ 0.001 nM이고, 선택적으로 ≥ 10^{-13} M.(예컨대, 10^{-8} M 이하, 예컨대, 10^{-8} M 내지 10^{-13} M, 예컨대, 10^{-9} M 내지 10^{-13} M)이다.

[0252] 일 구현예에서, Kd는 하기 검정에 의해 설명된 바와 같이, 관심이 되는 항체의 Fab 버전 및 이의 항원으로 실시된 방사성표지화된 항원 결합 검정(RIA)에 의해 측정한다. 항원에 대한 Fab의 용해 결합 친화성은 표지화되지 않은 항원의 적정 연속의 존재하에 Fab를 최소 농도의 (^{125}I) 표지된 항원과 평형시키고, 이후 결합된 항원을 항

Fab 항체 코팅된 플레이트로 포획함으로써 측정된다(예컨대, Chen et al., *J. Mol. Biol.* 293:865-881(1999)을 참조). 분석을 위한 조건을 확립하기 위해, MICROTITER® 다중웰 평판(Thermo Scientific)이 50 mM 탄산나트륨(pH 9.6)에서 5 μg/ml의 포획 항 Fab 항체(Cappel Labs)로 밤새 코팅되고, 차후에 실온(대략 23℃)에서 2 내지 5 시간 동안 PBS에서 2%(w/v) 소 혈청 알부민으로 차단된다. 비흡착제 플레이트(눙크(Nunc) #269620)에서, 100 pM 또는 26 pM[^{125}I] 항원은 관심이 되는 Fab-12의 연속 희석으로 혼합한다(예컨대, Presta et al., *Cancer* 57:4593-4599 (1997)의 평가와 일치함). 이후, 관심 Fab를 밤새 배양한다. 하지만, 배양은 평형에 도달하도록 더 오랜 기간(예컨대, 약 65시간) 동안 계속될 수 있다. 그 후, 혼합물을 실온에서의 배양(예컨대, 1시간 동안)을 위해 포획 플레이트로 옮긴다. 이후, 용액을 제거하고 플레이트는 PBS에서 0.1% 폴리소르베이트 20(TWEEN-20®)으로 8회 세척한다. 플레이트가 건조될 때, 150 μl/웰의 신틸란트(MICROSCINT-20™; Packard)를 첨가하고, 상기 플레이트를 TOPCOUNT™ 감마 계수기(Packard)에서 10 분 동안 계수한다. 경쟁 결합 분석에 사용하기 위해 최대 결합의 20% 이하를 제공하는 각 Fab의 농도가 선택된다.

[0253] 다른 구현예에 따라서, Kd는 약 10 반응 단위(RU)에서 고정된 항원 CM5 칩으로 25℃에서 BIACORE®-2000 또는 BIACORE®-3000(BIAcore, Inc., Piscataway, NJ)을 이용한 표면 플라스몬 공명 검정을 이용하여 측정한다. 간략하게, 카복시메틸화된 덱스트란 바이오센서 칩(CM5, BIACORE, Inc.)은 공급자의 지시에 따라 *N*-에틸-*N*' -(3-디메틸아미노프로필)-카보디이미드 염산염(EDC) 및 N-히드록시석신이미드(NHS)로 활성화된다. 항원은 대략 10 반응 단위(RU)의 연계된 단백질을 달성하기 위해, 5 μl/분의 유량의 주입 전에 10 mM 아세트산나트륨, pH 4.8로 5 μg/ml(약 0.2 μM)까지 희석한다. 항원 주사 후, 1 M 에탄올아민을 주사하여 반응하지 않은 기를 차단한다. 동역학 측정을 위해, Fab의 2배 연속 희석액(0.78 nM 내지 500 nM)을 약 25 μl/분의 유량으로 25℃에서 0.05% 폴리소르베이트 20(트윈-20™) 계면활성제(PBST)를 포함하는 PBS 내에 주입한다. 결합율(kon) 및 해리율(koff)은 결합 및 해리 센서그램을 동시에 피팅함으로써 단순한 1 대 1 랭뮤어(Langmuir) 결합 모델(비아코어® 평가 소프트웨어 버전 3.2)을 이용하여 계산한다. 평형 해리 상수(Kd)는 비율 koff/kon으로서 계산한다. 예컨대, Chen et al., *J. Mol. Biol.* 293:865-881 (1999)을 참조한다. 결합 속도가 상기 표면 플라즈몬 공명 검정에 의해 106M-1 s-1을 초과하는 경우, 분광기, 예컨대 중단-흐름 구비된 분광광도계(Aviv Instruments) 또는 교반된 큐벳을 갖는 8000-시리즈 SLM-AMINCO(상표명) 분광광도계(ThermoSpectronic)에서 측정된 바대로 항원의 증가하는 농도의 존재 하에 PBS(pH 7.2) 중의 20 nM 항-항원 항체(Fab 형태)의 25℃에서의 형광 방출 강도(여기 = 295 nm; 방출 = 340 nm, 16 nm 대역 통과)의 증가 또는 감소를 측정하는 형광 켄칭 기법을 이용함으로써 결합 속도를 결정할 수 있다.

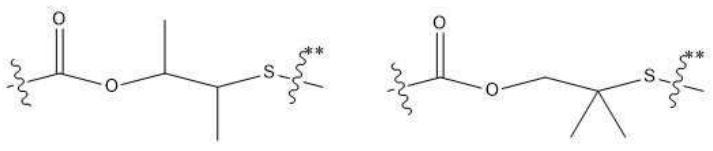
[0254] 2. 링커(L1)

[0255] 본원에 기재된 바와 같이, "링커"(L1, 링커-1)는 하나 이상의 CIDE 모이어티(D)를 항체(Ab)에 연결하여 Ab-CIDE를 형성하는 데 사용될 수 있는 이기능성 또는 다기능성 모이어티이다. 일부 구현예들에서, Ab-CIDE는 CIDE 및 항체에 공유결합으로 부착하기 위한 반응성 기능을 갖는 L1을 사용하여 제조할 수 있다. 예를 들어, 일부 구현예들에서, 항체(Ab)의 시스테인 티올은 링커의 반응성 작용기 또는 링커 L1-CIDE 기와 결합을 형성하여 Ab-CIDE를 만들 수 있다. 특히, 링커의 화학적 구조는 Ab-CIDE의 효능과 안전성 모두에 유의적 영향을 미칠 수 있다(Ducry & Stump, *Bioconjugate Chem*, 2010, 21, 5-13). 올바른 링커를 선택하면, 표적 세포의 의도된 세포 구획으로의 적절한 약물 전달에 영향을 미친다.

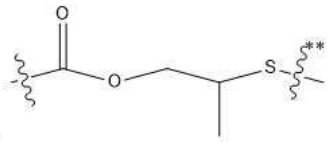
[0256] 특정 구현예들에서, L1 링커는 자기 희생적일 수 있다.

[0257] 특정 구현예들에서, 상기 L1 링커는 하기의 L1a, L1b 및 L1c:

[0258] L1a의 실시예:

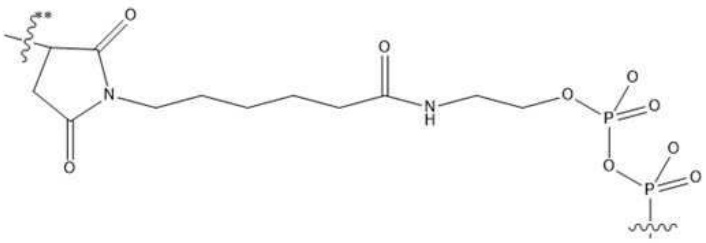
[0259] 

[0260] 또는



[0261]

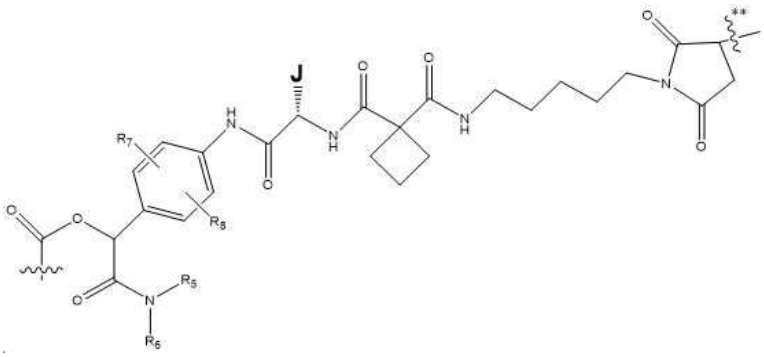
[0262] L1b의 실시예:



[0263]

[0264] 이고,

[0265] L1c의 실시예:



[0266]

[0267] 로 이루어진 군으로부터 선택되고,

[0268] 여기서,

[0269] J는 $-CH_2-CH_2-CH_2-NH-C(O)-NH_2$; $-CH_2-CH_2-CH_2-CH_2-NH_2$; $-CH_2-CH_2-CH_2-CH_2-NH-CH_3$; 또는 $-CH_2-CH_2-CH_2-CH_2-N(CH_3)_2$ 이고;

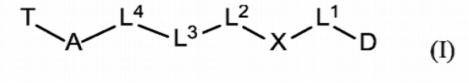
[0270] R_5 및 R_6은 독립적으로 수소 또는 C_{1-5}알킬이거나; 또는 R_5 및 R_6은 각각이 그에 부착된 질소와 함께 임의적으로 치환된 5원 내지 7원 헤테로시클릴을 형성하고;

[0271] R_7 및 R_8은 각각 독립적으로 수소, 할로, C_{1-5}알킬, C_{1-5} 알콕시 또는 히드록시이며;

[0272] 여기서  은 Ab에 대한 부착점이다.

[0273] 특정 구현예들에서, 상기 1 링커는 친수성 자기 희생적 링커이다. 이러한 유형의 L1 링커의 예는 WO2014/100762에 기재되어 있고, 이는 그 전체가 본원에 원용된다. L1 링커는 화학식 I-XII를 포함하지만, 이에 제한되지는 않는다.

[0274] 본 개시는 화학식(I)의 L1 링커:



(I)

[0275]

[0276] 또는 이의 염 또는 용매화물 또는 입체이성질체를 제공하고,

[0277] 여기서:

[0278] D는 약물 모이어티 또는 CIDE이고;

[0279] T는 항체와 같은 표적 모이어티이고;

[0280] X는 친수성 자기 희생적 링커이고;

[0281] L^1은 L1과 구별되며, 결합, 제2 자기 희생적 링커 또는 고리화 자기 제거 링커이고;

[0282] L^2는 결합 또는 제2 자기 희생적 링커이고;

[0283] 여기서, 만약 L^1이 제2 자기 희생적 링커 또는 고리화 자기 제거 링커인 경우, L은 결합이고;

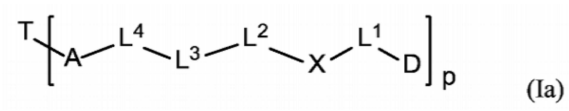
[0284] 여기서, 만약 L^2가 제2 자기 희생적 링커인 경우, L^1은 결합이고;

[0285] L^3은 펩티드 링커이고;

[0286] L^4는 결합 또는 스페이서이며; 그리고

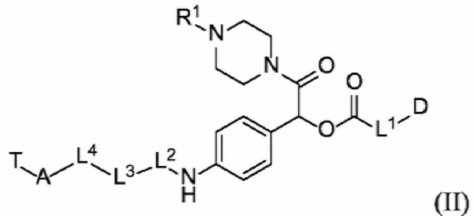
[0287] A는 아실 단위이다.

[0288] 일부 구현예들에서, 화학식(Ia)의 L1 링커:

[0289] 
(Ia)

[0290] 또는 이의 염 또는 용매화물 또는 입체이성질체가 제공되고; 여기서 D, T, X, L^1, L^2, L^3, L^4 및 A는 화학식(I)에 대해 정의된 바와 같고, p는 1 내지 20이다. 일부 구현예들에서, p는 1 내지 8이다. 일부 구현예들에서, p는 1 내지 6이다. 일부 구현예들에서, p는 1 내지 4이다. 일부 구현예들에서, p는 2 내지 4이다. 일부 구현예들에서, p는 1, 2, 3 또는 4이다.

[0291] 본 개시는 또한 화학식(II)의 L1 링커:

[0292] 
(II)

[0293] 또는 이의 염 또는 용매화물 또는 입체이성질체를 제공하고,

[0294] 여기서:

[0295] D는 약물 모이어티 또는 CIDE이고;

[0296] T는 표적화 모이어티 또는 항체이고;

[0297] R^1은 수소, 비치환 또는 치환된 $C1_{-3}$알킬, 또는 비치환 또는 치환된 헤테로시클릴이고;

[0298] L^1은 결합, 제2 자기 희생적 링커 또는 고리화 자기 제거 링커이고; 2

[0299] L^2는 결합, 제2 자기 희생적 링커이고;

[0300] 여기서, 만약 L^1이 제2 자기 희생적 링커 또는 고리화 자기 제거 링커인 경우, L^2는 결합이고;

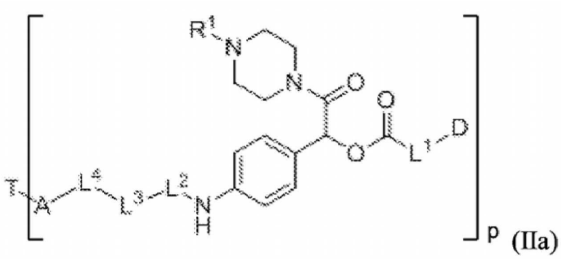
[0301] 여기서, 만약 L^1가 제2 자기 희생적 링커인 경우, L^2은 결합이고;

[0302] L^3은 펩티드 링커이고;

[0303] L^4는 결합 또는 스페이서이며; 그리고

[0304] A는 아실 단위이다.

[0305] 일부 구현예들에서, 화학식(IIa)의 L1 링커:

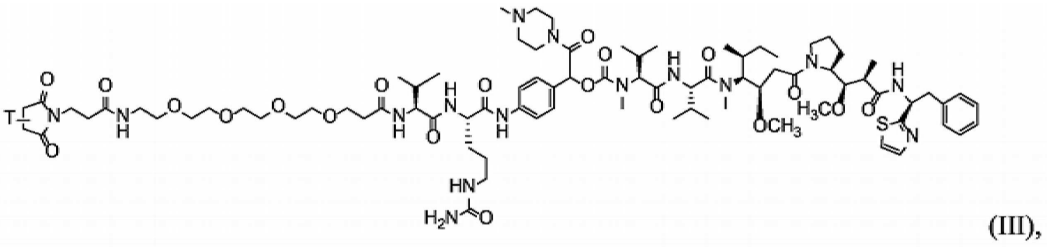


(IIa)

[0306]

[0307] 또는 이의 염 또는 용매화물 또는 입체이성질체가 제공되고; 여기서 D, T, L^1, L^2, L^3, L^4 및 A는 화학식(II)에 대해 정의된 바와 같고, p는 1 내지 20이다. 일부 구현예들에서, p는 1 내지 8이다. 일부 구현예들에서, p는 1 내지 6이다. 일부 구현예들에서, p는 1 내지 4이다. 일부 구현예들에서, p는 2 내지 4이다. 일부 구현예들에서, p는 1, 2, 3 또는 4이다.

[0308] 본 개시는 또한 화학식(III)의 L1 링커:



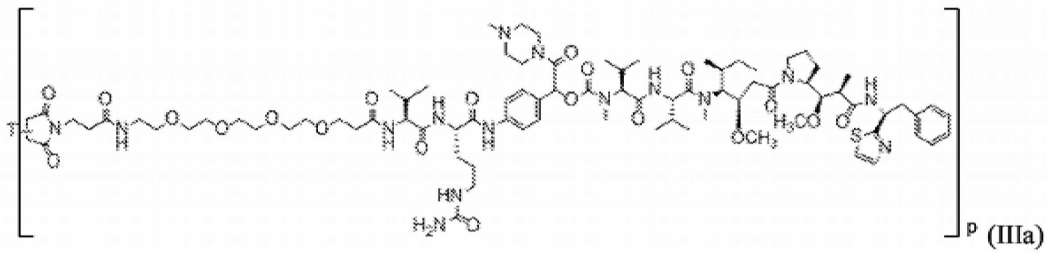
(III),

[0309]

[0310] 또는 이의 염 또는 용매화물 또는 입체이성질체를 제공하고,

[0311] 여기서 T는 표적화 모이어티이다.

[0312] 일부 구현예들에서, 화학식(IIIa)의 L1 링커:

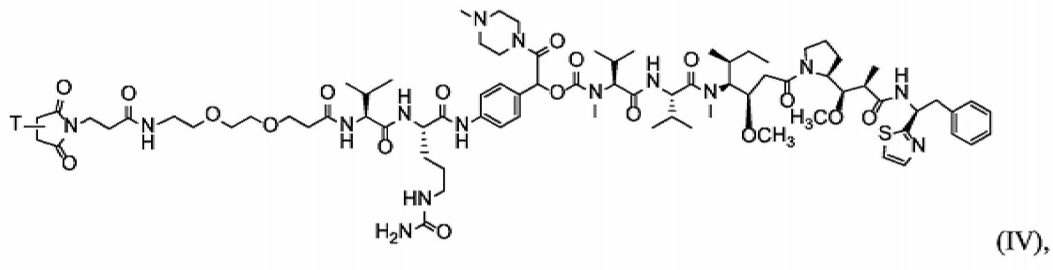


(IIIa)

[0313]

[0314] 또는 이의 염 또는 용매화물 또는 입체이성질체가 제공되고; 여기서 T는 표적화 모이어티이고 p는 1 내지 20이다. 일부 구현예들에서, p는 1 내지 8이다. 일부 구현예들에서, p는 1 내지 6이다. 일부 구현예들에서, p는 1 내지 4이다. 일부 구현예들에서, p는 2 내지 4이다. 일부 구현예들에서, p는 1, 2, 3 또는 4이다.

[0315] 본 개시는 화학식(IV)의 L1 링커:



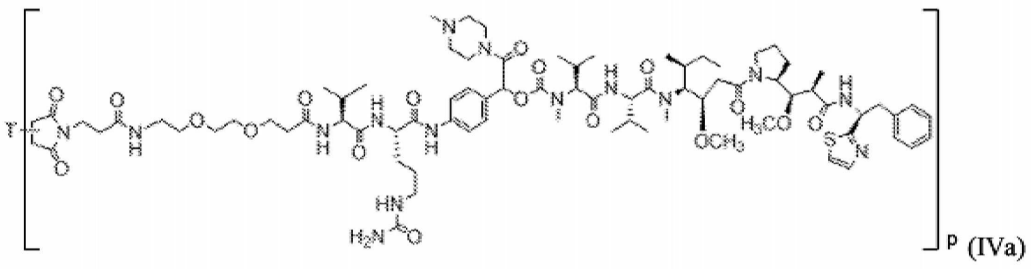
(IV),

[0316]

[0317] 또는 이의 염 또는 용매화물 또는 입체이성질체를 제공하고,

[0318] 여기서 T는 표적화 모이어티이다.

[0319] 일부 구현예들에서, 화학식(IVa)의 L1 링커:

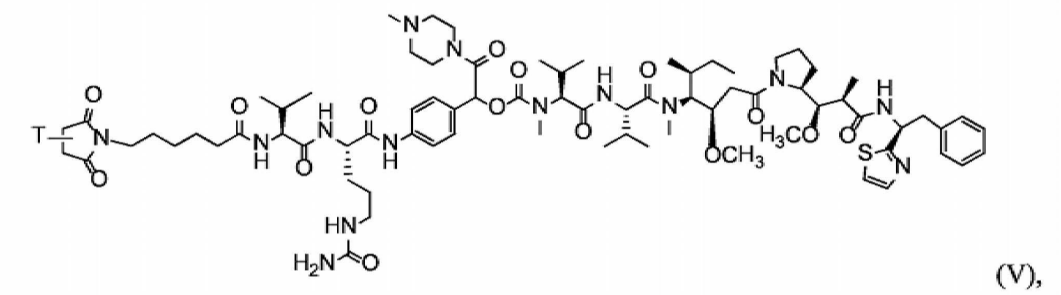


(IVa)

[0320]

[0321] 또는 이의 염 또는 용매화물 또는 입체이성질체가 제공되고; 여기서 T는 표적화 모이어티이고 p는 1 내지 20이다. 일부 구현예들에서, p는 1 내지 8이다. 일부 구현예들에서, p는 1 내지 6이다. 일부 구현예들에서, p는 1 내지 4이다. 일부 구현예들에서, p는 2 내지 4이다. 일부 구현예들에서, p는 1, 2, 3 또는 4이다.

[0322] 본 개시는 화학식(V)의 L1 링커:



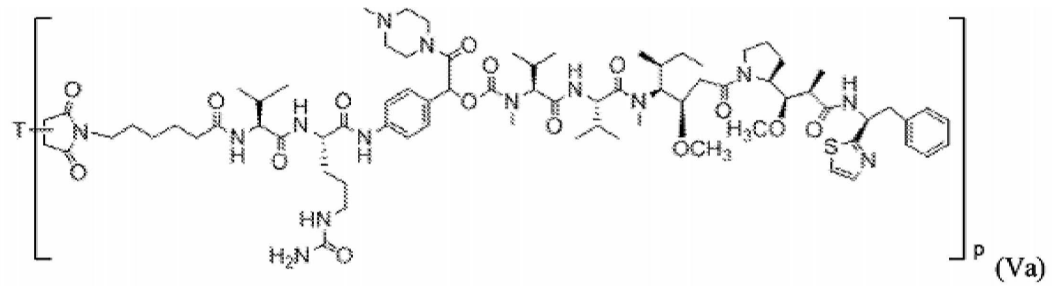
(V),

[0323]

[0324] 또는 이의 염 또는 용매화물 또는 입체이성질체를 제공하고,

[0325] 여기서 T는 표적화 모이어티이다.

[0326] 일부 구현예들에서, 화학식(Va)의 L1 링커:



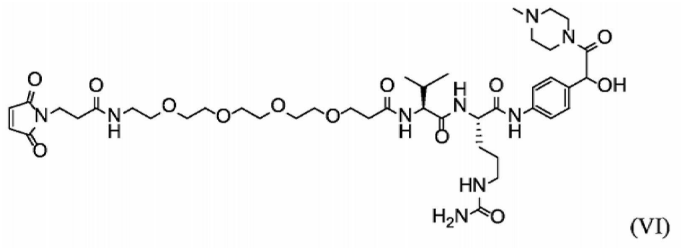
(Va)

[0327]

[0328] 또는 이의 염 또는 용매화물 또는 입체이성질체가 제공되고; 여기서 T는 표적화 모이어티이고 p는 1 내지 20이다. 일부 구현예들에서, p는 1 내지 8이다. 일부 구현예들에서, p는 1 내지 6이다. 일부 구현예들에서, p는 1

내지 4이다. 일부 구현예들에서, p는 2 내지 4이다. 일부 구현예들에서, p는 1, 2, 3 또는 4이다.

[0329] 본 개시는 화학식(VI)의 L1 링커:

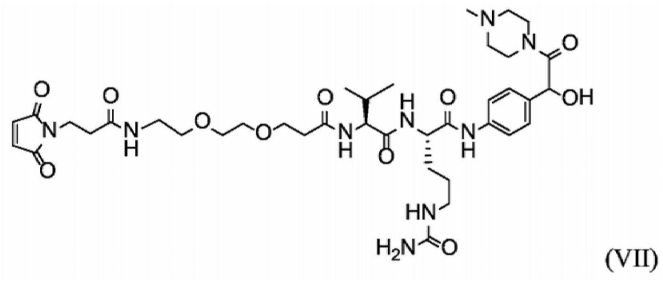


(VI)

[0330]

[0331] 또는 이의 염 또는 용매화물을 제공한다.

[0332] 본 개시는 화학식(VII)의 L1 링커:

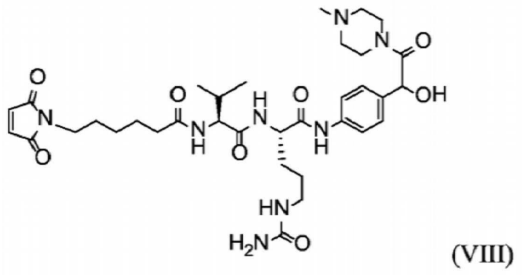


(VII)

[0333]

[0334] 또는 이의 염 또는 용매화물을 제공한다.

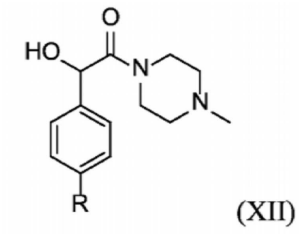
[0335] 본 개시는 화학식(VIII)의 L1 링커를 제공한다:



(VIII)

[0336]

[0337] 본 개시는 화학식(VII)의 L1 링커:



(XII)

[0338]

[0339] 또는 이의 염 또는 용매화물 또는 입체이성질체를 제공하고; 여기서 R은 NO_2 또는 NH_2이다.

[0340] 특정 구현예들에서, L1 링커는 또한 일반적으로 절단 가능(예컨대, 펩티드, 히드라존 또는 디설파이드) 또는 비절단성(예컨대, 티오에테르)의 두 범주로 나눌 수 있다. 링커가 절단 불가능한 링커인 경우, E3LB 부분에서의 이의 위치는 VHL 결합을 방해하지 않는 위치이다. 구체적으로, 비절단성 링커는 VHL 결합 도메인의 프롤린 상의 하이드록실 위치에서 공유결합으로 연결되지 않아야 한다. 리소좀 효소(예컨대, 카텝신 B)에 의해 가수분해될 수 있는 발린-시트룰린(Val-Cit)과 같은 펩티드 링커는 약물을 항체와 연결하는 데 사용되었다(US 6,214,345). 이는 부분적으로는 전신 순환에서의 상대적 안정성과 종양에서 약물을 효율적으로 방출하는 능력으로 인해 특히 유용하였다. 하지만, 천연 펩타이드가 나타내는 화학적 공간은 제한적이고; 따라서, 펩티드처럼 작용하고 리소좀 프로테아제에 의해 효과적으로 절단될 수 있는 다양한 비펩티드 링커를 갖는 것이 바람직하다. 비펩티드 구

조의 더 큰 다양성은 펩티드 링커에 의해 제공되지 않는 신규의 유익한 특성을 제공할 수 있다. 본원에서는 리소좀 효소에 의해 절단될 수 있는 링커 L1에 대한 상이한 유형의 비펩티드 링커를 제공한다.

[0341] a. 펩티드 모방체 링커

[0342] 본원에서는 리소좀 효소에 의해 절단가능한 Ab-CIDE에 대한 상이한 유형의 비펩티드, 펩티드모방체 링커를 제공한다. 예를 들어, 디펩티드(예컨대, Val-Cit)의 중간에 있는 아미드 결합은 아미드 모방체로 대체되었고; 그리고/또는 전체 아미노산(예컨대, Val-Cit 디펩티드의 발린 아미노산)은 비아미노산 모이어티(예컨대, 시클로알킬 디카르보닐 구조(예를 들어, 고리 크기 = 4 또는 5))로 대체되었다.

[0343] L1이 펩티드 모방체 링커일 때, 하기의 식으로 표시된다:

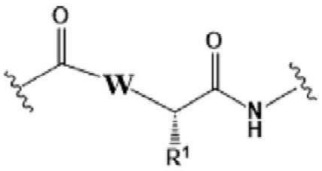
[0344] -Str-(PM)-Sp-,

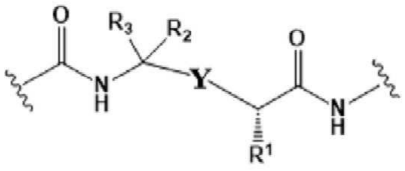
[0345] 여기서:

[0346] Str은 Ab에 공유 부착된 스트레처(stretcher) 단위이고;

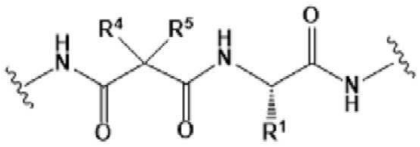
[0347] Sp는 CIDE 모이어티에 공유 부착된 결합 또는 스페이서 단위이며; 그리고

[0348] PM은 하기로 이루어진 군으로부터 선택된 비펩티드 화학 모이어티이고:





및



[0349]

[0350] W는 -NH-헤테로시클로알킬- 또는 헤테로시클로알킬이고;

[0351] Y는 헤테로아릴, 아릴, -C(O)C_1-C_6알킬렌, C_1-C_6알킬렌-NH_2, C_1-C_6알킬렌-NH-CH_3, C_1-C_6알킬렌-N-$(CH_3)_2$, C_1-C_6알케닐 또는 C_1-C_6알킬레닐이고;

[0352] 각각의 R^1은 독립적으로 C_1-C_{10}알킬, C_1-C_{10}알케닐, (C_1-C_{10}알킬)NHC(NH)NH_2 또는 (C_1-C_{10}알킬)NHC(O)NH_2이고;

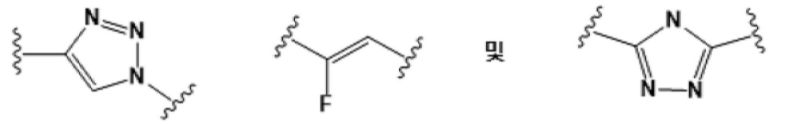
[0353] R^3 및 R^2는 각각 독립적으로 H, C_1-C_{10}알킬, C_1-C_{10}알케닐, 아릴알킬 또는 헤테로아릴알킬이거나, 또는 R^3 및 R^2는 함께 C_3-C_7시클로알킬을 형성할 수 있으며; 그리고

[0354] R^4 및 R^5는 각각 독립적으로 C_1-C_{10}알킬, C_1-C_{10}알케닐, 아릴알킬, 헤테로아릴알킬, (C_1-C_{10}알킬)OCH_2-이거나, 또는 R^4 및 R^5는 C_3-C_7시클로알킬 고리를 형성할 수 있다.

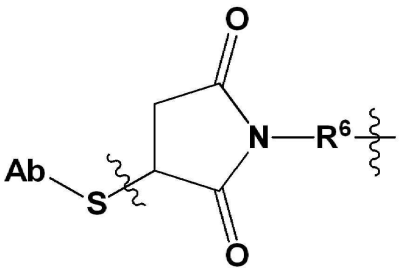
[0355] L1은 E3LB, L2 또는 PB 기들 중 임의의 것을 통해 CIDE에 연결될 수 있음에 주목한다.

[0356] 구현예들에서, Y는 헤테로아릴이고; R^4 및 R^5는 함께 시클로부틸 고리를 형성한다.

[0357] 구현예들에서, Y는 하기로 이루어진 군으로부터 선택된 모이어티이다:

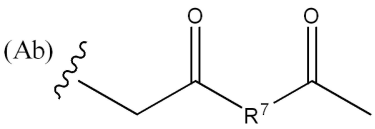
[0358] 

[0359] 구현예들에서, Str은 하기의 화학식으로 표시되는 화학적 잔기이고:

[0360] 

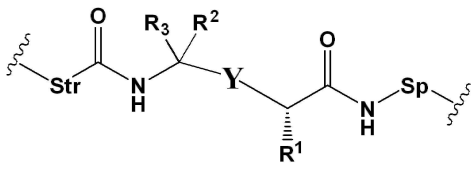
[0361] 여기서 R^6은 C_1-C_{10}알킬렌, C_1-C_{10}알케닐, C_3-C_8시클로알킬, (C_1-C_8알킬렌)O-, 및 C_1-C_{10}알킬렌-C(O)N(R^a)-C_2-C_6알킬렌으로 이루어진 군으로부터 선택되고, 여기서 각각의 알킬렌은 할로, 트리플루오로메틸, 디플루오로메틸, 아미노, 알킬아미노, 시아노, 술포닐, 술폰아미드, 술폭시드, 히드록시, 알콕시, 에스테르, 카르복실산, 알킬티오, C_3-C_8시클로알킬, C_4-C_7헤테로시클로알킬, 아릴, 아릴알킬, 헤테로아릴알킬 및 헤테로아릴로 이루어진 군으로부터 선택된 1개 내지 5개의 치환기로 치환될 수 있고, 각각의 R^a는 독립적으로 H 또는 C_1-C_6알킬이고; Sp는 -Ar-R^b-이며, 여기서 Ar는 아릴 또는 헤테로아릴이고, R^b는 (C_1-C_{10}알킬렌)O-이다. 말레이미드가 항체에 노출된 Cys 잔기와 Michael 첨가를 통해 반응함에 따라 항체에 대한 접합이 발생할 수 있다. 노출된 Cys 잔기는 분자 공학에 의해 인위적으로 도입되거나 사슬간 이황화 결합의 환원에 의해 생성될 수 있다.

[0362] 구현예들에서, Str는 하기의 화학식을 가지고:

[0363] 

[0364] 여기서 R^7은 C_1-C_{10}알킬렌, C_1-C_{10}알케닐, (C_1-C_{10}알킬렌)O-, N(R^c)-(C_2-C_6알킬렌)-N(R^c) 및 N(R^c)-(C_2-C_6알킬렌)로부터 선택되고; 여기서 각각의 R^c는 독립적으로 H 또는 C_1-C_6알킬이고; Sp는 -Ar-R^b-이며, 여기서 Ar은 아릴 또는 헤테로아릴이고, R^b는 (C_1-C_{10}알킬렌)O- 또는 Sp -C_1-C_6알킬렌-C(O)NH-이다.

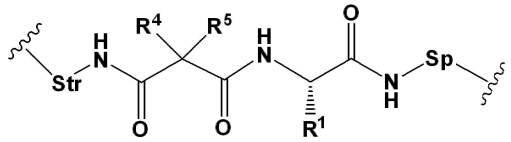
[0365] 구현예들에서, L1은 하기의 화학식으로 표시되는 비펩티드 화학적 잔기이고:

[0366] 

[0367] R^1은 C_1-C_6알킬, C_1-C_6알케닐, (C_1-C_6알킬)NHC(NH)NH_2 또는 (C_1-C_6알킬)NHC(O)NH_2이고;

[0368] R^3 및 R^2는 각각 독립적으로 H 또는 C_1-C_{10}알킬이다.

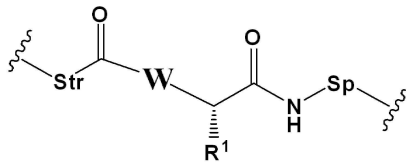
[0369] 구현예들에서, L1은 하기의 화학식으로 표시되는 비펩티드 화학적 잔기이고:

[0370] 

[0371] R^1은 C_1-C_6알킬, (C_1-C_6알킬)NHC(NH)NH_2 또는 (C_1-C_6알킬)NHC(O)NH_2이고;

[0372] R^4 및 R^5는 함께 C_3-C_7시클로알킬 고리를 형성한다.

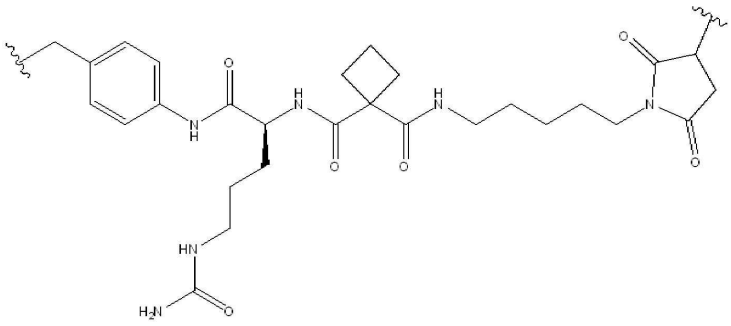
[0373] 구현예들에서, L1은 하기의 화학식으로 표시되는 비펩티드 화학적 잔기이고:

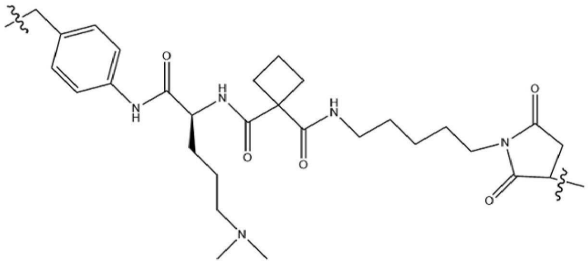
[0374] 

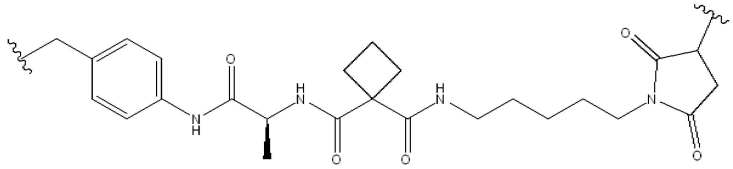
[0375] R^1은 C_1-C_6알킬, (C_1-C_6알킬)NHC(NH)NH_2 또는 (C_1-C_6알킬)NHC(O)NH_2이고 W는 상기 정의된 바와 같다.

[0376] 일부 구현예들에서, 링커는 WO2015/095227, WO2015/095124 또는 WO2015/095223에 기재된 것과 같은 펩티드모방체 링커일 수 있고, 이의 각각은 그 전체가 본원에 원용된다.

[0377] 특정 구현예들에서, 상기 링커는 하기로 이루어진 군으로부터 선택된다:

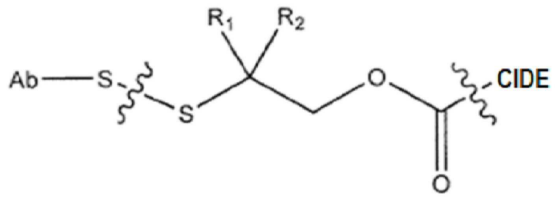
[0378]  ;

[0379]  ;

[0380]  및 .

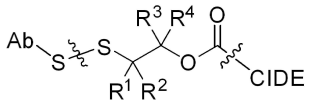
[0381] b. 비펩티드 모방체 링커

[0382] 일 양태에서, 링커 L1은 하기와 같이 항체 및 CIDE에 공유 결합될 수 있다:



[0383] .

[0384] 일 양태에서, 링커 L1은 상기 항체와 이황화 결합을 형성하고, 상기 링커는 하기의 구조를 가지고:

[0385] 

,

[0386] 여기서 R^1, R^2, R^3, 및 R^4는 H, 임의적으로 치환된 분지쇄 또는 직쇄 C_1-C_5알킬, 및 임의적으로 치환된 C_3-C_6시클로알킬로 이루어진 군으로부터 독립적으로 선택되거나, 또는 R^1 및 R^2 또는 R^3 및 R^4는 이들이 결합된 탄소 원자와 함께 임의적으로 치환된 C_3-C_6시클로알킬 고리 또는 3원 내지 6원 헤테로시클로알킬 고리를 형성한다.

[0387] 일 양태에서, 상기 링커의 카르보닐기는 CIDE에서 아민기에 연결된다. 또한, Ab에 연결된 황 원자는 항체의 시스테인으로부터 유래한 황기라는 점에 주목한다. 다른 양태에서, 링커 L1은 항체에 존재하는 유리 시스테인과 반응하여 공유 결합을 형성할 수 있는 작용성을 가진다. 상기 반응성 작용성의 비제한적인 예는 말레이미드, 할로아세트아미드, a-할로아세틸, 활성화된 에스테르, 예컨대, 숙신이미드 에스테르, 4-니트로페닐 에스테르, 펜타플루오로페닐 에스테르, 테트라플루오로페닐 에스테르, 무수물, 산 염화물, 술포닐 클로라이드, 이소시아네이트, 이소티오시아네이트를 포함하지만, 이에 제한되지는 않는다. 예를 들어, Klussman, et al (2004), *Bioconjugate Chemistry* 15(4):765-773의 페이지 766의 접합 방법, 및 본원의 실시예를 참조한다.

[0388] 일부 구현예들에서, L1 링커는 항체 상에 존재하는 친전자성 기와 반응할 수 있는 작용성을 가진다. 이러한 친전자성 기의 예는 알데히드 및 케톤 카르보닐 기를 포함하지만 이에 제한되지는 않는다. 일부 구현예들에서, 링커의 반응성 작용성의 헤테로원자는 항체 상의 친전자성 기와 반응할 수 있고 항체 단위에 대한 공유 결합을 형성할 수 있다. 이러한 반응성 작용성의 비제한적인 예는 하이드라지드, 옥심, 아미노, 하이드라진, 티오세미카르바존, 하이드라진 카르복실레이트 및 아릴하이드라지드를 포함하지만 이에 제한되지는 않는다.

[0389] L1 링커는 하나 이상의 링커 성분을 포함할 수 있다. 예시적인 링커 성분은 6-말레이미도카프로일("MC"), 말레이미도프로파노일("MP"), 발린-시트룰린("val-cit" 또는 "vc"), 알라닌-페닐알라닌("ala-phe"), p -아미노벤질옥시카르보닐("PAB"), N-숙신이미딜 4-(2-피리딜티오) 펜타노에이트("SPP"), 및 4-(N-말레이미도메틸) 시이클로헥산-1 카르복실레이트("MCC")를 포함한다. 이러한 링커 성분은 당해 분야에서 공지되어 있고, 이의 일부는 하기에서 설명된다.

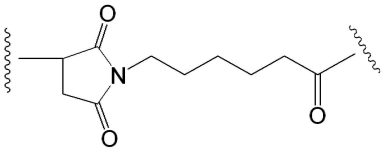
[0390] L1 링커는 CIDE의 방출을 촉진하는 "절단 가능한 링커"일 수 있다. 비제한적인 예시적 절단가능한 링커는 산 불안정성 링커(예컨대, 하이드라존을 포함), 프로테아제 민감성(예컨대, 펩티다제 민감성) 링커, 광불안정성 링커, 또는 이황화물 함유 링커를 포함한다(Chari et al, Cancer Research 52:127-131 (1992); 미국 특허 제5,208,020호).

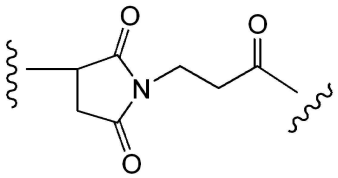
[0391] 특정 구현예들에서, 링커는 하기의 화학식을 가지고:

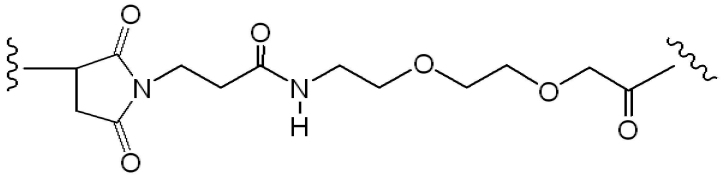
[0392] $$-A_a-W_w-Y_y-$$

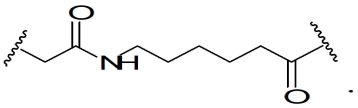
[0393] 여기서 A는 “스트레처 단위”이고, a는 0 내지 1의 정수이고; W는 “아미노산 단위”이고, w는 0 내지 12의 정수이고; Y는 “스페이서 단위”이며, y는 0, 1 또는 2이다. 상기 링커의 예시적인 구현예들은 미국 특허 제7,498,298호에서 기재되어 있다.

[0394] 일부 구현예들에서, L1 링커 성분은 항체를 다른 링커 성분 또는 CIDE 모이어티에 연결하는 "스트레처 단위"를 포함한다. 비제한적인 예시적인 스트레처 단위가 하기에 제시되어 있다(물결선은 항체, CIDE 또는 추가 링커 성분에 대한 공유 부착 부위를 나타냄):

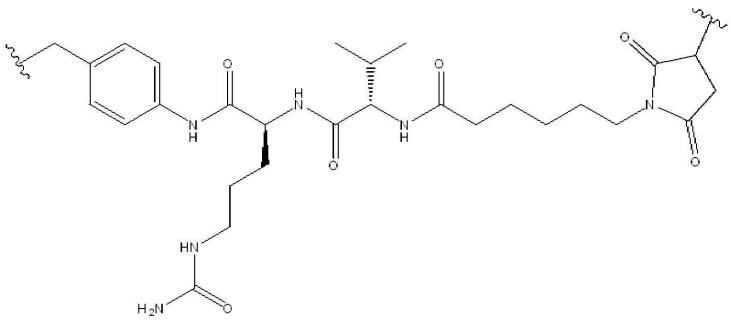
[0395]  MC

[0396]  MP

[0397]  mPEG

[0398] .

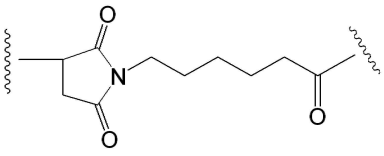
[0399] 특정 구현예들에서, 상기 링커는 하기와 같다:

[0400] .

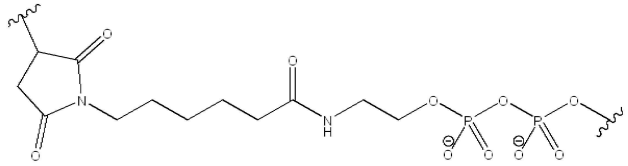
[0401] 특정 구현예들에서, 링커는 하기의 화학식을 가지고:

[0402] $-A_a-Y_y-$

[0403] 여기서 A 및 Y는 상기와 같이 정의된다. 특정 구현예들에서, 스페이서 단위 Y는 단인삼염 또는 비스인산염과 같은 인산염일 수 있다. 특정 구현예들에서, 스트레처 구성요소 A는 하기를 포함한다:

[0404]  MC

[0405] 특정 구현예들에서, 상기 링커는 하기와 같다:

[0406] .

[0407] 3. CIDE (“D”)

[0408] 유용한 CIDE는 상기에 기재된 일반 화학식을 가진다.

[0409] 유용한 Ab-L1-CIDE 및 접합되지 않은 분해제는 세포 표적화, 단백질 표적화 및 분해와 같은 바람직한 특성을 나

타낸다. 특정 구현예들에서, Ab-L1-CIDE는 0.0001 내지 약 2.0 미만, 또는 약 1.0 미만, 또는 약 0.8 미만, 또는 약 0.7 미만, 또는 약 0.6 미만, 또는 약 0.5 미만, 또는 약 0.4 미만, 또는 약 0.3 미만, 또는 약 0.2 미만의 DC50(μg/mL)을 나타낸다. 특정 구현예들에서, Ab-L1-CIDE는 적어도 70, 75, 80, 85, 90, 95, 96, 97, 98 또는 99의 DCmax를 나타낸다.

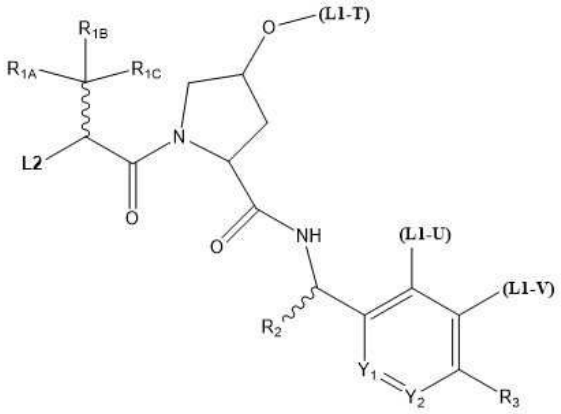
[0410] CIDE는 하기의 구성 요소를 가진 것들을 포함한다.

[0411] a. E3 유비퀴틴 리가아제 결합기(E3LB)

[0412] E3 유비퀴틴 리가아제(인간에서 600개 초과가 공지되어 있음)는 유비퀴틴화에 대한 기질 특이성을 부여한다. 상기 리가아제에 결합하는 공지된 리간드가 있다. 본원에 기재된 바와 같이, E3 유비퀴틴 리가아제 결합기는 폰 히펠-린다우(VHL)인 E3 유비퀴틴 리가아제에 결합할 수 있는 펩티드 또는 소분자이다.

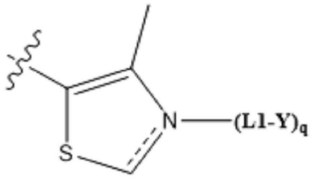
[0413] 특정 E3 유비퀴틴 리가아제는 또한 엘론긴(elongin) B 및 C, Cul2 및 Rbx1로 구성된 E3 리가아제 복합체 VCB의 기질 인식 하위단위인 폰 히펠-린다우(VHL) 종양 억제자이다. VHL의 주요 기질은 낮은 산소 수준에 반응하여 사이토카인 에리스로포이에틴을 유도하는 적혈구 및 프로 혈관신생 성장 인자 VEGF와 같은 유전자를 상향 조절하는 전사 인자인 저산소증 유도 인자 1a (HIF- 1a)이다.

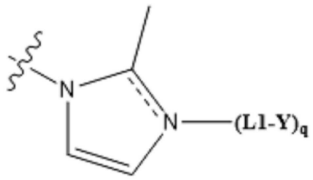
[0414] 일 양태에서, 본원의 요지는 하기의 화학 구조를 갖는 CIDE의 E3LB 부분에 관한 것으로서:



[0415] E3LB

[0416] 여기서 R_{1A}, R_{1B} 및 R_{1C}는 각각 독립적으로 수소 또는 C_{1-5}알킬이거나; 또는 R_{1A}, R_{1B} 및 R_{1C} 중 2개는 각각이 그에 부착된 탄소와 함께 C_{1-5}시클로알킬을 형성하고;R_2는 C_{1-5}알킬이고;



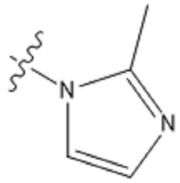


[0417] R_3은 시아노, , 및 으로 이루어진 군으로부터 선택되고, 여기서 ----은 단일 또는 이중 결합이며; q는 1 또는 0이고;

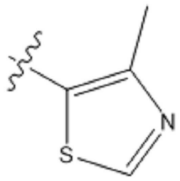
[0418] Y_1 및 Y_2 중 하나는 -CH이고, Y_1 및 Y_2 중 다른 하나는 -CH 또는 N이고;

[0419] 여기서, L1-T, L1-U, L1-V 및 L1-Y는 각각 독립적으로 본원의 다른 곳에서 기재된 바와 같고; L2는 본원의 다른 곳에서 기재된 바와 같다.

[0420] 특정 구현예들에서, E3LB는 R_3이 시아노인 구조를 가진다.



[0421] 특정 구현예들에서, E3LB는 R_3이 인 구조를 가진다.

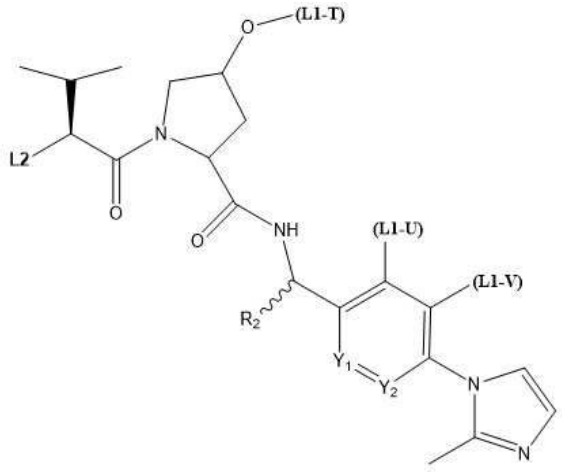


[0422] 특정 구현예들에서, E3LB는 R_3이 인 구조를 가진다.

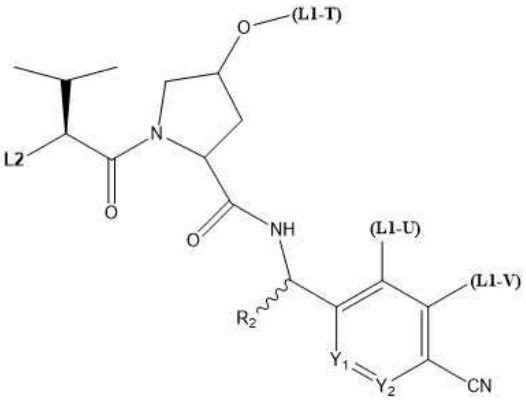
[0423] 특정 구현예들에서, E3LB는 R_{1A}, R_{1B} 및 R_{1C}가 각각 독립적으로 수소 또는 메틸인 구조를 가진다.

[0424] 특정 구현예들에서, E3LB는 R_{1A} 및 R_{1B}가 각각 메틸인 구조를 가진다.

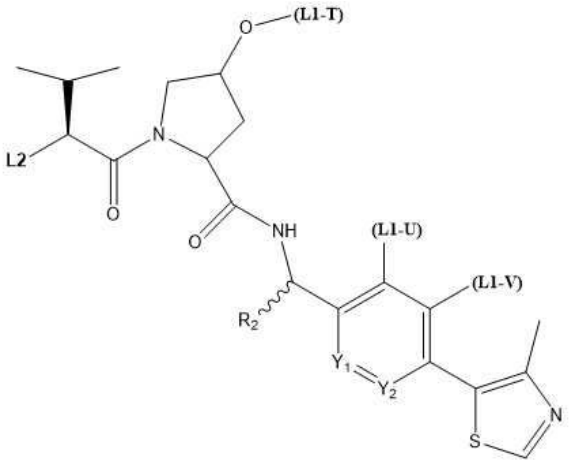
[0425] 특정 구현예들에서, E3LB는 하기의 화학식들 중 하나를 가진다:



[0426] E3LBa,



[0427] E3LBb, 또는



[0428] E3LBc,

[0429] 특정 구현예들에서, E3LB는 R_2가 수소, 메틸, 에틸 또는 프로필인 구조를 가진다.

[0430] 특정 구현예들에서, E3LB는 R_2이 메틸인 구조를 가진다.

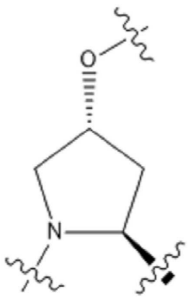


[0431] 특정 구현예들에서, E3LB는 R_2이 인 구조를 가진다.

[0432] 특정 구현예들에서, E3LB는 Y_1 및 Y_2가 각각 -CH인 구조를 가진다.

[0433] 특정 구현예들에서, E3LB는 Y_1이 N이고 Y_2가 -CH인 구조를 가진다.

[0434] 특정 구현예들에서, E3LB는 Y_1이 -CH이고 Y_2가 N인 구조를 가진다.



[0435] 특정 구현예들에서, E3LB의 프롤린 부분은 하기의 구조를 가진다: .

[0436] E3LB 부분은 L2 부분이거나 이에 공유 연결될 수 있는 모이어티를 갖는 적어도 하나의 말단, 및 L1 부분에 공유 연결되거나 연결될 수 있는 모이어티를 갖는 적어도 하나의 말단을 가진다. 예를 들어, E3LB 부분은 아미드 결합을 통해 L2 부분에 공유 연결될 수 있는 -NHCOOH 모이어티에서 종결된다.

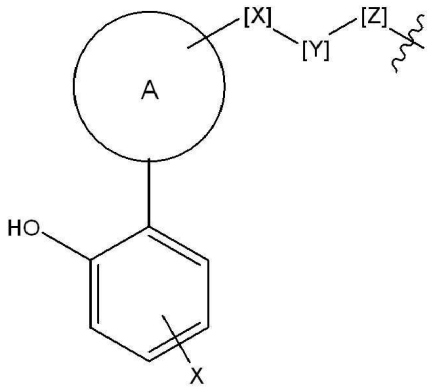
[0437] 본원에 기재된 양태들 또는 구현예들 중 임의의 것에서, 본원에 기재된 E3LB는 이의 약학적으로 허용 가능한 염, 거울상이성질체, 부분입체이성질체, 용매화물 또는 다형체일 수 있다. 또한, 본원에 기재된 양태들 또는 구현예들 중 임의의 것에서, 본 명세서에 기재된 바와 같은 E3LB는 결합을 통해 직접 또는 화학적 링커에 의해 PB에 결합될 수 있다.

[0438] b. BRM 단백질 결합기(PB)

[0439] CIDE의 PB 부분은 BRM의 모든 변형체, 돌연변이, 스플라이스 변형체, 삽입-결실 및 융합을 포함하여 BRM에 결합하는 소분자 모이어티이다. BRM은 아과 A, 구성요소 2, SMARCA2 및 BRAHMA로도 공지되어 있다. 이러한 소분자 표적 단백질 결합 모이어티는 또한 이들 조성물의 약학적으로 허용 가능한 염, 거울상이성질체, 용매화물 및 다형체뿐만 아니라 관심이 되는 단백질을 표적화할 수 있는 다른 소분자를 포함한다.

[0440] 본원에 기재된 CIDE 또는 DAC는 공지된 BRM-결합 화합물, WO2019/195201에 개시된 것을 포함하는 결합 화합물의 임의의 잔기를 포함할 수 있으며, 이는 그 전체가 본원에 원용된다.

[0441] 특정 구현예들에서, BRM-결합 화합물은 하기의 화학식 I의 화합물:



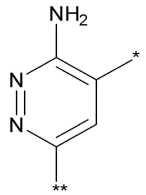
[0442] (I),

[0443] 또는 이의 입체이성질체 또는 호변이성질체, 또는 전술한 임의의 것의 약학적으로 허용 가능한 염이고, 여기서:

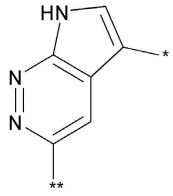
[0444] X는 수소 또는 할로겐이고;

[0445] 

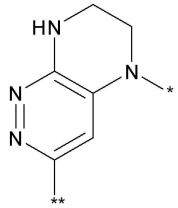
는 하기로 이루어진 군으로부터 선택되고:

[0446] (a) 

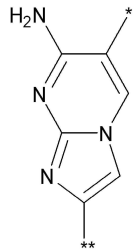
;

[0447] (b) 

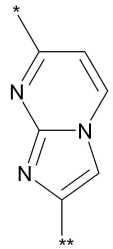
;

[0448] (c) 

;

[0449] (d) 

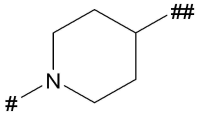
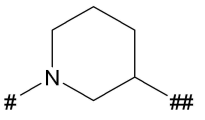
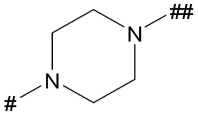
; 및



[0450] (e) ,

[0451] 여기서, (a)-(e)의 경우, *는 [X]에 대한 부착점을 나타내거나, 또는 [X]가 부재한 경우, *는 [Y]에 대한 부착점을 나타내며, **는 [X]에 페닐 고리에 대한 부착점을 나타내며; 그리고 여기서:

[0452] (i) [X]는 3-15원 헤테로시클릴 또는 5-20원 헤테로아릴이고,

[0453] 단,  이 (a)인 경우, [X]는  ,  , 또는  이 아니고, 여기서 #는  에 대한 부착점을 나타내고 ## L2에 대한 부착점을 나타내고,

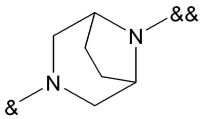
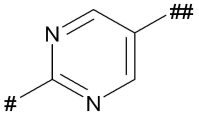
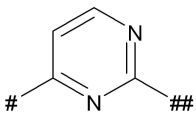
[0454] [Y]는 부재하며, 그리고

[0455] [Z]는 부재하거나, 또는

[0456] (ii) [X]는 3-15원 헤테로시클릴 또는 5-20원 헤테로아릴이고, 여기서 [X]의 3-15원 헤테로시클릴은 하나 이상의 -OH 또는 C_{1-6}알킬로 임의적으로 치환되고,

[0457] [Y]는 부재하며, 그리고

[0458] [Z]는 3-15원 헤테로시클릴 또는 5-20원 헤테로아릴이고,

[0459] 단,  이 (a)이고 [X]가  이며, 여기서 &는  에 대한 부착점을 나타내고 &&는 [Z]에 대한 부착점을 나타내는 경우, [Z]는  또는  이 아니고, 여기서 #는 [X]에 대한 부착점을 나타내고 ##는 L2에 대한 부착점을 나타내거나; 또는

[0460] (iii) [X]는 3-15원 헤테로시클릴 또는 5-20원 헤테로아릴이고,

[0461] [Y]는 메틸렌이고, 여기서 [Y]의 메틸렌은 하나 이상의 메틸기로 임의적으로 치환되며, 그리고

[0462] [Z]는 3-15원 헤테로시클릴이거나; 또는

[0463] (iv) [X]는 부재하고,

[0464] [Y]는 에테닐렌이고, 여기서 [Y]의 에테닐렌은 하나 이상의 할로로 임의적으로 치환되며, 그리고

[0465] [Z]는 5-20원 헤테로아릴이고,

[0466] 단,  는 (a), (b), (d), 또는 (e)이거나; 또는

[0467] (v) [X]는 부재하고,

[0468] [Y]는 에티닐렌이며, 그리고

[0469] [Z]는 5-20원 헤테로아릴이고,

[0470] 단, 

는 (a), (b), (d), 또는 (e)이거나; 또는

[0471] (vi) [X]는 부재하고,

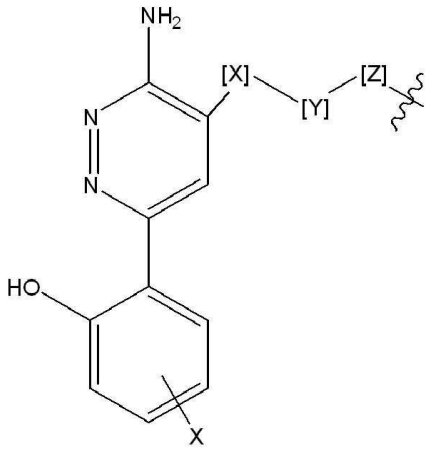
[0472] [Y]는 시클로프로필 또는 시클로부틸이며, 그리고

[0473] [Z]는 5-20원 헤테로아릴이고,

[0474] 단, 

는 (a), (b), (d), 또는 (e)인, 접합체.

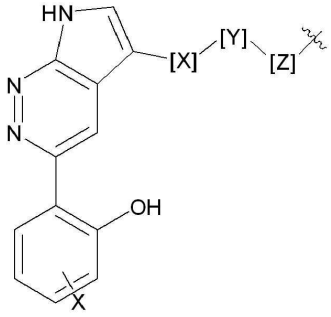
[0475] 특정 구현예들에서, BRM-결합 화합물은 하기의 화학식(I-A)의 화합물:

[0476] 

(I-A),

[0477] 또는 이의 입체이성질체 또는 호변이성질체, 또는 전술한 임의의 것의 약학적으로 허용 가능한 염이고, 여기서 X는 수소 또는 할로겐이고, [X], [Y] 및 [Z]는 화학식(I)의 화합물에 대해 상기 정의된 바와 같다.

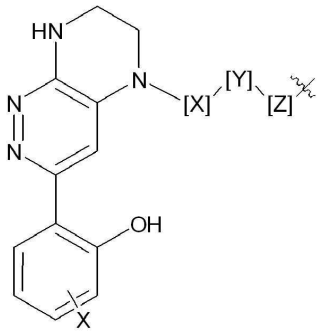
[0478] 특정 구현예들에서, BRM-결합 화합물은 하기의 화학식(I-B)의 화합물:

[0479] 

(I-B),

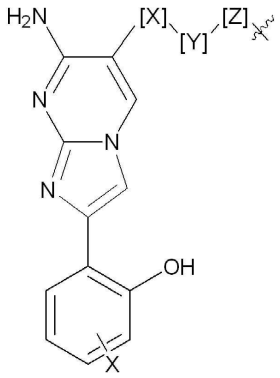
[0480] 또는 이의 입체이성질체 또는 호변이성질체, 또는 전술한 임의의 것의 약학적으로 허용 가능한 염이고, 여기서 X는 수소 또는 할로겐이고, [X], [Y] 및 [Z]는 화학식(I)의 화합물에 대해 상기 정의된 바와 같다.

[0481] 특정 구현예들에서, BRM-결합 화합물은 하기의 화학식(I-C)의 화합물:

[0482]  (I-C),

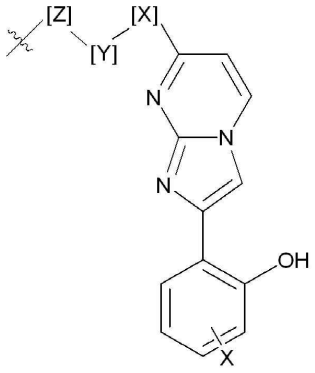
[0483] 또는 이의 입체이성질체 또는 호변이성질체, 또는 전술한 임의의 것의 약학적으로 허용 가능한 염이고, 여기서 X는 수소 또는 할로겐이고, [X], [Y] 및 [Z]는 화학식(I)의 화합물에 대해 상기 정의된 바와 같다.

[0484] 특정 구현예들에서, BRM-결합 화합물은 하기의 화학식(I-D)의 화합물:

[0485]  (I-D),

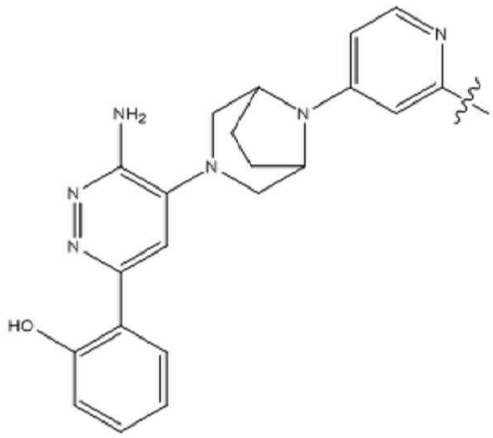
[0486] 또는 이의 입체이성질체 또는 호변이성질체, 또는 전술한 임의의 것의 약학적으로 허용 가능한 염이고, 여기서 X는 수소 또는 할로겐이고, [X], [Y] 및 [Z]는 화학식(I)의 화합물에 대해 상기 정의된 바와 같다.

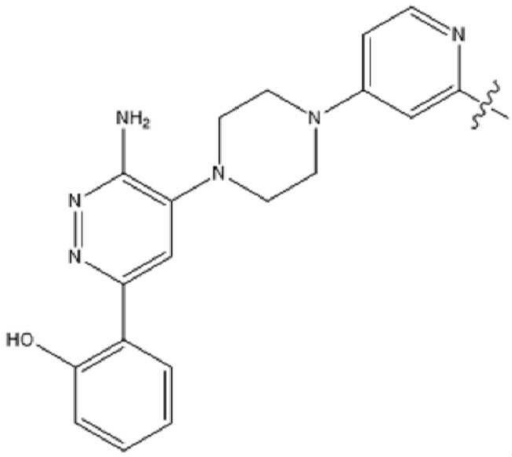
[0487] 특정 구현예들에서, BRM-결합 화합물은 하기의 화학식(I-E)의 화합물:

[0488]  (I-E),

[0489] 또는 이의 입체이성질체 또는 호변이성질체, 또는 전술한 임의의 것의 약학적으로 허용 가능한 염이고, 여기서 X는 수소 또는 할로겐이고, [X], [Y] 및 [Z]는 화학식(I)의 화합물에 대해 상기 정의된 바와 같다.

[0490] 특정 구현예들에서, CIDE의 PB(BRM) 부분은 하기의 구조를 가지고:

[0491]  , 또는

[0492]  ,

[0493] 여기서,  은 L2에 대한 부착점이다.

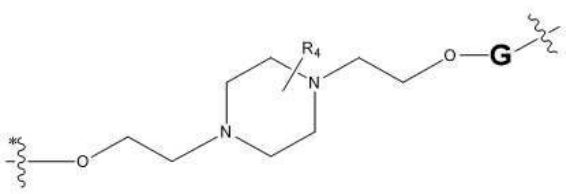
[0494] c. 링커 L2

[0495] 본원에 기재된 바와 같은 CIDE의 E3LB 및 PB 부분은 링커(L2, 링커 L2, 링커-2)와 연결될 수 있다. 특정 구현예들에서, 상기 링커 L2는 상기 E3LB 부분에 공유 결합되고 상기 PB 부분에 공유 결합되어 상기 CIDE를 구성한다.

[0496] 특정 구현예들에서, 상기 L2 부분은 WO2019/195201에 개시된 링커로부터 선택될 수 있으며, 이는 그 전체가 본원에 원용된다.

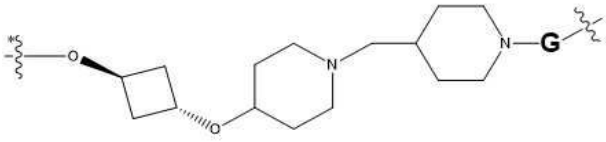
[0497] E3LB 기 및 PB 기는 상기 링커의 화학적 성질에 적절하고 안정적인 임의의 기를 통해 상기 링커 기에 공유 연결될 수 있고, 특정 양태들에서, 상기 L2는 아미드, 에스테르, 티오에스테르, 케토기, 카바메이트(우레탄) 또는 에테르를 통해 E3LB 기 및 PB 기에 독립적으로 공유 결합되고, 이들 기의 각각은 E3LB 기 및 PB 기의 어느 위치에나 삽입되어 E3LB 기가 유비퀴틴 리가아제에 결합하고 PB 기가 분해될 BRM 표적 단백질에 결합될 수 있다. 즉, 본원에 나타낸 바와 같이, 상기 링커는 E3LB 및 PB가 각각의 결합 짝에 결합하는 것을 조절하도록 설계되고 E3LB 및 PB에 연결될 수 있다.

[0498] 특정 구현예들에서, L2는 E3LB 및 PB에 공유 결합된 링커이고, 상기 L2는 하기의 화학식을 가지고:

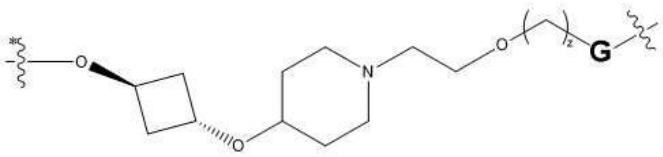


[0499] L2a,

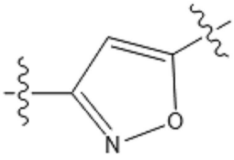
[0500] 여기서, R_4는 수소 또는 메틸,

[0501]  L2b,

[0502] 또는

[0503]  L2c

[0504] 이고, 여기서, z는 1 또는 0이고,

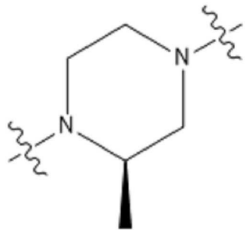
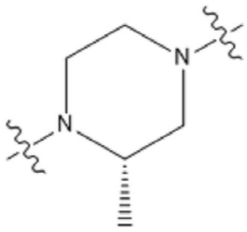
[0505] G는  또는 -C(O)NH-이며; 그리고,

[0506]  는 PB에 대한 부착점이다.

[0507] L2a의 특정 구현예들에서, R_4는 수소이다.

[0508] L2a의 특정 구현예들에서, R_4는 메틸이다.

[0509] L2a의 특정 구현예들에서, R_4는 메틸이고, 상기 메틸은 이것이 부착된 피페라진에 대해 하기와 같이 배향된다:

[0510]  또는 .

[0511] L2c의 특정 구현예들에서, z는 0이다.

[0512] L2c의 특정 구현예들에서, z는 1이다.

[0513] 이제 Ab-CIDE를 참조하면, Ab-CIDE는 단일 항체가 하나 초과의 CIDE를 가질 수 있는 단일 항체를 포함할 수 있으며, 각각의 CIDE는 링커 L1을 통해 상기 항체에 공유 연결된다. "CIDE 로딩"은 항체당 CIDE 모이어티의 평균 수이다. CIDE 로딩은 항체(Ab) 당 1 내지 20개 CIDE(D)의 범위일 수 있다. 즉, Ab-CIDE 화학식 $Ab-(L1-D)_p$에서, p는 약 1 내지 약 20, 약 1 내지 약 8, 약 1 내지 약 5, 약 1 내지 약 4, 또는 약 1 내지 약 3의 값을 가진다. 링커 L1을 통해 항체에 공유결합으로 연결된 각각의 CIDE는 동일하거나 상이한 CIDE일 수 있고 상기 항체에 공유결합으로 연결된 임의의 다른 L1과 동일한 유형 또는 상이한 유형의 링커를 가질 수 있다. 특정 구현예들에서, Ab는 시스테인 조작된 항체이고 p는 약 2이다.

[0514] 접합 반응으로부터 Ab-CIDE의 제조에서 항체 당 CIDE의 평균 수는 질량 분석, ELISA 검정, 전기 영동 및 HPLC와 같은 통상적인 수단을 특징으로 할 수 있다. p의 관점에서 Ab-CIDE의 정량적 분포가 또는 결정될 수 있다.

ELISA에 의해, Ab-CIDE의 특정 제제에서 p의 평균값을 결정할 수 있다(Hamblett et al (2004) Clin. Cancer Res. 10:7063-7070; Sanderson et al (2005) Clin. Cancer Res. 11:843-852). 하지만, p 값의 분포는 ELISA의 항체-항원 결합 및 검출 한계에 의해 식별할 수 없다. 또한, Ab-CIDE의 검출을 위한 ELISA 분석은 중쇄 또는 경쇄 단편 또는 특정 아미노산 잔기와 같이 항체에 CIDE 모이어티가 부착된 위치를 결정하지 않는다. 일부 경우들에, 다른 CIDE 로딩과 함께 p가 Ab-CIDE로부터의 특정 값인 균일한 Ab-CIDE의 분리, 정제, 및 특성화는 역상 HPLC 또는 전기영동과 같은 수단에 의해 달성될 수 있다.

[0515] 일부 Ab-CIDE의 경우에, p는 항체 상에서 부착 부위의 수에 의해 제한될 수 있다. 예를 들어, 항체는 단지 1개 또는 수 개의 시스테인 티올기를 가질 수 있거나 단지 1개 또는 수개의 충분한 반응성 티올기를 가질 수 있고 이를 통해 링커가 부착될 수 있다. L1-D를 연결하는 Ab의 다른 반응 부위는 리신 잔기의 아민 작용기이다. p의 값은 약 1 내지 약 20, 약 1 내지 약 8, 약 1 내지 약 5, 약 1 내지 약 4, 약 1 내지 약 3의 값을 포함하고, 여기서 p는 2이다. 일부 구현예들에서, 본원에 기재된 요지는 p가 약 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 또는 8인 임의의 Ab-CIDE에 관한 것이다.

[0516] 일반적으로, 이론적 최대치보다 적은 CIDE 모이어티가 접합 반응 동안 항체에 접합된다. 항체는, 예를 들어, 링커 L1-CIDE 기(L1-D) 또는 링커 시약과 반응하지 않는 많은 리신 잔기를 포함할 수 있다. 가장 반응성이 높은 리신기만이 아민 반응성 링커 시약과 반응할 수 있다. 또한, 가장 반응성이 높은 시스테인 티올기만이 티올 반응성 링커 시약 또는 링커 L1-CIDE 기와 반응할 수 있다. 일반적으로, 항체는 CIDE 모이어티에 연결될 수 있는 유리 및 반응성 시스테인 티올기를 많이 함유하지 않는다. 화합물의 항체에서 대부분의 시스테인 티올 잔기는 이황화 가교로서 존재하며 부분 또는 전체 환원 조건하에서 디티오트레이톨(DTT) 또는 TCEP와 같은 환원제로 환원되어야 한다. 하지만, CAR의 CIDE 로딩(CIDE/항체 비율, "CAR")은 하기를 포함하는 여러 상이한 방식으로 제어할 수 있다: (i) 항체에 비해 몰 과량의 링커 L1-CIDE 기 또는 링커 시약을 제한함에 의해, (ii) 접합 반응 시간 또는 온도를 제한함에 의해, 및 (iii) 시스테인 티올 변형을 위한 환원적 조건 부분적으로 제한함에 의해.

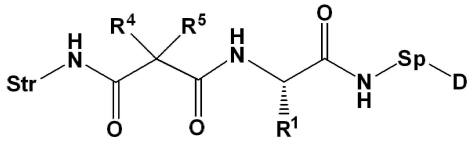
[0517] **III. L1-CIDE 화합물**

[0518] 본원에 기재된 CIDE는 링커 L1에 공유결합으로 연결되어 L1-CIDE 기를 제조할 수 있다. 이들 화합물은 하기의 일반식을 가지고:

[0519] (L1-D),

[0520] 여기서, D는 구조 E3LB-L2-PB를 갖는 CIDE이고; 여기서 E3LB는 L2에 공유 결합된 E3 리가아제 결합기이고; L2는 E3LB 및 PB에 공유 결합된 링커이고; PB는 L2에 공유 결합된 BRM 단백질 결합기이며; L1은 D에 공유 결합된 링커이다. 이들 구성요소들 각각에 대해 유용한 기는 상기 기재된 바와 같다.

[0521] 특정 구현예들에서, L1은 펩티드 모방체 링커를 포함하여 본원의 다른 곳에 기재된 바와 같다. 특정 구현예들에서, L1-CIDE는 하기의 화학식을 가지고:

[0522] 

[0523] 여기서

[0524] Str은 스트레처 단위이고;

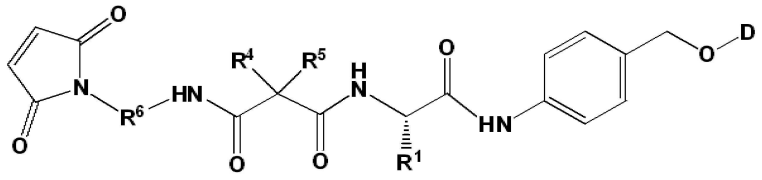
[0525] Sp는 D, 즉, CIDE 모이어티에 공유결합으로 부착된 결합 또는 스페이서 단위이고;

[0526] R^1은 C_1-C_{10}알킬, (C_1-C_{10}알킬)NHC(NH)NH_2 또는 (C_1-C_{10}알킬)NHC(O)NH_2이고;

[0527] R^4 및 R^5는 각각 독립적으로 C_1-C_{10}알킬, 아릴알킬, 헤테로아릴알킬, (C_1-C_{10}알킬)OCH_2-이거나, 또는 R^4 및 R^5는 C_3-C_7시클로알킬 고리를 형성할 수 있고;

[0528] D는 CIDE 모이어티이다.

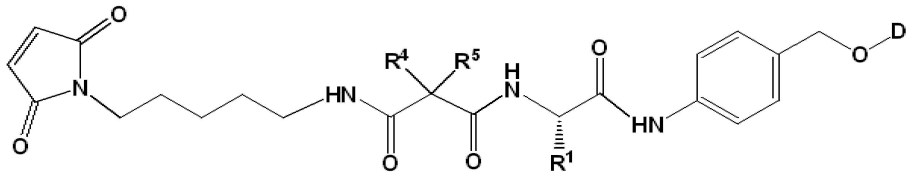
[0529] L1-CIDE 화합물은 하기의 화학식으로 표시할 수 있고;

[0530] 

,

[0531] 여기서 R_6은 C_1-C_{10}알킬렌이고; R^4 및 R^5는 함께 C_3-C_7시클로알킬 고리를 형성하며, D는 CIDE 모이어티이다.

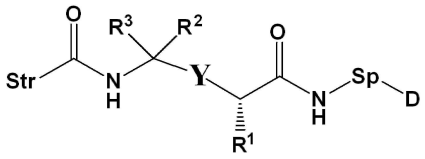
[0532] L1-CIDE 화합물은 하기의 화학식으로 표시할 수 있고;

[0533] 

이고,

[0534] 여기서 R^1, R^4 및 R^5는 본원의 다른 곳에 기재된 바와 같고, D는 CIDE 모이어티이다.

[0535] L1-CIDE 화합물은 하기의 화학식으로 표시할 수 있고;

[0536] 

[0537] 여기서

[0538] Str은 스트레처 단위이고;

[0539] Sp는 D, 즉, CIDE 모이어티에 공유결합으로 부착된 임의의 스페이서 단위이고;

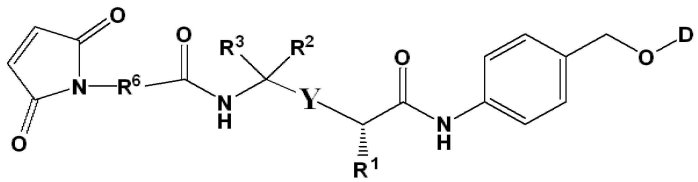
[0540] Y는 헤테로아릴, 아릴, -C(O)C_1-C_6알킬렌, C_1-C_6알킬렌-NH_2, C_1-C_6알킬렌-NH-CH_3, C_1-C_6알킬렌-N-$(CH_3)_2$, C_1-C_6알케닐 또는 C_1-C_6알킬레닐이고;

[0541] R^1은 C_1-C_{10}알킬, (C_1-C_{10}알킬)NHC(NH)NH_2 또는 (C_1-C_{10}알킬)NHC(O)NH_2이고;

[0542] R^3 및 R^2는 각각 독립적으로 H, C_1-C_{10}알킬, 아릴알킬 또는 헤테로아릴알킬이거나, 또는 R^3 및 R^2는 함께 C_3-C_7시클로알킬을 형성할 수 있으며; 그리고

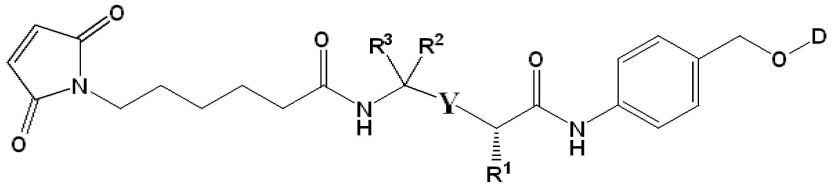
[0543] D는 CIDE 모이어티이다.

[0544] L1-CIDE 화합물은 하기의 화학식으로 표시할 수 있고;

[0545] 

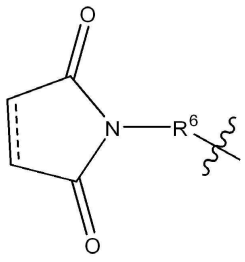
[0546] 여기서, R^6은 C_1-C_{10}알킬렌이고, R^1, R^2 및 R^3은 본원의 다른 곳에 기재된 바와 같고, D는 CIDE 모이어티이다.

[0547] L1-CIDE 화합물은 하기의 화학식으로 표시할 수 있고;

[0548] 

[0549] 여기서 R^1, R^2 및 R^3는 본원의 다른 곳에 기재된 바와 같고, D는 CIDE 모이어티이다.

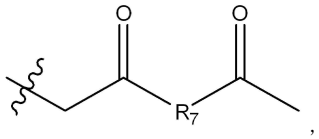
[0550] 상기 L1-CIDE 화합물들 중 임의의 것에서, Str은 하기의 화학식을 가지고:

[0551] ,

[0552] 여기서 R^6은 C_1-C_{10}알킬렌, C_3-C_8시클로알킬, O-(C_1-C_8알킬렌), 및 C_1-C_{10}알킬렌-C(O)N(R^a)-C_2-C_6알킬렌으로 이루어진 군으로부터 선택되고, 여기서 각각의 알킬렌은 할로, 트리플루오로메틸, 디플루오로메틸, 아미노, 알킬아미노, 시아노, 술포닐, 술폰아미드, 술폭시드, 히드록시, 알콕시, 에스테르, 카르복실산, 알킬티오, C_3-C_8시클로알킬, C_4-C_7헤테로시클로알킬, 아릴, 아릴알킬, 헤테로아릴알킬 및 헤테로아릴로 이루어진 군으로부터 선택된 1개 내지 5개의 치환기로 치환될 수 있고; 각각의 R^a는 독립적으로 H 또는 C_1-C_6알킬이고; Sp는 -Ar-R^b-이며, 여기서 Ar는 아릴 또는 헤테로아릴이고, R^b는 (C_1-C_{10}알킬렌)O-이다.

[0553] 특정 L1-CIDE 화합물에서, R^6은 C_1-C_{10}알킬렌이고, Sp는 -Ar-R^b-이고, 여기서 Ar은 아릴이고 R^b는 (C_1-C_6알킬렌)O-이거나; 또는 R_6은 -$(CH_2)_q$-는 1-10이다.

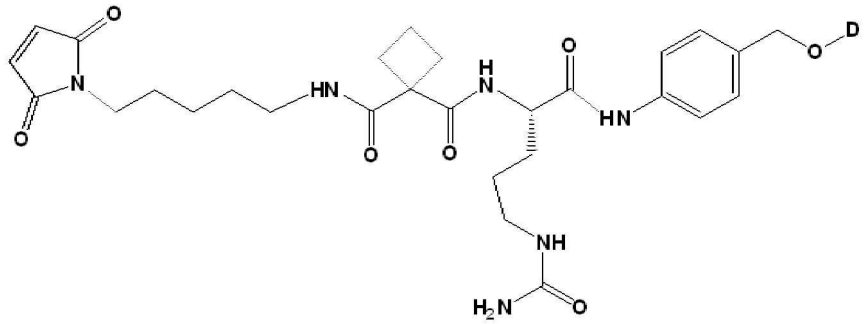
[0554] 상기 L1-CIDE 화합물들 중 임의의 것에서, Str은 하기의 화학식을 가지고:

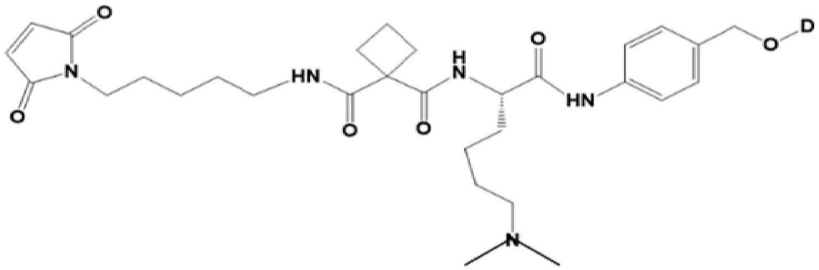
[0555] ,

[0556] 여기서, 은 항체에 접합할 수 있는 모이어티를 나타내고, R^7은 C_1-C_{10}알킬렌, C_1-C_{10}알킬렌-O, N(R^c)-(C_2-C_6알킬렌)-N(R^c) 및 N(R^c)-(C_2-C_6알킬렌)으로부터 선택되고; 여기서 각각의 R^c는 독립적으로 H 또는 C_1-C_6알킬이고;

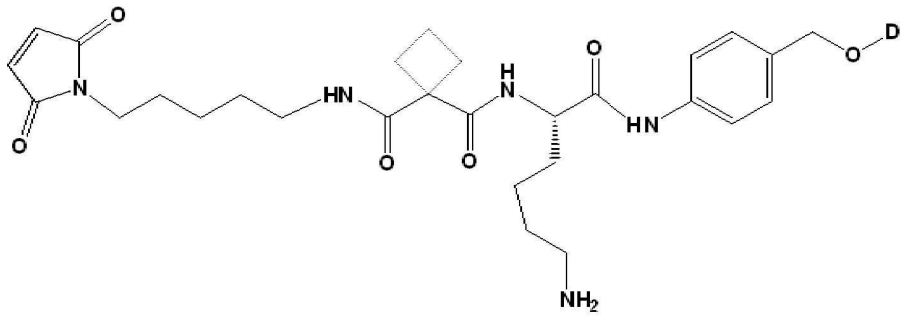
[0557] Sp는 -Ar-R^b-이고, 여기서 Ar은 아릴 또는 헤테로아릴이고, R^b는 (C_1-C_{10}알킬렌)O-이거나; 또는 R^6은 C_1-C_{10}알킬렌이고, Sp는 -Ar-R^b-이고, 여기서 Ar은 아릴이고 R^b는 (C_1-C_6알킬렌)O-이다.

[0558] L1-CIDE는 하기의 화학식을 가질 수 있고, 여기서 각각의 경우에 D는 CIDE 모이어티이다:

[0559]  ;

[0560] 

[0561] 및

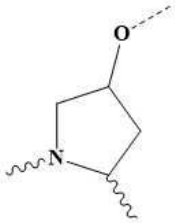
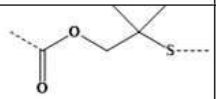
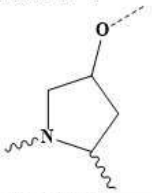
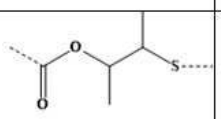
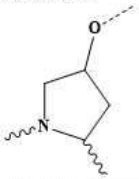
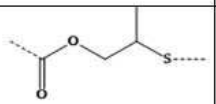
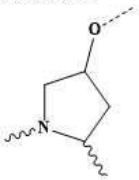
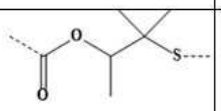


[0562]

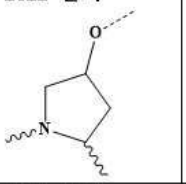
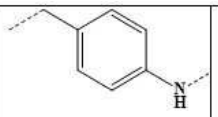
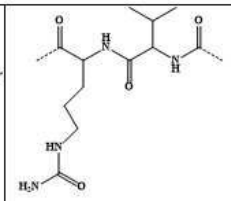
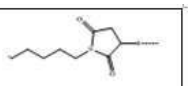
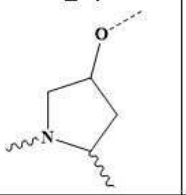
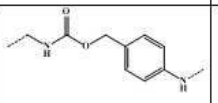
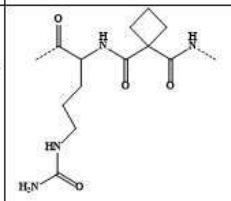
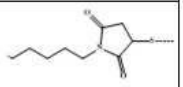
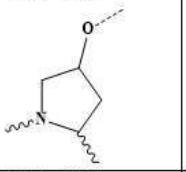
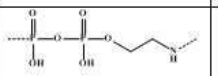
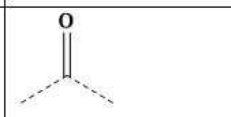
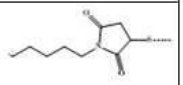
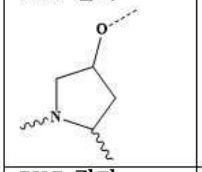
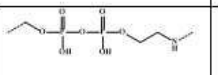
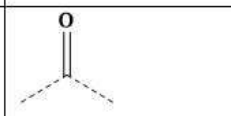
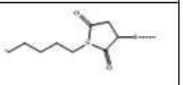
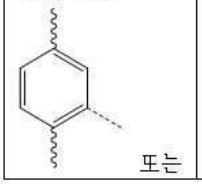
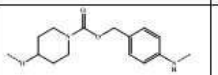
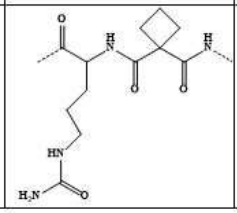
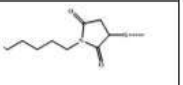
[0563] 이제 CIDE의 PB 기를 참조하면, 특정 구현예들에서, PB는 본원의 다른 곳에서 기재된 바와 같다. 이제 CIDE의 E3LB 기를 참조하면, E3LB는 본원의 다른 곳에서 기재된 바와 같다. Ab-CIDE는 PB, E3LB, Ab, L1 및 L2의 임의의 조합을 포함할 수 있다.

[0564] 본원에 개시된 요지를 고려하여, 당업자는 L1 및 L2 부착점이 가변될 수 있음을 이해할 것이다. 추가로, -Str-(PM)-Sp-와 같은 링커의 부분은 상호 교환될 수 있다. 추가적으로, 링커 L1의 부분은 상호 교환될 수 있다. CIDE, 항체 및 상호교환될 수 있는 다른 링커에 대한 L1 링커 부착의 비제한적 예는 표 1-L1에 도시된 것을 포함하지만, 이에 제한되지는 않는다.

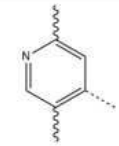
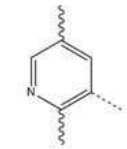
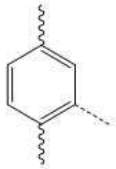
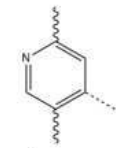
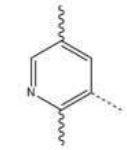
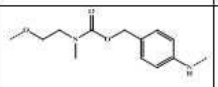
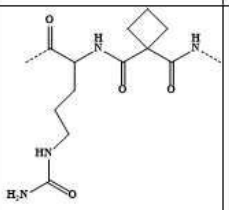
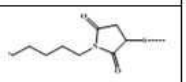
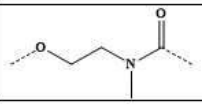
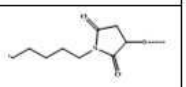
[0565]

L1이 부착된 CIDE 부분	L1의 CIDE 부착 부분	L1의 링커 부분	L1의 항체 부착 부분
E3LB 잔기 	해당 없음		해당 없음
E3LB 잔기 	해당 없음		해당 없음
E3LB 잔기 	해당 없음		해당 없음
E3LB 잔기 	해당 없음		해당 없음

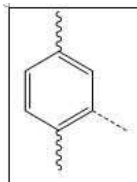
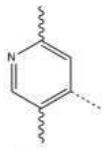
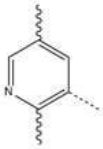
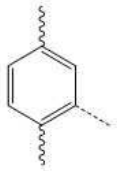
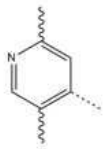
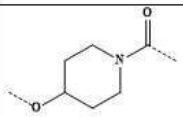
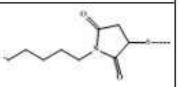
[0566]

E3LB 잔기 			
E3LB 잔기 			
E3LB 잔기 			
E3LB 잔기 			
E3LB 잔기  또는			

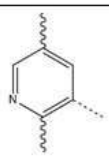
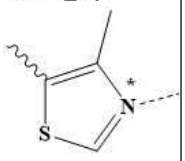
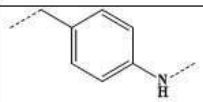
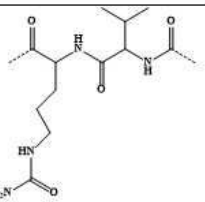
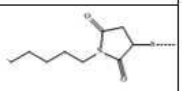
[0567]

 또는 			
E3LB 잔기  또는  또는 			
E3LB 잔기		해당 없음	

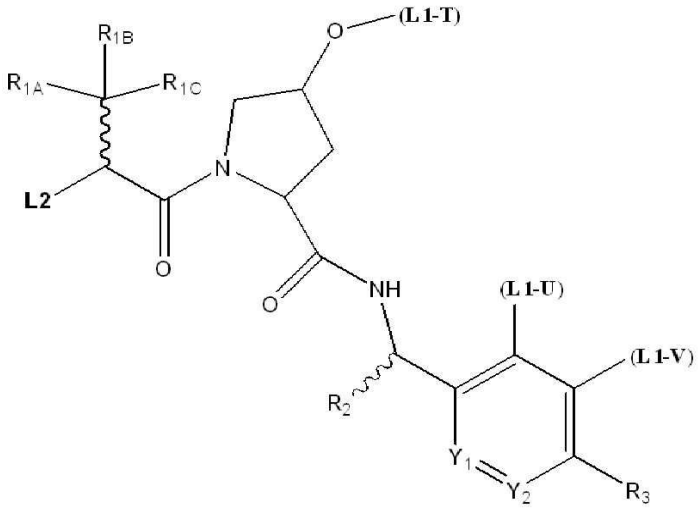
[0568]

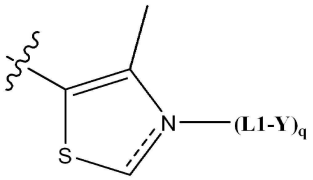
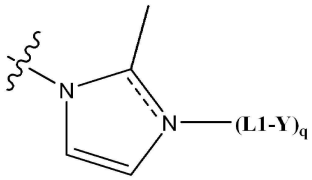
 또는  또는 			
E3LB 잔기  또는  또는		해당 없음	

[0569]

			
E3LB 잔기 			
L2-단백질 결합기 - 임의의 사용가능한 위치			

[0570] 특정 구현예들에서, 링커 L1은 상이한 위치인 L1-T, L1-U, L1-V 및 L1-Y(R_3 기로부터)에서 E3LB 잔기에 공유결합으로 연결될 수 있고:

[0571] 

[0572] R_3은 시아노,  , 및  으로 이루어진 군으로부터 선택되고, 여기서 ____은 단일 또는 이중 결합이고;

[0573] Ab는 링커인 적어도 하나의 L1에 공유 결합된 항체이고;

[0574] L1-T, L1-U 및 L1-V는 각각 독립적으로 수소, 또는 Ab 및 D에 공유 결합된 L1 링커이고;

[0575] L1-Y는 수소, 또는 Ab 및 D에 공유 결합된 L1 링커이며; 그리고

[0576] q는 1 또는 0이다.

[0577] 링커-L1은, 링커 L1과 항체 사이의 공유 결합이 이황화 결합인 한, 항체의 임의의 위치에 부착될 수 있다.

[0578] 구현예들에서, 항체 Ab는 각각 링커 L1을 통해 1 내지 8개의 화학적 분해 유도제(CIDE) D에 접합된다.

[0579] $Ab-(L1-D)_p$, 여기서 p는 1 내지 8임

[0580] D는 하기와 같이 링커 L2를 통해 표적 단백질 결합(PB) 리간드에 연결된 E3 리가아제 결합(E3LB) 리간드를 포함한다:

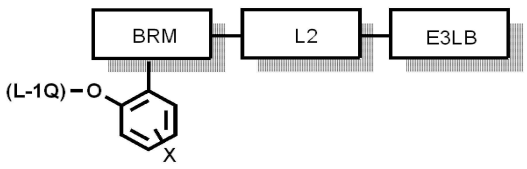
[0581] E3LB－L2－PB

[0582] 구현예들에서, L1은 CIDE를 Ab에 연결하기 위해 항체의 조작된 Cys 잔기의 황과 이황화 결합을 형성한다.

[0583] 구현예들에서, 상기 항체는 L1을 통해 CIDE의 E3LB 리간드에 연결된다.

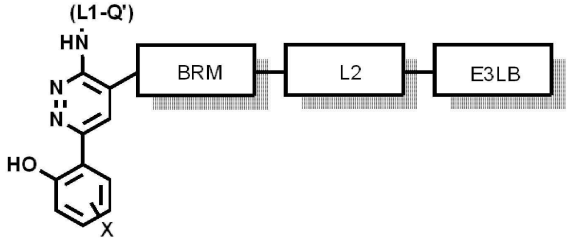
[0584] 구현예들에서, L1은 CIDE의 E3LB 리간드의 E3LB 리간드 잔기에 연결된다.

[0585] 예를 들어, 구현예들에서, L1은 하기에 예시된 바와 같이 부착점(L1-Q)에서 BRM의 일부에 공유 결합되고:

[0586] 

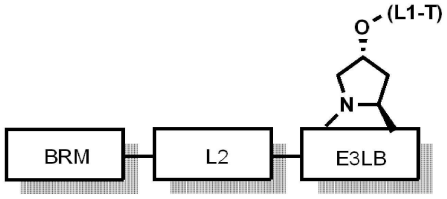
, 여기서 X는 수소 또는 할로겐이며, L1은 L1b 및 L1c로부터 선택된다.

[0587] 구현예들에서, L1은 하기에 예시된 바와 같이 부착점(L1-Q')에서 BRM의 일부에 공유 결합되고:

[0588] 

, 여기서 X는 수소 또는 할로겐이며, L1은 L1b 및 L1c로부터 선택된다.

[0589] 구현예들에서, L1은 하기에 예시된 바와 같이 부착점(L1-Q')에서 E3LB의 일부에 공유 결합되고:

[0590] 

, 여기서 L1은 L1a, L1b 및 L1c로부터 선택된다.

[0591] 이제 Ab-CIDE 및 L1-CIDE 화합물을 참조하면, 본원에 기재된 바와 같이 이들은 고체 또는 액체 형태로 존재할 수 있다. 고체 상태에서는, 결정형 또는 비결정형 또는 이들의 혼합물로서 존재할 수 있다. 숙련된 기술자는 약학적으로 허용 가능한 용매화물이 결정성 또는 비결정성 화합물에 대해 형성될 수 있음을 인식할 것이다. 결정질 용매화물에서, 용매 분자는 결정화 중에 결정 격자에 통합된다. 용매화물은 에탄올, 이소프로판올, DMSO, 아세트산, 에탄올아민 또는 에틸 아세테이트와 같은 비수성 용매를 수반할 수 있지만, 이에 제한되지 않거나, 또는 결정성 격자에 혼입되는 용매로서 물을 수반할 수 있다. 물이 결정성 격자 내에 혼입된 용매인 용매화물은 일반적으로 "수화물"이라고 한다. 수화물은 화학양론적 수화물뿐만 아니라 다양한 양의 물을 함유하는 조성물을 포함한다. 본원에 기재된 요지는 이러한 모든 용매화물을 포함한다.

[0592] 당업자는 이의 다양한 용매화물을 포함하여 결정 형태로 존재하는 본원에 기재된 특정 화합물 및 Ab-CIDE가 다형성(즉, 상이한 결정 구조에서 발생할 수 있는 능력)을 나타낼 수 있음을 추가로 인식할 것이다. 이러한 상이한 결정 형태는 일반적으로 "다형체"로 공지되어 있다. 본원에 개시된 요지는 이러한 모든 다형체를 포함한다. 다형체는 화학 조성은 같지만 패킹, 기하학적 배열, 및 결정질 고체 상태의 기타 기술적 특성이 상이하다. 따라서, 다형체는 모양, 밀도, 경도, 변형성, 안정성 및 용해 특성과 같은 물리적 특성이 상이할 수 있다. 다형체는 일반적으로 식별에 사용할 수 있는 상이한 녹는점, IR 스펙트럼 및 X선 분말 회절 패턴을 나타낸다. 당업자는, 예를 들어, 화합물 제조에 사용되는 반응 조건 또는 시약을 변경하거나 조정함으로써 상이한 다형체를 생성할 수 있음을 이해할 것이다. 예를 들어, 온도, 압력 또는 용매의 변화는 다형체를 발생시킬 수 있다. 또한, 하나의 다형체는 특정 조건하에서 자발적으로 다른 다형체로 전환될 수 있다.

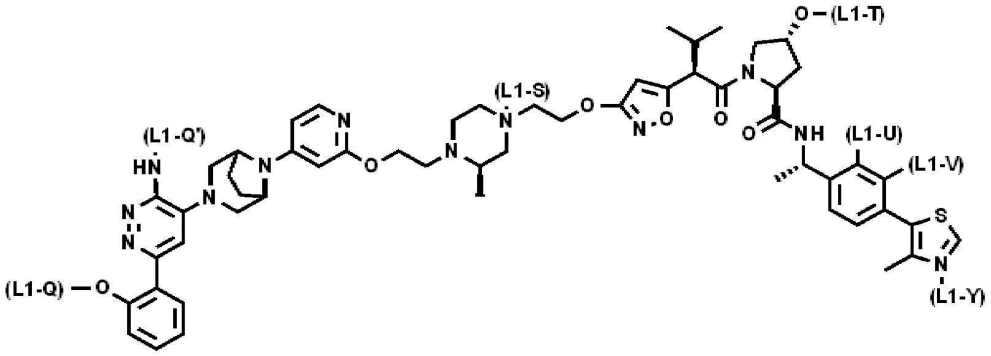
[0593] 본원에 기재된 화합물 및 Ab-CIDE 또는 이의 염은 입체이성질체 형태로 존재할 수 있다(예컨대, 이는 하나 이상의 비대칭 탄소 원자를 함유한다). 개별 입체이성질체(거울상이성질체 및 부분입체이성질체) 및 이들의 혼합물은 본원에 개시된 요지의 범위 내에 포함된다. 마찬가지로, 화합물 또는 화학식(I)의 염은 화학식에 나타낸 것 이외에 다른 호변이성질체 형태로 존재할 수 있으며, 이들은 또한 본원에 개시된 요지의 범위 내에 포함되는 것으로 이해된다. 본원에 개시된 요지는 본원에 기재된 특정 군의 조합 및 하위집합을 포함하는 것으로 이해되어야 한다. 본원에 개시된 요지의 범위는 입체이성질체의 혼합물뿐만 아니라 정제된 거울상이성질체 또는 거울상이성질체적으로/부분입체이성질체적으로 풍부한 혼합물을 포함한다. 본원에 개시된 요지는 상기 본원에 정의된 특정 군의 조합 및 하위집합을 포함하는 것으로 이해되어야 한다.

[0594] 본원에 개시된 요지는 또한 하나 이상의 원자가 자연에서 일반적으로 발견되는 원자 질량 또는 질량 수와 상이한 원자 질량 또는 질량 수를 갖는 원자로 대체된다는 사실을 제외하고는 본원에 기재된 화합물의 동위원소 표지된 형태를 포함한다. 본원에 기재된 화합물 및 이의 약학적으로 허용 가능한 염에 포함될 수 있는 동위원소의 예는 수소, 탄소, 질소, 산소, 인, 황, 불소, 요오드, 염소의 동위원소, 예컨대 ^{2}H, ^{3}H, ^{11}C, ^{13}C, ^{14}C, ^{15}N, ^{17}O, ^{18}O, ^{31}P, ^{32}P, ^{35}S, ^{18}F, ^{36}Cl, ^{123}I 및 ^{125}I를 포함한다.

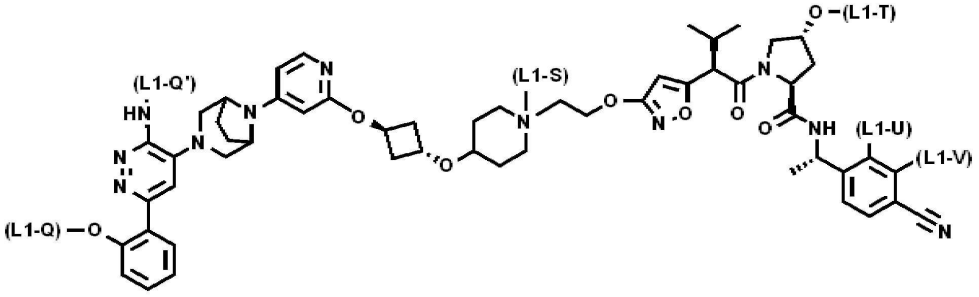
[0595] 전술한 동위원소 및/또는 다른 원자의 다른 동위원소를 함유하는 본원에 개시된 바와 같은 화합물 및 Ab-CIDE 및 이의 약학적으로 허용 가능한 염은 본원에 개시된 요지의 범위 내에 있다. 동위원소 표지된 화합물이 본원에

개시되고, 예를 들어, ^{3}H 및 ^{14}C와 같은 방사성 동위원소가 포함된 화합물이 약물 및/또는 기질 조직 분포 분석에 유용하다. 삼중수소, 즉 ^{3}H 및 탄소-14, 즉 ^{14}C, 동위원소는 제조 및 검출의 용이성으로 인해 일반적으로 사용된다. ^{11}C 및 ^{18}F 동위원소는 PET(양전자 방출 단층 촬영)에 유용하고, ^{125}I 동위원소는 SPECT(단일 광자 방출 전산화 단층 촬영에 유용하며, 이들 모두는 뇌 영상에 유용하다. 추가로, 중수소, 즉 ^{2}H와 같은 더 무거운 동위원소로의 치환은 더 큰 대사 안정성, 예를 들어, 증가된 생체내 반감기 또는 감소된 투여량 요구 사항으로 인한 특정 치료 이점을 제공할 수 있고, 따라서 일부 상황에서 바람직할 수 있다. 동위원소 표지된 화합물은 일반적으로 동위원소 표지되지 않은 시약을 쉽게 입수 가능한 동위원소 표지된 시약으로 대체함으로써 반응식 및/또는 하기의 실시예에 개시된 절차를 실시함으로써 제조할 수 있다.

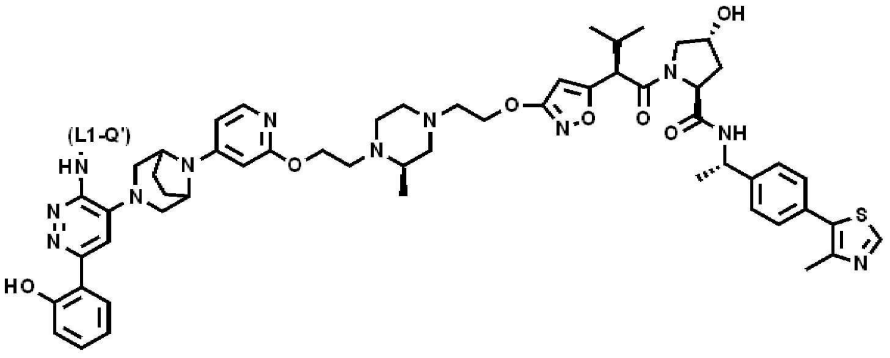
[0596] 구현예들에서, D는,



[0597] 또는

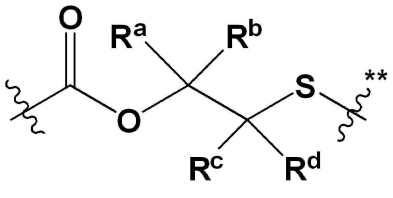


[0598] 이고, 여기서 L1은 L1-Q, L1-Q', L1-S, L1-T, L1-U, L1-V 및 L1-Y로 이루어진 군으로부터 선택된 하나의 부착점에서 D에 공유결합으로 연결되어 있다. L1에 대한 부착점이 아닌 L1-Q, L1-Q', L1-S, L1-T, L1-U, L1-V 및 L1-Y의 각각은 이의 원래 원자가를 유지하는 것으로 이해되어야 한다. 예를 들어, 만약 L1이 L1-Q'에 부착된 경우, L1-Q, L1-S, L1-T, L1-U, L1-V 또는 L1-Y에 부착되지 않고, D는 하기의 구조를 가진다:



[0599] .

[0600] 구현예들에서, L1은 하기의 구조를 갖는 L1a이고:



[0601] , 여기서,

[0602] R^a, R^b, R^c, 및 R^d는 H, 임의적으로 치환된 분지쇄 또는 직쇄 C_1-C_5알킬, 및 임의적으로 치환된 C_3-C_6시클로알킬로 이루어진 군으로부터 각각 독립적으로 선택되거나, 또는 R^a 및 R^b 또는 R^c 및 R^d는 이들이 결합된 탄소 원자와 함께 임의적으로 치환된 C_3-C_6시클로알킬 고리 또는 3원 내지 6원 헤테로시클로알킬 고리를 형성하고, 그리고 여기서  는 Ab에 대한 부착점이다.

[0603] 구현예들에서, L1a는 L1-T에 부착되고, R^a, R^b, R^c, 및 R^d 중 적어도 하나는 메틸이다.

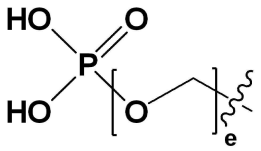
[0604] 구현예들에서, L1a는 L1-T에 부착되고, R^a, R^b, R^c, 및 R^d 중 적어도 2개는 메틸이다.

[0605] 구현예들에서, L1a는 L1-T에 부착되고, R^a 및 R^c는 각각 메틸이고, R^b 및 R^d는 각각 수소이다.

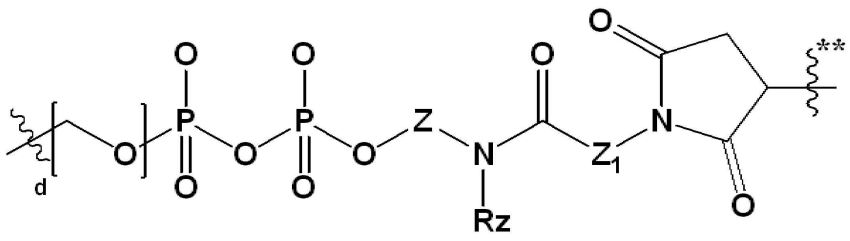
[0606] 구현예들에서, L1a는 L1-T에 부착되고, R^a, R^c 및 R^d는 각각 메틸이고, R^b는 수소이다.

[0607] 구현예들에서, L1a는 L1-T에 부착되고, R^a 및 R^b는 각각 수소이고 R^c 및 R^d는 이들이 결합된 탄소 원자와 함께 결합하여 임의적으로 치환된 3원 내지 6원 헤테로시클로알킬 고리를 형성한다. 구현예들에서, 상기 3원 내지 6원 헤테로시클로알킬 고리는 임의적으로 치환된 피페리딘 고리이다. 구현예들에서, 상기 피페리딘 고리는 메틸로 치환된다.

[0608] 구현예들에서, L1a는 L1-T에 부착되고, 여기서 R^a, R^b, R^c, 및 R^d 중 적어도 2개는 메틸이고; 인산염 모이어티는 L1-Q에 부착되며, 여기서 상기 인산염 모이어티는 하기 구조를 가지고:

[0609]  , 여기서 e는 1이다.

[0610] 구현예들에서, L1은 하기의 구조를 갖는 L1b이고:

[0611]  , 여기서,

[0612] Z 및 Z_1은 각각 독립적으로 C_{1-12}알킬렌 또는 $-[CH_2]_g-[-O-CH_2]_h-$이고, 여기서 g는 0, 1 또는 2이며, h는 1-5이고; R_z는 H 또는 C_{1-3}알킬이고; d는 0, 1 또는 2이며; 그리고 여기서  는 Ab에 대한 부착점이다.

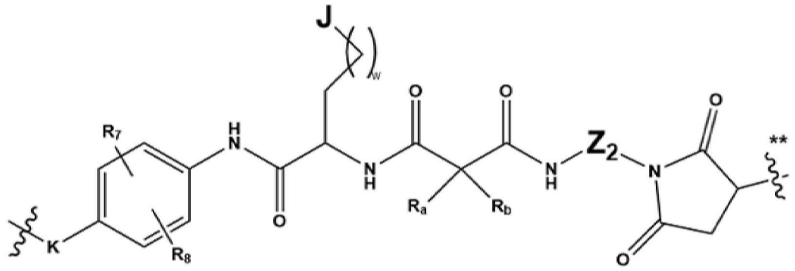
[0613] 구현예들에서, Z 및 Z_1은 각각 독립적으로 C_{1-12}알킬렌이고, R_z는 수소이며, d는 0 또는 1이다.

[0614] 구현예들에서, Z는 C_2알킬렌이고, Z_1은 C_5알킬렌이고, R_z는 수소이며, d는 0 또는 1이다.

[0615] 구현예들에서, L1b는 L1-Q에 부착되고, d는 1이다.

[0616] 구현예들에서, L1b는 L1-T에 부착되고, d는 0이다.

[0617] 구현예들에서, L1은 하기의 구조를 갖는 L1c이고:

[0618]  , 여기서,

[0619] Z_2는 C_{1-12}알킬렌 또는 $-[CH_2]_g-[-O-CH_2]_h-$이고, 여기서 g는 0, 1 또는 2이고, h는 1-5이고;

[0620] w는 0, 1, 2, 3, 4 또는 5이며, 그리고 여기서  는 Ab에 대한 부착점이고;

[0621] J는 수소, $-N(R_x)(R_y)$, $-C(O)NH_2$, $-NH-C(O)-NH_2$, $-NH-C(=NH)-NH_2$이고, 여기서 R_x 및 R_y는 수소 및 C_{1-3}알킬로부터 각각 독립적으로 선택되고, 여기서 R_x 및 R_y는 수소 및 C_{1-3}a알킬로부터 각각 독립적으로 선택되고;

[0622] K는 $-CH_2-$, $-CH(R)-$, $-CH(R)-O-^$, $-C(O)-$, $^-C(O)-O-CH(R)-$, $-CH_2-O-C(O)-^$, $-CH_2-O-C(O)-NH-^$, $^-O-C(L1c)-C(O)-NR_xR_y-$, $^-C(L1c)-C(O)-NR_xR_y-$, $-CH_2-O-C(O)-NH-CH_2-$, $-CH_2-O-C(O)-R-[CH_2]_q-O-^$, $-CH_2-O-C(O)-R-[CH_2]_q-^$로부터 선택되고, 여기서 ^는 CIDE에 대한 부착을 나태내고, 여기서 R은 수소, C_{1-3}알킬, $N(R_x)(R_y)$, $-O-N(R_x)(R_y)$ 또는 $C(O)-N(R_x)(R_y)$이고, 여기서 q는 0, 1, 2, 또는 3이며, R_x 및 R_y는 수소 및 C_{1-3}알킬로부터 각각 독립적으로 선택되거나, 또는 R_x 및 R_y는 각각이 그에 부착된 질소와 함께 임의적으로 치환된 5원 내지 7원 헤테로시클릴을 형성하고;

[0623] Ra 및 Rb는 수소 및 C_{1-3}알킬로부터 각각 독립적으로 선택되거나, 또는 Ra 및 Rb는 각각이 그에 부착된 탄소와 함께 임의적으로 치환된 C_{3-6}시클로알킬을 형성하며; 그리고

[0624] R_7 및 R_8은 각각 독립적으로 수소, 할로, C_{1-5}알킬, C_{1-5}알콕시 또는 히드록실이다.

[0625] 구현예들에서, Z_2는 C_{1-12}알킬렌이고, w는 2이고, J는 $-NH-C(O)-NH_2$이고, Ra 및 Rb는 각각이 그에 부착된 탄소와 함께 임의적으로 치환된 C_{3-6}시클로알킬을 형성하며, R_7 및 R_8은 각각 독립적으로 수소이다.

[0626] 구현예들에서, Z_2는 C_5알킬렌이고, w는 2이고, J는 $-NH-C(O)-NH_2$이고, Ra 및 Rb는 각각이 그에 부착된 탄소와 함께 임의적으로 치환된 C_4시클로알킬을 형성하며, R_7 및 R_8은 각각 독립적으로 수소이다.

[0627] 구현예들에서, Z_2는 C_{1-12}알킬렌이고, w는 2이고, J는 $-NH-C(O)-NH_2$이고, K는 $-CH_2-O-C(O)-$이고, Ra 및 Rb는 각각이 그에 부착된 탄소와 함께 임의적으로 치환된 C_{3-6}시클로알킬을 형성하며, R_7 및 R_8은 각각 독립적으로 수소이다.

[0628] 구현예들에서, Z_2는 C_5알킬렌이고, w는 2이고, J는 $-NH-C(O)-NH_2$이고, K는 $-CH_2-O-C(O)-$이고, Ra 및 Rb는 각각이 그에 부착된 탄소와 함께 임의적으로 치환된 C_4시클로알킬을 형성하며, R_7 및 R_8은 각각 독립적으로 수소이다.

[0629] 구현예들에서, Z_2는 C_{1-12}알킬렌이고, w는 3이고, J는 $-N(R_x)(R_y)$이고, 여기서 R_x 및 R_y는 수소 및 C_{1-3}알킬로부터 각각 독립적으로 선택되고, Ra 및 Rb는 각각이 그에 부착된 탄소와 함께 임의적으로 치환된 C_{3-6}시클로알킬을 형성하며, R_7 및 R_8은 각각 독립적으로 수소이다.

[0630] 구현예들에서, Z_2는 C_5알킬렌이고, w는 3이고, J는 $-N(R_x)(R_y)$이고, 여기서 R_x 및 R_y는 각각 메틸이고, Ra 및 Rb는 각각이 그에 부착된 탄소와 함께 C_4시클로알킬을 형성하며, R_7 및 R_8은 각각 독립적으로 수소이다.

[0631] 구현예들에서, Z_2는 C_{1-12}알킬렌이고, w는 3이고, J는 $-N(R_x)(R_y)$이고, 여기서 R_x 및 R_y는 수소 및 C_{1-3}알킬로부터

각각 독립적으로 선택되고, K는 $-CH_2-$이고, Ra 및 Rb는 각각이 그에 부착된 탄소와 함께 임의적으로 치환된 C_{3-6} 시클로알킬을 형성하며, R_7 및 R_8은 각각 독립적으로 수소이다.

[0632] 구현예들에서, Z_2는 C_5알킬렌이고, w는 3이고, J는 $-N(R_x)(R_y)$이고, 여기서 R_x 및 R_y는 각각 메틸이고, K는 $-CH_2-$이고, Ra 및 Rb는 각각이 그에 부착된 탄소와 함께 C_4시클로알킬을 형성하며, R_7 및 R_8은 각각 독립적으로 수소이다.

[0633] 구현예들에서, Z_2는 C_{1-12}알킬렌이고, w는 0이고, J는 수소이고, Ra 및 Rb는 각각이 그에 부착된 탄소와 함께 임의적으로 치환된 C_{3-6}시클로알킬을 형성하며, R_7 및 R_8은 각각 독립적으로 수소이다.

[0634] 구현예들에서, Z_2는 C_5알킬렌이고, w는 0이고, J는 수소이고, Ra 및 Rb는 각각이 그에 부착된 탄소와 함께 C_4시클로알킬을 형성하며, R_7 및 R_8은 각각 독립적으로 수소이다.

[0635] 구현예들에서, Z_2는 C_{1-12}알킬렌이고, w는 0이고, J는 수소이고, K는 $-CH_2-$이고, Ra 및 Rb는 각각이 그에 부착된 탄소와 함께 임의적으로 치환된 C_{3-6}시클로알킬을 형성하며, R_7 및 R_8은 각각 독립적으로 수소이다.

[0636] 구현예들에서, Z_2는 C_5알킬렌이고, w는 0이고, J는 수소이고, K는 $-CH_2-$이고, Ra 및 Rb는 각각이 그에 부착된 탄소와 함께 C_4시클로알킬을 형성하며, R_7 및 R_8은 각각 독립적으로 수소이다.

[0637] 구현예들에서, Z_2는 C_{1-12}알킬렌이고, w는 2이고, J는 $-NH-C(O)-NH_2$이고, Ra 및 Rb는 각각이 그에 부착된 탄소와 함께 임의적으로 치환된 C_{3-6}시클로알킬을 형성하며, R_7 및 R_8은 각각 독립적으로 수소이다.

[0638] 구현예들에서, Z_2는 C_5알킬렌이고, w는 2이고, J는 $-NH-C(O)-NH_2$이고, Ra 및 Rb는 각각이 그에 부착된 탄소와 함께 임의적으로 치환된 C_4시클로알킬을 형성하며, R_7 및 R_8은 각각 독립적으로 수소이다.

[0639] 구현예들에서, Z_2는 C_{1-12}알킬렌이고, w는 2이고, J는 $-NH-C(O)-NH_2$이고, K는 $-CH(R)-O-C(O)-$이고, 여기서 R은 $C(O)-N(R_x)(R_y)$이고, 여기서 R_x 및 R_y는 각각이 그에 부착된 질소와 함께 임의적으로 치환된 5원 내지 7원 헤테로시클릴을 형성하고, Ra 및 Rb는 각각이 그에 부착된 탄소와 함께 임의적으로 치환된 C_{3-6}시클로알킬을 형성하며, R_7 및 R_8은 각각 독립적으로 수소이다.

[0640] 구현예들에서, Z_2는 C_5알킬렌이고, w는 2이고, J는 $-NH-C(O)-NH_2$이고, K는 $-CH(R)-O-C(O)-$이고, 여기서 R은 $C(O)-N(R_x)(R_y)$이고, 여기서 R_x 및 R_y는 각각이 그에 부착된 질소와 함께 임의적으로 치환된 피페라진을 형성하고, Ra 및 Rb는 각각이 그에 부착된 탄소와 함께 임의적으로 치환된 C_4시클로알킬을 형성하며, R_7 및 R_8은 각각 독립적으로 수소이다.

[0641] 구현예들에서, Z_2는 C_{1-12}알킬렌이고, w는 3이고, J는 $-N(R_x)(R_y)$이고, 여기서 R_x 및 R_y는 수소 및 C_{1-3}알킬로부터 각각 독립적으로 선택되고, K는 $-CH_2-O-C(O)-$이고, Ra 및 Rb는 각각이 그에 부착된 탄소와 함께 임의적으로 치환된 C_{3-6}시클로알킬을 형성하며, R_7 및 R_8은 각각 독립적으로 수소이다.

[0642] 구현예들에서, Z_2는 C_5알킬렌이고, w는 3이고, J는 $-N(R_x)(R_y)$이고, 여기서 R_x 및 R_y는 각각 메틸이고, K는 $-CH_2-O-C(O)-$이고, Ra 및 Rb는 각각이 그에 부착된 탄소와 함께 C_4시클로알킬을 형성하며, R_7 및 R_8은 각각 독립적으로 수소이다.

[0643] 구현예들에서, L1c는 L1-Q에 부착되고, K는 $-CH_2-$이다.

[0644] 구현예들에서, L1c는 L1-Q'에 부착되고, K는 $-CH_2-O-C(O)-$이다.

[0645] 구현예들에서, L1c는 L1-S에 부착되고, K는 $-CH_2-$이다.

[0646] 구현예들에서, L1c는 L1-T에 부착되고, K는 $-CH(R)-O-C(O)-$이고, 여기서 R은 $C(O)-N(R_x)(R_y)$이고, 여기서 R_x 및

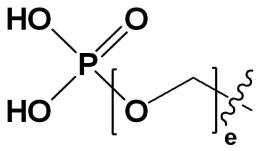
R_y는 각각이 그에 부착된 질소와 함께 임의적으로 치환된 5원 내지 7원 헤테로시클릴을 형성한다.

[0647] 구현예들에서, L1c는 L1-U에 부착된다.

[0648] 구현예들에서, L1c는 L1-V에 부착된다.

[0649] 구현예들에서, L1c는 L1-Y에 부착되고, K는 $-CH_2-$이다.

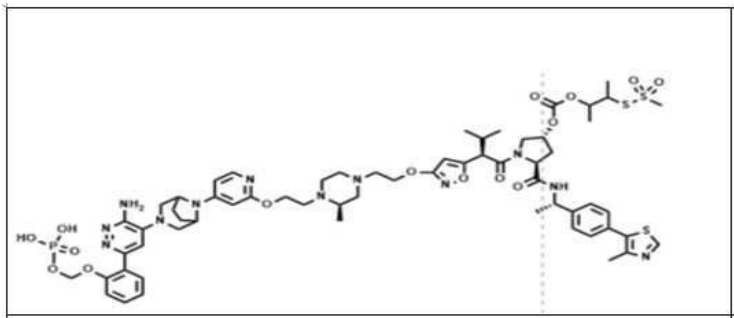
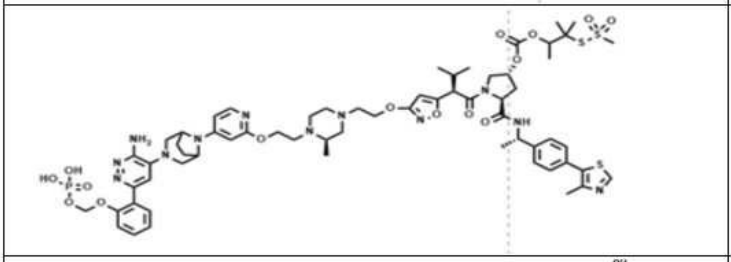
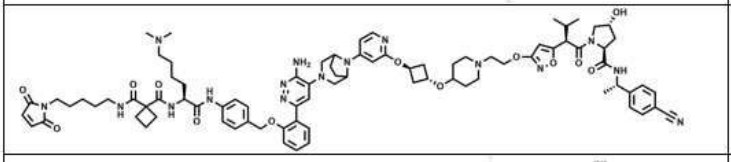
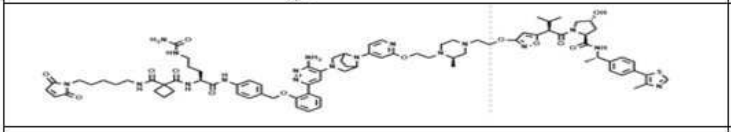
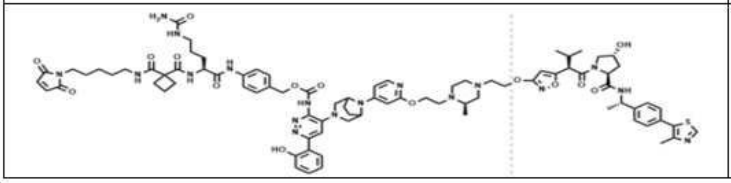
[0650] 구현예들에서, L1c는 L1-Q에 부착되고, 여기서 K는 $-CH_2-$이며; 인산염 모이어티는 L1-T에 부착되고, 여기서 상기 인산염 모이어티는 하기의 구조를 가지고:



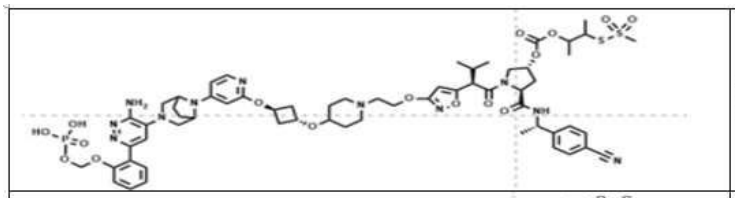
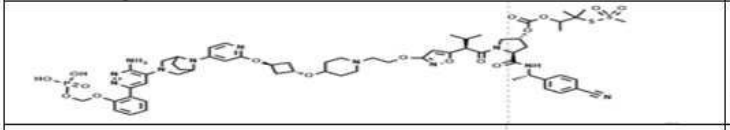
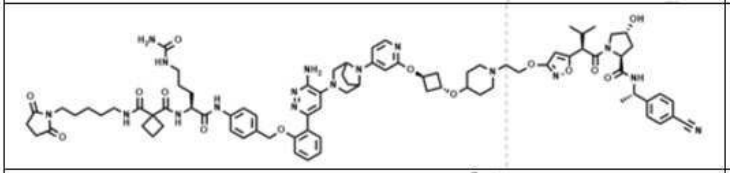
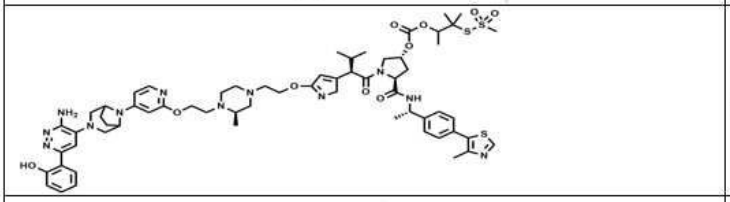
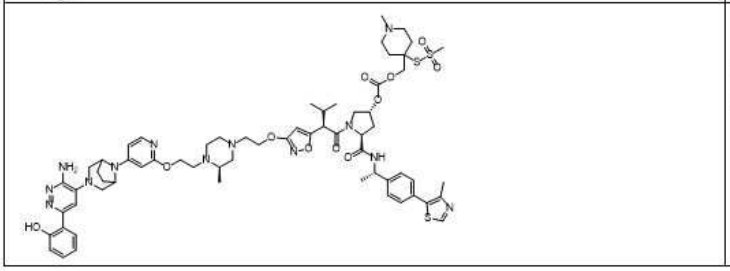
[0651] , 여기서 e는 0이다.

[0652] 특정 구현예들에서, 본원에 기재된 요지는 하기의 L1-CIDE들을 포함한다.

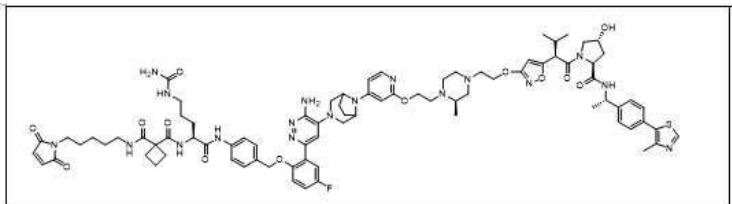
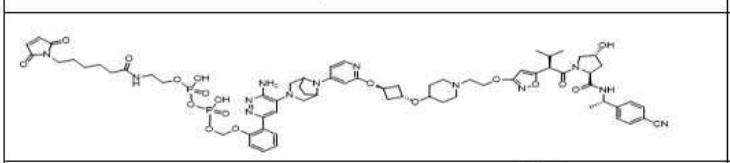
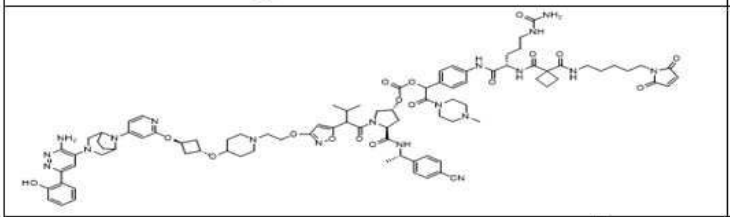
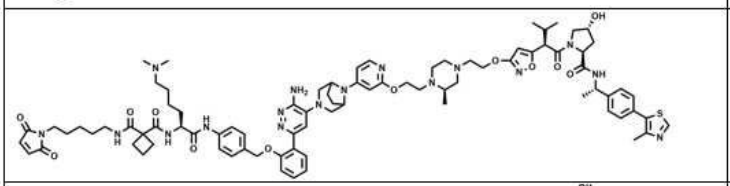
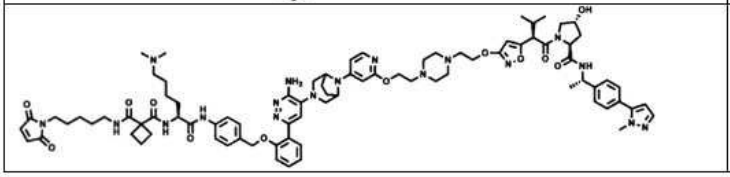
[0653]

	L1-CIDE-BRM1-10
	L1-CIDE-BRM1-9
	L1-CIDE-BRM1-19
	L1-CIDE-BRM1-13
	L1-CIDE-BRM1-20

[0654]

	L1-CIDE-BRM1-11
	L1-CIDE-BRM1-12
	L1-CIDE-BRM1-14
	L1-CIDE-BRM1-7
	L1-CIDE-BRM1-8

[0655]

	L1-CIDE-BRM1-16
	L1-CIDE-BRM1-17
	L1-CIDE-BRM1-18
	L1-CIDE-BRM1-21
	L1-CIDE-BRM1-22

[0656] 본원에 개시된 요지는 하기의 비제한적인 구현예들을 포함한다:

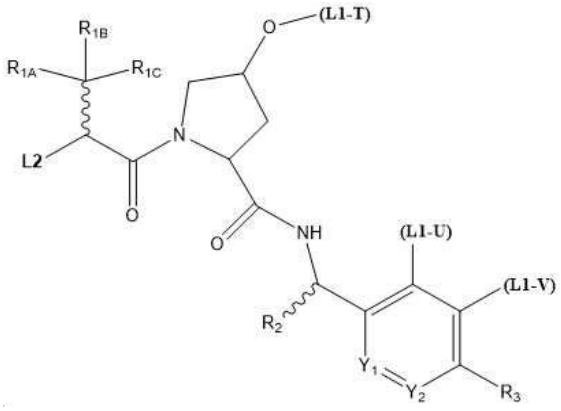
[0657] 1. 하기의 화학 구조를 갖는 접합체로서:

[0658] $Ab-(L1-D)_p$,

[0659] 여기서,

[0660] D는 구조 E3LB-L2-PB를 갖는 CIDE이고;

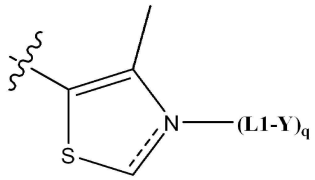
[0661] E3LB는 L2에 공유 결합되고, 상기 E3LB는 하기의:

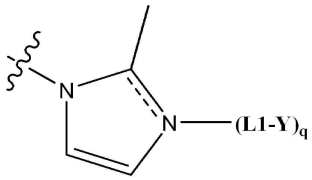


[0662] E3LB

[0663] 화학식을 갖고, 여기서,R_{1A}, R_{1B} 및 R_{1C}는 각각 독립적으로 수소 또는 C_{1-5}알킬이거나; 또는 R_{1A}, R_{1B} 및 R_{1C} 중 2개는 각각이 그에 부착된 탄소와 함께 C_{1-5}시클로알킬을 형성하고;

[0664] R_2는 C_{1-5}알킬이고;

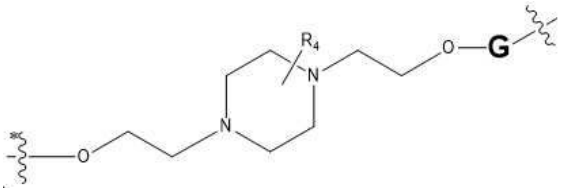
[0665] R_3은 시아노, 

, 및 

으로 이루어진 군으로부터 선택되고, 여기서 ----은 단일 또는 이중 결합이고;

[0666] Y_1 및 Y_2 중 하나는 -CH이고, Y_1 및 Y_2 중 다른 하나는 -CH 또는 N이고;

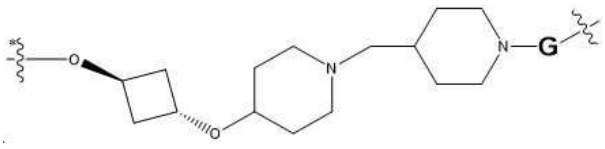
[0667] L2는 E3LB 및 PB에 공유 결합된 링커이고, 상기 L2는 하기의:



[0668] L2a,

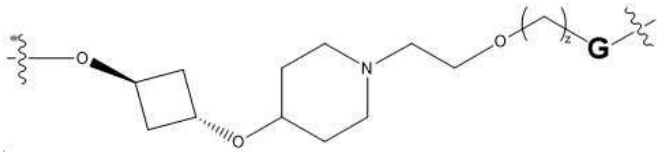
[0669] 화학식을 갖고,

[0670] 여기서, R_4는 수소 또는 메틸,



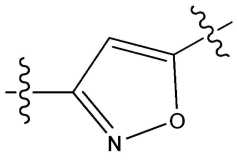
[0671] L2b,

[0672] 또는

[0673]  L2c

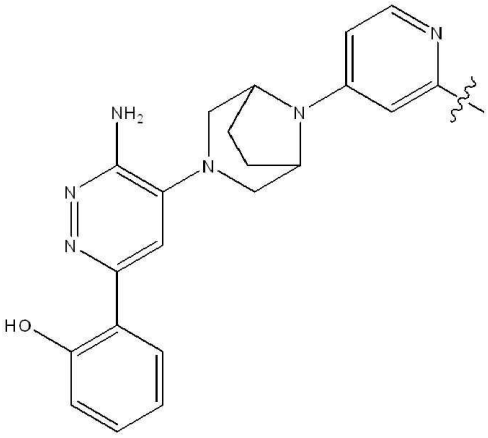
[0674] 이고, 여기서,

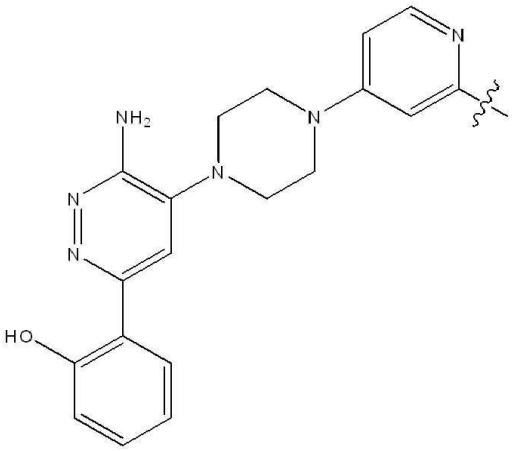
[0675] z는 1 또는 0이고,

[0676] G는  또는 -C(O)NH-이며; 그리고,

[0677]  는 PB에 대한 부착점이고;

[0678] PB는 L2에 공유 결합된 단백질 결합기로서, 하기의 구조는 가지고:

[0679]  , 또는

[0680]  ;

[0681] Ab는 링커인 적어도 하나의 L1에 공유 결합된 항체이고;

[0682] L1-T, L1-U 및 L1-V는 각각 독립적으로 수소, 또는 Ab 및 D에 공유 결합된 L1 링커이고;

[0683] L1-Y는 수소, 또는 Ab 및 D에 공유 결합된 L1 링커이고;

[0684] q는 1 또는 0이며;

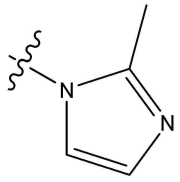
[0685] 그리고,

[0686] p는 약 1 내지 약 8의 값을 가지는, 접합체.

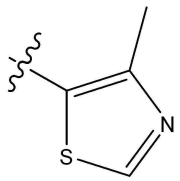
[0687] 2. 구현예 1에 있어서,

[0688] R_3는 시아노인, 접합체.

[0689] 3. 구현예 1에 있어서,

[0690] R_3은  인, 접합체.

[0691] 4. 구현예 1에 있어서,

[0692] R_3은  인, 접합체.

[0693] 5. 구현예 1에 있어서,

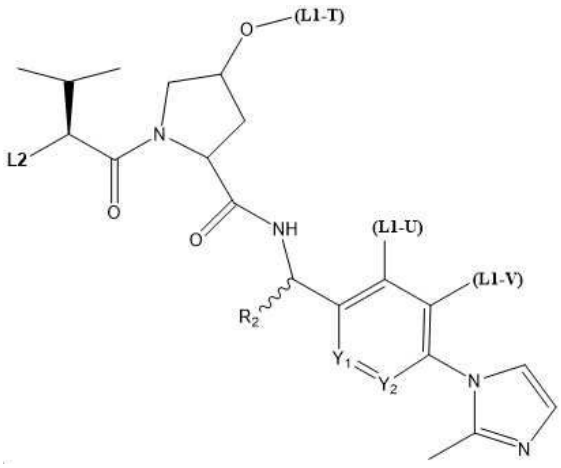
[0694] R_{1A}, R_{1B} 및 R_{1C}는 각각 독립적으로 수소 또는 메틸인, 접합체.

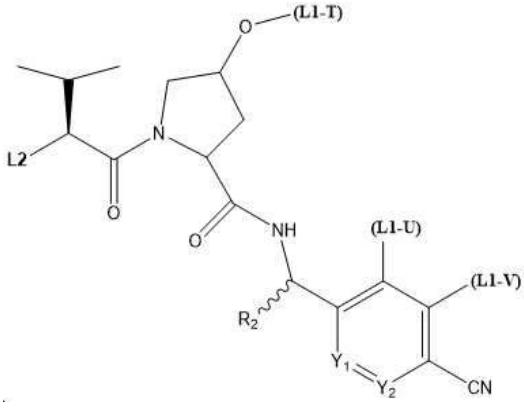
[0695] 6. 구현예 5에 있어서,

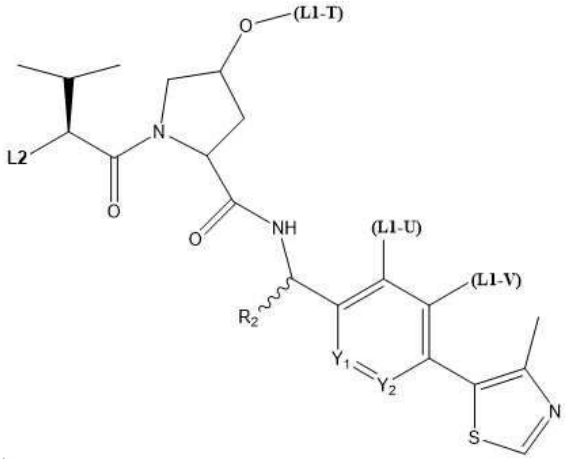
[0696] R_{1A} 및 R_{1B}는 각각 메틸인, 접합체.

[0697] 7. 구현예 6에 있어서,

[0698] E3LB는 하기의 구조를 가지고:

[0699]  E3LBa,

[0700]  E3LBb, 또는

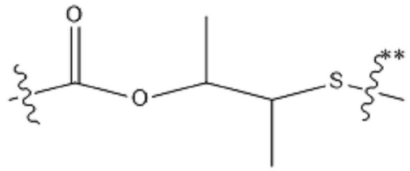
[0701] 

E3LBc

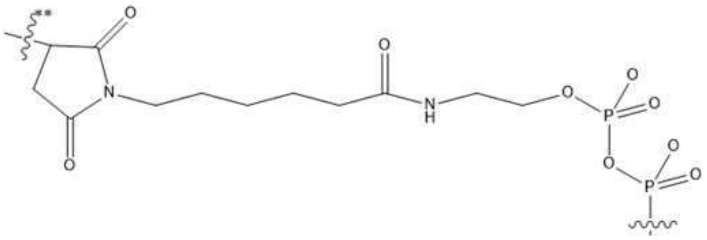
[0702] 구조를 가지는, 접합체.

[0703] 8. 구현예 1에 있어서,

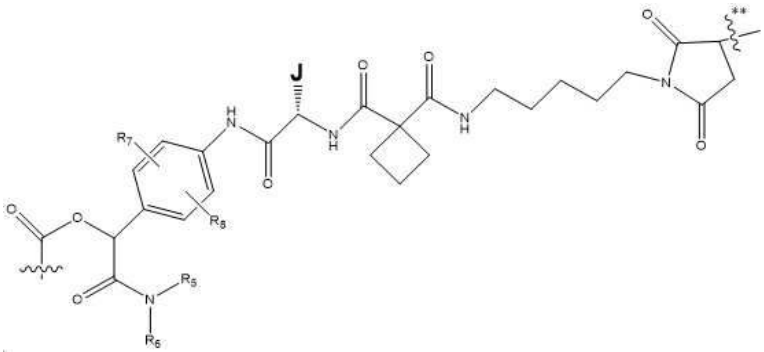
[0704] L1은 각각의 경우에서 독립적으로 하기로 이루어진 군으로부터 선택된 링커이고:

[0705] 

,

[0706] 

,

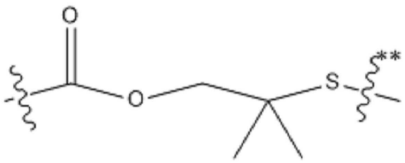
[0707] 

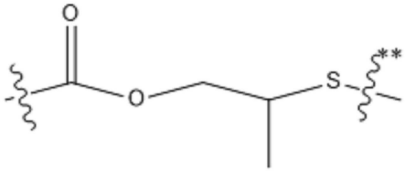
[0708] ;

[0709] 여기서, J는 $-CH_2-CH_2-CH_2-NH-C(O)-NH_2$; $-CH_2-CH_2-CH_2-CH_2-NH_2$; $-CH_2-CH_2-CH_2-CH_2-NH-CH_3$; 또는 $-CH_2-CH_2-CH_2-CH_2-N(CH_3)_2$이고;

[0710] R_5 및 R_6은 독립적으로 수소 또는 C_{1-5}알킬이거나; 또는 R_5 및 R_6은 각각이 그에 부착된 질소와 함께 임의적으로 치환된 5원 내지 7원 헤테로시클릴을 형성하고;

[0711] R_7 및 R_8은 각각 독립적으로 수소, 할로, C_{1-5}알킬, C_{1-5} 알콕시 또는 히드록시이며;

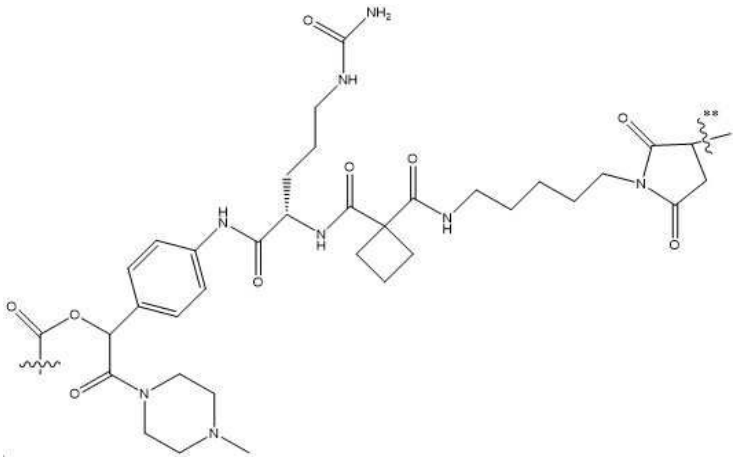
[0712]  이고,

[0713]  이며,

[0714] 그리고 여기서,  은 Ab에 대한 부착점인, 접합체.

[0715] 9. 구현예 8에 있어서,

[0716] 하기의:

[0717] 

[0718] 구조를 가지는, 접합체.

[0719] 10. 구현예 1에 있어서,

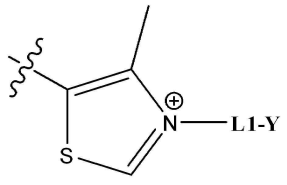
[0720] L1-T은 링커인, 접합체.

[0721] 11. 구현예 1에 있어서,

[0722] L1-U 또는 L1-V는 링커인, 접합체.

[0723] 12. 구현예 1에 있어서,

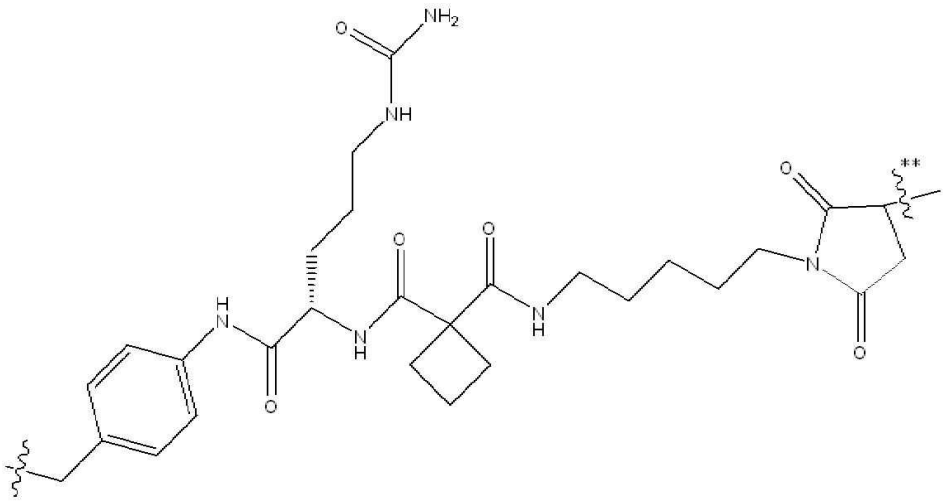
[0724] L1-Y는 링커이고, q는 1인, 접합체:

[0725] 

.

[0726] 13. 구현예 12에 있어서,

[0727] L1-Y는 하기의 구조를 가지는, 접합체:

[0728] 

.

[0729] 14. 구현예 1에 있어서,

[0730] L1-T는 링커이고;

[0731] L1-U 및 L1-T는 각각 수소이며; 그리고

[0732] q는 0인, 접합체.

[0733] 15. 구현예 1에 있어서,

[0734] z는 0인, 접합체.

[0735] 16. 구현예 1에 있어서,

[0736] z는 1인, 접합체.

[0737] 17. 구현예 1에 있어서,

[0738] R_2는 수소, 메틸, 에틸 또는 프로필인, 접합체.

[0739] 18. 구현예 17에 있어서,

[0740] R_2는 메틸인, 접합체.

[0741] 19. 구현예 18에 있어서,

[0742] R_2는 

로서 E3LB에 결합되는, 접합체.

[0743] 20. 구현예 1에 있어서,

[0744] Y_1 및 Y_2는 각각 -CH인, 접합체.

[0745] 21. 구현예 1에 있어서,

[0746] Y_1은 N이고 Y_2는 -CH인, 접합체.

[0747] 22. 구현예 1에 있어서,

[0748] Y_1은 -CH이고 Y_2는 N인, 접합체.

[0749] 23. 구현예 1에 있어서,

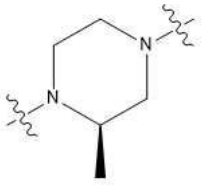
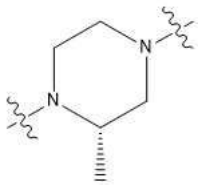
[0750] R_4는 수소인, 접합체.

[0751] 24. 구현예 1에 있어서,

[0752] R_4는 메틸인, 접합체.

[0753] 25. 구현예 24에 있어서,

[0754] R_4는 하기와 같이:

[0755]  또는  메틸인, 접합체.

[0756] 26. 구현예 1에 있어서,

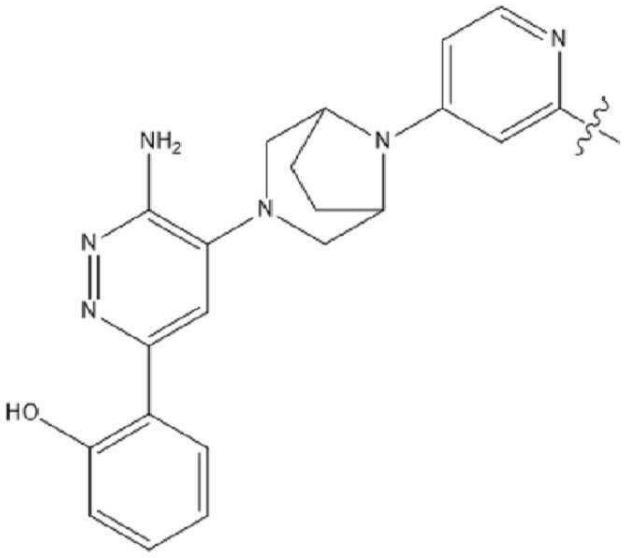
[0757] Ab는 CD71, Trop2, NaPi2b, Ly6E, EpCAM, MSLN, 및 CD22로 이루어진 군으로부터 선택된 폴리펩티드 중 하나 이상에 결합되는 항체인, 접합체.

[0758] 27. 구현예 26에 있어서,

[0759] Ab는 CD71 및 Trop2로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상의 폴리펩티드에 결합되는 항체인, 접합체.

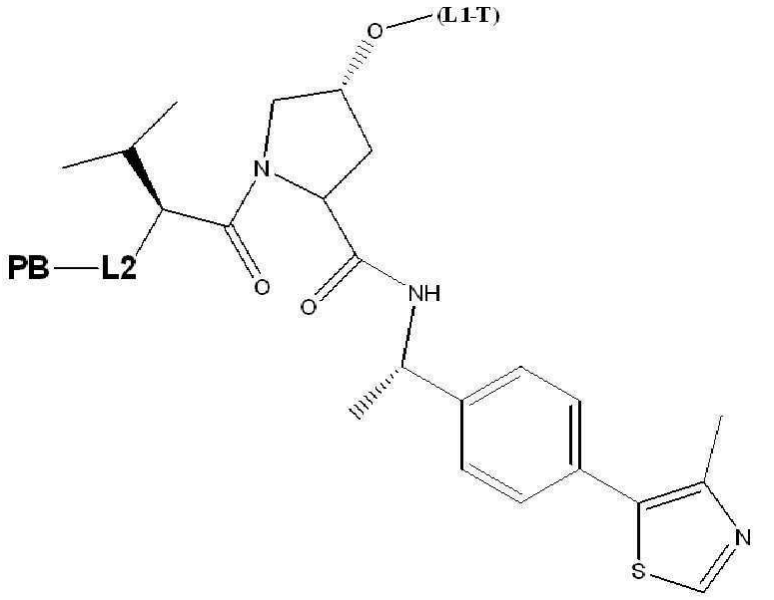
[0760] 28. 구현예 1에 있어서,

[0761] PB는 L2에 공유 결합된 단백질 결합기로서, 하기의 구조는 가지는, 접합체:

[0762] .

[0763] 29. 구현예 1에 있어서,

[0764] 하기의 화학식 Ia를 가지고:

[0765] 

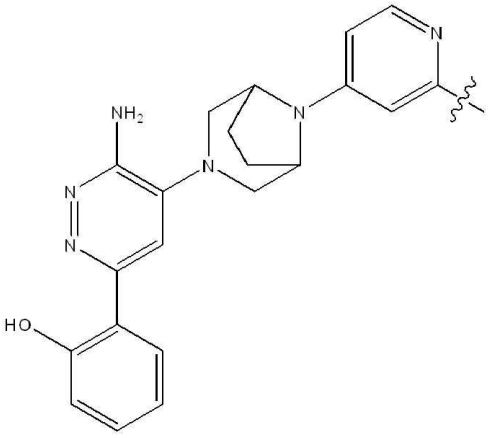
Ia,

[0766] 여기서,

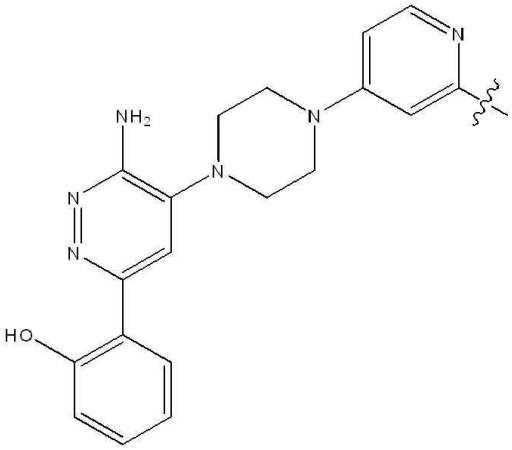
[0767] L1-T는 Ab에 공유 결합된 링커이고;

[0768] Ab는 CD71, Trop2, NaPi2b, Ly6E, EpCAM, MSLN, 및 CD22로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상의 폴리펩티드에 결합되는 항체이고;

[0769] PB는 L2에 공유 결합된 단백질 결합기로서, 하기의 구조는 가지고:

[0770] 

, 또는

[0771] 

;

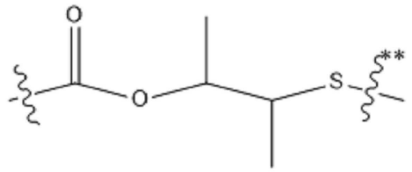
[0772] L2는 하기의 L2a, L2b 및 L2c로 이루어진 군으로부터 선택되며:

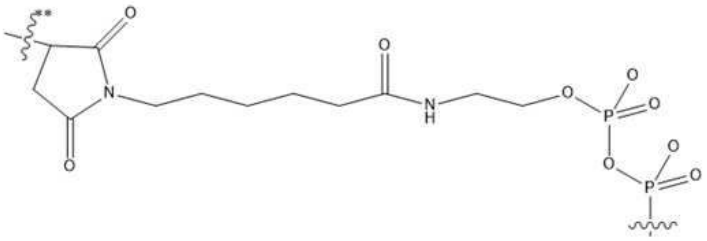
[0773] 그리고,

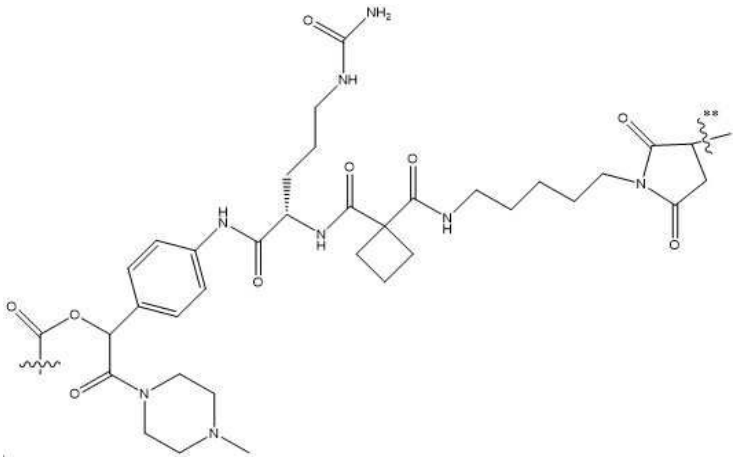
[0774] p는 약 4 내지 약 8의 값을 가지는, 접합체.

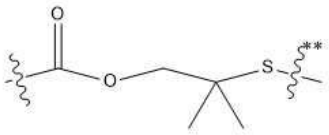
[0775] 30. 구현예 29에 있어서,

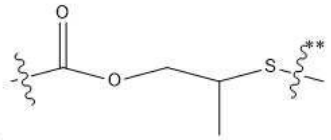
[0776] L1-T는 하기로 이루어진 군으로부터 선택된 링커이고:

[0777]  ,

[0778]  ,

[0779]  ,

[0780]  , 및

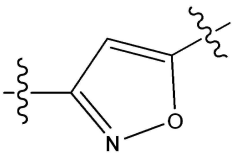
[0781]  ;

[0782] 여기서,  은 Ab에 대한 부착점인, 접합체.

[0783] 31. 구현예 29에 있어서,

[0784] L2는 L2a인, 접합체.

[0785] 32. 구현예 31에 있어서,

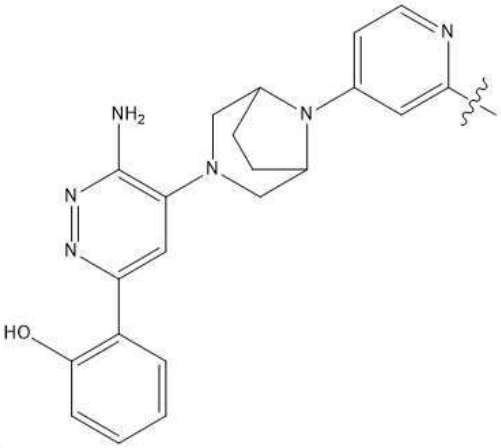
[0786] G는  인, 접합체.

[0787] 33. 구현예 31에 있어서,

[0788] R_4는 메틸인, 접합체.

[0789] 34. 구현예 29에 있어서,

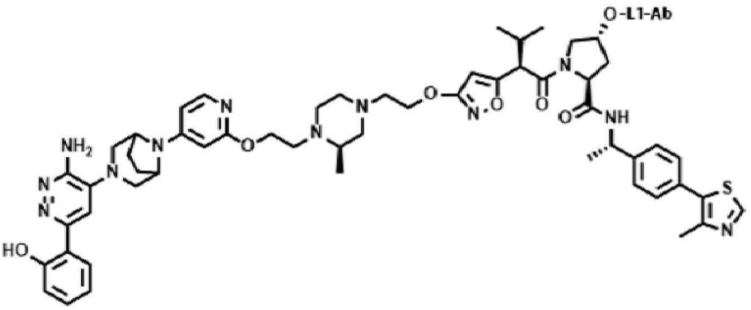
[0790] PB는 하기와 같은, 접합체:

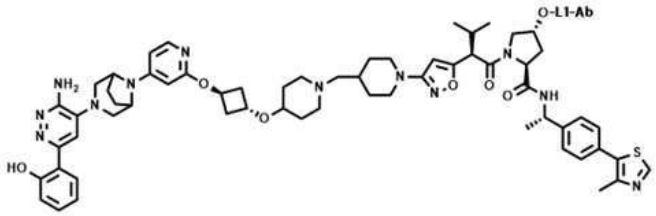
[0791] .

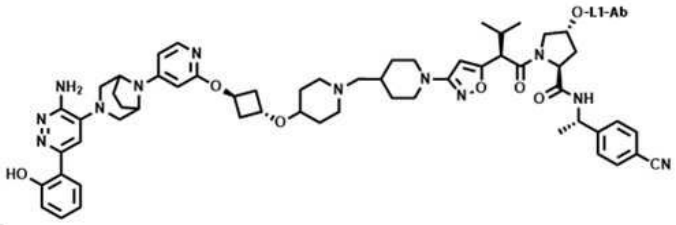
[0792] 35. 구현예 29에 있어서,

[0793] p는 약 5 내지 약 7의 값을 가지는, 접합체. 36. 구현예 1에 있어서,

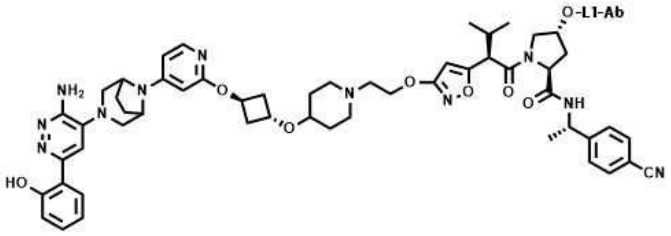
[0794] 하기의 구조를 가지는 접합체:

[0795]  1-L2a,

[0796] . 2-L2b,

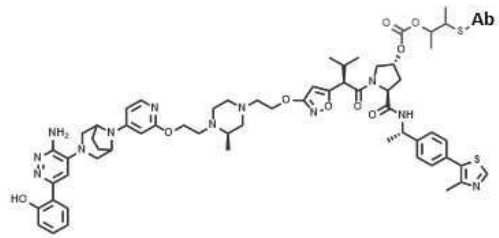
[0797]  3-L2b,

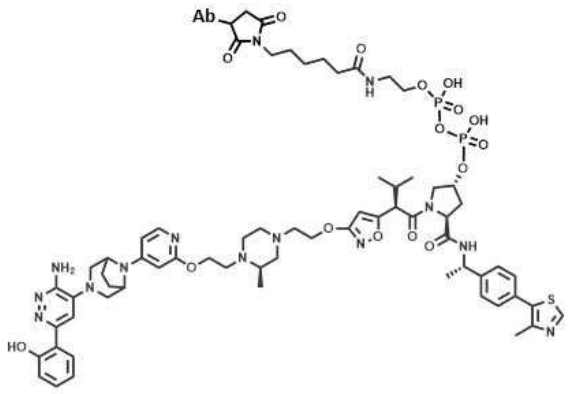
[0798] 및

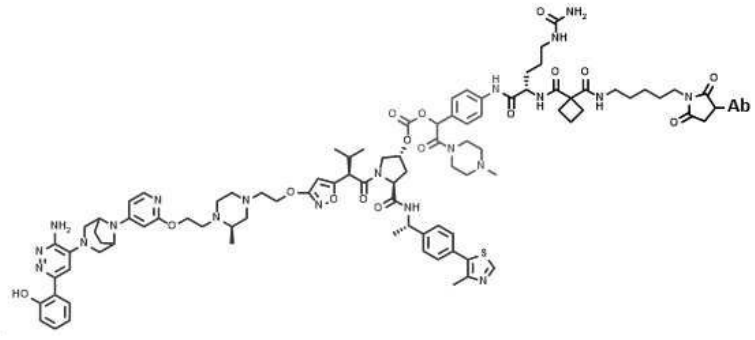
[0799]  4-L2c.

[0800] 37. 구현예 1에 있어서,

[0801] 하기의 구조를 가지는 접합체:

[0802] ,

[0803] , 및

[0804] .

[0805] 38. 구현예 1의 접합체 및 하나 이상의 약학적으로 허용 가능한 부형제를 포함하는, 약학적 조성물.

[0806] 39. 치료를 필요로 하는 인간의 질병을 치료하는 방법으로서,

[0807] 구현예 1의 접합체 또는 구현예 38의 조성물의 유효량을 상기 인간에게 투여하는 단계를 포함하는, 방법.

[0808] 40. 구현예 39에 있어서,

[0809] 상기 질병은 암인, 방법.

[0810] 41. 구현예 40에 있어서,

[0811] 상기 암은 BRM 의존성인. 방법.

[0812] 42. 구현예 40에 있어서,

[0813] 상기 암은 비소세포 폐암인, 방법.

[0814] 43. 대상체에서 표적 BRM 단백질의 수준을 감소시키는, 방법으로서,

[0815] 구현예 1의 접합체 또는 구현예 38의 조성물을 상기 대상체에게 투여하는 단계를 포함하고, 여기서 상기 PB 부분은 상기 표적 BRM 단백질에 결합하고, 여기서 유비퀴틴 리가아제는 상기 결합된 표적 BRM 단백질의 분해에 영향을 미치며, 여기서 상기 BRM 표적 단백질의 수준이 감소되는, 방법.

[0816] **IV. 제형**

[0817] 본원에 기재된 바와 같은 치료 Ab-CIDE의 약학적 제제는 비경구 투여, 예컨대, 약학적으로 허용 가능한 비경구 비히클을 사용한 볼루스, 정맥내, 종양내 주사를 위해 및 단위 투여량의 주사가능한 형태로 제조될 수 있다. 원하는 정도의 순도를 갖는 Ab-CIDE는 임의적으로 하나 이상의 약학적으로 허용 가능한 부형제(Remington's Pharmaceutical Sciences (1980) 16th edition, Osol, A. Ed.)와 재구성을 위한 동결건조 제제 또는 수용액의 형태로 혼합된다.

[0818] Ab-CIDE는 표준 제약 관행에 따라 약학적 조성물로서 제형화될 수 있다. 이러한 양태에 따르면, Ab-CIDE를 하나 이상의 약학적으로 허용 가능한 부형제와 함께 포함하는 약학적 조성물이 제공된다.

[0819] 일반적인 제제는 Ab-CIDE를 담체 및/또는 희석제와 같은 부형제와 혼합하여 제조하다. 적합한 담체, 희석제 및 부형제는 당업자에게 널리 공지되어 있고, 탄수화물, 왁스, 수용성 및/또는 팽창가능한 중합체, 친수성 또는 소수성 물질, 젤라틴, 오일, 용매, 물 등과 같은 물질을 포함한다. 사용되는 특정 담체, 희석제 또는 부형제는 Ab-CIDE가 적용되는 수단 및 목적에 따라 달라진다. 일반적으로 용매는 당업자가 포유류에 투여 가능한 안전 물질(GRAS)이라고 인식하는 용매를 기반으로 선택된다.

[0820] 일반적으로, 안전한 용매란 물 및 물에 용해되거나 혼합될 수 있는 기타 무독성 용매와 같은 무독성 수성 용매이다. 적합한 수성 용매는 물, 에탄올, 프로필렌 글리콜, 폴리에틸렌 글리콜(예컨대, PEG 400, PEG 300) 등, 그리고 이들의 혼합물을 포함한다. ™허용 가능한 희석제, 담체, 부형제, 또는 안정화제는 사용된 투여량 및 농도에서 수용체에 비독성이며, 완충액, 예컨대 포스페이트, 시트레이트, 및 다른 유기산; 아스코르브산 및 메티오닌을 포함하는 항산화제; 보존제(예컨대 옥타데실디메틸벤질 암모늄 클로라이드; 헥사메토늄 클로라이드; 벤즈알코늄 클로라이드, 벤즈에토늄 클로라이드; 페놀, 부틸 또는 벤질 알코올; 알킬 파라벤, 예컨대 메틸 또는 프로필 파라벤; 카테콜; 레조르시놀; 주기로헥산올; 3-펜탄올; 및 m-크레졸); 저분자량(약 10 잔기 미만) 폴리펩티드; 단백질, 예컨대 혈청 알부민, 젤라틴, 또는 면역글로불린; 친수성 중합체, 예컨대 폴리비닐피롤리돈; 아미노산, 예컨대 글리신, 글루타민, 아스파라긴, 히스티딘, 아르기닌, 또는 라이신; 모노사카라이드, 디사카라이드, 및 글루코스, 만노스, 또는 덱스트린을 포함하는 다른 탄수화물; 킬레이트제, 예컨대 EDTA; 당류, 예컨대 수크로스, 만니톨, 트레할로스 또는 소르비톨; 염 형성 짝이온, 예컨대 나트륨; 금속 착물(예를 들면, Zn-단백질 복합체); 및/또는 비-이온성 계면활성제, 예컨대 TWEEN™, PLURONICS™, 또는 폴리에틸렌 글리콜(PEG)이 포함된다.

[0821] 제제는 또한 Ab-CIDE의 원활한 제시를 제공하거나 의약품 제조를 돕디 위해 한 가지 이상의 완충액, 안정화제, 계면활성제, 침윤제, 윤활제, 유화제, 현탁제, 보존제, 항산화제, 불투명화 작용제, 활택제, 가공 보조제, 착색제, 감미료, 방향제, 풍미제, 및 다른 공지된 첨가제를 포함할 수 있다. 제제는 통상적인 용해 및 혼합 절차를 사용하여 제조될 수 있다.

[0822] 제제는 주위 온도에서 적절한 pH에서 및 원하는 정도의 순도에서, 생리학적으로 허용 가능한 담체, 다시 말하면, 사용된 투여량 및 농도에서 수용자에게 비독성인 담체와 혼합함으로써 실시될 수 있다. 제제의 pH는 화

합물의 특정 사용 및 농도에 주로 의존하지만, 약 3 내지 약 8까지의 범위에 이를 수 있다. pH 5의 아세테이트 완충액 내 제제는 적합한 구현예이다.

[0823] Ab-CIDE 제제는 무균일 수 있다. 특히, 생체내 투여에 이용되는 제제는 무균이어야 한다. 이러한 멸균은 무균 여과 막을 통한 여과에 의해 쉽게 달성된다.

[0824] Ab-CIDE는 통상적으로 고체 조성물, 동결 건조된 제제 또는 수용액으로서 보관될 수 있다.

[0825] Ab-CIDE를 포함한 약학적 조성물은 모범 의료행위 지침과 일치하는 방식, 다시 말하면, 양, 농도, 일정, 과정, 운반제 및 투여 경로로 제형화, 투약 및 투여될 수 있다. 이와 관련하여 고려해야 할 요소에는 치료 중인 특정 장애, 치료 중인 특정 포유동물, 개별 환자의 임상 병태, 장애의 원인, 제제 전달 부위, 투여 방법, 투여 일정, 및 의료 종사자에게 공지된 기타 요소가 포함된다. 투여되는 화합물의 "치료적 유효량"은 이러한 고려 사항에 의해 좌우될 것이며, 응고 인자 매개 장애를 예방, 개선 또는 치료하는 데 필요한 최소량이다. 그러한 양은 바람직하게는 숙주에 독성이 있거나 숙주를 출혈에 유의적으로 취약하게 만드는 양 미만이다.

[0826] Ab-CIDE는 쉽게 제어가능한 투여량의 약물을 제공하고 규정된 요법에 대한 환자 순응도를 가능하게 하기 위한 약학적 제형으로 조제된다. 적용을 위한 약학적 조성물(또는 제제)은 약물을 투여하는 데 사용된 방법에 따라서 다양한 방식으로 포장될 수 있다. 일반적으로, 유통 물품은 적절한 형태에서 약학적 제제가 그 안에 축적된 용기를 포함한다. 적합한 용기는 당업자에게 널리 알려져 있고, 그리고 병(플라스틱 및 유리), 향주머니, 앰풀, 플라스틱 가방, 금속 기통 등과 같은 물질을 포함한다. 용기는 또한, 패키지의 내용물에 무분별한 접근을 예방하기 위한 탬퍼 프루프 기계조립을 포함할 수 있다. 이에 더하여, 용기는 용기의 내용물을 설명하는 표지가 그 위에 부착된다. 표지는 또한 적절한 주의사항을 포함할 수 있다.

[0827] 약학적 조성물은 무균 주사가능 제조물, 예컨대, 무균 주사가능한 수성 또는 유성 현탁액의 형태일 수 있다. 이러한 현탁액은 전술된 적합한 분산제 또는 습윤제 및 현탁제를 이용하여 당해 분야에서 공지된 기술에 따라서 제형화될 수 있다. 무균 주사용 제제는 또한 1,3-부탄디올과 같은 무독성 비경구적으로 허용 가능한 희석제 또는 용매 중의 멸균 주사용 용액 또는 현탁액일 수 있다. 무균 주사용 제제는 또한 동결건조 분말로 제조될 수 있다. 이용될 수 있는 허용 가능한 운반제와 용매 중에는 물, 링거액 및 등장성 염화나트륨 용액이 있다. 또한, 무균 고정유가 용매 또는 현탁 매질로서 통상적으로 이용된다. 이러한 목적을 위해 합성 모노- 또는 디글리세라이드를 포함하여 임의의 블랜드 고정 오일이 사용될 수 있다. 이에 더하여, 지방산, 예컨대, 올레산이 주사가능 물질의 제조에서 유사하게 이용될 수 있다.

[0828] 단일 제형을 생산하기 위해 담체 물질과 조합될 수 있는 Ab-CIDE의 양은 치료되는 숙주 및 특정 투여 방식에 따라서 가변될 것이다. 예를 들어, 인간에게 경구 투여용으로 의도되는 지속 방출 제제는 총 조성물의 약 5 내지 약 95%(중량:중량)에서 가변될 수 있는 적절하고 편의한 양의 담체 물질과 배합된 대략 1 내지 1000 mg의 활성 물질을 함유할 수 있다. 약학적 조성물은 투여를 위한 쉽게 계측가능한 양을 제공하도록 제조될 수 있다. 예를 들어, 정맥내 주입용으로 의도된 수용액은 약 30 mL/시의 속도로 적합한 용적의 주입이 발생할 수 있도록 용액의 밀리리터당 약 3 내지 500 μg의 활성 성분을 함유할 수 있다.

[0829] 비경구 투여에 적합한 제제는 항산화제, 완충액, 세균발육저지제, 및 제제를 의도된 수용자의 혈액과 등장성이 되게 만드는 용질을 함유할 수 있는 수성과 비수성 무균 주사 용액; 그리고 현탁제 및 농화제를 포함할 수 있는 수성과 비수성 무균 현탁액을 포함한다.

[0830] 제제는 단위 용량 또는 다중 용량 용기, 예를 들어, 밀봉된 앰풀 및 바이알에서 포장될 수 있고, 사용 직전에 주사를 위한 무균 액체 담체, 예를 들어, 물의 첨가만을 필요로 하는 동결 건조된(동결 건조) 상태에서 보관될 수 있다. 즉석 주입 용액 및 현탁액은 전술한 종류의 멸균 분말, 과립 및 정제로부터 제조된다. 바람직한 단위 투여량 제제는 본원에 전술한 바와 같이 활성 성분의 일일 용량 또는 단위 일일 하위 용여량, 또는 이의 적절한 분획을 함유하는 것이다.

[0831] 요지는 수의학적 담체와 함께 상기 정의된 바와 같은 적어도 하나의 활성 성분을 포함하는 수의학적 조성물을 더 제공한다. 수의학적 담체는 조성물을 투여하는 목적에 유용한 물질이며, 그렇지 않으면 수의학 분야에서 불활성이거나 허용 가능한 고체, 액체 또는 기체 물질일 수 있고 활성 성분과 양립할 수 있다. 상기 수의학적 조성물은 비경구 또는 임의의 다른 원하는 경로에 의해 투여할 수 있다.

[0832] **V. 적응증 및 치료 방법**

[0833] 본원에 개시된 Ab-CIDE는 BRM과 관련된 다양한 질병 또는 장애를 치료하는 데 사용될 수 있음이 고려된다.

또한, 치료에 사용하기 위한 Ab-CIDE 또는 Ab-CIDE를 포함하는 조성물이 본원에 제공된다. 일부 구현예들에서, 본원에 개시된 바와 같은 질병 및 장애의 치료 또는 예방을 위한 Ab-CIDE 또는 Ab-CIDE를 포함하는 조성물이 본원에 제공된다. 또한, 치료에서 Ab-CIDE 또는 Ab-CIDE를 포함하는 조성물의 사용이 본원에 제공된다. 일부 구현예들에서, 본원에 개시된 바와 같은 질병 및 장애의 치료 또는 예방을 위한 Ab-CIDE의 사용이 본원에 제공된다. 또한, 본원에 개시된 질병 및 장애의 치료 또는 예방을 위한 약제의 제조에서 Ab-CIDE 또는 Ab-CIDE를 포함하는 조성물의 사용이 본원에 제공된다.

[0834] 일반적으로, 치료될 질병 또는 장애는 BRM 의존성 질병 또는 장애, 예를 들어, 암과 같은 과증식성 질병이다. 본원에서 치료되는 암의 예는 BRM 의존성 암을 포함한다. 특정 구현예들에서, 상기 암은 비소세포 폐암이다.

[0835] 특정 구현예들에서, 본원에 기재된 요지는 대상체에서 표적 BRM 단백질의 수준을 감소시키는 방법에 관한 것이며,

[0836] 본원에 기재된 바와 같은 Ab-CIDE 또는 본원에 기재된 바와 같은 Ab-CIDE를 포함하는 조성물을 대상체에게 투여하는 단계를 포함하고, 여기서 PB 부분은 표적 BRM 단백질에 결합하며, 여기서 유비퀴틴 리가아제는 결합된 표적 BRM 단백질의 분해를 초래하고, 여기서 BRM 표적 단백질의 수준은 감소된다.

[0837] 특정 구현예들에서, 상기 기재된 것과 같은 항 NaPi2b 항체를 포함하는 Ab-CIDE는 고형 종양, 예컨대, 난소를 치료하는 방법에 사용된다. 특정 구현예들에서, 항 CD71, Trop2, NaPi2b, Ly6E, EpCAM, MSLN 또는 CD22 항체를 포함하는 Ab-CIDE는 종양 또는 암을 치료하는 방법에 사용된다.

[0838] Ab-CIDE는 치료할 상태에 적합한 임의의 경로로 투여할 수 있다. Ab-CIDE는 일반적으로 비경구적으로, 즉 주입, 피하, 근육내, 정맥내, 피내, 척추강내 및 경막외로 투여될 것이다.

[0839] Ab-CIDE는 요법에서 단독으로 또는 다른 작용제와 병용하여 사용할 수 있다. 예를 들어, Ab-CIDE는 적어도 한 가지 추가 치료제와 병용 투여될 수 있다. 상기 언급된 병용 요법은 병용 투여(2개 이상의 치료제가 동일한 또는 별개의 조성물에 포함되는 경우) 및 개별 투여를 포함하고, 그런 경우에 Ab-CIDE의 투여가, 추가 치료제 및/또는 보조제의 투여 이전에, 동시에, 및/또는 이후에 발생할 수 있다. Ab-CIDE는 또한 방사선요법과 병용하여 사용할 수 있다.

[0840] Ab-CIDE(및 임의의 추가 치료제)는 비경구, 폐내 및 비내를 포함한 임의의 적합한 수단에 의해, 그리고 국소 치료를 위해 원하는 경우에, 병소내 투여에 의해 투여될 수 있다. 비경구 주입에는 근육내, 정맥내, 동맥내, 복강내 또는 피하 투여가 포함된다. 투약은 부분적으로는 투약이 단기인지 만성인지에 따라 임의의 적합한 경로, 예를 들어, 주사, 가령, 정맥내 또는 피하 주사에 의해 이루어질 수 있다. 단일 또는 다양한 시점에 걸친 다중 투여, 일시 투여 및 펄스 주입을 비롯한(그러나 이에 제한되지 않는) 다양한 투약 일정이 본원에서 고려된다.

[0841] 질환의 예방 또는 치료를 위한, Ab-CIDE의 적절한 투여량(단독으로 또는 하나 이상의 다른 추가 치료제와 병용하여 사용될 때)은 치료되는 질병의 유형, Ab-CIDE의 유형, 질병의 중증도 및 경과, Ab-CIDE가 예방적 또는 치료적 목적으로 투여되는지의 여부, 선행 요법, 환자의 임상 병력 및 Ab-CIDE에 대한 반응, 및 주치의의 재량에 의존할 것이다. Ab-CIDE는 적합하게는, 한꺼번에 또는 일련의 치료에 걸쳐 환자에게 투여된다. 질환의 유형과 중증도에 따라서, 약 1 μg/kg 내지 15 mg/kg(예컨대, 0.1 mg/kg - 10 mg/kg)의 Ab-CIDE가, 예를 들어, 1회 이상의 별개 투여에 의한, 또는 연속 주입에 의한 것인지에 상관없이, 환자에게 투여하기 위한 초기 후보 투여량일 수 있다. 상기 언급된 요소들에 따라, 하나의 전형적인 일일 투여량의 범위는 약 1 μg/kg 내지 100 mg/kg 또는 그 이상이 될 수 있다. 수일 또는 보다 장기에 걸친 반복된 투여를 위하여, 병태에 따라, 치료는 일반적으로 질병 증상이 바람직하게 억제될 때까지 지속될 것이다. Ab-CIDE의 한 가지 예시적인 투여량은 약 0.05 mg/kg 내지 약 10 mg/kg의 범위일 것이다. 따라서, 약 0.5 mg/kg, 2.0 mg/kg, 4.0 mg/kg 또는 10 mg/kg(또는 이의 임의의 조합)의 하나 이상의 용량이 환자에게 투여될 수 있다. 그러한 용량은 간헐적으로, 예컨대, 매주마다 또는 3주마다 투여될 수 있다(예컨대, 따라서 환자가 약 2회 내지 약 20회, 또는, 예컨대, 약 6회 용량을 투여받는다). 초기에는 보다 높은 부하 용량, 후속하여 보다 낮은 하나 이상의 용량이 투여될 수 있다. 하지만, 다른 투여량 요법이 유용할 수 있다. 상기 요법의 진행은 통상적인 기술 및 분석에 의해 용이하게 모니터링된다.

[0842] 본원에 기재된 방법은 표적 단백질을 분해하는 방법을 포함한다. 특정 구현예들에서, 상기 방법은 대상체에게 Ab-CIDE를 투여하는 단계를 포함하고, 여기서 상기 표적 단백질은 분해된다. 단백질의 분해 수준은 약 1% 내지 약 5%; 또는 약 1% 내지 약 10%; 또는 약 1% 내지 약 15%; 또는 약 1% 내지 약 20%; 약 1% 내지 약 30%; 또는 약 1% 내지 약 40%; 약 1% 내지 약 50%; 또는 약 10% 내지 약 20%; 또는 약 10% 내지 약 30%; 또는 약 10% 내

지 약 40%; 또는 약 10% 내지 약 50%; 또는 적어도 약 1%; 또는 적어도 약 10%; 또는 적어도 약 20%; 또는 적어도 약 30%; 또는 적어도 약 40%; 또는 적어도 약 50%; 또는 적어도 약 60%; 또는 적어도 약 70%; 또는 적어도 약 80%; 또는 적어도 약 90%; 또는 적어도 약 95%; 또는 적어도 약 99%일 수 있다.

[0843] 본원에 기재된 방법은 비소세포 폐암과 같은 신생물 조직의 증식을 감소시키는 방법을 포함한다. 특정 구현예들에서, 상기 방법은 대상체에게 Ab-CIDE를 투여하는 단계를 포함하고, 여기서 신생물 조직의 증식이 감소된다. 감소의 수준은 약 1% 내지 약 5%; 또는 약 1% 내지 약 10%; 또는 약 1% 내지 약 15%; 또는 약 1% 내지 약 20%; 약 1% 내지 약 30%; 또는 약 1% 내지 약 40%; 약 1% 내지 약 50%; 또는 약 10% 내지 약 20%; 또는 약 10% 내지 약 30%; 또는 약 10% 내지 약 40%; 또는 약 10% 내지 약 50%; 또는 적어도 약 1%; 또는 적어도 약 10%; 또는 적어도 약 20%; 또는 적어도 약 30%; 또는 적어도 약 40%; 또는 적어도 약 50%; 또는 적어도 약 60%; 또는 적어도 약 70%; 또는 적어도 약 80%; 또는 적어도 약 90%; 또는 적어도 약 95%; 또는 적어도 약 99%일 수 있다.

[0844] **VI. 제조 물품**

[0845] 다른 양태에서, 제조품, 예를 들어, 상기 기재된 질병 및 장애의 치료에 유용한 물질을 함유하는 "키트"가 제공된다. 상기 키트는 Ab-CIDE를 포함하는 용기를 포함한다. 상기 키트는 용기 상에 또는 용기와 결합된 표지 또는 포장 삽입물을 더 포함할 수 있다. "약품 설명서(package insert)"라는 용어는 치료 제품의 사용에 관한 적응증, 사용법, 투여량, 투여, 금기 및/또는 경고에 대한 정보를 포함하는 치료 제품의 상용 패키지에 관례적으로 포함되는 지침서를 지칭하는 데 사용된다.

[0846] 적합한 용기는, 예를 들어, 병, 바이알, 주사기, 블리스터 팩 등을 포함한다. "바이알"은 액체 또는 동결건조 제제를 담기에 적합한 용기이다. 일 구현예에서, 상기 바이알은 일회용 바이알, 예컨대, 마개가 달린 20-cc 일회용 바이알이다. 상기 용기는 다양한 재료들, 예컨대, 유리 또는 플라스틱으로부터 형성될 수 있다. 용기는 병태를 치료하는 데 효과적인 Ab-CIDE 또는 이의 제제를 포함하며, 멸균 접근 포트를 가질 수 있다(예를 들어, 용기는 피하 주사 바늘로 구멍을 뚫을 수 있는 마개를 갖는 정맥내 용액 백 또는 바이알일 수 있다).

[0847] 조성물 내의 적어도 한 가지 활성 제제는 Ab-CIDE이다. 표지 또는 패키지 삽입물(약품 설명서)은 조성물(들)이 선택된 질병, 예컨대, 암을 치료하는 데 이용된다는 것을 지시한다. 또한, 표지 또는 패키지 삽입물은 치료될 환자가 과증식성 장애, 신경변성, 심장 비대, 통증, 편두통 또는 신경외상성 질병 또는 반응과 같은 장애를 갖는 환자임을 나타낼 수 있다. 일 구현예에서, 표지 또는 패키지 삽입물은 Ab-CIDE를 포함하는 조성물이 비정상적인 세포 성장으로 인한 장애를 치료하는 데 사용될 수 있음을 나타낸다. 표지 또는 패키지 삽입물은 조성물이 기타의 장애를 치료하는 데 사용될 수 있음을 나타낼 수도 있다. 대안적으로 또는 추가적으로, 상기 제조 물품은 약학적으로 허용 가능한 완충액, 예컨대, 주사(BWFI)용 정균수, 인산염 완충 식염수, 링거 용액 및 덱스트로즈 용액이 포함된 제2 용기를 더 포함할 수 있다. 다른 완충액, 희석제, 필터, 바늘 및 주사기가 포함된 상업적 및 사용자 관점에서 바람직한 다른 물질들을 더 포함할 수 있다.

[0848] 키트는 Ab-CIDE 및 존재하는 경우 제2 약학적 제제의 투여를 위한 지시사항을 추가로 포함할 수 있다. 예를 들어, 만약 키트가 Ab-CIDE를 포함하는 제1 조성물 및 제2 약학적 제제를 포함하는 경우, 상기 키트는 치료가 필요한 환자에게 제1 및 제2 약학적 조성물의 동시적, 순차적 또는 개별적 투여를 위한 설명서를 더 포함할 수 있다.

[0849] 다른 구현예에서, 상기 키트는 Ab-CIDE의 고체 경구 형태, 예컨대, 정제 또는 캡슐의 전달에 적합하다. 이러한 키트는 바람직하게는, 다수의 단위 투여량을 포함한다. 이러한 키트는 이의 의도된 사용의 순서로 정향된 용량을 갖는 카드를 포함할 수 있다. 이러한 키트의 예는 “블리스터 팩”이다. 블리스터 팩은 포장 업계에서 일반적으로 공지되어 있고 약학적 단위 제형을 포장하는 데 폭넓게 이용된다. 원하는 경우에, 메모리 지원이, 예를 들어, 숫자, 문자 또는 다른 마킹의 형태에서, 또는 치료 일정에서 투여량이 투여될 수 있는 일자를 지정하는 일정표 삽입물로 제공될 수 있다.

[0850] 일 구현예에 따라서, 키트는 (a) 이에 Ab-CIDE가 함유된 제1 용기; 및 임의적으로 (b) 항 과증식 활성을 갖는 제2 화합물을 포함하는 제2 제약 제제가 내부에 함유된 제2 용기를 포함한다. 대안적으로 또는 추가적으로, 키트는 약학적으로 허용 가능한 완충액, 예컨대 정균성 주사용수 (BWFI), 인산염 완충 식염수, 링거액 및 덱스트로스 용액을 포함하는 제3(또는 제4) 용기를 더 포함할 수 있다. 다른 완충액, 희석제, 필터, 바늘 및 주사기가 포함된 상업적 및 사용자 관점에서 바람직한 다른 물질들을 더 포함할 수 있다.

[0851] 키트가 Ab-CIDE 및 제2 치료제를 포함하는 특정한 다른 구현예들에서, 키트는 분리된 병 또는 분리된 호일 패킷과 같은 별도의 조성물을 함유하기 위한 용기를 포함할 수 있고; 하지만, 별도의 조성물은 분할되지 않은 단일

용기 내에 함유될 수도 있다. 일반적으로, 키트에는 개별 구성 요소의 투여 안내가 포함되어 있다. 키트 형태는 개별 성분이 바람직하게는 상이한 투여 제형(예컨대, 경구 및 비경구)로 투여되거나, 상이한 투여 간격으로 투여되거나, 조합의 개별 성분의 적정이 처방 의사에 의해 요구되는 경우에 특히 유리하다.

[0852] **VII. 접합체의 제조 방법**

[0853] **합성 경로**

[0854] 본원에 기재된 요지는 또한 L1-CIDE로부터 CIDE, L1-CIDE 및 Ab-CIDE를 제조하는 방법에 관한 것이다. 일반적으로, 방법은 항체가 L1-CIDE 상의 임의의 이용가능한 부착점에 공유 결합되는 조건하에서 항체, 또는 이의 변이체, 돌연변이, 스플라이스 변이체, 인델 및 융합체를 L1-CIDE와 접촉시키는 단계를 포함하며, 여기서 Ab-CIDE가 제조된다. 본원에 기재된 요지는 또한 L1에 공유결합으로 부착된 Ab-L1 부분, 즉 항체, 또는 이의 변이체, 돌연변이, 스플라이스 변이체, 인델 및 융합체로부터 Ab-CIDE를 제조하는 방법에 관한 것이며, 상기 방법은 CIDE가 Ab-L1 상의 임의의 이용 가능한 부착점에 공유 결합되는 조건하에서 CIDE를 Ab-L1과 접촉시키는 단계를 포함하고, 여기서 Ab-CIDE가 제조된다. 상기 방법은 Ab-CIDE의 일상적인 분리 및 정제를 추가로 포함할 수 있다.

[0855] CIDE, L1-CIDE 및 Ab-CIDE 및 본원에 기재된 다른 화합물은 특히 본원에 포함된 설명에 비추어 화학 분야에 널리 공지된 것과 유사한 공정을 포함하는 합성 경로에 의해 그리고 하기에 기재된 다른 헤테로사이클에 대한 공정에 의해 합성될 수 있다: Comprehensive Heterocyclic Chemistry II, Editors Katritzky and Rees, Elsevier, 1997, e.g. Volume 3; Liebigs Annalen der Chemie, (9):1910-16, (1985); Helvetica Chimica Acta, 41:1052-60, (1958); Arzneimittel-Forschung, 40(12):1328-31, (1990). 출발 물질은 일반적으로 Aldrich Chemicals(Milwaukee, WI)와 같은 상업적 공급원으로부터 입수가능하거나 당업자에게 일반적으로 공지된 방법(예컨대, Louis F. Fieser and Mary Fieser, *Reagents for Organic Synthesis*, v. 1-23, Wiley, N.Y. (1967-2006 ed.에 기재된 방법), 또는 보충제 포함한(Beilstein 온라인 데이터베이스를 통해서도 입수 가능함) *Beilsteins Handbuch der organischen Chemie*, 4, Aufl. ed. Springer-Verlag, Berlin에 공지된 방법을 사용하여 용이하게 제조된다.

[0856] CIDE, L1-CIDE 및 Ab-CIDE 및 본원에 기재된 바와 같은 기타 화합물 및 필요한 시약 및 중간체의 합성에 유용한 합성 화학 변형 및 보호기 방법론(보호 및 탈보호)은 당업계에 공지되어 있으며, 예를 들어, R. Larock, Comprehensive Organic Transformations, VCH Publishers (1989); T. W. Greene and P. G .M. Wuts, Protective Groups in Organic Synthesis, 3rd Ed., John Wiley and Sons (1999); and L. Paquette, ed., Encyclopedia of Reagents for Organic Synthesis, John Wiley and Sons (1995) 및 이의 이후 버전에 기재된 것을 포함한다. CIDE, L1-CIDE, Ab-CIDE 및 기타 화합물을 제조할 때, 중간체의 원격 기능성(예컨대, 1차 또는 2차 아민)의 보호가 필요할 수 있다. 이러한 보호의 필요성은 원격 작용기의 특성과 제조 방법의 조건에 따라 달라진다. 적합한 아미노-보호 기에는 아세틸, 트리플루오로아세틸, t-부톡시카르보닐(BOC), 벤질옥시카르보닐(CBz or CBZ) 및 9-플루오레닐메틸렌옥시카르보닐(Fmoc)을 포함한다. 이러한 보호의 필요성은 당업자에 의해 용이하게 판단된다. 보호 기 및 이의 용도의 일반적인 설명에 대해서는, T. W. Greene, Protective Groups in Organic Synthesis, John Wiley & Sons, New York, 1991을 참조한다.

[0857] 일반 절차 및 실시예는 CIDE, L1-CIDE 및 Ab-CIDE 및 본원에 기재된 다른 화합물을 제조하기 위한 예시적인 방법을 제공한다. 당업자는 다른 합성 경로가 Ab-CIDE와 화합물을 합성하기 위해 사용될 수 있음을 이해할 것이다. 특정 출발 물질 및 시약이 반응식, 일반 절차, 및 실시예에 도시되고 논의되지만, 다양한 유도체 및/또는 반응 조건을 제공하기 위해서는 기타의 출발 물질 및 시약을 대체할 수 있다. 또한, 하기 기재된 방법에 의해 제조된 많은 예시적인 화합물은 본 개시 내용에 비추어 당업자에게 널리 공지된 통상적인 화학을 사용하여 추가로 개질될 수 있다.

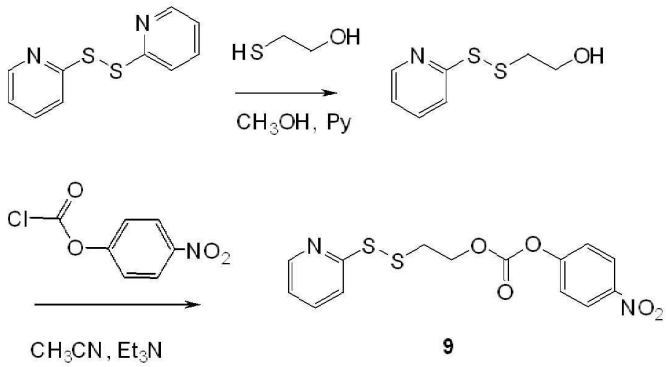
[0858] 일반적으로, Ab-CIDE는 WO 2013/055987; WO 2015/023355; WO 2010/009124; WO 2015/095227의 절차에 따라 CIDE를 L1 링커 시약과 연결하여 L1-CIDE를 제조함으로써 제조할 수 있고, 본원에 기재된 시스테인 조작된 항체를 포함하여 L1-CIDE를 항체 또는 변이체, 돌연변이, 스플라이스 변이체, 삽입결실 및 이의 융합체 중 임의의 것과 접합시키는 단계를 포함한다. 대안적으로, Ab-CIDE는 본원에 기재된 시스테인 조작된 항체를 포함하는 항체 또는 변이체, 돌연변이, 스플라이스 변이체, 인델 및 이들의 융합을 먼저 L1 링커 시약과 연결하고 이를 임의의 CIDE와 접합함으로써 제조될 수 있다.

[0859] 하기의 합성 경로는 CIDE, L1-CIDE 및 Ab-CIDE 및 기타 화합물 및 이의 성분을 제조하는 예시적인 방법을 설명한다. CIDE, L1-CIDE 및 Ab-CIDE 및 기타 화합물 및 이들의 성분을 제조하기 위한 다른 합성 경로는 본원의 다

른 곳에 개시되어 있다.

[0860] 1. 링커 L1

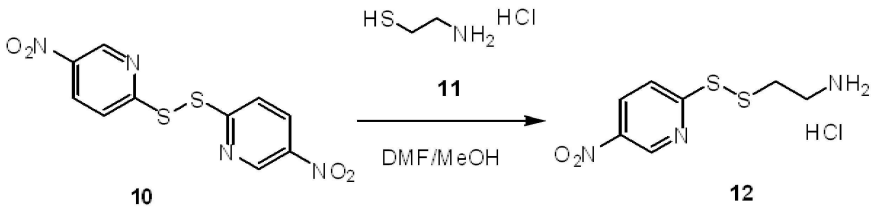
[0861] 링커 L1과 관련하여, 반응식 1-4는 항체 Ab에 대한 이황화 부착을 위한 예시적인 링커 L1에 대한 합성 경로를 도시한다. Ab는 이황화 결합을 통해 L1에 연결되고 CIDE는 CIDE에서 사용 가능한 부착물을 통해 L1에 연결된다.



[0862]

[0863] 반응식 1

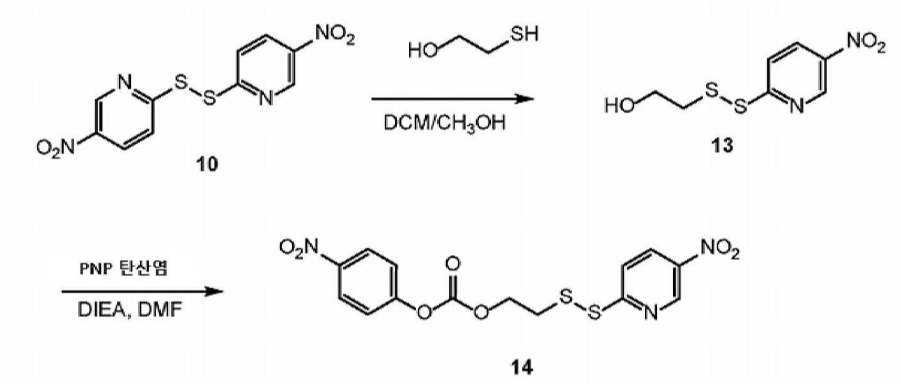
[0864] 반응식 1을 참조하여, 1,2-디(피리딘-2-일)디술판 및 2-머캅토에탄올을 피리딘 및 메탄올 중에서 실온에서 반응시켜 2-(피리딘-2-일디술파닐)에탄올을 수득하였다. 트리에틸아민 및 아세토니트릴에서 4-니트로페닐 카르보노클로리데이트로 아실화하여 4-니트로페닐 2-(피리딘-2-일디술파닐)에틸 카르보네이트 **9**를 수득하였다.



[0865]

[0866] 반응식 2

[0867] 반응식 2를 참조하여, 무수 DMF/MeOH(25 mL/25 mL) 중의 1,2-비스(5-니트로피리딘-2-일)디술판 **10**(1.0 g, 3.22 mmol)의 혼합물에 HOAc(0.1 mL)에 이어서 2-아미노에탄티올 염산염 **11**(183 mg, 1.61 mmol)을 첨가하였다. 반응 혼합물을 실온에서 밤새 교반한 후, 진공하에서 농축하여 용매를 제거하고 잔류물을 DCM(30 mL × 4)으로 세척하여 2-((5-니트로피리딘-2-일)디설파닐)에탄아민 염산염 **12**를 연황색 고체로서 수득하였다(300 mg, 69.6%). ^{1}H NMR (400 MHz, DMSO-d_6) δ 9.28 (d, J = 2.4 Hz, 1H), 8.56 (dd, J = 8.8, 2.4 Hz, 1H), 8.24 (s, 4H), 8.03 (d, J = 8.8 Hz, 1H), 3.15 - 3.13 (m, 2H), 3.08 - 3.06 (m, 2H).



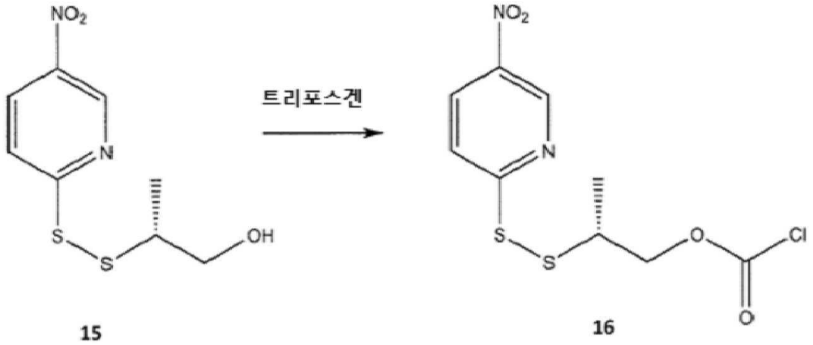
[0868]

[0869] 반응식 3

[0870] 반응식 3을 참조하여, 무수 DCM/CH_3OH(250 mL/250 mL) 중의 1,2-비스(5-니트로피리딘-2-일)디설판 **10**(9.6 g, 30.97 mmol) 및 2-메르캅토에탄올(1.21 g, 15.49 mmol)의 용액을 실온에서 24시간 동안 N_2 하에서 교반하였다.

혼합물을 진공하에서 농축한 후, 잔류물을 DCM(300 mL)으로 희석하였다. MnO_2(10 g)를 첨가하고 혼합물을 실온에서 0.5시간 동안 추가로 교반하였다. 혼합물을 실리카겔 상의 컬럼 크로마토그래피(DCM/MeOH = 100/1 내지 100/1)로 정제하여 2-((5-니트로피리딘-2-일)디설파닐)에탄올 **13**(2.2 g, 61.1%)을 갈색 오일로서 수득하였다. ^{1}H NMR (400 MHz, $CDCl_3$) δ 9.33 (d, J = 2.8 Hz, 1H), 8.38 - 8.35 (dd, J = 9.2, 2.8 Hz, 1H), 7.67 (d, J = 9.2 Hz, 1H), 4.10 (t, J = 7.2 Hz, 1H), 3.81 - 3.76 (q, 2H), 3.01 (t, J = 5.2 Hz, 2H).

[0871] 무수 DMF(10 mL) 중 **13**(500 mg, 2.15 mmol)의 용액에 DIEA(834 mg, 6.45 mmol)에 이어서 PNP 탄산염(비스(4-니트로페닐)탄산염(1.31 g, 4.31 mmol)을 첨가하였다. 반응 용액을 실온에서 4시간 동안 교반하고 혼합물을 분취용 HPLC(FA)로 정제하여 4-니트로페닐 2-((5-니트로피리딘-2-일)디설파닐)에틸 카보네이트 **14**(270 mg, 33.1%)를 연갈색 오일로서 수득하였다. ^{1}H NMR (400 MHz, $CDCl_3$) δ 9.30 (d, J = 2.4 Hz, 1H), 8.43 - 8.40 (dd, J = 8.8, 2.4 Hz, 1H), 8.30 - 8.28 (m, 2H), 7.87 (d, J = 8.8 Hz, 1H), 7.39 - 7.37 (m, 2H), 4.56 (t, J = 6.4 Hz, 2H), 3.21 (t, J = 6.4 Hz, 2H).



[0872]

[0873] 반응식 4

[0874] 반응식 4를 참조하여, 설퍼릴 클로라이드(DCM 중 1.0 M 용액 2.35 mL, 2.35 mmol)를 건조 DCM(7.5 mmol) 중 5-니트로피리딘-2-티올(334 mg, 2.14 mmol)의 교반된 현탁액에 아르곤 분위기하에서 0° C(얼음/아세톤)에서 적가하였다. 반응 혼합물은 황색 현탁액에서 황색 용액으로 바뀌었고 실온으로 가온한 다음, 2시간 동안 교반한 후, 용매를 진공 증발에 의해 제거하여 황색 고체를 제공하였다. 고체를 DCM(15 mL)에 재용해시키고 건조 DCM(7.5 mL) 중 (*R*)-2-머캅토프로판-1-올(213 mg, 2.31 mmol)의 용액으로 0℃에서 아르곤 분위기하에서 적가 처리하였다. 반응 혼합물을 실온으로 가온하고 LC/MS에 의한 분석이 체류 시간 1.41분에서 실질적인 생성물 형성을 나타내는 시점에서 20시간 동안 교반하였다. (ES+) m/z 247 ($[M+H]^{+\cdot}$, 약 100% 상대적 강도). 침전물을 여과로 제거하고 여액을 진공에서 증발시켜 주황색 고체를 수득하였고, 이를 H_2O(20 mL)로 처리하고 수산화암모늄 용액으로 염기성화하였다. 혼합물을 DCM(3 x 25 mL)으로 추출하고 취합한 추출물을 H2O(20 mL), 염수(20 mL)로 세척하고 건조($MgSO_4$) 및 여과하고 진공에서 증발시켜 조 생성물을 수득하였다. 플래시 크로마토그래피에 의한 정제(1% 증분의 구배 용리: 100% DCM 대 98:2 v/v DCM/MeOH)로 (R)-2-((5-니트로피리딘-2-일)디술파닐)프로판-1-올 **15**를 오일로 수득하였다(111 mg, 21% 수율).

[0875] DCM(10 mL) 중 트리포스겐, $Cl_3COCOOCCl_3$, Sigma Aldrich, CAS Reg. 32315-10-9(241 mg, 0.812 mmol)의 용액에 DCM(10 mL) 중 (R)-2-((5-니트로피리딘-2-일)디설파닐)프로판-1-올 15(500 mg, 2.03 mmol) 및 피리딘(153 mg, 1.93 mmol)의 용액을 20 °C에서 적가하였다. 반응 혼합물을 20°C에서 30분 동안 교반한 후, 농축하고 (R)-2-((5-니트로피리딘-2-일)디설파닐)프로필 카르보노클로리데이트 **16**을 추가 정제 없이 직접 사용하여 카르보노클로리데이트 기를 통해 CIDE에서 임의의 입수 가능한 기를 공유 결합할 수 있다.

[0876] 2. 시스테인 조작 항체

[0877] 환원 및 재산화에 의한 접합을 위한 시스테인 조작된 항체와 관련하여, 이들은 일반적으로 하기와 같이 제조될 수 있다. 경쇄 아미노산은 카바트에 따라 번호가 매겨진다(Kabat et al., *Sequences of proteins of immunological interest*, (1991) 5th Ed., US Dept of Health and Human Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD). 중쇄 아미노산은 카바트 시스템으로 명시된 경우를 제외하고 EU 넘버링 시스템에 따라

번호가 매겨진다(Edelman et al (1969) Proc. Natl. Acad. of Sci. 63(1):78-85). 단일 문자 아미노산 약어가 사용된다.

[0878] CHO 세포에서 발현된 전장 시스테인 조작된 단일클론 항체(THIOMAB™ 항체)는 시스테인 부가물(시스틴)을 보유하거나 세포 배양 조건으로 인해 조작된 시스테인에서 글루타티오닐화된다. 이와 같이, CHO 세포에서 정제된 THIOMAB™ 항체는 Cys 반응성 링커 L1-CIDE 중간체에 접합될 수 없다. 시스테인 조작된 항체는 DTT(클리랜드(Cleland) 시약, 디티오트레이톨) 또는 TCEP(트리스(2-카르복시에틸)포스핀 염산염; Getz et al (1999) Anal. Biochem. Vol 273:73-80; Soltec Ventures, Beverly, Ma)과 같은 환원제로 처리한 후, 탈수소아스코르빈산과 같은 약한 산화제를 사용하여 사슬간 이황화 결합을 재형성(재산화)하여 본원에 기재된 L1-CIDE 중간체와의 접합을 위해 반응성으로 만들어질 수 있다. CHO 세포에서 발현되는 전장 시스테인 조작 단일클론 항체(THIOMAB™ 항체)(Gomez et al (2010) Biotechnology and Bioeng. 105(4):748-760; Gomez et al (2010) Biotechnol. Prog. 26:1438-1445)는, 예를 들어, 실온에서 2 mM EDTA와 함께 50 mM Tris, pH 8.0에서 밤새 약 50배 과량의 DTT로 환원되어 Cys 및 글루타티온 부가물을 제거하고 항체에서 사슬간 이황화 결합을 감소시킨다. PLRP-S 컬럼을 사용하여 역상 LCMS로 부가물의 제거를 모니터링하였다. 환원된 THIOMAB™ 항체를 희석하고 적어도 4 용적의 10 mM 숙신산나트륨, pH 5 완충액을 첨가하여 산성화하였다.

[0879] 대안적으로, 항체를 희석하고 pH 5인 10 mM 숙시네이트의 적어도 4 부피를 첨가하고 pH가 대략 5가 될 때까지 10% 아세트산으로 적정함으로써 산성화시켰다. 이어서, pH 저하 및 희석된 THIOMAB™ 항체를 HiTrap S 양이온 교환 컬럼에 로딩하고 여러 컬럼 부피의 10 mM 아세트산나트륨(pH 5)으로 세척하고 50 mM 트리스(pH 8.0), 150 mM 염화나트륨으로 용출하였다. 재산화를 실시함으로써 모 Mab에 존재하는 시스테인 잔기 사이에 이황화 결합이 재확립되었다. 상기 기재된 용출된 환원된 THIOMAB™ 항체를 약 3시간 동안 15X 데히드로아스코르브산(DHAA)으로 처리하거나, 대안적으로 200 nM 내지 2 mM 수성 황산구리($CuSO_4$)로 실온에서 밤새 처리하였다. 당업계에 공지된 다른 산화제, 즉 산화제 및 산화 조건이 사용될 수 있다. 주위 공기 산화가 또한 효과적일 수 있다. 이러한 온화하고 부분적인 재산화 단계는 고충실도로 효율적으로 사슬내 이황화물을 형성한다. 재산화는 PLRP-S 컬럼을 사용한 역상 LCMS로 모니터링하였다. 재산화된 THIOMAB™ 항체를 pH 대략 5에 도달하도록 상기 기재된 바와 같이 석시네이트 완충액으로 희석하고, 용출이 pH 5(완충액 A)의 10 mM 석시네이트 중 10 mM 석시네이트, pH 5, 300 mM 염화나트륨(완충액 B)의 구배로 실시되는 것을 제외하고 상기 기재된 바와 같이 S 컬럼 상에서의 정제를 실시하였다. 용출된 Thiomab™ 항체에 EDTA를 최종 농도 2 mM이 되도록 첨가하고 필요에 따라 최종농도가 5 mg/mL 초과가 되도록 농축하였다. 접합할 준비가 된 생성된 THIOMAB™ 항체를 분취량으로 -20°C 또는 -80°C에 보관하였다. 액체 크로마토그래피/질량 분광계 분석은 6200 시리즈 TOF 또는 QTOF 애질런트(Agilent) LC/MS에서 실시하였다. 샘플은 80° C로 가열된 PRLP-S®, 1000A, 마이크로보어 컬럼(50mm × 2.1mm, 영국 슈롭셔 소재의 Polymer Laboratories)에서 크로마토그래피되었다. 30-40% B의 선형 구배(용매 A: 물 중 0.05% TFA, 용매 B: 아세토니트릴 중 0.04% TFA)를 사용하였고 용리액은 전기분무 공급원을 사용하여 직접 이온화되었다. 데이터는 MassHunter 소프트웨어(애질런트)에 의해 수집하고 디컨볼루션되었다. PriLC/MS 분석 전에, 항체 또는 접합체(50 마이크로그램)를 PNGase F(2 단위/ml; PROzyme, San Leandro, CA)로 37℃에서 2시간 동안 처리하여 N 결합 탄수화물을 제거하였다.

[0880] 대안적으로, 항체 또는 접합체를 LysC(항체 또는 접합체 50 μg(마이크로그램)당 0.25 μg)로 37℃에서 15분 동안 부분 분해하여 LCMS에 의한 분석을 위한 Fab 및 Fc 단편을 수득하였다. 디컨볼루션된 LCMS 스펙트럼의 피크를 할당하고 정량화하였다. CIDE 대 항체 비율(CAR)은 관찰된 모든 피크에 대한 CIDE 결합 항체에 해당하는 피크 또는 피크들의 강도 비율을 계산하여 산출하였다.

[0881] 3. 항체에 대한 링커 L1-CIDE 기의 접합

[0882] 링커 L1-CIDE 화합물을 항체에 접합하는 한 방법에서, 상기 환원 및 재산화 절차 후, 10 mM 석시네이트, pH 5, 150 mM NaCl, 2 mM EDTA 중의 시스테인 조작된 항체(THIOMAB™ 항체)는 1 M Tris를 사용하여 pH 7.5-8.5로 pH 조정한다. 약 3몰 내지 20 당량의 과량의 티올 반응성 기를 갖는 링커-CIDE 중간체(예컨대, 말레이미드 또는 4-니트로피리디 디설파이드, 또는 메탄티오설포닐(MTS) 디설파이드)를 DMF, DMA 또는 프로필렌 글리콜에 용해하고 환원, 재산화 및 pH 조정된 항체에 첨가한다. 반응은 실온 또는 37℃에서 배양하고 반응 혼합물의 LC-MS 분석에 의해 결정되는 바와 같이 완료될 때까지(1 내지 약 24시간) 모니터링한다. 반응이 완료되면, 접합체는 여러 방법 중 하나 또는 임의의 조합으로 정제하며, 목표는 남아있는 미반응 L1-CIDE 중간체 및 응집된 단백질(유의적 수준으로 존재하는 경우)을 제거하는 것이다. 예를 들어, 접합체는 최종 pH가 대략 5.5가 될 때까지 pH 5.5인 10 mM 히스티딘-아세테이트로 희석되고 Akta 정제 시스템(GE 헬스케어(Healthcare))에 연결된 HiTrap S 컬럼 또

는 S maxi 스핀 컬럼(피어스(Pierce))을 사용하는 S 양이온 교환 크로마토그래피로 정제할 수 있다. 대안적으로, 접합체는 Akta 정제 시스템 또는 Zeba 스핀 컬럼에 연결된 S200 컬럼을 사용하는 겔 여과 크로마토그래피에 의해 정제할 수 있다. 대안적으로, 투석을 사용할 수 있다. THIOMAB™ 항체 CIDE 접합체는 겔 여과 또는 투석을 사용하여 240 mM 수크로스와 함께 20 mM His/아세테이트, pH 5로 제형화하였다. 정제된 접합체는 원심 한외여과로 농축하고 무균 상태에서 0.2-μm 필터를 통해 여과한 후 냉동하여 보관한다. Ab-CIDE는 단백질 농도를 결정하기 위한 BCA 분석, 응집 분석을 위한 분석적 SEC(크기 배제 크로마토그래피) 및 CAR을 계산하기 위한 리신 C 엔도펩티다제(LysC) 처리 후 LC-MS로 특성화하였다.

[0883] 크기 배제 크로마토그래피는 0.75 ml/분의 유량으로 0.25 mM 염화칼륨 및 15% IPA와 함께 0.2 M 인산칼륨 pH 6.2 중에서 Shodex KW802.5 칼럼을 사용하여 실시한다. 접합체의 응집 상태는 280 nm에서 흡광도의 용출된 피크 면적의 적분에 의해 결정하였다.

[0884] LC-MS 분석은 애질런트 QTOF 6520 ESI 기구를 사용하여 실시할 수 있다. 예를 들어, CAR은 37° C에서 30분 동안 Tris, pH 7.5에서 1:500 w/w 엔도프로테이나제(Endoproteinase) Lys C(프로메가(Promega))로 처리한다. 생성된 절단 단편은 80° C로 가열된 1000Å(옹스트롬), 8 μm(미크론) PLRP-S(고가교 폴리스티렌) 컬럼에 로드되고 5분 안에 30% B에서 40% B의 구배로 용출한다. 이동상 A는 0.05% TFA가 포함된 H_2O이고 이동상 B는 0.04% TFA가 포함된 아세토니트릴이었다. 유량은 0.5 ml/분이었다. 단백질 용출은 전기분무 이온화 및 MS 분석 전에 280 nm에서 UV 흡광도 검출에 의해 모니터링하였다. 비접합된 Fc 단편, 잔류 비접합된 Fab 및 약물의 Fab의 크로마토그래피 분리능이 알반적으로 달성되었다. 상기 수득된 m/z 스펙트럼은 Mass Hunter™ 소프트웨어(Agilent Technologies)를 사용하여 디컨볼루션하여 질량 단편의 질량을 계산하였다.

[0885] **일반 합성 방법**

[0886] 화학 구조 $Ab-(L1-D)_p$를 갖는 접합체를 제조하는 일반적인 방법이 하기에 기재되어 있다.

[0887] 1.1 E3LB-CIDE 중간체를 제조하기 위해 L2를 E3LB에 결합시키는 일반적인 합성 방법

[0888] 특정 구현예들에서, L2는 먼저 제1 적합한 용매, 제1 염기 및 제1 결합 시약과 접촉하여 제1 용액을 제조한다. 특정 구현예들에서, L2를 제1 적합한 용매, 제1 염기 및 제1 결합 시약과 접촉시키는 것은 실온(약 25℃)에서 약 15분 동안 진행한다. 이후, E3LB는 상기 제1 용액과 접촉한다.

[0889] 특정 구현예들에서, E3LB와 제1 용액의 접촉은 실온(약 25℃)에서 약 1시간 동안 진행한다. 이후, 용액을 농축하고 임의적으로 정제한다.

[0890] 특정 구현예들에서, L2 대 제1 염기 대 제1 결합 시약의 몰비는 약 1:4:1.19이다. 특정 구현예들에서, L2 대 제1 염기 대 제1 결합 시약의 몰비는 약 1:2:0.5, 약 1:3:1, 약 1:4:2, 약 1:5:3, 또는 약 1:6:4이다.

[0891] 특정 구현예들에서, L2 대 E3LB의 몰비는 약 1:1이다. 특정 구현예들에서, L2 대 E3LB의 몰비는 약 1:0.5, 약 1:0.75, 약 1:2, 또는 약 0.5:1이다.

[0892] 1.2 E3LB-L2 중간체를 PB에 결합시켜 CIDE를 제조하는 일반적인 합성 방법

[0893] 특정 구현예들에서, E3LB-L2 중간체는 PB에 결합되어 CIDE를 제조한다. 특정 구현예들에서, PB는 먼저 제2의 적합한 용매, 제2 염기 및 제2 결합 시약과 접촉한다. 특정 구현예들에서, 상기 접촉은 실온(약 25℃)에서 약 10분 동안 진행한다. 이후, 용액을 E3LB-L2 중간체와 접촉시킨다. 특정 구현예들에서, E3LB-L2 중간체와 제2 용액의 접촉은 실온(약 25℃)에서 약 1시간 동안 진행한다. 이후, 용액을 농축하고 임의적으로 정제하여 CIDE를 제조한다.

[0894] 특정 구현예들에서, PB 대 제2 염기 대 제2 결합 시약의 몰비는 약 1:4:1.2이다. 특정 구현예들에서, PB 대 제2 염기 대 제2 결합 시약의 몰비는 약 1:3:0.75, 약 1:5:1, 약 1:3:2, 또는 약 1:5:3이다.

[0895] 특정 구현예들에서, PB 대 E3LB-L2 중간체의 몰비는 약 1:1이다. 특정 구현예들에서, PB 대 E3LB-L2 중간체의 몰비는 약 1:0.5, 약 1:0.75, 약 1:2, 또는 약 0.5:1이다.

[0896] 1.3 L1-CIDE를 제조하기 위해 CIDE를 L1에 결합시키는 일반적인 합성 방법

[0897] 특정 구현예들에서, CIDE는 제3의 적합한 용매에서 L1 및 제3의 염기와 접촉하여 용액을 제조한다. 특정 구현예들에서, 상기 접촉은 약 25℃에서 약 2시간 동안 진행된다. 이후, 용액을 임의적으로 정제하여 L1-CIDE를 준비

할 수 있다.

[0898] 특정 구현예들에서, CIDE 대 L1의 몰비는 약 1:4이다. 특정 구현예들에서, CIDE 대 L1의 몰비는 약 1:1, 1:2, 1:3, 1:5, 1:6, 1:7, 또는 약 1:8이다.

[0899] 1.4 L1-CIDE를 항체에 결합시키는 일반적인 합성 방법

[0900] 특정 구현예들에서, L1-CIDE는 티올 및 제4의 적합한 용매와 접촉하여 제4의 용액을 형성한다. 이후, 상기 용액을 항체와 접촉하여 접합체를 준비한다. 특정 구현예들에서,

[0901] 상기 티올은 말레이미드 또는 4-니트로피리디 이황화물이다. 특정 구현예들에서, 적합한 용매는 디메틸포름아미드, 디메틸아세트아미드 및 프로필렌 글리콜로 이루어진 군으로부터 선택된다.

[0902] 특정 구현예들에서, L1-CIDE 대 티올 반응기의 몰비는 약 3:1 내지 약 20:1이다.

[0903] 특정 구현예들에서, 상기 L1-CIDE, 티올 반응기 및 적합한 용매를 포함하는 용액을 항체와 접촉시키는 단계는 약 1 내지 약 24시간 동안 진행된다. 특정 구현예들에서, 상기 L1-CIDE, 티올 반응기 및 적합한 용매를 포함하는 용액을 항체와 접촉시키는 단계는 약 실온(약 25° C)에서 약 37° C까지 진행된다.

[0904] 상기 일반적인 방법들에 대한 특정 구현예들에서, 적합한 용매는 디메틸포름아미드, 테트라히드로푸란, 에틸아세테이트, 아세톤, 아세토니트릴, 디메틸설폭시드 및 프로필렌 카보네이트로 이루어진 군으로부터 선택되는 극성 비양성자성 용매이다.

[0905] 상기 일반적인 방법들에 대한 특정 구현예들에서, 염기는 *N,N*-디이소프로필에틸아민(DIEA), 트리에틸아민, 및 2,2,2,6,6-테트라메틸피페리딘으로 이루어진 군으로부터 선택된다. 특정 구현예들에서, 결합 시약은 1-[비스(디메틸아미노)메틸렌]-1H-1,2,3-트리아졸로[4,5-b]피리디늄3-헥사플루오로포스페이트 산화물(HATU), (벤조트리아졸-1-일옥시)트리스(디메틸아미노)포스포늄 헥사플루오로포스페이트(BOP), (7-아자벤조트리아졸-1-일옥시)트리피롤리디노포스포늄 헥사플루오로포스페이트(PyAOP), O-(벤조트리아졸-1-일)-N,N,N',N'-테트라메틸우로늄 헥사플루오로포스페이트(HBTU), O-(벤조트리아졸-1-일)- N,N,N',N'-테트라메틸우로늄 테트라플루오로보레이트(TBTU), O-(6-클로로벤조트리아졸-1-일)-N,N,N',N'-테트라메틸우로늄헥사플루오로포스페이트(HCTU), O-(N-Suc-시니미딜)-1,1,3,3-테트라메틸-우로늄 테트라플루오로보레이트(TSTU), O-(5-노르보르넨-2,3-디카르복스이미드)-N,N,N',N'-테트라메틸우로늄 테트라플루오로보레이트(TNTU), O-(1,2-디히드로-2-옥소-1-피리딜-N,N,N',N'-테트라메틸우로늄 테트라플루오로보레이트(TPTU), 및 카르보닐디이미다졸(CDI)로 이루어진 군으로부터 선택된다.

[0906] 바람직한 구현예에서, 용매는 디메틸포름아미드이고, 염기는 *N,N*-디이소프로필에틸아민이고, 결합 시약은 HATU이다.

[0907] 상기 일반적인 방법들에 대한 특정 구현예들에서, 접촉은 약 30초, 1분, 2분, 3분, 4분, 5분, 6분, 7분, 8분, 9분, 10분, 11분, 12분, 13분, 14분, 15분, 16 분, 17분, 18분, 19분, 20분, 30분, 60분, 90분, 120분, 180분, 4시간, 5시간, 6시간, 7시간, 8시간, 9시간, 10시간, 20시간, 40시간, 60시간 또는 72시간 동안 진행된다.

[0908] 상기 일반적인 방법들에 대한 특정 구현예들에서, 접촉은 약 20° C, 21° C, 22° C, 23° C, 24° C, 25° C, 26° C, 27° C, 28° C, 29° C, 30° C, 31° C, 32° C, 33° C, 34° C, 35° C, 36° C, 37° C, 38° C, 39° C, 40° C, 41° C, 42° C, 43° C, 44° C, 45° C, 46° C, 47° C, 48° C, 49° C, 50° C, 60° C, 70° C, 80° C, 90° C, 또는 100° C에서 진행된다.

[0909] 하기의 실시예는 제한이 아니라 예시를 위해 제공된다.

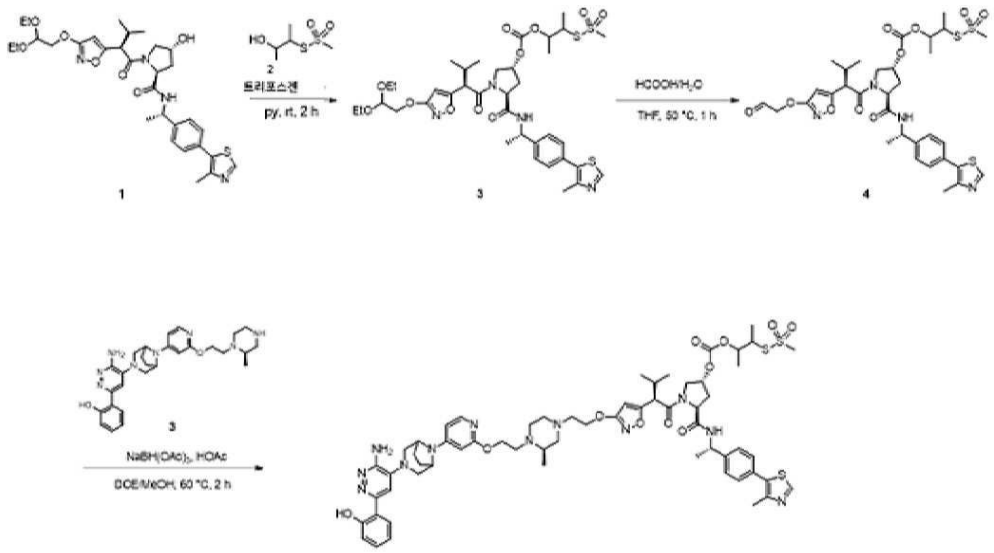
[0910] 실시예

[0911] 달리 명시되지 않는 한 모든 화합물은 올레핀 이성질체(약 1:1)의 혼합물이다 괄호 안에 나열된 ^{13}C 공명은 특정 화합물의 주요 이성질체의 올레핀 이성질체 및/또는 대체 N-Me 아미드 결합 회전이성질체를 나타낸다.

[0912] 합성 실시예 1

[0913] L1-CIDE-BRM1-1의 합성

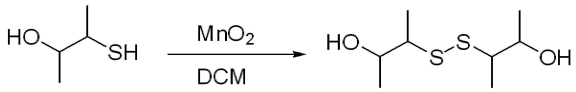
[0914] L1-CIDE-BRM1-1은 하기의 반응식, 반응식 1로 합성하였다:



[0915]

[0916] 반응식 1

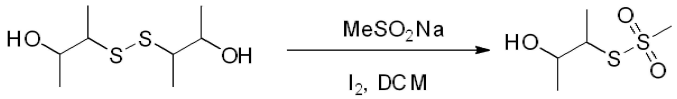
[0917] **3,3'-디설판디일비스(부탄-2-올)**은 하기와 같이 2단계로 합성하였다:



[0918]

[0919] 무수 디클로로메탄(40 mL) 중 3-메르캅토부탄-2-올(2.0 g, 19 mmol)의 23℃ 용액에 MnO_2(2.46 g, 28 mmol)를 첨가하였다. 반응 혼합물을 23° C에서 1 시간 동안 교반한 다음, 여과하였다. 여액을 진공에서 농축하여 *3,3'-디설판디일비스(부탄-2-올)*(1.97 g, 99%)을 무색 오일로서 수득하였다. ^{1}H NMR (400 MHz, $CDCl_3$) δ 4.13-4.08 and 3.83-3.78 (m, 2 H), 2.94-2.91 and 2.82-2.78 (m, 2 H), 2.38-2.26 and 2.14-2.02 (m, 2 H), 1.35-1.22 (m, 12 H).

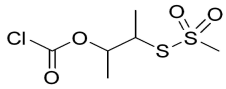
[0920] ***S*-(3-히드록시부탄-2-일)메탄술포노티오에이트**, 하기의 화합물 3(상기 반응식 1의 화합물 2임)은 하기와 같이 합성되었다:



[0921]

[0922] 무수 디클로로메탄(50 mL) 중 *3,3'-디설판디일비스(부탄-2-올)*(1.97 g, 9.36 mmol)의 23℃ 용액에 메탄설피산나트륨(1.91 g, 18.7 mmol) 및 요오드(2.38 g, 9.36 mmol)를 첨가하였다. 반응 혼합물을 암실에서 23° C에서 1 시간 동안 교반한 다음, 여과하였다. 여액을 농축하고, 잔류물을 DCM 중 0 내지 5% MeOH로 용출하는 실리카 상의 크로마토그래피로 정제하여 S-(3-히드록시부탄-2-일)메탄설포노티오에이트(1.20 g, 70%)를 연황색 오일로서 수득하였다. ^{1}H NMR (400 MHz, $CDCl_3$) *δ* 4.13-4.11 and 3.96-3.93 (m, 1 H), 3.77-3.73 and 3.51-3.47 (m, 1 H), 3.42 and 3.39 (s, 3 H), 2.04 and 1.96 (brs, 1 H), 1.53 and 1.42 (d, *J* = 7.2 Hz, 3 H), 1.33 and 1.23 (d, *J* = 6.0 Hz, 3 H).

[0923] ***S*-(3-((클로로카르보닐)옥시)부탄-2-일)메탄술포노티오에이트의 합성.**



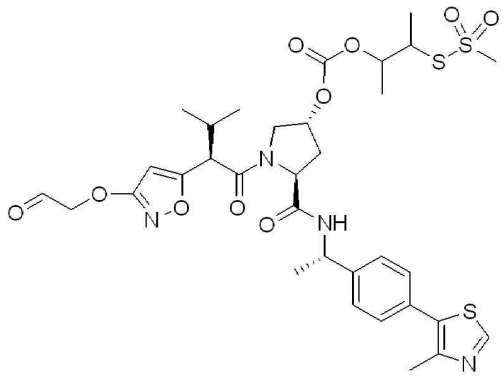
[0924]

[0925] 23℃에서 디클로로메탄(2 mL) 중 *S*-(3-히드록시부탄-2-일)메탄술포노티오에이트(300 mg, 1.63 mmol) 및 피리딘(516 mg, 6.51 mmol)의 용액에 디클로로메탄(2 mL) 중 트리포스겐(242 mg, 0.81 mmol)의 용액을 첨가하였다. 반응물을 23℃에서 30분 동안 교반하였다. 반응 혼합물을 농축 건조시켜 표제 화합물(380 mg, 95%)을 황색 오일로서 수득하고, 이를 다음 단계에서 직접 사용하였다.

[0926] **S-(3-(((((3*R*,5*S*)-1-((*R*)-2-(3-(2,2-디에톡시에톡시)이속사졸-5-일)-3-메틸부타노일)-5-(((*S*)-1-(4-(4-메틸티아졸-5-일)페닐)에틸)카르바모일)피롤리딘-3-일)옥시)카르보닐)옥시)부탄-2-일)메탄술포노티오에이트**

[0927] 23° C에서 무수 디클로로메탄(5 mL) 중 (2*S*,4*R*)-1-((*R*)-2-(3-(2,2-디에톡시에톡시)이속사졸-5-일)-3-메틸부타노일)-4-히드록시-*N*-((*S*)-1-(4-(4-메틸티아졸-5-일)페닐)에틸)피롤리딘-2-카르복스아미드[상기 실시예 1 반응식의 화합물 **1**; 제조를 위해 US 2020/0038378의 p293-294(페이지 상단 번호 매기기)를 참조.] (300 mg, 0.49 mmol) 및 4 Å MS(100 mg)의 혼합물에 트리에틸아민(198 mg, 1.95 mmol), 및 무수 디클로로메탄(2 mL) 중 *S*-(3-((클로로카르보닐)옥시)부탄-2-일)메탄술포노티오에이트(362 mg, 1.46 mmol)를 23° C에서 천천히 첨가하였다. 혼합물을 23℃에서 16시간 동안 교반한 다음, 감압 하에 농축하였다. 잔류물을 실리카겔(석유 에테르 중 0~70% 에틸 아세테이트)의 플래시 크로마토그래피로 정제하여 표제 화합물(120 mg, 30%)을 백색 고체로서 수득하였다. LCMS (ESI) *m/z*: 825.3 $[M+H]^+$.

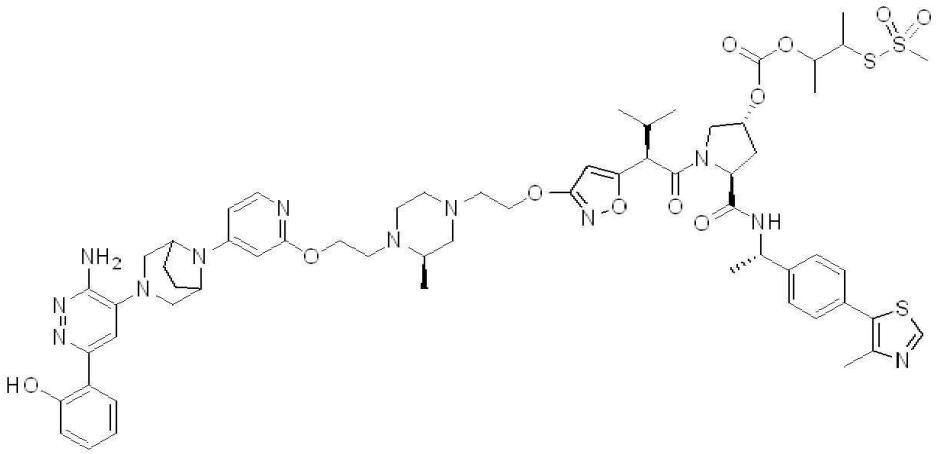
[0928] **S-(3-(((((3*R*,5*S*)-1-((*R*)-3-메틸-2-(3-(2-옥소에톡시)이속사졸-5-일)부타노일)-5-(((*S*)-1-(4-(4-메틸티아졸-5-일)페닐)에틸)카르바모일)피롤리딘-3-일)옥시)카르보닐)옥시)부탄-2-일)메탄술포노티오에이트의 합성**



[0929]

[0930] S-(3-(((((3*R*,5*S*)-1-((*R*)-2-(3-(2,2-디에톡시에톡시)이속사졸-5-일)-3-메틸부타노일)-5-(((*S*)-1-(4-(4-메틸티아졸-5-일)페닐)에틸)카르바모일)피롤리딘-3-일)옥시)카르보닐)옥시)부탄-2-일)메탄술포노티오에이트(120 mg, 0.15 mmol)에 23℃에서 물(1 mL) 중 포름산(2 mL, 2 mmol)을 첨가하였다. 혼합물을 50℃에서 1시간 동안 교반한 다음, 농축하여 표제 화합물(105 mg, 96%)을 황색 오일로서 수득하였다. LCMS (ESI) *m/z*: 751.2 $[M+H]^+$.

[0931] **S-(3-(((((3*R*,5*S*)-1-((2*R*)-2-(3-(2-((3*R*)-4-(2-((4-(3-(3-아미노-6-(2-히드록시페닐)피리다진-4-일)-3,8-디아자비시클로[3.2.1]옥탄-8-일)피리딘-2-일)옥시)에틸)-3-메틸피페라진-1-일)에톡시)이속사졸-5-일)-3-메틸부타노일)-5-(((*S*)-1-(4-(4-메틸티아졸-5-일)페닐)에틸)카르바모일)피롤리딘-3-일)옥시)카르보닐)옥시)부탄-2-일)메탄술포노티오에이트의 합성**



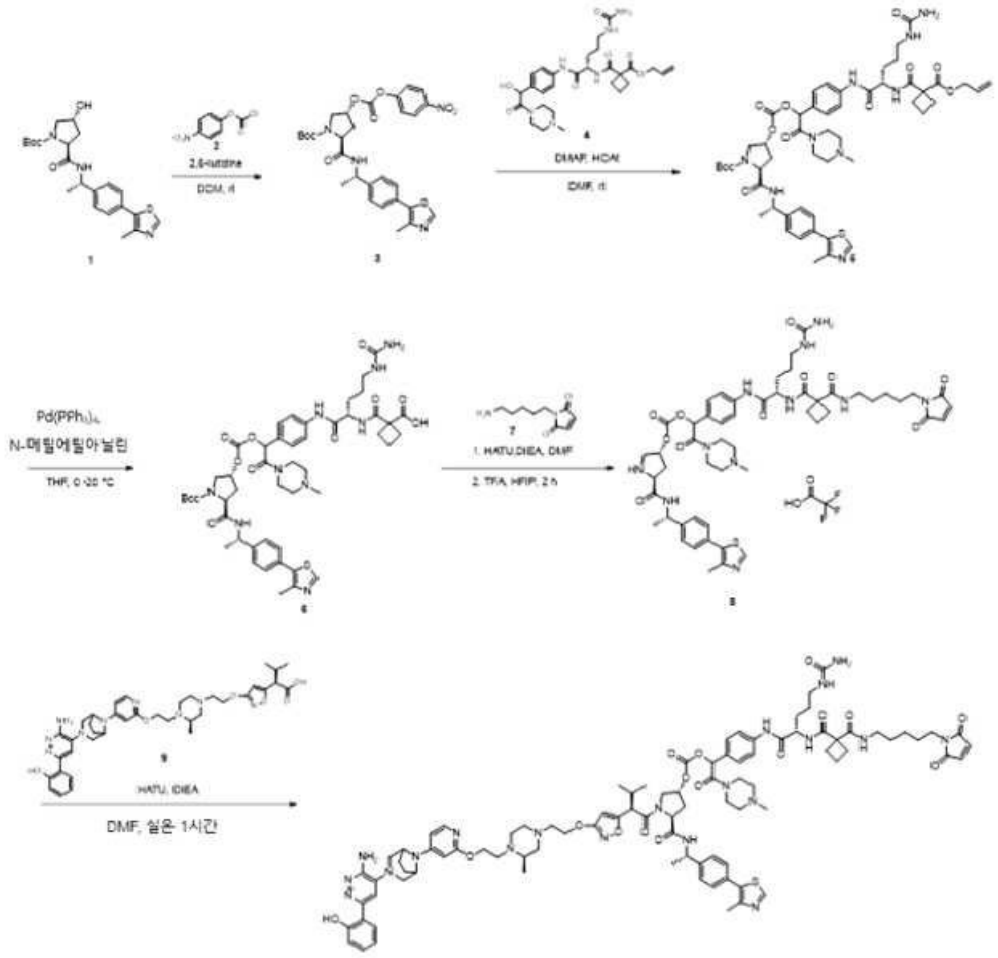
[0932]

[0933] 디클로로메탄(2 mL) 및 메탄올(2 mL) 중 *S*-(3-(((((3*R*,5*S*)-1-((*R*)-3-메틸-2-(3-(2-옥소에톡시)이속사졸-5-일)부타노일)-5-(((*S*)-1-(4-(4-메틸티아졸-5-일)페닐)에틸)카르바모일)피롤리딘-3-일)옥시)카르보닐)옥시)부탄-2-일)메탄술포노티오에이트(105 mg, 0.14 mmol) 및 2-(6-아미노-5-(8-(2-(2-((*R*)-2-메틸피페라진-1-일)에톡시)피리딘-4-일)-3,8-디아자비시클로[3.2.1]옥탄-3-일)피리다진-3-일)페놀[상기 실시예 1 반응식의 화합물 **3**. 이는 하기의 실시예 4 반응식에서 화합물 **4**임.] (73 mg, 0.14 mmol) 및 HOAc(0.2-0.3 mL)의 23° C 용액에 $NaBH(OAc)_3$(593 mg, 2.80 mmol)을 첨가하였다. 반응 혼합물을 23ºC에서 3시간 동안 교반한 다음, 농축하였다. 잔류물을 분취용 TLC(디클로로메탄 중 8% 메탄올)로 정제하여 표제 화합물(48 mg, 27%)을 백색 고체로서 수득하였다. ^{1}H NMR (400 MHz, DMSO-d_6): δ 14.21 - 14.08 (m, 1H), 9.01 - 8.97 (m, 1H), 8.59 - 8.46 (m, 1H), 7.92 (d, J = 4.8 Hz, 1H), 7.79 (d, J = 6.0 Hz, 1H), 7.55 - 7.33 (m, 5H), 7.28 - 7.19 (m, 1H), 6.96 - 6.79 (m, 2H), 6.60 - 6.48 (m, 1H), 6.18 - 6.08 (m, 2H), 6.05 - 5.91 (m, 2H), 5.24 - 5.11 (m, 1H), 4.99 - 4.86 (m, 2H), 4.57 - 4.44 (m, 2H), 4.43 - 4.35 (m, 1H), 4.31 - 4.17 (m, 4H), 3.94 - 3.79 (m, 2H), 3.77 - 3.67 (m, 2H), 3.61 - 3.51 (m, 2H), 3.29 - 3.23 (m, 4H), 3.21 - 3.14 (m, 3H), 3.04 - 2.93 (m, 3H), 2.87 - 2.78 (m, 1H), 2.64 - 2.58 (m, 3H), 2.48 - 2.41 (m, 3H), 2.38 - 2.31 (m, 2H), 2.20 - 2.16 (m, 2H), 2.07 - 1.82 (m, 2H), 1.49 - 1.21 (m, 10H), 1.06 - 0.90 (m, 6H), 0.88 - 0.76 (m, 3H); LCMS (ESI) *m/z*: 1251.0 $[M+H]^+$.

[0934] 합성 실시예 2

[0935] L1-CIDE-BRM1-2의 합성

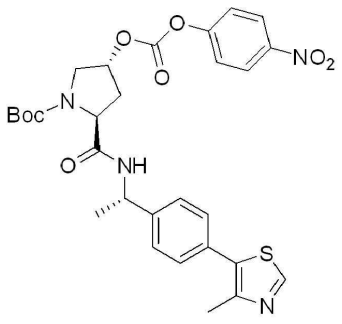
[0936] L1-CIDE-BRM1-2는 하기의 반응식, 반응식 2로 합성하였다:



[0937]

[0938] 반응식 2

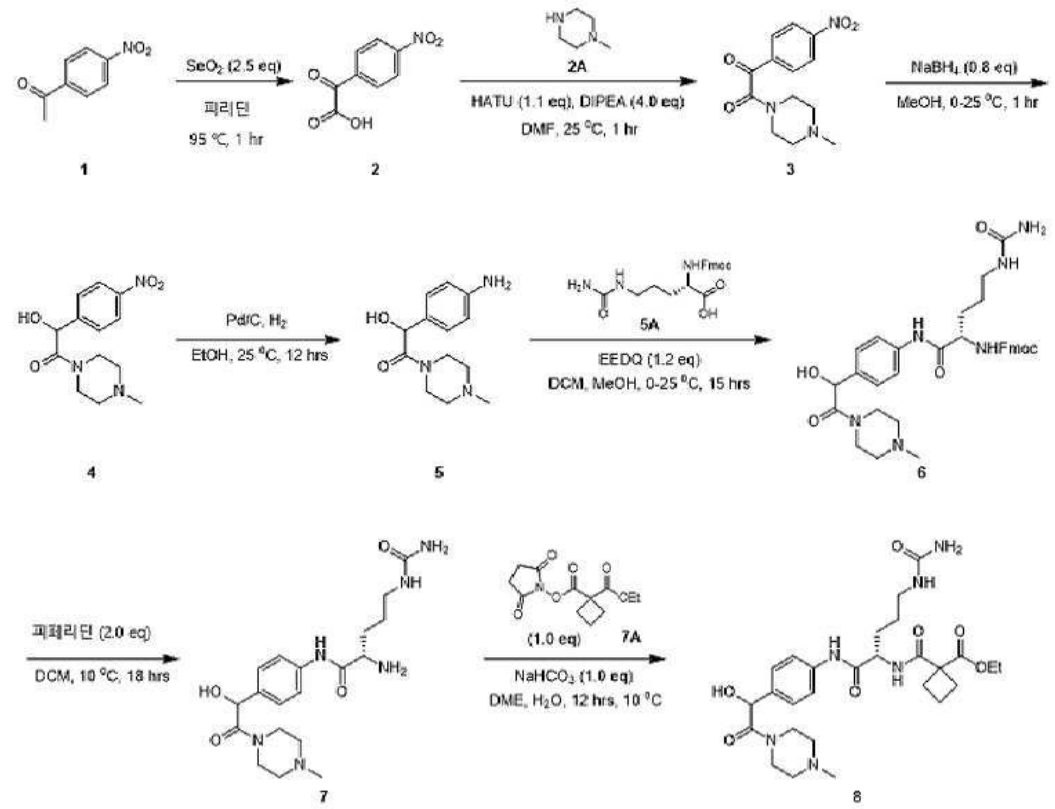
[0939] **(2*S*,4*R*)-*tert*-부틸 2-(((*S*)-1-(4-(4-메틸티아졸-5-일)페닐)에틸)카르바모일)-4-(((4-니트로페녹시)카르보닐)옥시)피롤리딘-1-카르복실레이트의 합성**



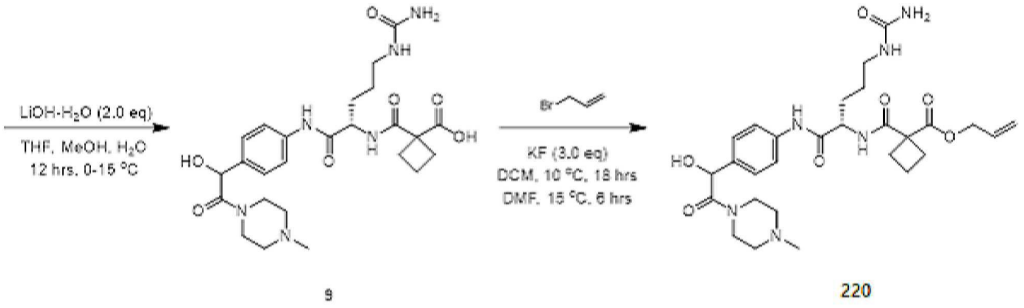
[0940]

[0941] 23° C에서 무수 디클로로메탄(80 mL) 중 4-니트로페닐 카르보노클로리데이트(1.68 g, 8.34 mmol) 및 (2*S*,4*R*)-*tert*-부틸-4-히드록시-2-(((*S*)-1-(4-(4-메틸티아졸-5-일)페닐)에틸)카르바모일)피롤리딘-1-카르복실레이트(상기 실시예 반응식 2의 화합물 **1**을 참조; 제조를 위해 J. Med. Chem. 2019, 62, 941 또는 J. Med. Chem. 2014, 57, 8657을 참조)(3.0 g, 6.95 mmol)의 용액에 2,6-루티딘(1.12 g, 10.4 mmol)을 첨가하였다. 반응 혼합물을 23° C에서 18시간 동안 교반한 다음, 농축하여 표제 화합물(4.0 g, 99%)을 황색 고체로서 수득하였다. 상기 물질을 다음 단계에서 직접 사용하였다. LCMS (ESI) *m/z*: 597.2 $[M+H]^+$.

[0942] **화합물 4, 반응식 2: 반응식 2a를 통한 알릴 1-(((2S)-1-((4-(1-히드록시-2-(4-메틸피페라진-1-일)-2-옥소에틸)페닐)아미노)-1-옥소-5-우레이도펜탄-2-일)카르바모일)시클로부탄카르복실레이트의 합성.**



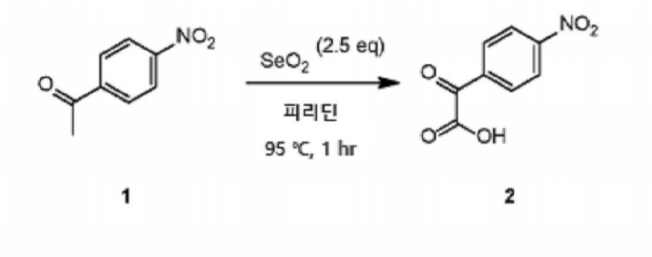
[0943]



[0944]

[0945] 반응식 2a

[0946] ***i. 반응식 2a의 화합물 2의 일반적인 제조 절차***

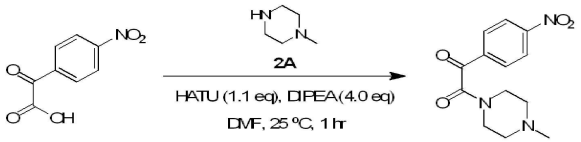


[0947]

[0948] 4개의 개별 반응을 병렬로 실시하였다. 피리딘(3.00 L) 중 화합물 **1**(200 g, 1.21 mol)의 용액에 SeO_2(336 g, 3.03 mol)를 23℃에서 첨가하였다. 이후, 혼합물을 95℃의 오일 수조에서 1시간 동안 가열하였다. 4가지 반응을 워크업을 위해 조합하였다. 조합된 반응물을 45-50℃에서 여과한 다음, 여액을 23℃로 냉각시키고 상기 온도에서 1.5시간 동안 유지하였다. 혼합물을 여과하고 필터 케이크를 진공에서 건조시켜 화합물 **2**를 수득하였다. 여액을 5.00 L로 감압 농축하고 23℃에서 12시간 동안 교반하였다. 혼합물을 여과하고 필터 케이크를 진공에서 건조하여 추가 화합물 **2**(둘 모두의 로트 조합 = 830 g, 88% 수율)를 황색 고체로서 수득하였다. ^{1}H NMR (400 MHz, DMSO-d_6): δ 8.63-8.64 (m, 2H), 8.37-8.40 (m, 2H), 8.17-8.19 (m, 2H), 7.90-7.94 (m, 1H), 7.48-7.52 (m,

2H).

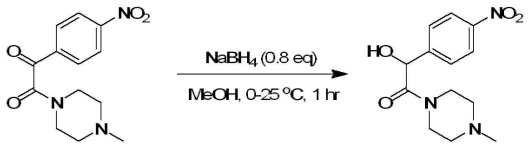
[0949] *ii. 반응식 2a의 화합물 3의 일반적인 제조 절차*



[0950] 2 3

[0951] 두 반응을 병렬로 실시하였다. DMF(700 mL) 중 화합물 **2**(140 g, 538 mmol)의 23° C 용액에 화합물 **2A**(54 g, 538 mmol), HATU(225 g, 592 mmol) 및 DIPEA(278 g, 2.15 mmol)를 첨가하였다. 혼합물을 23° C에서 1시간 동안 교반하였다. 이후, 두 반응을 워크업을 위해 조합하였다. 취합한 반응 혼합물을 DCM(3.00 L)으로 희석하고 염수(1.00 L × 3)로 세척하였다. 유기층을 Na_2SO_4 상에서 건조시키고, 여과하고, 감압 하에 농축하였다. 잔류물을 컬럼 크로마토그래피(SiO_2, 석유 에테르/에틸 아세테이트 = 50/1 내지 0/1)로 정제하여 화합물 **3**(200 g, 67% 수율)을 황색 고체로 수득하였다.

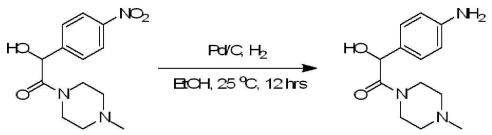
[0952] *iii. 반응식 2a의 화합물 4의 일반적인 제조 절차*



[0953] 3 4

[0954] MeOH(1.30 L) 중 화합물 **3**(184 g, 531 mmol)의 용액에 $NaBH_4$(16.1 g, 425 mmol)를 0℃에서 첨가하였다. 혼합물을 23℃로 가온하고 상기 온도에서 1시간 동안 교반하였다. 반응 혼합물을 감압하에서 농축하고, 잔류물을 물로 희석하고, HCl(1 M)로 pH = 7로 조정하고, EtOAc(1.00 L x 3)로 추출하였다. 취합한 유기층을 Na_2SO_4 상에서 건조하고 여과하고 감압하에 농축하였다. 잔류물을 컬럼 크로마토그래피(SiO_2, 디클로로메탄/메탄올 = 100/1 내지 10/1)로 정제하였다. 조 생성물을 23℃에서 10분 동안 EtOH(500 mL)로 분쇄하여 화합물 **4**(161 g, 54% 수율)를 황색 고체로서 수득하였다. ^{1}H NMR: (400 MHz, DMSO-d_6): δ 8.24 (d, J = 8.4 Hz, 2H), 7.64 (d, J = 8.4 Hz, 2H), 6.14 (d, J = 6.4 Hz, 1H), 5.60 (d, J = 6.0 Hz, 1H), 3.57-3.47 (m, 2H), 3.43 (s, 2H), 2.23 (s, 2H), 2.12 (s, 5H).

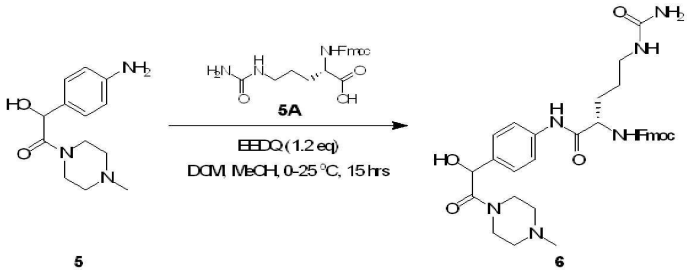
[0955] *iv. 반응식 2a의 화합물 5의 일반적인 제조 절차*



[0956] 4 5

[0957] 4개의 반응을 병렬로 실시하였다. EtOH(600 mL) 중 화합물 **4**(40 g, 143 mmol)의 용액에 Pd/C(8.50 g, 10%)를 N_2 분위기하에서 첨가하였다. 현탁액을 탈기하고 H_2로 3 회 퍼징하였다. 혼합물을 H_2(15 psi) 하에 23° C에서 12시간 동안 교반하였다. 이후, 4개의 반응을 워크업을 위해 조합하였다. 취합한 반응 혼합물을 여과하고 필터 케이크를 MeOH(1.00 L)로 세척하였다. 취합한 여액 및 세척액을 감압하에 농축하여 화합물 **5**(140 g, 98% 수율)를 황색 고체로서 수득하였다. ^{1}H NMR: (400 MHz, CD_3OD): δ 7.11 (d, J = 8.4 Hz, 2H), 6.72 (d, J = 8.4 Hz, 2H), 5.29 (s, 1H), 3.74 (s, 1H), 3.62-3.49 (m, 1H), 3.47-3.35 (m, 2H), 2.48 (s, 1H), 2.35-2.25 (m, 2H), 2.22 (s, 3H), 1.90 (s, 1H).

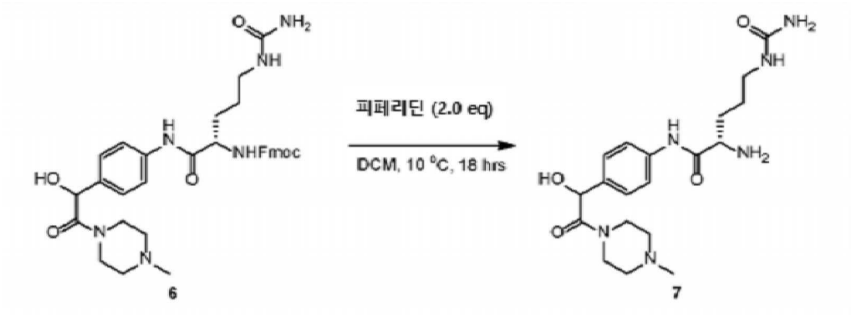
[0958] *v. 반응식 2a의 화합물 6의 일반적인 제조 절차*



[0959]

[0960] MeOH(350 mL) 및 DCM(700 mL) 중 Fmoc-L-시트룰린(화합물 **5A**)(95 g, 239 mmol) 및 화합물 **5**(72 g, 287 mmol)의 용액에 0℃에서 EEDQ(71 g, 287 mmol)를 한번에 첨가하였다. 혼합물을 23℃로 가온하고 상기 온도에서 N_2 하에서 15시간 동안 교반하였다. 반응 혼합물을 감압하에 농축하였다. 조 생성물을 15℃에서 2시간 동안 MTBE(1.00 L)로 분쇄하여 화합물 **6**(185 g, 조)을 주황색 고체로서 수득하였다.

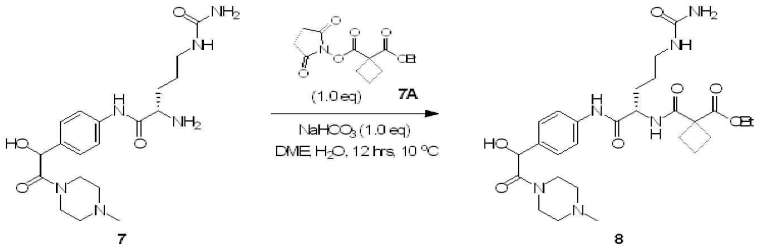
[0961] *vi. 반응식 2a의 화합물 7의 일반적인 제조 절차*



[0962]

[0963] DCM(1.40 L) 중 화합물 **6**(190 g, 302 mmol)의 교반 용액에 10℃에서 피페리딘(52 g, 604 mmol)을 첨가하였다. 혼합물을 10℃에서 18시간 동안 교반한 다음, 감압하에 농축하였다. 잔류물을 컬럼 크로마토그래피(SiO_2, 디클로로메탄/메탄올 = 100/1 내지 3/1)로 정제하여 화합물 **7**(85 g, 68% 수율)을 황색 오일로서 수득하였다. ^{1}H NMR (400 MHz, CD_3OD): δ 7.65 (d, J = 8.4 Hz, 2H), 7.37 (d, J = 8.4 Hz, 2H), 5.43 (s, 1H), 3.68 (s, 1H), 3.62 (d, J = 4.0 Hz, 1H), 3.53-3.44 (m, 2H), 3.24-3.06 (m, 2H), 2.81 (d, J = 5.2 Hz, 2H), 2.45 (s, 1H), 2.36-2.25 (m, 2H), 2.22 (s, 3H), 1.97 (s, 1H), 1.86-1.75 (m, 1H), 1.68-1.54 (m, 6H).

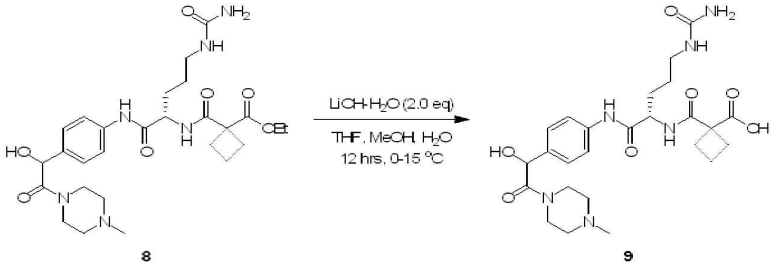
[0964] *vii. 반응식 2a의 화합물 8의 일반적인 제조 절차*



[0965]

[0966] DME(470 mL) 및 H_2O(290 mL) 중 화합물 **7**(76 g, 187 mmol)의 10° C 용액에 화합물 **7A**(63 g, 234 mmol) 및 $NaHCO_3$(20 g, 234 mmol)을 첨가하였다. 혼합물을 10℃에서 12시간 동안 교반한 다음, 감압하에 농축하였다. 잔류물을 컬럼 크로마토그래피(SiO_2, 디클로로메탄/메탄올 = 10/1 내지 3/1)로 정제하여 화합물 **8**(92 g, 70% 수율)을 황색 고체로서 수득하였다.

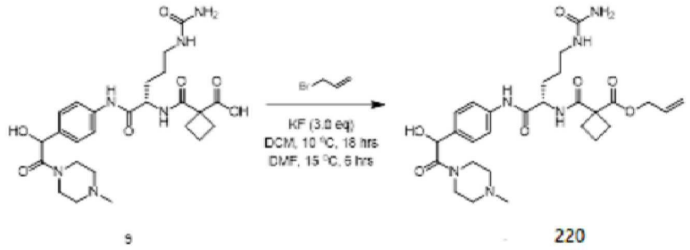
[0967] *viii. 반응식 2a의 화합물 9의 일반적인 제조 절차*



[0968]

[0969] THF(190 mL) 및 MeOH(95 mL) 중 화합물 **8**(63 g, 112 mmol)의 교반된 용액에 H_2O(190 mL) 중 LiOH•H_2O(9.43 g, 225 mmol)의 용액을 0℃에서 첨가하였다. 반응 혼합물을 15℃로 가온하고 상기 온도에서 12시간 동안 교반하였다. 이후, 반응 혼합물을 감압하에 농축하였다. 역상 HPLC(0.1% TFA 조건)로 잔류물을 정제하여 화합물 **9**(50.g, 81% 수율)를 백색 고체로서 수득하였다. ^{1}H NMR (400 MHz, CD_3OD): δ 7.68 (d, J = 7.6 Hz, 2H), 7.37 (d, J = 8.4 Hz, 2H), 5.48 (s, 1H), 4.50-4.53 (m, 1H), 3.78 (s, 2H), 3.69-3.56 (m, 1H), 3.27-3.10 (m, 5H), 2.79 (s, 3H), 2.71-2.62 (m, 2H), 2.60-2.50 (m, 2H), 2.17-2.07 (m, 1H), 2.06-2.03 (m, 4H), 2.03-1.97 (m, 1H), 1.97-1.86 (m, 1H), 1.74-1.78 (m, 1H), 1.69-1.53 (m, 2H).

[0970] *ix. 반응식 2의 화합물 4의 일반적인 제조 절차(220)*

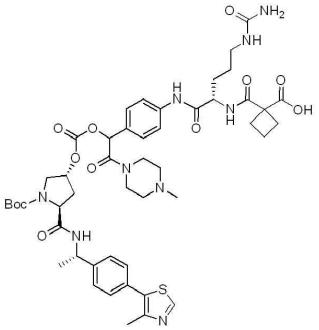


[0971]

[0972] DMF(350 mL) 중 화합물 **9**(70 g, 131 mmol)의 15° C 용액에 KF(23 g, 394 mmol) 및 Bu_4NHSO_4(12.5 g, 36.8 mmol)를 첨가하였다. 이후, 3-브로모프로프-1-엔(398 g, 3.29 mol)을 15℃에서 적가하고, 혼합물을 상기 온도에서 추가로 6시간 동안 교반하였다.

[0973] 반응 혼합물을 여과하고 여액을 감압하에서 농축하였다. 잔류물을 분취용 HPLC(컬럼: 페노메넥스 루나(Phenomenex luna) c18 250 mm*100 mm*10 um; 이동상: [물(0.1% TFA)-ACN]; B%: 0%-20%, 30분)로 정제하여 **220**(26 g, 34% 수율)을 백색 고체로서 수득하였다. ^{1}H NMR (400 MHz, CD_3OD): δ 7.69 (d, J = 8.4 Hz, 2H), 7.39 (d, J = 8.4 Hz, 2H), 6.02 (s, 1H), 5.75 (d, J = 10.0 Hz, 2H), 5.49 (s, 1H), 4.50-4.54 (m, 1H), 4.34-4.09 (m, 1H), 4.03 (s, 2H), 3.96-3.51 (m, 3H), 3.50-3.33 (m, 3H), 3.26-3.06 (m, 6H), 2.75-2.49 (m, 4H), 2.22-2.08 (m, 1H), 2.06-1.87 (m, 2H), 1.81-1.72 (m, 1H), 1.70-1.52 (m, 2H). LCMS: ($M+H^+$ = 573.3)

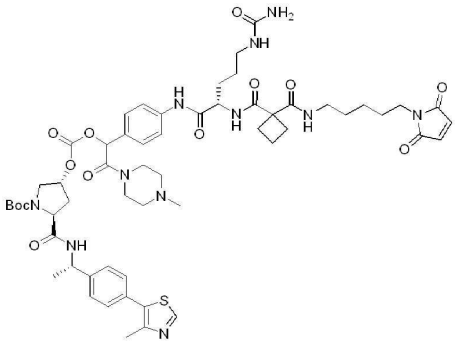
[0974] **화합물 6, 반응식 2: 1-(((2*S*)-1-((4-(1-(((((3*R*,5*S*)-1-(*tert*-부톡시카르보닐)-5-(((*S*)-1-(4-(4-메틸티아졸-5-일)페닐)에틸)카르바모일)피롤리딘-3-일)옥시)카르보닐)옥시)-2-(4-메틸피페라진-1-일)-2-옥소에틸)페닐)아미노)-1-옥소-5-우레이도펜탄-2-일)카르바모일)시클로부탄카르복실산의 합성**



[0975]

[0976] 디클로로메탄(5 mL) 및 메틸 알코올(5 mL) 중 (2*S*,4*R*)-*tert*-부틸 4-(((1-(4-((*S*)-2-(1-((알릴옥시)카르보닐)시클로부탄카르복사미도)-5-우레이도펜탄아미도)페닐)-2-(4-메틸피페라진-1-일)-2-옥소에톡시)카르보닐)옥시)-2-(((*S*)-1-(4-(4-메틸티아졸-5-일)페닐)에틸)카르바모일)피롤리딘-1-카르복실레이트(76 mg, 0.07 mmol) 및 1,3-디메틸피리미딘-2,4,6(1*H*,3*H*,5*H*)-트리온(58 mg, 0.37 mmol)의 용액에 23° C에서 $Pd(PPh_3)_4$(17 mg, 0.01 mmol)을 첨가하였다. 반응 혼합물을 23ºC에서 10시간 동안 질소 분위기하에 교반한 다음, 농축하였다. 잔류물을 하기의 조건: 칼럼: 페노메넥스 제미니(Phenomenex Gemini)-NX 80*30 mm*3 um, 이동상: (25-45%) 물(10 mM NH_4HCO_3)-ACN을 갖는 분취용 HPLC로 정제하여 표제 화합물(50 mg, 69%)을 황색 고체로서 수득하였다. LCMS (ESI) *m/z*: 990.6 $[M+H]^+$.

[0977] **(2*S*,4*R*)-*tert*-부틸 4-(((1-(4-((*S*)-2-(1-((5-(2,5-디옥소-2,5-디히드로-1*H*-피롤-1-일)펜틸)카르바모일)시클로부탄카르복사미도)-5-우레이도펜탄아미도)페닐)-2-(4-메틸피페라진-1-일)-2-옥소에톡시)카르보닐)옥시)-2-(((*S*)-1-(4-(4-메틸티아졸-5-일)페닐)에틸)카르바모일)피롤리딘-1-카르복실레이트의 합성**

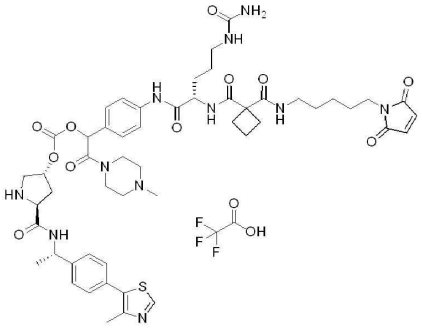


[0978]

[0979] 23° C에서 DMF(8 mL) 중 1-(((2*S*)-1-((4-(1-(((((3*R*,5*S*)-1-(*tert*-부톡시카르보닐)-5-(((S)-1-(4-(4-메틸티아졸-5-일)페닐)에틸)카르바모일)피롤리딘-3-일)옥시)카르보닐)옥시)-2-(4-메틸피페라진-1-일)-2-옥소에틸)페닐)아미노)-1-옥소-5-우레이도펜탄-2-일)카르바모일)시클로부탄카르복실산(69 mg, 0.07 mmol) 및 1-(5-아미노펜틸)-1*H*-피롤-2,5-디온(16 mg, 0.08 mmol)의 혼합물에 *N,N*-디이소프로필에틸아민(0.03 mL, 0.21 mmol) 및 HATU(32 mg, 0.08 mmol)를 첨가하였다. 반응 혼합물을 23ºC에서 16시간 동안 교반한 다음, 농축하였다. 잔류물을 분취용 HPLC(보스톤 그린(Boston Green) ODS 150*30 mm*5 um, (25-45%) 물(0.075% TFA)-ACN)로 정제하여 표제 화합물(67 mg, 84%)을 백색 고체로서 수득하였다. LCMS (ESI) *m/z*: 1155.6 $[M+H]^+$.

[0980] **화합물 7, 반응식 2: 1-(4-((*S*)-2-(1-((5-(2,5-디옥소-2,5-디히드로-1*H*-피롤-1-일)펜틸)카르바모일)시클로부탄카르복스아미도)-5-우레이도펜탄아미도)페닐)-2-(4-메틸피페라진-1-일)-2-옥소에틸 ((3*R*,5*S*)-5-(((*S*)-1-(4-(4-메틸티아졸-5-일)페닐)에틸)카르바모일)피롤리딘-3-일)카보네이트**

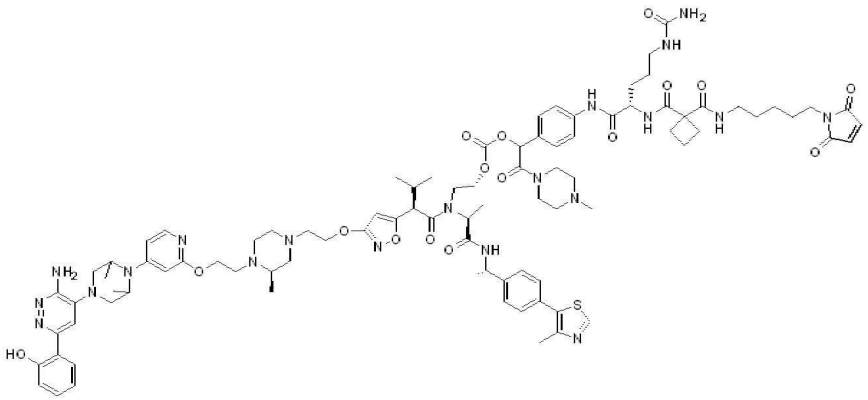
[0981] **2,2,2-트리플루오로아세테이트의 합성**



[0982]

[0983] HFIP(2 mL, 0.06 mmol) 내 5% TFA 중 (2*S*,4*R*)-*tert*-부틸 4-(((1-(4-((*S*)-2-(1-((5-(2,5-디옥소-2,5-디히드로-1*H*-피롤-1-일)펜틸)카르바모일)시클로부탄카르복사미도)-5-우레이도펜탄아미도)페닐)-2-(4-메틸피페라진-1-일)-2-옥소에톡시)카르보닐)옥시)-2-(((*S*)-1-(4-(4-메틸티아졸-5-일)페닐)에틸)카르바모일)피롤리딘-1-카르복실레이트(67.4 mg, 0.06 mmol)의 용액을 23° C에서 1.5시간 동안 교반하였다. 이후, 반응 혼합물을 농축시켜 표제 화합물(62 mg, 99.9%)을 황색 오일로서 수득하였다. LCMS (ESI) *m/z*: 1054.7 $[M+H]^+$.

[0984] **L1-CIDE-BRM1-2: (3*R*,5*S*)-1-((2*R*)-2-(3-(2-((3*R*)-4-(2-((4-(3-(3-아미노-6-(2-히드록시페닐)피리다진-4-일)-3,8-디아자비시클로[3.2.1]옥탄-8-일)피리딘-2-일)옥시)에틸)-3-메틸피페라진-1-일)에톡시)이속사졸-5-일)-3-메틸부타노일)-5-(((S)-1-(4-(4-메틸티아졸-5-일)페닐)에틸)카르바모일)피롤리딘-3-일(1-(4-((*S*)-2-(1-((5-(2,5-디옥소-2,5-디히드로-1*H*-피롤-1-일)펜틸)카르바모일)시클로부탄카르복사미도)-5-우레이도펜탄아미도)페닐)-2-(4-메틸피페라진-1-일)-2-옥소에틸)카보네이트의 합성**



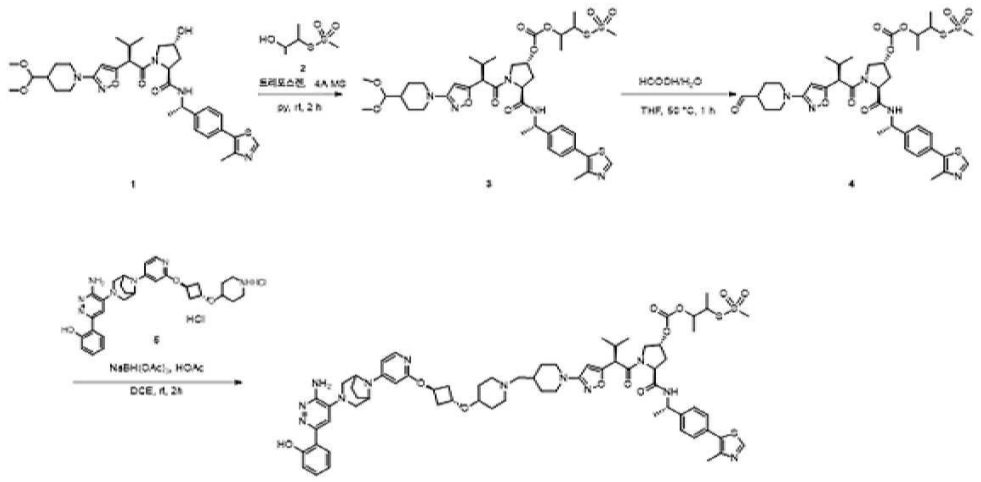
[0985]

[0986] 23° C에서 DMF(2.5 mL) 중 1-(4-((*S*)-2-(1-((5-(2,5-디옥소-2,5-디히드로-1*H*-피롤-1-일)펜틸)카르바모일)시클로부탄카르복스아미도)-5-우레이도펜탄아미도)페닐)-2-(4-메틸피페라진-1-일)-2-옥소에틸 ((3*R*,5*S*)-5-(((*S*)-1-(4-(4-메틸티아졸-5-일)페닐)에틸)카르바모일)피롤리딘-3-일)카보네이트 2,2,2-트리플루오로아세테이트(62 mg, 0.06 mmol) 및 (2*R*)-2-(3-(2-((3*R*)-4-(2-((4-(3-(3-아미노-6-(2-히드록시페닐)피리다진-4-일)-3,8-디아자비시클로[3.2.1]옥탄-8-일)피리딘-2-일)옥시)에틸)-3-메틸피페라진-1-일)에톡시)이속사졸-5-일)-3-메틸부탄산(50 mg, 0.07 mmol)의 혼합물에 *N*,*N*-디이소프로필에틸아민(0.03 mL, 0.18 mmol) 및 HATU(27 mg, 0.07 mmol)를 첨가하였다. 반응 혼합물을 23ºC에서 16시간 동안 교반한 다음, 농축하였다. 잔류물을 하기의 조건: 칼럼: 페노메넥스 제미니(Phenomenex Gemini)-NX 80*30 mm*3 um; 이동상: (26-46%) 물(10 mM NH_4HCO_3)-ACN을 갖는 분취용 HPLC로 정제하여 표제 화합물(44 mg, 42%)을 백색 고체로서 수득하였다. ^{1}H NMR (400 MHz, CD_3OD): δ 8.88 - 8.83 (m, 1H), 7.80 - 7.75 (m, 1H), 7.75 - 7.65 (m, 3H), 7.49 - 7.32 (m, 7H), 7.25 - 7.19 (m, 1H), 6.93 - 6.84 (m, 2H), 6.76 (s, 1H), 6.75 - 6.71 (m, 1H), 6.57 - 6.54 (m, 1H), 6.29 - 6.19 (m, 2H), 5.25 - 5.21 (m, 1H), 4.98 - 4.93 (m, 2H), 4.64 - 4.62 (m, 2H), 4.51 (s, 3H), 4.41 - 4.27 (m, 3H), 4.23 - 4.08 (m, 1H), 4.01 - 3.89 (m, 1H), 3.79 - 3.54 (m, 4H), 3.48 - 3.40 (m, 2H), 3.27 - 3.16 (m, 4H), 3.15 - 3.03 (m, 4H), 2.97 - 2.85 (m, 2H), 2.83 - 2.69 (m, 4H), 2.61 - 2.51 (m, 3H), 2.50 - 2.33 (m, 8H), 2.29 - 2.17 (m, 6H), 2.14 - 2.11 (m, 3H), 1.93 (s, 4H), 1.75 (s, 1H), 1.62 - 1.45 (m, 9H), 1.35 - 1.23 (m, 4H), 1.16 - 1.10 (m, 3H), 1.09 - 0.92 (m, 3H), 0.92 - 0.80 (m, 3H); LCMS (ESI) *m/z*: 1764.8 $[M+H]^+$.

[0987] 합성 실시예 3

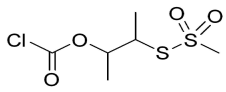
[0988] L1-CIDE-BRM1-3의 합성

[0989] L1-CIDE-BRM1-3은 하기의 반응식, 반응식 3으로 합성하였다:



[0990]

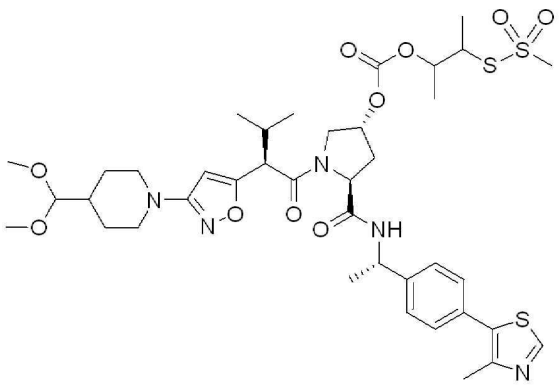
[0991] ***S*-(3-((클로로카르보닐)옥시)부탄-2-일)메탄술포노티오에이트의 합성**



[0992]

[0993] 디클로로메탄(2 mL) 및 피리딘(516 mg, 6.51 mmol) 중 *S*-(3-히드록시부탄-2-일) 메탄술포노티오에이트(300 mg, 1.63 mmol)의 용액에 23℃에서 디클로로메탄(2 mL) 중 트리포스겐(242 mg, 0.81 mmol)의 용액을 첨가하였다. 반응물을 23℃에서 30분 동안 교반한 다음, 농축 건조시켜 표제 화합물(380 mg, 95%)을 황색 오일로서 수득하였다. 상기 물질을 다음 단계에서 직접 사용하였다.

[0994] **S-(3-(((((3*R*,5*S*)-1-((*R*)-2-(3-(4-(디메톡시메틸)피페리딘-1-일)이속사졸-5-일)-3-메틸부타노일)-5-(((*S*)-1-(4-(4-메틸티아졸-5-일)페닐)에틸)카르바모일)피롤리딘-3-일)옥시)카르보닐)옥시)부탄-2-일)메탄술포노티오에이트의 합성**

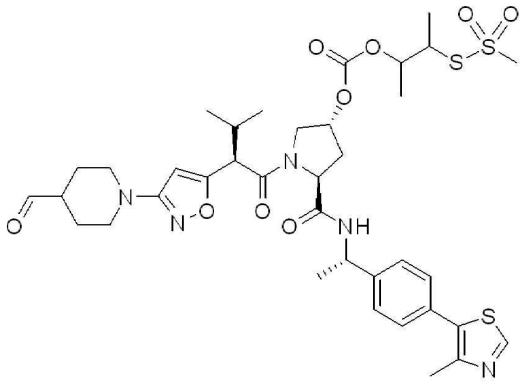


[0995]

[0996] 디클로로메탄(2 mL) 중 (2*S*,4*R*)-1-((*R*)-2-(3-(4-(디메톡시메틸)피페리딘-1-일)이속사졸-5-일)-3-메틸부타노일)-4-히드록시-*N*-((*S*)-1-(4-(4-메틸티아졸-5-일)페닐)에틸)피롤리딘-2-카르복스아미드(250 mg, 0.39 mmol)(상기 반응식 3의 화합물 **1**을 참조; 제조법은 US 2020/0038378의 451-452 페이지에 기재되어 있고, 이는 그 전체가 본원에 원용됨) 및 4Å MS(50 mg)의 23° C 혼합물에 피리딘(0.09 mL, 1.17 mmol), 및 디클로로메탄(1 mL) 중 *S*-(3-((클로로카르보닐)옥시)부탄-2-일) 메탄설포노티오에이트(220 mg, 0.89 mmol)를 첨가하였다. 반응물을 23 °C에서 30분 동안 교반한 다음, 농축하였다. 잔류물을 실리카겔의 플래시 크로마토그래피 컬럼(에틸 아세테이트 중 0~60% 디클로로메탄)으로 정제하여 표제 화합물 **3**(130 mg, 39%)을 백색 고체로서 수득하였다. LCMS (ESI)

m/z: 850.3 $[M+H]^+$.

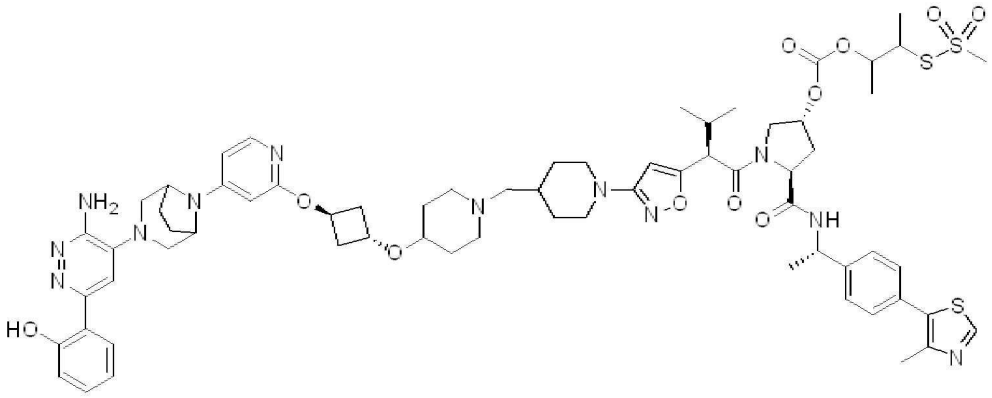
[0997] **S-(3-(((((3*R*,5*S*)-1-((*R*)-2-(3-(4-포르밀피페리딘-1-일)이속사졸-5-일)-3-메틸부타노일)-5-(((*S*)-1-(4-(4-메틸티아졸-5-일)페닐)에틸)카르바모일)피롤리딘-3-일)옥시)카르보닐)옥시)부탄-2-일)메탄술포노티오에이트의 합성**



[0998]

[0999] 물(1 mL) 및 포름산(3 mL) 중 *S*-(3-(((((3*R*,5*S*)-1-((*R*)-2-(3-(4-(디메톡시메틸)피페리딘-1-일)이속사졸-5-일)-3-메틸부타노일)-5-(((*S*)-1-(4-(4-메틸티아졸-5-일)페닐)에틸)카르바모일)피롤리딘-3-일)옥시)카르보닐)옥시)부탄-2-일) 메탄술포노티오에이트(130 mg, 0.15 mmol)의 용액을 50° C에서 2시간 동안 교반하였다. 이후, 반응 혼합물을 농축시켜 표제 화합물(120 mg, 98%)을 황색 오일로서 수득하였다. LCMS (ESI) *m/z*: 804.3 $[M+H]^+$.

[1000] **L1-CIDE-BRM1-3: *S*-(3-(((((3*R*,5*S*)-1-((2*R*)-2-(3-(4-((4-(*트랜스*-3-((4-(3-(3-아미노-6-(2-히드록시페닐)피리다진-4-일)-3,8-디아자비시클로[3.2.1]옥탄-8-일)피리딘-2-일)옥시)시클로부톡시)피페리딘-1-일)메틸)피페리딘-1-일)이속사졸-5-일)-3-메틸부타노일)-5-(((*S*)-1-(4-(4-메틸티아졸-5-일)페닐)에틸)카르바모일)피롤리딘-3-일)옥시)카르보닐)옥시)부탄-2-일) 메탄술포노티오에이트의 합성**



[1001]

[1002] 디클로로메탄(1 mL) 및 메탄올(1 mL) 중 S-(3-(((((3*R*,5*S*)-1-((*R*)-2-(3-(4-포르밀피페리딘-1-일)이속사졸-5-일)-3-메틸부타노일)-5-(((*S*)-1-(4-(4-메틸티아졸-5-일)페닐)에틸)카르바모일)피롤리딘-3-일)옥시)카르보닐)옥시)부탄-2-일) 메탄술포노티오에이트(120 mg, 0.15 mmol)의 23° C 용액에 2-(6-아미노-5-(8-(2-(*트랜스*-3-(피페리딘-4-일옥시)시클로부톡시)피리딘-4-일)-3,8-디아자비시클로[3.2.1]옥탄-3-일)피리다진-3-일)페놀 염산염(상기 반응식 3의 화합물 **5**를 참조; 제조를 위해 US 2020/0038378의 p306-307(페이지 상단 번호 매기기)을 참조.) (82 mg, 0.15 mmol), HOAc(0.2 ml) 및 나트륨 트리아세톡시보로하이드라이드(317 mg, 1.49 mmol)를 첨가한다. 반응 혼합물을 23 ºC에서 3시간 동안 교반한 다음, 농축하였다. 조 잔류물을 분취용 TLC(메탄올:디클로로메탄=1: 10)로 정제하여 표제 화합물(31 mg, 14%)을 백색 고체로서 수득하였다. ^{1}H NMR (400 MHz, DMSO-d_6): δ 14.13 (s, 1H), 8.98 (s, 1H), 8.49 (d, *J* = 7.2 Hz, 1H), 7.91 (d, *J* = 7.2 Hz, 1H), 7.76 (d, *J* = 6.4 Hz, 1H), 7.52 - 7.41 (m, 3H), 7.40 - 7.33 (m, 2H), 7.24 - 7.21 (m, 1H), 6.90 - 6.80 (m, 2H), 6.54 - 6.51 (m, 1H), 6.14 - 6.12 (m, 2H), 6.00 - 5.91 (m, 2H), 5.18 - 5.15 (m, 2H), 4.95 - 4.90 (m, 2H), 4.50 - 4.46 (m, 2H), 4.39 - 4.35 (m, 1H), 4.32 - 4.22 (m, 1H), 3.94 - 3.66

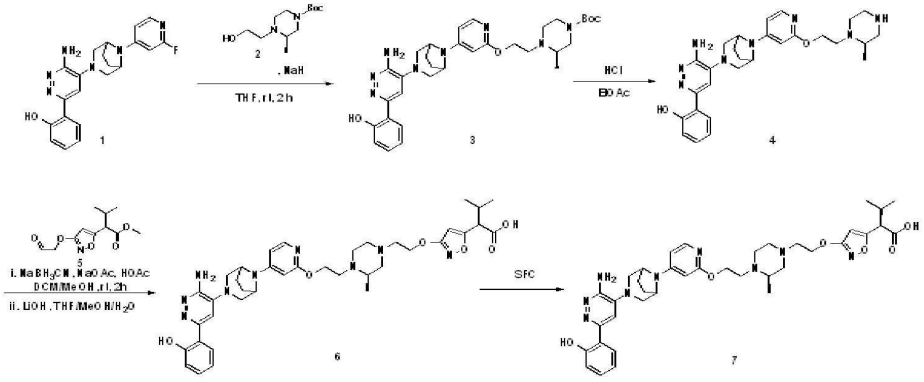
(m, 3H), 3.64 - 3.55 (m, 4H), 3.54 - 3.52 (m, 2H), 3.28 - 3.21 (m, 4H), 3.02 - 3.01 (m, 2H), 2.77 - 2.69 (m, 2H), 2.45 (s, 3H), 2.30 - 2.22 (m, 4H), 2.19 - 2.15 (m, 2H), 2.10 - 2.05 (m, 2H), 2.04 - 1.89 (m, 5H), 1.81 - 1.57 (m, 5H), 1.47 - 1.34 (m, 8H), 1.33 - 1.28 (m, 2H), 1.27 - 1.20 (m, 2H), 1.16 - 1.02 (m, 2H), 0.95 - 0.91 (m, 3H), 0.85 - 0.75 (m, 3H); LCMS (ESI) *m/z*: 1331.9 $[M+H]^+$.

[1003] 합성 실시예 4

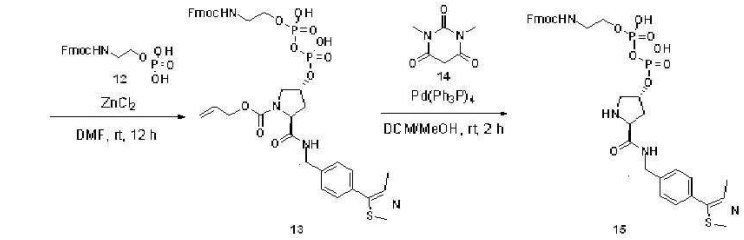
[1004] L1-CIDE-BRM1-4의 합성

[1005] L1-CIDE-BRM1-4는 하기의 반응식, 반응식 4으로 합성하였다:

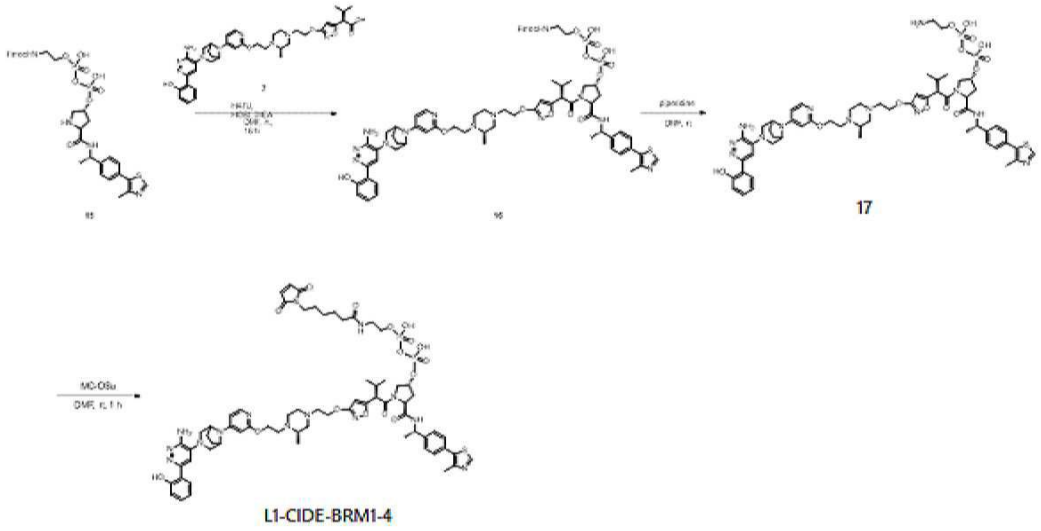
[1006]



[1007]

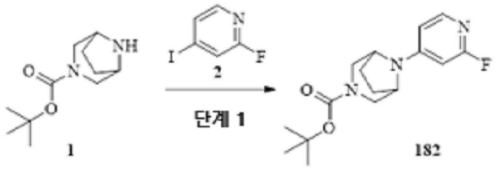


[1008]



[1009] **화합물 1, 반응식 4:**

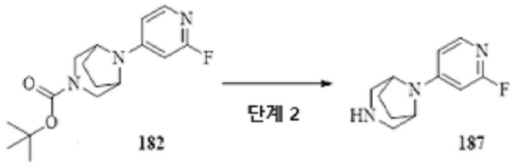
[1010] **단계 1:** **182**의 제조



[1011]

[1012] 2-플루오로-4-요오도피리딘(**2**)(52 g, 230 mmol)을 1,4-디옥산(750 mL) 중 *tert*-부틸 3,8-디아자비시클로[3.2.1]옥탄-3-카르복실레이트(**1**)(37 g, 175 mmol), 나트륨 *tert*-부톡시드(26 g, 265 mmol), 불화칼륨(17 g, 284 mmol) , 크산트포스(4.8 g, 8.2 mmol)의 자기 교반된 혼합물을 함유한 1구 2 L 둥근 바닥 플라스크에 첨가하였다. 혼합물을 15분 동안 질소 기체로 퍼징한 다음, 트리스(디벤질리덴아세톤)디-팔라듐(0)(3.7 g, 4.0 mmol)을 첨가하였다. 반응 플라스크에 질소 주입구로 막힌 콘덴서를 장착하고 110° C로 설정된 예열된 오일 수조에 넣었다. 110℃에서 1.25시간 동안 질소 분위기하에 교반한 후 생성된 갈색/적색 현탁액을 23℃로 냉각시키고 셀라이트를 통해 여과하였다. 필터 케이크를 Et_2O로 세척하고, 취합한 여액 및 세척액을 감압하에 농축하여 적색 오일(127 g)을 수득하였다. 조 물질을 0-40% EtOAc/DCM을 사용하는 플래시 크로마토그래피로 정제하여 **182**를 황색 거품 고체(56 g, 약 100%)로서 제공하였다.

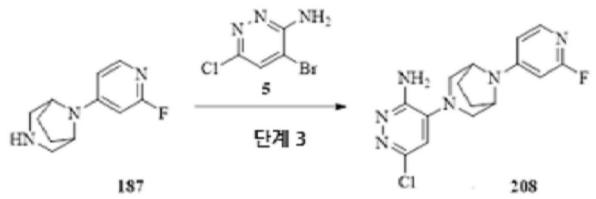
[1013] **단계 2:** **187**의 제조.



[1014]

[1015] 1,4-디옥산(220 mL, 880 mmol) 중 4 M HCl의 용액을 23° C에서 1구 2 L 둥근 바닥 플라스크 내에서 MeCN(650 mL) 중 **182**(56 g, 약 175 mmol)의 자기 교반 용액에 50분에 걸쳐 첨가하였다. 혼합물을 23℃에서 1시간 동안 교반되도록 하고, 이 시간 동안 황색/주황색 현탁액이 되었다. 반응 혼합물을 황색 고체로 농축하고, 상기 물질을 Et_2O(1000 mL)와 함께 23℃에서 1시간 동안 분쇄하였다. 혼합물을 여과하고, 수집된 물질을 감압하에 건조시켜 **187**의 트리-HCl 염을 황색 분말(61 g)로서 제공하였다. 상기 염을 DCM(1000 mL)에 현탁시키고 포화 수성 $NaHCO_3$(500 mL)로 천천히 중화시켰다. 층을 분리하고 수성상을 DCM(2 x 500 mL)으로 추가로 추출하였다. 취합한 유기상을 포화 NaCl(250 mL)로 세척하고, 무수 Na_2SO_4으로 건조하고, 여과하고, 농축하여 **187**의 유리 염기를 황색 고체(32g, 86%)로서 제공하였다. 참고: $NaHCO_3$ 용액이 수상 내에서 생성물의 손실을 방지할 수 있을 만큼 충분히 포화되었는지 확인한다.

[1016] **단계 3:** **208**의 제조.

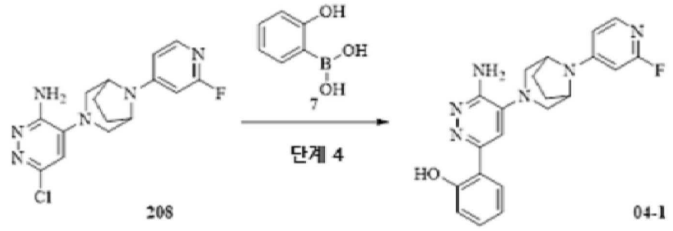


[1017]

[1018] 23° C에서 1 L 삼각 플라스크 내에서 1,8-디아자비시클로[5.4.0]운덱-7-엔(**5**)(3.0 mL, 20 mmol)을 무수 DMF(300 mL) 중 **187**(30 g, 145 mmol) 3-아미노-4-브로모-6-클로로피리다진(44 g, 209 mmol) 및 *N,N*-디이소프로필에틸아민(80 mL, 460 mmol)의 자기 교반된 용액에 첨가하였다. 상기 용액을 2개의 450 mL 밀폐형 둥근 바닥 플라스크 사이에 균일하게 분할한 다음, 100° C로 설정된 오일 수조에서 23시간 동안 자기 교반하였다. 투명한 적색 반응 혼합물을 취합하고 고진공하에 갈색 잔류물(107 g)로 농축하였다. 잔류물을 0~5% MeOH/DCM을 사용하

는 플래시 크로마토그래피로 2회 정제하여 1당량의 *N,N*-디이소프로필에틸아민(20 g, 30%)에 착화된 **208**의 노란색 고체를 제공하였다. 상기 착화물은 약 72 중량%의 208(**208**의 약 15 g)을 함유하였다.

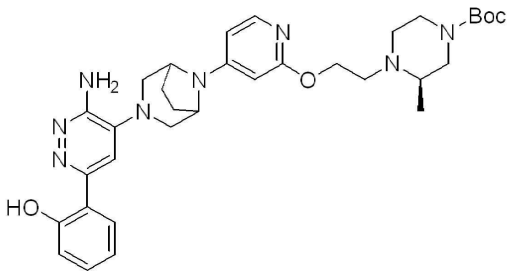
[1019] **단계 4: 04-1**의 제조.



[1020]

[1021] 2-히드록시페닐보론산(9.0 g, 65 mmol)을 23° C에서 1,4-디옥산(600 mL)과 탈이온수(120 mL)의 혼합물 중 **208** 아민 착화물(17 g, 37 mmol) 및 탄산칼륨(16 g, 113 mmol)의 자기 교반된 혼합물을 함유한 1구 2 L 둥근 바닥 플라스크에 첨가하였다. 상기 혼합물을 30분 동안 질소 기체로 퍼징한 후 루포스(RuPhos)-Pd-G3(1.8 g, 2.1 mmol)을 첨가하였다. 플라스크에 질소 주입구로 막힌 콘덴서를 장착하고 100° C로 설정된 예열된 오일 수조에 넣었다. 100℃에서 23시간 동안 질소 분위기하에 교반한 후, 생성된 짙은 적색 용액을 23℃로 냉각시키고 감압하에 갈색 고체로 농축하였다(40 g). 조 물질의 ^{1}H NMR 분석은 **04-1**을 주요 생성물로서 나타내었다. 상기 물질을 유사한 순도를 갖는 이전 배치로부터의 조 **04-1** 6.8 g과 조합하였다. 조합된 배치를 0-100% EtOAc/DCM을 사용하는 플래시 크로마토그래피에 이어서 0-10% MeOH/DCM으로 용출하는 추가 크로마토그래피로 정제하여 HPLC에 의해 98% 순수한 **04-1**을 황색 고체로 제공하였다. 상기 고체를 Et_2O로 분쇄하고, 여과에 의해 수집하고, 감압하에 건조하여 **04-1**을 황색 분말로서(8.0 g, 47% 합산 수율) 제공하였다.

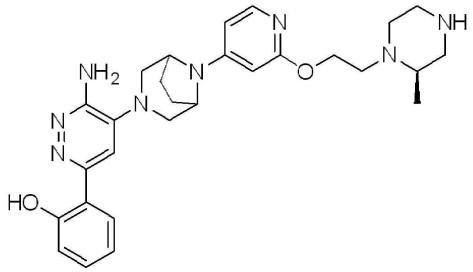
[1022] **화합물 3, 반응식 4: (3*R*)-*tert*-부틸 4-(2-((4-(3-(3-아미노-6-(2-히드록시페닐)피리다진-4-일)-3,8-디아자비시클로[3.2.1]옥탄-8-일)피리딘-2-일)옥시)에틸)-3-메틸피페라진-1-카르복실레이트의 합성**



[1023]

[1024] THF(20 mL) 중 2-(6-아미노-5-(8-(2-플루오로피리딘-4-일)-3,8-디아자비시클로[3.2.1]옥탄-3-일)피리다진-3-일)페놀(1.5 g, 3.82 mmol)(상기 반응식 4의 화합물 **1**을 참조) 및 수소화나트륨(미네랄 오일 중 60%; 0.46 g, 11.47 mmol)의 용액에 (*R*)-*tert*-부틸 4-(2-히드록시에틸)-3-메틸피페라진-1-카르복실레이트(상기 반응식 4의 화합물 **2**를 참조; 또한 그 전체가 본원에 원용된 WO2011/28685의 페이지 88, 컬럼 89의 합성 경로를 참조)(1.87 g, 7.64 mmol)를 23° C에서 적가하였다. 이후, 혼합물을 60℃에서 12시간 동안 교반하였다. 23° C로 냉각한 후, 반응물을 물(100 mL)로 희석하고 생성된 혼합물을 에틸 아세테이트(150 mL × 3)로 추출하였다. 취합한 유기층을 염수로 세척하고(100 mL), 무수 황산나트륨으로 건조시키고 여과하였다. 여액을 농축하고, 잔류물을 실리카겔(DCM 중 메탄올의 0~5%)의 플래시 크로마토그래피로 정제하여 표제 화합물(1.2 g, 64%)을 회색 고체로서 수득하였다. LCMS (ESI) *m/z*: 617.6 $[M+H]^+$.

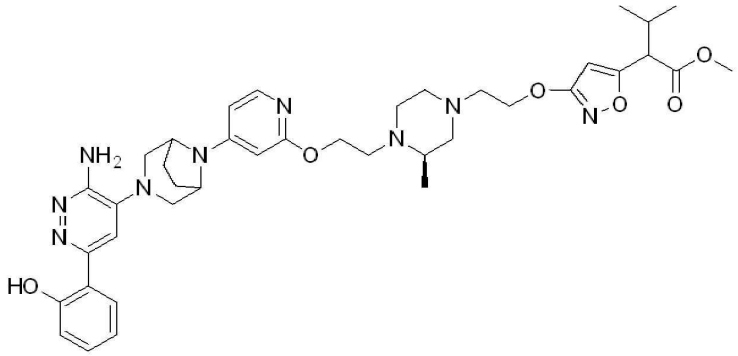
[1025] **화합물 4, 반응식 4: 2-(6-아미노-5-(8-(2-(2-((*R*)-2-메틸피페라진-1-일)에톡시)피리딘-4-일)-3,8-디아자비시클로[3.2.1]옥탄-3-일)피리다진-3-일)페놀의 합성**



[1026]

[1027] 에틸 아세테이트(10 mL) 중 (3*R*)-*tert*-부틸 4-(2-((4-(3-(3-아미노-6-(2-히드록시페닐)피리다진-4-일)-3,8-디아자비시클로[3.2.1]옥탄-8-일)피리딘-2-일)옥시)에틸)-3-메틸피페라진-1-카르복실레이트(1.2 g, 1.95 mmol)의 23° C 용액에 4 M HCl/EtOAc(20 mL, 1.95 mmol)를 첨가하였다. 혼합물을 23ºC에서 16시간 동안 교반한 다음, 농축하였다. 잔류물을 실리카겔의 플래시 크로마토그래피 컬럼(DCM 중 0~10% MeOH(1% $NH_3 H_2O$))로 정제하여 표제 화합물(900 mg, 90%)을 황색 고체로서 수득하였다.

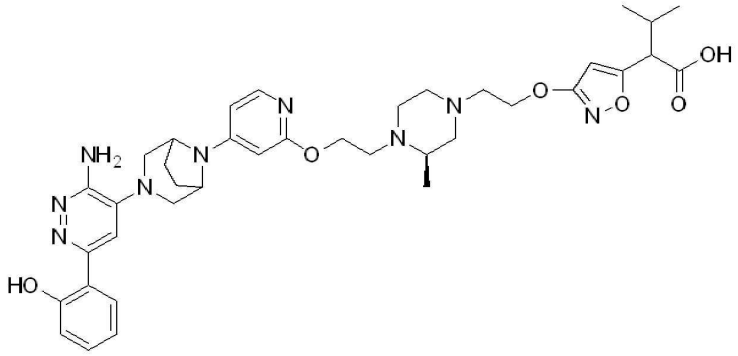
[1028] **메틸 2-(3-(2-((3*R*)-4-(2-((4-(3-(3-아미노-6-(2-히드록시페닐)피리다진-4-일)-3,8-디아자비시클로[3.2.1]옥탄-8-일)피리딘-2-일)옥시)에틸)-3-메틸피페라진-1-일)에톡시)이속사졸-5-일)-3-메틸부타노에이트의 합성**



[1029]

[1030] 23° C에서 메틸 알코올(10 mL) 및 디클로로메탄(10 mL) 중 $NaBH(OAc)_3$(746 mg, 3.48 mmol), 2-(6-아미노-5-(8-(2-(2-((*R*)-2-메틸피페라진-1-일)에톡시)피리딘-4-일)-3,8-디아자비시클로[3.2.1]옥탄-3-일)피리다진-3-일)페놀(900 mg, 1.74 mmol) 및 메틸 3-메틸-2-(3-(2-옥소에톡시)이속사졸 -5-일)부타노에이트(상기 반응식 4의 화합물 5를 참조; US 2020/0038378의 페이지 428에서 합성 경로를 참조, 이는 그 전체가 본원에 원용됨)(463 mg, 1.92 mmol)의 용액에 아세트산나트륨(712 mg, 8.71 mmol)을 첨가하였다. 반응 혼합물을 23ºC에서 16시간 동안 교반한 다음, 농축하였다. 잔류물을 실리카겔의 플래시 크로마토그래피 컬럼(DCM 중 0~10% MeOH)으로 정제하여 표제 화합물(1.0 g, 77%)을 황색 고체로서 수득하였다. LCMS (ESI) *m/z*: 742.6 $[M+H]^+$.

[1031] **화합물 6, 반응식 4: 2-(3-(2-((3*R*)-4-(2-((4-(3-(3-아미노-6-(2-히드록시페닐)피리다진-4-일)-3,8-디아자비시클로[3.2.1]옥탄-8-일)피리딘-2-일)옥시)에틸)-3-메틸피페라진-1-일)에톡시)이속사졸-5-일)-3-메틸부탄산의 합성**

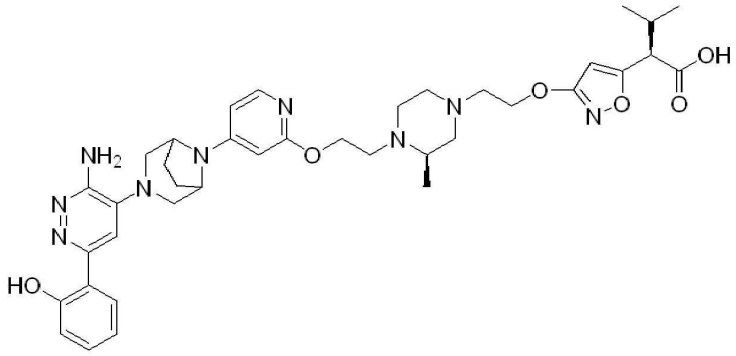


[1032]

[1033] 물(6 mL) 및 메틸 알코올(6 mL) 중 메틸 2-(3-(2-((3*R*)-4-(2-((4-(3-(3-아미노-6-(2-히드록시페닐)피리다진-4-일)-3,8-디아자비시클로[3.2.1]옥탄-8-일)피리딘-2-일)옥시)에틸)-3-메틸피페라진-1-일)에톡시)이속사졸-5-일)-

3-메틸부타노에이트(1.0 g, 1.35 mmol)의 23° C 용액에 수산화리튬 일수화물(3 mg, 6.74 mmol)을 첨가하였다. 혼합물을 23° C에서 16시간 동안 교반한 다음, 농축하여 표제 화합물(980 mg)을 황색 고체로서 수득하였다. LCMS (ESI) *m/z*: 728.3 $[M+H]^+$.

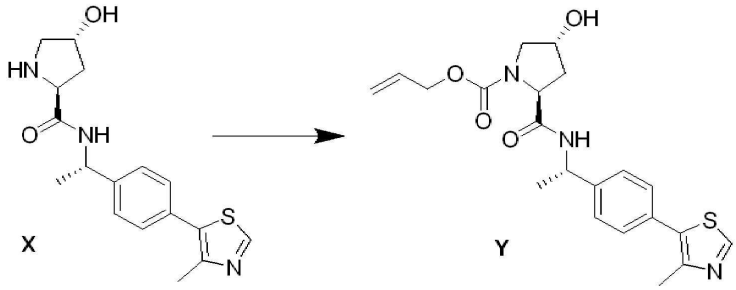
[1034] **화합물 7, 반응식 4: (2*R*)-2-(3-(2-((3*R*)-4-(2-((4-(3-(3-아미노-6-(2-히드록시페닐)피리다진-4-일)-3,8-디아자비시클로[3.2.1]옥탄-8-일)피리딘-2-일)옥시)에틸)-3-메틸피페라진-1-일)에톡시)이속사졸-5-일)-3-메틸부탄산의 합성**



[1035]

[1036] 2-(3-(2-((3*R*)-4-(2-((4-(3-(3-아미노-6-(2-히드록시페닐)이속사졸-4-일)-3,8-디아자비시클로[3.2.1]옥탄-8-일)이속사졸-2-일)옥시)에틸)-3-메틸피페라진-1-일)에톡시)이속사졸-5-일)-3-메틸부탄산(900 mg, 1.24 mmol)을 키랄 SFC로 분리하여(DAICEL CHIRALPAK AD(250 mm*50 mm,10 um) 0.1%NH_3H_2O, IPA, 18%) 제1 피크 (2*S*)-2-(3-(2-((3*R*)-4-(2-((4-(3-(3-아미노-6-(2-히드록시페닐)피리다진-4-일)-3,8-디아자비시클로[3.2.1]옥탄-8-일)피리딘-2-일)옥시)에틸)-3-메틸피페라진-1-일)에톡시)이속사졸-5-일)-3-메틸부탄산(400 mg, 44%) 및 제2 피크 (2*R*)-2-(3-(2-((3*R*)-4-(2-((4-(3-(3-아미노-6-(2-히드록시페닐)피리다진-4-일)-3,8-디아자비시클로[3.2.1]옥탄-8-일)피리딘-2-일)옥시)에틸)-3-메틸피페라진-1-일)에톡시)이속사졸-5-일)-3-메틸부탄산(450 mg, 50%)를 백색 고체로서 수득하였다.

[1037] **화합물 15의 합성, 반응식 4:**



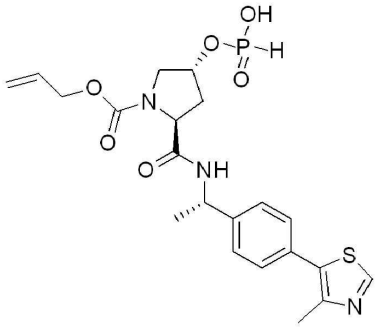
[1038]

[1039] **반응식 4의 화합물 8(이하 화합물 Y로 지칭함)의 제조. 알릴((S)-1-((2S,4R)-4-히드록시-2-((4-(4-메틸티아졸-5-일)벤질)카르바모일)피롤리딘-1-일)-3,3-디메틸-1-옥소부탄-2-일)카르바메이트의 합성.**

[1040] 알릴 클로로포르메이트(485 mg, 4.02 mmol)를 1:1 THF:H_2O(34 mL) 중의 (2S,4R)-4-히드록시-N-((S)-1-(4-(4-메틸티아졸-5-일)페닐)에틸)피롤리딘-2-카르복스아미드(예컨대, 상기 화합물 **1**을 참조; *J. Med. Chem.* **2019**, *62*, 941에 기재된 제제를 참조)(1.65 g, 3.83 mmol) 및 $NaHCO_3$(1.61 g, 19.2 mmol)의 0℃ 혼합물에 첨가하였다. 생성된 혼합물을 25℃로 가온하고 상기 온도에서 12시간 동안 교반하였다. 물(50 mL)로 희석한 후, 반응 혼합물을 EtOAc(3 x 50 mL)로 추출하고, 취합한 유기층을 염수(50 mL)로 세척하고, Na_2SO_4로 건조하고, 여과하고, 농축하였다. 잔류물을 DCM 중의 0-3% MeOH로 용출하는 실리카겔 상의 플래시 컬럼 크로마토그래피로 정제하여 (2S,4R)-알릴-4-히드록시-2-(((S)-1-(4-(4-메틸티아졸-5-일)페닐)에틸)카르바모일)피롤리딘-1-카복실레이트(상기 화합물 **Y**를 참조)(1.60 g, 81%)를 회색 고체로서 수득하였다. LCMS(10-80, AB, 7.0분): RT = 2.57분, m/z = 537.1 $[M+Na]^+$.

[1041] **반응식 4의 화합물 9의 제조. (2*S*,4*R*)-알릴 4-((히드록시히드로포스포릴)옥시)-2-(((*S*)-1-(4-(4-메틸티아졸-**

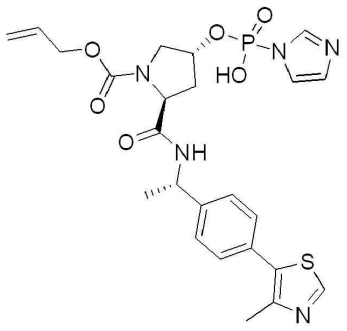
5-일)페닐)에틸)카르바모일)피롤리딘-1-카복실레이트



[1042]

[1043] THF(30 mL) 중 (2*S*,4*R*)-알릴 4-히드록시-2-(((*S*)-1-(4-(4-메틸티아졸-5-일)페닐)에틸)카르바모일)피롤리딘-1-카르복실레이트(2.0 g, 4.81 mmol)의 용액에 THF(5 mL) 중 PCl_3(1.67 mL, 19.3 mmol) 및 THF(3 mL) 중 Et_3N(4.03 mL, 29 mmol)를 -78° C에 첨가하였다. 반응 혼합물을 -78℃에서 20분 동안 교반한 다음, 23℃로 가온시켰다. 생성된 혼합물을 23℃에서 12시간 동안 교반한 다음, 물(20 mL) 및 수성 $NaHCO_3$(5 mL)로 켄칭하였다. 23℃에서 10분 동안 교반한 후, 혼합물을 1 N HCl를 사용하여 pH = 3으로 산성화하고, 이어서 감압하에 농축하였다. 잔류물을 실리카겔의 플래시 크로마토그래피 컬럼(DCM 중 0~10% 메탄올)으로 정제하여 표제 화합물(1.5 g, 65%)을 무색 고체로서 수득하였다. LCMS (ESI) *m/z*: 480.2 $[M+H]^+$.

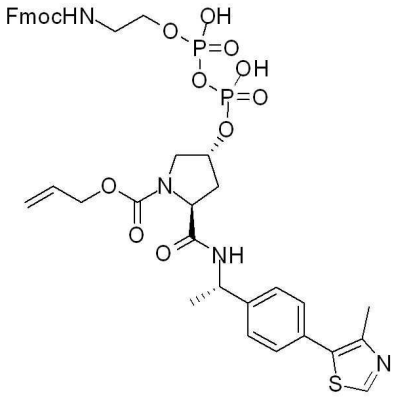
[1044] **반응식 4의 화합물 10의 제조. (2*S*,4*R*)-알릴 4-((히드록시(1*H*-이미다졸-1-일)포스포릴)옥시)-2-(((*S*)-1-(4-(4-메틸티아졸-5-일)페닐)에틸)카르바모일)피롤리딘-1-카복실레이트의 합성**



[1045]

[1046] CCl_4(8 mL) 및 아세토니트릴(8 mL) 중 (2*S*,4*R*)-알릴 4-((히드록시히드로포스포릴)옥시)-2-(((*S*)-1-(4-(4-메틸티아졸-5-일)페닐)에틸)카르바모일)피롤리딘-1-카르복실레이트(600 mg, 1.25 mmol) 및 Et_3N(0.52 mL, 3.75 mmol)의 23° C 용액에 23℃에서 1-(트리메틸실릴)-1*H*-이미다졸(0.53 g, 3.75 mmol)을 첨가하였다. 반응 혼합물을 23℃에서 40분 동안 교반한 다음, 농축하였다. 잔류물을 MTBE/EtOAc=5/1(3 mL)로 분쇄하고, 생성된 침전물을 여과로 수집하고, MTBE(3 mL)로 세척하고, 공기 건조시켜 표제 화합물(680 mg, 99%)을 수득하였다. LCMS (ESI) m/z: 546.3 $[M+H]^+$.

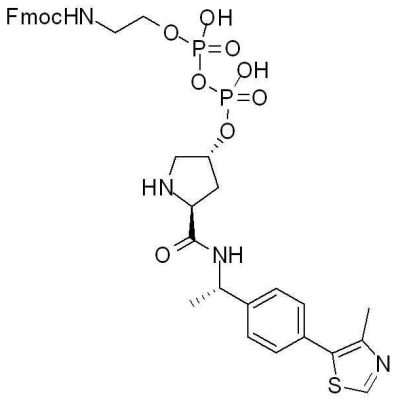
[1047] **반응식 4의 화합물 10의 제조. (2*S*,4*R*)-알릴 4-((((2-((((9*H*-플루오렌-9-일)메톡시)카르보닐)아미노)에톡시)(히드록시)포스포릴)옥시)(히드록시)포스포릴)옥시)-2-(((*S*)-1-(4-(4-메틸티아졸-5-일)페닐)에틸)카르바모일)피롤리딘-1-카복실레이트의 합성**



[1048]

[1049] *N*,*N*-디메틸포름아미드(13 mL) 중 (2*S*,4*R*)-알릴 4-((히드록시(1*H*-이미다졸-1-일)포스포릴)옥시)-2-(((S)-1-(4-(4-메틸티아졸-5-일)페닐)에틸)카르바모일)피롤리딘-1-카복실레이트(600 mg, 1.1 mmol) 및 (9*H*-플루오렌-9-일)메틸(2-(포스포노옥시)에틸)카바메이트(상기 반응식 4의 화합물 **12**; *J. Org. Chem.* **2007**, *72*, 3116에 기재된 바와 같이 제조됨) (400 mg, 1.1 mmol)의 23° C 용액에 Et_2O(5.5 mL, 5.5 mmol) 중 1 M 염화아연을 첨가하였다. 반응 혼합물을 23ºC에서 12시간 동안 교반한 다음, 농축하였다. 잔류물을 실리카겔의 플래시 크로마토그래피 컬럼(DCM 중 0~30% 메탄올(3% NH_3●H_2O))로 정제하여 표제 화합물(340 mg, 37%)을 황색 오일로서 수득하였다. LCMS (ESI) *m/z*: 814.3 $[M+H]^+$.

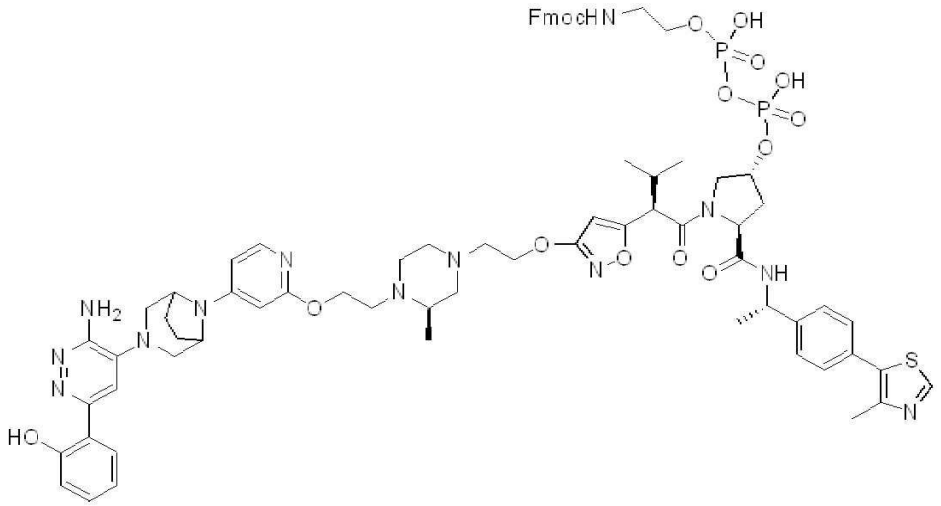
[1050] **화합물 15, 반응식 4: (9*H*-플루오렌-9-일)메틸 (2-((히드록시((히드록시(((3*R*,5*S*)-5-(((*S*)-1-(4-(4-메틸티아졸-5-일)페닐)에틸)카르바모일)피롤리딘-3-일)옥시)포스포릴)옥시)포스포릴)옥시)에틸)카바메이트의 합성**



[1051]

[1052] 디클로로메탄(5 mL) 및 메틸 알코올(5 mL) 중 (2*S*,4*R*)-알릴 4-((((2-((((9*H*-플루오렌-9-일)메톡시)카르보닐)아미노)에톡시)(히드록시)포스포릴)옥시)(히드록시)포스포릴)옥시)-2-(((*S*)-1-(4-(4-메틸티아졸-5-일)페닐)에틸)카르바모일)피롤리딘-1-카르복실레이트(340 mg, 0.40 mmol) 및 1,3-디메틸피리미딘-2,4,6(1*H*,3*H*,5*H*)-트리온(316 mg, 2.0 mmol)의 23° C 용액에 $Pd(PPh_3)_4$(94 mg, 0.08 mmol)을 첨가하였다. 반응 혼합물을 23ºC에서 2시간 동안 질소 분위기하에 교반한 다음, 농축하였다. 잔류물을 하기의 조건: 칼럼: YMC Triart C18 150*25 mm*5 um; 이동상: 20-50% 물(10 mM NH_4HCO_3)-ACN; 검출기, UV 254 nm을 갖는 분취용 HPLC로 정제하여 표제 화합물(202 mg, 66%)을 백색 고체로서 수득하였다. LCMS (ESI) *m/z*: 757.4 $[M+H]^+$.

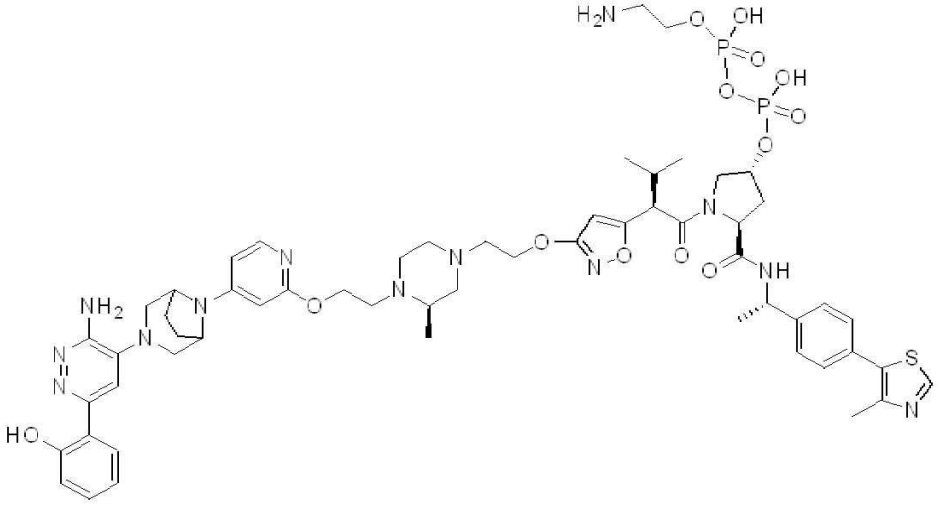
[1053] **화합물 16, 반응식 4: (9*H*-플로렌-9-일)메틸 (2-(((((((3*R*,5*S*)-1-((2*R*)-2-(3-(2-((3*R*)-4-(2-((4-(3-(3-아미노-6-(2-히드록시페닐)피리다진-4-일)-3,8-디아자비시클로[3.2.1]옥탄-8-일)피리딘-2-일)옥시)에틸)-3-메틸피페라진-1-일)에톡시)이속사졸-5-일)-3-메틸부타노일)-5-(((*S*)-1-(4-(4-메틸티아졸-5-일)페닐)에틸)카르바모일)피롤리딘-3-일)옥시)(히드록시)포스포릴)옥시)(히드록시)포스포릴)옥시)에틸)카르바메이트의 합성**



[1054]

[1055] 무수 *N,N*-디메틸포름아미드(2 mL) 중 (2*R*)-2-(3-(2-((3*R*)-4-(2-((4-(3-(3-아미노-6-(2-히드록시페닐)피리다진-4-일)-3,8-디아자비시클로[3.2.1]옥탄-8-일)피리딘-2-일)옥시)에틸)-3-메틸피페라진-1-일)에톡시)이속사졸-5-일)-3-메틸부탄산(308 mg, 0.42 mmol), HATU(201 mg, 0.53 mmol) 및 (9*H*-플루오렌-9-일)메틸(2-((히드록시((히드록시(((3*R*,5*S*)-5-(((*S*)-1-(4-(4-메틸티아졸-5-일)페닐)에틸)카르바모일)피롤리딘-3-일)옥시)포스포릴)옥시)포스포릴)옥시)에틸)카르바메이트(80 mg, 0.11 mmol)의 용액을 23℃에서 20분 동안 교반하였다. *N,N*-디이소프로필에틸아민(1 mL, 0.63 mmol)을 첨가한 다음, 생성된 혼합물을 23℃에서 2일 동안 교반하였다. 혼합물을 하기의 조건: 칼럼: 페노메넥스 제미니(Phenomenex Gemini)-NX 150*30 mm*5 um; 이동상: 24-51% 물($0.05\%NH_3 \cdot H_2O$)-ACN을 갖는 분취용 HPLC로 직접 정제하여 표제 화합물(60 mg, 39%)을 백색 고체로서 수득하였다. LCMS (ESI) *m/z*: 1467.7 $[M+H]^+$.

[1056] **화합물 17, 반응식 4: [2-아미노에톡시(히드록시)포스포릴][(3*R*,5*S*)-1-[(2*R*)-2-[3-[2-[(3*R*)-4-[2-[[4-[3-[3-아미노-6-(2-히드록시페닐)피리다진-4-일]-3,8-디아자비시클로[3.2.1]옥탄-8-일]-2-피리딜]옥시]에틸]-3-메틸-피페라진-1-일]에톡시]이속사졸-5-일]-3-메틸-부타노일]-5-[[(1*S*)-1-[4-(4-메틸티아졸-5-일)페닐]에틸]카르바모일]피롤리딘-3-일] 인산수소의 합성**

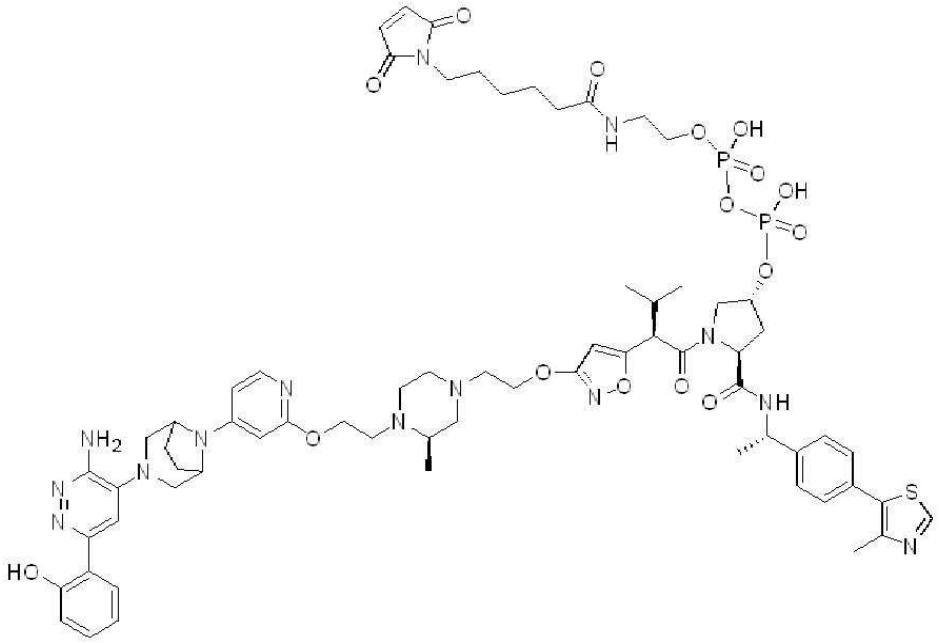


[1057]

[1058] 무수 *N,N*-디메틸포름아미드(0.5 mL) 중 (9*H*-플로렌-9-일)메틸 (2-(((((((3*R*,5*S*)-1-((2*R*)-2-(3-(2-((3*R*)-4-(2-((4-(3-(3-아미노-6-(2-히드록시페닐)피리다진-4-일)-3,8-디아자비시클로[3.2.1]옥탄-8-일)피리딘-2-일)옥시)에틸)-3-메틸피페라진-1-일)에톡시)이속사졸-5-일)-3-메틸부타노일)-5-(((*S*)-1-(4-(4-메틸티아졸-5-일)페닐)에틸)카르바모일)피롤리딘-3-일)옥시)(히드록시)포스포릴)옥시)(히드록시)포스포릴)옥시)에틸)카르바메이트(20 mg, 0.01 mmol) 및 피페리딘(2 mg, 0.01 mmol)의 용액을 23℃에서 2시간 동안 교반하였다. 이후, 혼합물을 분취용 HPLC(페노메넥스 제미니-NX 150*30 mm*5 um, 20-50% 물($0.05\%NH_3 \cdot H_2O$)-ACN)로 직접 정제하여 표제 화합물(18 mg, 94%)을 백색 고체로서 수득하였다. ^1H NMR (400 MHz, DMSO-d_6): δ 9.01 - 8.91 (m, 1H), 7.93 -

7.89 (m, 1H), 7.79 - 7.75 (m, 1H), 7.48 (s, 1H), 7.43 - 7.28 (m, 5H), 7.23 - 7.19 (m, 2H), 6.88 - 6.80 (m, 3H), 6.54 - 6.52 (m, 1H), 6.14 - 6.10 (m, 2H), 5.97 (s, 2H), 4.89 - 4.86 (m, 2H), 4.52 - 4.35 (m, 3H), 4.26 - 4.21 (m, 5H), 4.08 - 3.73 (m, 5H), 3.06 - 2.98 (m, 4H), 2.95 - 2.91 (m, 3H), 2.89 - 2.84 (m, 6H), 2.69 - 2.66 (m, 4H), 2.46 - 2.41 (m, 6H), 2.36 - 2.31 (m, 2H), 2.17 - 2.15 (m, 3H), 1.98 - 1.95 (m, 3H), 1.89 - 1.84 (m, 2H), 1.55 - 1.51 (m, 9H), 1.39 - 1.31 (m, 3H), 1.26 - 1.21 (m, 3H), 1.03 - 0.92 (m, 8H), 0.80 - 0.71 (m, 5H); LCMS (ESI) *m/z*: 1245.6 $[M+H]^+$.

[1059] **L1-CIDE-BRM1-4: [(3*R*,5*S*)-1-[2-[3-[2-[(3*R*)-4-[2-[[4-[3-[3-아미노-6-(2-히드록시페닐)피리다진-4-일]-3,8-디아자비시클로[3.2.1]옥탄-8-일]-2-피리딜]옥시]에틸]-3-메틸-피페라진-1-일]에톡시]이속사졸-5-일]-3-메틸-부타노일]-5-[[(1S)-1-[4-(4-메틸티아졸-5-일)페닐]에틸]카르바모일]피롤리딘-3-일][2-[6-(2,5-디옥소피롤-1-일)헥사노일아미노]에톡시-히드록시-포스포릴]인산수소의 합성**



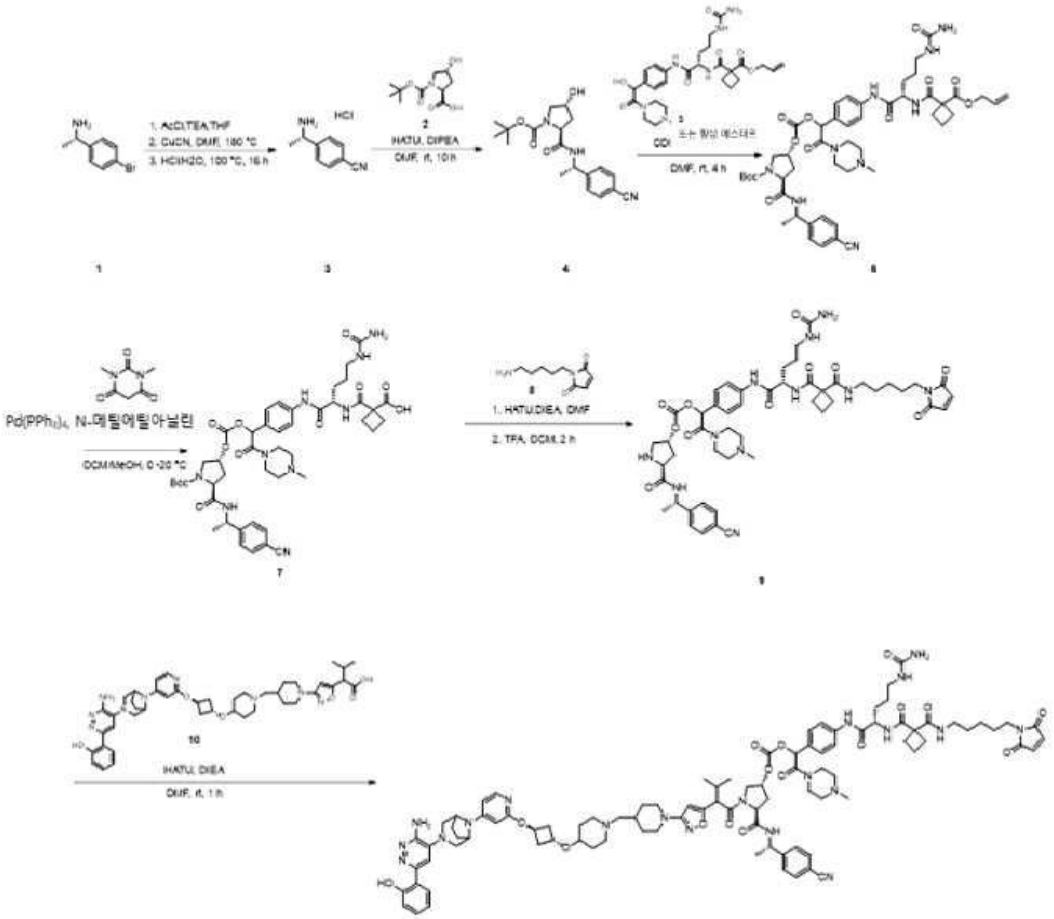
[1060]

[1061] 무수 *N,N*-디메틸포름아미드(2 mL) 중 [2-아미노에톡시(히드록시)포스포릴][(3*R*,5*S*)-1-[2-[3-[2-[(3*R*)-4-[2-[[4-[3-[3-아미노-6-(2-히드록시페닐)피리다진-4-일]-3,8-디아자비시클로[3.2.1]옥탄-8-일]-2-피리딜]옥시]에틸]-3-메틸-피페라진-1-일]에톡시]이속사졸-5-일]-3-메틸-부타노일]-5-[[(1*S*)-1-[4-(4-메틸티아졸-5-일)페닐]에틸]카르바모일]피롤리딘-3-일]수소 인산염(50 mg, 0.04 mmol)의 23° C 용액에 1-(6-(2,5-디옥소피롤리딘-1-일)-6-옥소헥실)-1*H*-피롤-2,5-디온(24 mg, 0.08 mmol) 및 *N,N*-디이소프로필에틸아민(0.01 mL, 0.08 mmol)을 첨가하였다. 혼합물을 23℃에서 1시간 동안 교반한 다음, 분취용 HPLC(페노메넥스 제미니-NX 80*30 mm*30 umto, 17-47% 물(10 mM NH_4HCO_3)-ACN)로 직접 정제하여 표제 화합물(7.9 mg, 14%)을 백색 고체로서 수득하였다. ^1H NMR (400 MHz, DMSO-d_6): δ 8.98 - 8.95 (m, 1H), 8.60 - 8.41 (m, 1H), 7.94 - 7.90 (m, 1H), 7.79 - 7.75 (m, 1H), 7.48 (s, 1H), 7.45 - 7.30 (m, 4H), 7.23 - 7.20 (m, 1H), 6.99 - 6.94 (m, 2H), 6.88 - 6.80 (m, 2H), 6.54 - 6.50 (m, 1H), 6.14 - 6.10 (m, 1H), 5.98 - 5.96 (m, 2H), 4.89 - 4.86 (m, 2H), 4.54 - 4.35 (m, 3H), 4.26 - 4.21 (m, 4H), 3.95 - 3.71 (m, 5H), 3.24 - 3.21 (m, 1H), 3.04 - 2.98 (m, 3H), 2.82 - 2.75 (m, 1H), 2.69 - 2.64 (m, 1H), 2.45 - 2.42 (m, 5H), 2.36 - 2.31 (m, 1H), 2.18 - 2.15 (m, 2H), 2.07 - 1.92 (m, 5H), 1.79 (s, 12H), 1.46 - 1.44 (m, 5H), 1.38 - 1.35 (m, 3H), 1.26 - 1.22 (m, 3H), 1.16 - 1.14 (m, 2H), 0.99 - 0.95 (m, 6H), 0.89 - 0.76 (m, 4H); LCMS (ESI) *m/z*: 1438.8 $[M+H]^+$.

[1062] 합성 실시예 5

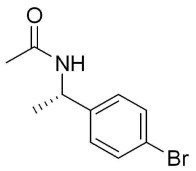
[1063] L1-CIDE-BRM1-5의 합성

[1064] L1-CIDE-BRM1-2는 하기의 반응식, 반응식 5로 합성하였다:



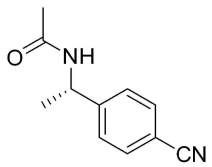
[1065]

[1066] **(*S*)-N-(1-(4-브로모페닐)에틸)아세트아미드의 합성**

[1067] 

[1068] 아세틸 클로라이드(2.35 g, 30 mmol)를 0° C에서 THF(50 mL) 중 (*S*)-1-(4-브로모페닐)에탄아민(5.0 g, 25 mmol) 및 Et_3N(3.8 g, 37.49 mmol)의 용액에 적가하였다. 반응물을 상기 온도에서 2.5시간 동안 교반한 다음, EtOAc(50 mL × 3)와 포화 NaCl 용액(50 mL) 사이에 분배하였다. 취합한 유기층을 황산나트륨 상에서 건조시키고 여과하고 농축시켰다. 잔류물을 실리카겔(석유 에테르 중 0~50% EtOAc)의 플래시 크로마토그래피로 정제하여 표제 화합물(4.0 g, 66%)을 백색 고체로서 수득하였다. LCMS (ESI) *m/z*: 241.8 $[M+H]^+$.

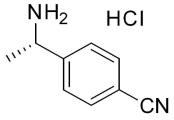
[1069] **(*S*)-*N*-(1-(4-시아노페닐)에틸)아세트아미드의 합성**

[1070] 

[1071] N,N-디메틸포름아미드(40 mL) 중 구리(I) 시안화물(1.78 g, 20 mmol) 및 (*S*)-*N*-(1-(4-브로모페닐)에틸)아세트아미드(4.0 g, 16.5 mmol)의 혼합물을 24시간 동안 환류시켰다. 23° C로 냉각한 후, 혼합물을 여과하고 여액을 농축하였다. 잔류물을 23℃에서 포화 $NaHCO_3$ 수용액(80 mL)에 첨가하고 10분 동안 교반하였다. 이후, 포화 차아염소산나트륨 수용액을 첨가하고, 23℃에서 24시간 동안 계속 교반하였다. 혼합물을 EtOAc(70 mL × 3)로 추출

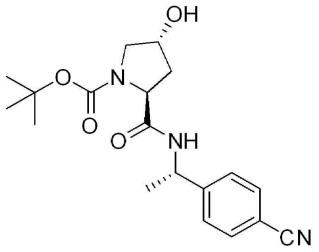
하고, 취합한 유기층을 물(70 mL × 3)로 세척하고, 황산나트륨 상에서 건조하고, 여과하고, 농축하여 표제 화합물(2.7 g, 87%)을 황색 고체로서 수득하였다. LCMS (ESI) *m/z*: 189.2 $[M+H]^+$.

[1072] **(*S*)-4-(1-아미노에틸)벤조니트릴 염산염의 합성**

[1073] 

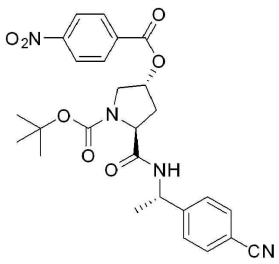
[1074] (*S*)-*N*-(1-(4-시아노페닐)에틸)아세트아미드(2.4 g, 12.8 mmol) 및 수성 2 M HCl(20 mL, 12.8 mmol)의 용액을 100℃에서 24시간 동안 교반하였다. 반응 용액을 23° C로 냉각한 다음, 농축시켜 표제 화합물(1.8 g, 97%)을 황색 고체로서 수득하였다. LCMS (ESI) *m/z*: 147.1 $[M+H]^+$.

[1075] **화합물 4, 반응식 5: (2*S*,4*R*)-*tert*-부틸 2-(((*S*)-1-(4-시아노페닐)에틸)카르바모일)-4-히드록시피롤리딘-1-카르복실레이트의 합성**

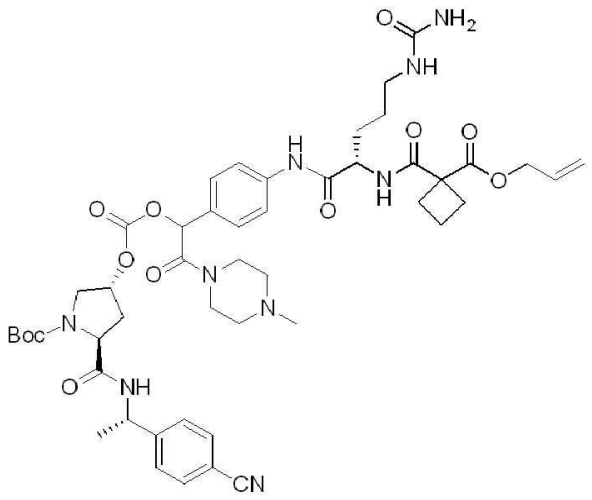
[1076] 

[1077] *N*,*N*-디메틸포름아미드(50 mL) 중 (*S*)-4-(1-아미노에틸)벤조니트릴 염산염(1.6 g, 11 mmol) 및 (2*S*,4*R*)-1-(*tert*-부톡시카보닐)-4-히드록시피롤리딘-2-카르복실산(2.8 g, 12 mmol)의 23° C 혼합물에 *N*,*N*-디이소프로필에틸아민(4.3 g, 33 mmol) 및 HATU(1.63 g, 12 mmol)를 첨가하였다. 반응물을 23ºC에서 16시간 동안 교반한 다음, 농축하였다. 잔류물을 실리카겔(디클로로메탄 중 50~100% 에틸 아세테이트)의 플래시 크로마토그래피로 정제하여 표제 화합물(1.7 g, 43%)을 황색 고체로서 수득하였다. LCMS (ESI) *m/z*: 360.1 $[M+H]^+$.

[1078] **(2*S*,4*R*)-*tert*-부틸 2-(((*S*)-1-(4-시아노페닐)에틸)카르바모일)-4-((4-니트로벤조일)옥시)피롤리딘-1-카르복실레이트의 합성**

[1079] 

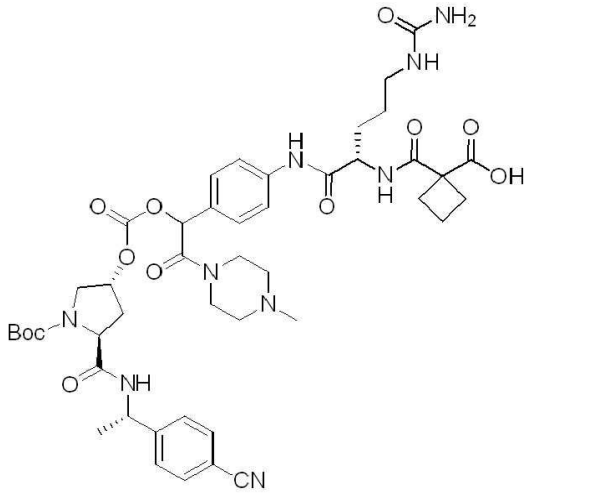
[1080] 23° C의 무수 디클로로메탄(80 mL) 중 4-니트로페닐클로로포르메이트(1.68 g, 8.3 mmol) 및 (2*S*,4*R*)-*tert*-부틸 2-(((*S*)-1-(4-시아노페닐)에틸)카르바모일)-4-히드록시피롤리딘-1-카르복실레이트(3.0 g , 7.0 mmol)의 혼합물에 2,6-루티딘(1.1 g, 10.43 mmol)을 첨가하였다. 반응 혼합물을 23° C에서 18시간 동안 교반한 다음, 농축하여 표제 화합물(437 mg, 99.8%)을 황색 고체로서 수득하였다. LCMS (ESI) *m/z*: 597.2 $[M+H]^+$. **화합물 6, 반응식 5: (2*S*,4*R*)-*tert*-부틸 4-(((1-(4-((*S*)-2-(1-((알릴옥시)카르보닐)시클로부탄카르복사미도)-5-우레이도펜탄아미도)페닐)-2-(4-메틸피페라진-1-일)-2-옥소에톡시)카르보닐)옥시)-2-(((*S*)-1-(4-시아노페닐)에틸)카르바모일)피롤리딘-1-카르복실레이트의 합성**



[1081]

[1082] 무수 *N,N*-디메틸포름아미드(10 mL) 중 tert-부틸 (2*S*,4*R*)-*tert*-부틸 2-(((*S*)-1-(4-시아노페닐)에틸)카르바모일)-4-((4-니트로벤조일)옥시)피롤리딘-1-카르복실레이트(437 mg, 0.83 mmol) 및 알릴 1-(((2*S*)-1-((4-(1-히드록시-2-(4-메틸피페라진-1-일)-2-옥소에틸)페닐)아미노)-1-옥소-5-우레이도펜탄-2-일)카르바모일)시클로부탄카르복실레이트(334 mg, 0.58 mmol)의 23° C 혼합물에 DMAP(203 mg, 1.67 mmol)를 첨가하였다. 반응 혼합물을 40℃에서 18시간 동안 교반한 다음, 23℃로 냉각하고 여과하였다. 여액을 분취용 HPLC(엑스티메이트(Xtimate) C18 150*40 mm*5 um/물(0.225% FA)-ACN, 18-48%)로 직접 정제하여 표제 화합물(65 mg, 8%)을 백색 고체로서 수득하였다. LCMS (ESI) *m/z*: 958.6 $[M+H]^+$.

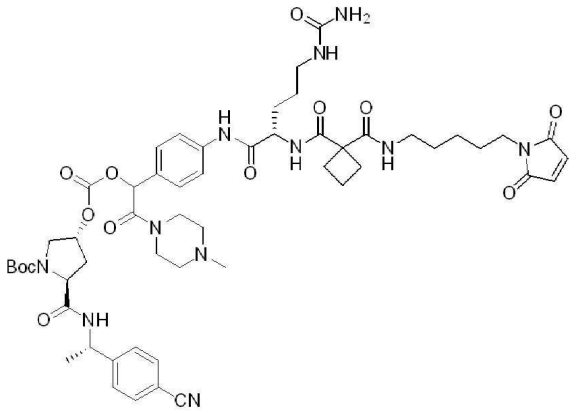
[1083] **화합물 7, 반응식 5: 1-(((2*S*)-1-((4-(1-(((((3*R*,5*S*)-1-(*tert*-부톡시카르보닐)-5-(((*S*)-1-(4-시아노페닐)에틸)카르바모일)피롤리딘-3-일)옥시)카르보닐)옥시)-2-(4-메틸피페라진-1-일)-2-옥소에틸)페닐)아미노)-1-옥소-5-우레이도펜탄-2-일)카르바모일)시클로부탄카르복실산의 합성**



[1084]

[1085] 디클로로메탄(3 mL) 및 메틸 알코올(3 mL) 중 (2*S*,4*R*)-*tert*-부틸 4-(((1-(4-((*S*)-2-(1-((알릴옥시)카르보닐)시클로부탄카르복사미도)-5-우레이도펜탄아미도)페닐)-2-(4-메틸피페라진-1-일)-2-옥소에톡시)카르보닐)옥시)-2-(((*S*)-1-(4-시아노페닐)에틸)카르바모일)피롤리딘-1-카르복실레이트(65 mg, 0.07 mmol) 및 1,3-디메틸피리미딘-2,4,6(1*H*,3*H*,5*H*)-트리온(53 mg, 0.34 mmol)의 용액에 23° C에서 $Pd(PPh_3)_4$(16 mg, 0.01 mmol)을 첨가하였다. 반응 혼합물을 질소 분위기하에 23℃에서 10시간 동안 교반한 다음, 농축하였다. 잔류물을 하기의 조건: 칼럼: 페노메넥스 제미니(Phenomenex Gemini)-NX 80*30 mm*3 um, 이동상: (24-50%) 물(10 mM NH_4HCO_3)-ACN을 갖는 분취용 HPLC로 정제하여 표제 화합물(40 mg, 64%)을 적색 고체로서 수득하였다. LCMS (ESI) *m/z*: 918.6 $[M+H]^+$.

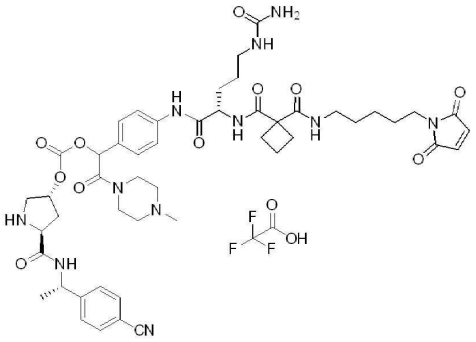
[1086] **화합물 9, 반응식 5: (2*S*,4*R*)-*tert*-부틸 2-(((S)-1-(4-시아노페닐)에틸)카르바모일)-4-(((1-(4-((*S*)-2-(1-((5-(2,5-디옥소-2,5-디히드로-1*H*-피롤-1-일)펜틸)카르바모일)시클로부탄카르복사미도)-5-우레이도펜탄아미도)페닐)-2-(4-메틸피페라진-1-일)-2-옥소에톡시)카르보닐)옥시)피롤리딘-1-카르복실레이트의 합성**



[1087]

[1088] *N*,*N*-디메틸포름아미드(4 mL) 중 1-(((2*S*)-1-((4-(1-(((((3*R*,5*S*)-1-(*tert*-부톡시카르보닐)-5-(((*S*)-1-(4-시아노페닐)에틸)카르바모일)피롤리딘-3-일)옥시)카르보닐)옥시)-2-(4-메틸피페라진-1-일)-2-옥소에틸)페닐)아미노)-1-옥소-5-우레이도펜탄-2-일)카르바모일)시이클로부탄카르복실산(40 mg, 0.04 mmol) 및 1-(5-아미노펜틸)-1*H*-피롤-2,5-디온(10 mg, 0.05 mmol)의 23° C 혼합물에 *N*,*N*-디이소프로필에틸아민(0.02 mL, 0.13 mmol) 및 HATU(20 mg, 0.05 mmol)를 첨가하였다. 반응 혼합물을 23 ºC에서 16시간 동안 교반한 다음, 농축하였다. 잔류물을 분취용 HPLC(보스톤 그린(Boston Green) ODS 150*30 mm*5 um, 물(0.075% TFA)-ACN, 20%-50%)로 정제하여 표제 화합물(31 mg, 65%)을 백색 고체로서 수득하였다. LCMS (ESI) *m/z*: 1082.7 $[M+H]^+$.

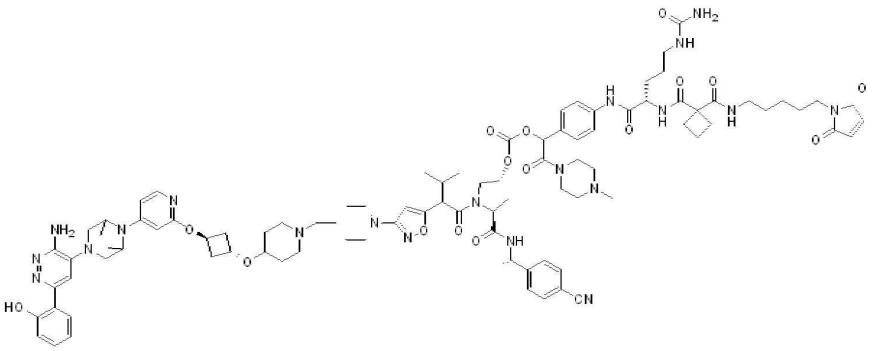
[1089] **(3*R*,5*S*)-5-(((*S*)-1-(4-시아노페닐)에틸)카르바모일)피롤리딘-3-일(1-(4-((*S*)-2-(1-((5-(2,5-디옥소-2,5-디히드로-1*H*-피롤-1-일)펜틸)카르바모일)시클로부탄카르복사미도)-5-우레이도펜탄아미도)페닐)-2-(4-메틸피페라진-1-일)-2-옥소에틸)카보네이트 2,2,2-트리플루오로아세테이트의 합성**



[1090]

[1091] HFIP(3 mL)의 5% TFA 중 (2*S*,4*R*)-*tert*-부틸 2-(((S)-1-(4-시아노페닐)에틸)카르바모일)-4-(((1-(4-((*S*)-2-(1-((5-(2,5-디옥소-2,5-디히드로-1*H*-피롤-1-일)펜틸)카르바모일)시클로부탄카르복사미도)-5-우레이도펜탄아미도)페닐)-2-(4-메틸피페라진-1-일)-2-옥소에톡시)카르보닐)옥시)피롤리딘-1-카르복실레이트의 용액(30.5 mg, 0.03 mmol)을 23℃에서 1.5시간 동안 교반하였다. 이후, 반응 혼합물을 농축시켜 표제 화합물(28 mg, 99%)을 분홍색 오일로서 수득하였다. LCMS (ESI) *m/z*: 982.7 $[M+H]^+$.

[1092] **L1-CIDE-BRM-1-5: (3*R*,5*S*)-1-(2-(3-(4-(*트랜스*-3-((4-(3-(3-아미노-6-(2-히드록시페닐)피리다진-4-일)-3,8-디아자비시클로[3.2.1]옥탄-8-일)피리딘-2-일)옥시)시클로부톡시)피페리딘-1-일)메틸)피페리딘-1-일)이속사졸-5-일)-3-메틸부타노일)-5-(((*S*)-1-(4-시아노페닐)에틸)카르바모일)피롤리딘-3-일(1-(4-((*S*)-2-(1-((5-(2,5-디옥소)-2,5-디히드로-1*H*-피롤-1-일)펜틸)카르바모일)시클로부탄카르복사미도)-5-우레이도펜탄아미도)페닐)-2-(4-메틸피페라진-1-일)-2-옥소에틸)카르보네이트의 합성**



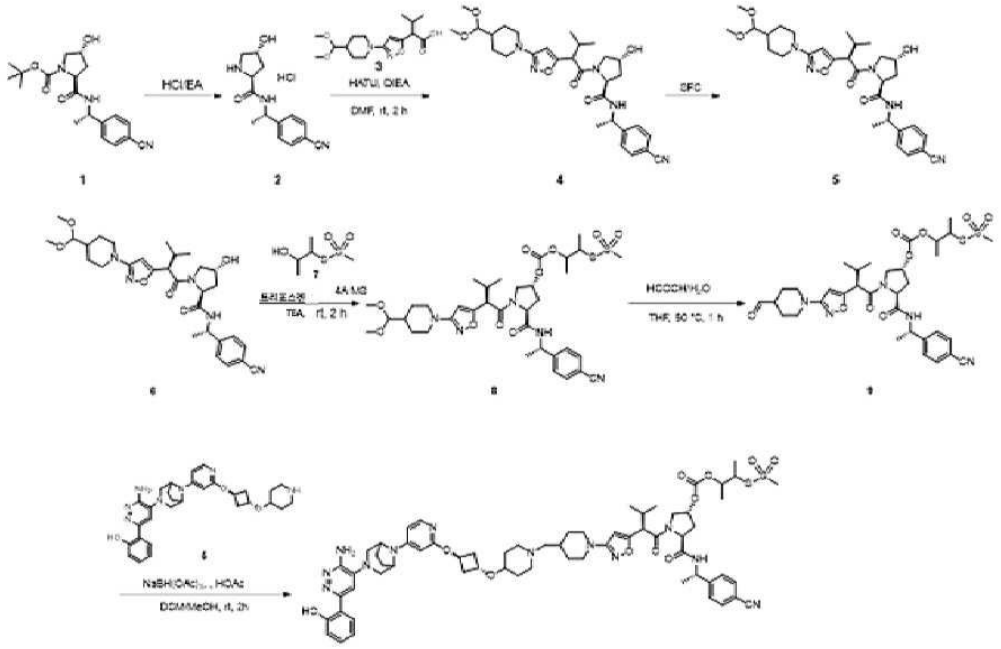
[1093]

[1094] 23° C에서 DMF(3 mL) 중 (3*R*,5*S*)-5-(((*S*)-1-(4-시아노페닐)에틸)카르바모일)피롤리딘-3-일(1-(4-((*S*)-2-(1-((5-(2,5-디옥소-2,5-디히드로-1*H*-피롤-1-일)펜틸)카르바모일)시클로부탄카르복사미도)-5-우레이도펜탄아미도)페닐)-2-(4-메틸피페라진-1-일)-2-옥소에틸)카보네이트 2,2,2-트리플루오로아세테이트(28 mg, 0.03 mmol) 및 2-(3-(4-((4-(*트랜스*-3-((4-(3-(3-아미노-6-(2-히드록시페닐)피리다진-4-일)-3,8-디아자비시클로[3.2.1]옥탄-8-일)피리딘-2-일)옥시)시클로부톡시)피페리딘-1-일)메틸)피페리딘-1-일)이속사졸-5-일)-3-메틸부탄산(27 mg, 0.03 mmol)의 혼합물에 *N,N*-디이소프로필에틸아민(0.01 mL, 0.08 mmol) 및 HATU(13 mg, 0.03 mmol)를 첨가하였다. 혼합물을 23 ºC에서 4시간 동안 교반한 다음, 농축하였다. 잔류물을 하기의 조건: 칼럼: 페노메넥스 제미니(Phenomenex Gemini)-NX 80*30 mm*3 um; 이동상: (18-36%) 물(10 mM NH_4HCO_3)-ACN을 갖는 분취용 HPLC로 정제하여 표제 화합물(23 mg, 31%)을 백색 고체로서 수득하였다. ^{1}H NMR (400 MHz, CD_3OD): δ 7.80 - 7.58 (m, 6H), 7.57 - 7.34 (m, 5H), 7.24 - 7.21 (m, 1H), 6.96 - 6.84 (m, 2H), 6.80 - 6.73 (m, 1H), 6.56 - 6.54 (m, 1H),6.33 - 6.20 (m, 1H), 6.17 - 6.03 (m, 1H), 5.27 - 5.19 (m, 1H), 5.14 - 5.12 (m, 1H), 4.62 - 4.60 (m, 5H), 4.54 - 4.51 (m, 3H), 4.42 - 4.39 (m, 1H), 4.17 - 3.86 (m, 2H), 3.84 - 3.76 (m, 1H), 3.74 - 3.64 (m, 3H), 3.63 - 3.50 (m, 4H), 3.48 - 3.43 (m, 3H), 3.38 - 3.35 (m, 2H), 3.25 - 3.22 (m, 2H), 3.26 - 3.18 (m, 1H), 3.17 - 3.00 (m, 4H), 2.86 - 2.83 (m, 2H), 2.59-2.55 (m, 6H), 2.48 - 2.35 (m, 7H), 2.29 - 2.12 (m, 8H), 2.09 - 1.86 (m, 8H), 1.85 - 1.68 (m, 1H), 1.79 - 1.75 (m, 5H), 1.67 - 1.52 (m, 7H), 1.51 - 1.43 (m, 2H), 1.41 - 1.23 (m, 9H), 1.10 - 0.94 (m, 3H), 0.93 - 0.81 (m, 3H); LCMS (ESI) *m/z*: 1772.9 $[M+H]^+$.

[1095] 합성 실시예 6

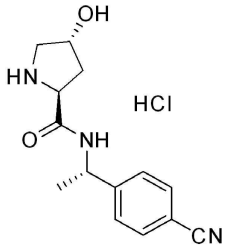
[1096] L1-CIDE-BRM1-6의 합성

[1097] L1-CIDE-BRM1-6은 하기의 반응식, 반응식 6으로 합성하였다:



[1098]

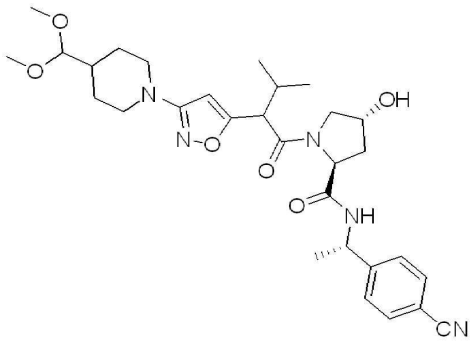
[1099] **(2*S*,4*R*)-*N*-((*S*)-1-(4-시아노페닐)에틸)-4-히드록시피롤리딘-2-카르복스아미드 염산염의 합성**



[1100]

[1101] 에틸 아세테이트(5 mL) 중 (2*S*,4*R*)-*tert*-부틸 2-(((*S*)-1-(4-시아노페닐)에틸)카르바모일)-4-히드록시피롤리딘-1-카르복실레이트(상기 반응식 5의 화합물 **4**를 참조)(2.0 g, 5.56 mmol)의 23° C 용액에 4 M HCl(10 mL; 건조 HCl 기체를 건조 EtOAc에 버블링하여 제조함)을 첨가하였다. 반응 혼합물을 23° C에서 16시간 동안 교반한 다음, 농축하여 표제 화합물(1.4 g, 97%)을 백색 고체로서 수득하였다.

[1102] **화합물 4, 반응식 6: (2*S*,4*R*)-*N*-((*S*)-1-(4-시아노페닐)에틸)-1-(2-(3-(4-(디메톡시메틸)피페리딘-1-일)이속사졸-5-일)-3-메틸부타노일)-4-히드록시피롤리딘-2-카르복스아미드의 합성**

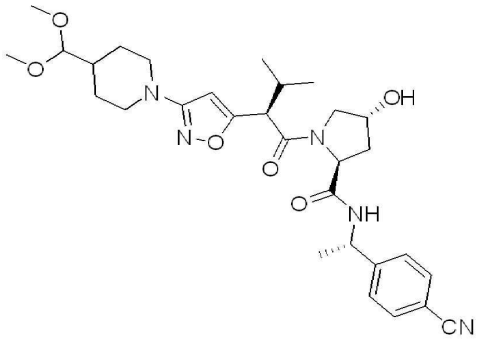


[1103]

[1104] 무수 *N*,*N*-디메틸포름아미드(20 mL) 중 (2*S*,4*R*)-*N*-((*S*)-1-(4-시아노페닐)에틸)-4-히드록시피롤리딘-2-카르복스아미드 염산염(900 mg, 3.47 mmol) 및 2-(3-(4-(디메톡시메틸)피페리딘-1-일)이속사졸-5-일)-3-메틸부탄산(상기 반응식 6의 화합물 **3**을 참조; US 2020/0038378의 페이지 450에 개시된 합성 경로를 참조, 이의 그 전체가 본원에 원용됨)(1.4 g, 3.43 mmol)의 23° C 용액에 DIEA(1.71 mL, 10.29 mmol) 및 HATU(2.0 g, 5.15 mmol)를 첨가하였다. 혼합물을 23℃에서 2시간 동안 교반한 다음, 물(100 mL)과 에틸 아세테이트(100 mL × 3) 사이에 분배

하였다. 취합한 유기층을 염수(50 mL × 2)로 세척하고, 황산 나트륨으로 건조시키고 여과하고 농축시켰다. 잔류물을 실리카겔(석유 에테르 중 0~100% 에틸 아세테이트)의 플래시 크로마토그래피로 정제하여 표제 화합물(2.0 g, 98%)을 무색 오일로서 수득하였다. LCMS (ESI) *m/z*: 568.3 $[M+H]^+$.

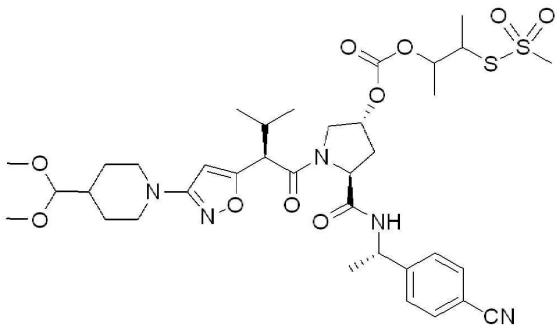
[1105] **화합물 5, 반응식 6: (2*S*,4*R*)-*N*-((*S*)-1-(4-시아노페닐)에틸)-1-((*R*)-2-(3-(4-(디메톡시메틸)피페리딘-1-일)이속사졸-5-일)-3-메틸부타노일)-4-히드록시피롤리딘-2-카르복스아미드의 합성**



[1106]

[1107] (2*S*,4*R*)-*N*-((*S*)-1-(4-시아노페닐)에틸)-1-(2-(3-(4-(디메톡시메틸)피페리딘-1-일)이속사졸-5-일)-3-메틸부타노일)-4-히드록시피롤리딘-2-카르복사미드(2 g, 3.52 mmol)를 키랄 SFC(DAICEL CHIRALPAK OD(250 mm*30 mm,10 um); (20%) 0.1%NH_3H_2O, EtOH)로 분리하여 제1 피크 (2*S*,4*R*)-*N*-((*S*)-1-(4-시아노페닐)에틸)-1-((*S*)-2-(3-(4-(디메톡시메틸)피페리딘-1-일)이속사졸-5-일)-3-메틸부타노일)-4-히드록시피롤리딘-2-카르복스아미드(400 mg, 20%) 및 제2 피크 (2*S*,4*R*)-*N*-((*S*)-1-(4-시아노페닐)에틸)-1-((*R*)-2-(3-(4-(디메톡시메틸)피페리딘-1-일)이속사졸-5-일)-3-메틸부타노일)-4-히드록시피롤리딘-2-카르복사미드(700 mg, 35%) 둘 모두를 백색 고체로서 수득하였다. ^{1}H NMR (400 MHz, DMSO-d_6,): δ 8.49 (d, *J* = 7.2 Hz, 1H), 7.82 - 7.76 (m, 2H), 7.50 - 7.44 (m, 2H), 6.11 (s, 1H), 5.13 (d, *J* = 3.6 Hz, 1H), 4.93 - 4.89 (m, 1H), 4.36 - 4.31 (m, 1H), 4.27 - 4.25 (s, 1H), 4.07 (d, *J* = 7.6 Hz, 1H), 3.72 - 3.53 (m, 4H), 3.45 - 3.40 (m, 1H), 3.26 (s, 6H), 2.76 - 2.67 (m, 2H), 2.25 - 2.16 (m, 1H), 2.08 - 1.96 (m, 1H), 1.79 - 1.61 (m, 4H), 1.44 - 1.33 (m, 3H), 1.30 - 1.19 (m, 2H), 0.98 - 0.89 (m, 3H), 0.84 - 0.74 (m, 3H).

[1108] **화합물 8, 반응식 6: *S*-(3-(((((3*R*,5*S*)-5-(((*S*)-1-(4-시아노페닐)에틸)카르바모일)-1-((*R*)-2-(3-(4-(디메톡시메틸)피페리딘-1-일)이속사졸-5-일)-3-메틸부타노일)피롤리딘-3-일)옥시)카르보닐)옥시)부탄-2-일)메탄술포노티오에이트의 합성**

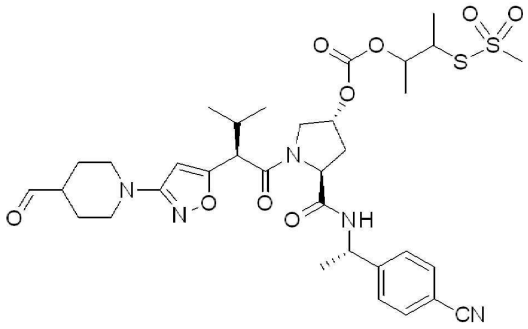


[1109]

[1110] 무수 디클로로메탄(3 mL) 중 (2*S*,4*R*)-*N*-((*S*)-1-(4-시아노페닐)에틸)-1-((*R*)-2-(3-(4-(디메톡시메틸)피페리딘-1-일)이속사졸-5-일)-3-메틸부타노일)-4-히드록시피롤리딘-2-카르복스아미드(300 mg, 0.53 mmol) 및 4Å Ms(100 mg)의 23° C 혼합물에 디클로로메탄(2 mL) 중 *S*-(3-((클로로카르보닐)옥시)부탄-2-일)메탄술포노티오에이트(상기 반응식 6의 화합물 **7** 또는 상기 반응식 1의 화합물 **2**를 참조)(391 mg, 1.59 mmol) 및 무수 디클로로메탄(3 mL) 중 Et_3N(214 mg, 2.11 mmol)의 용액을 천천히 첨가하였다. 반응물을 23ºC에서 16시간 동안 교반한 다음, 여과하였다. 여액을 농축하고, 잔류물을 실리카겔(석유 에테르 중 0~70% 에틸 아세테이트)의 플래시 크로마토그래피로 정제하여 표제 화합물(200 mg, 49%)을 백색 고체로서 수득하였다. LCMS (ESI) *m/z*: 778.1 $[M+H]^+$.

[1111] **화합물 9, 반응식 6: *S*-(3-(((((3*R*,5*S*)-5-(((*S*)-1-(4-시아노페닐)에틸)카르바모일)-1-((*R*)-2-(3-(4-포르밀피페**

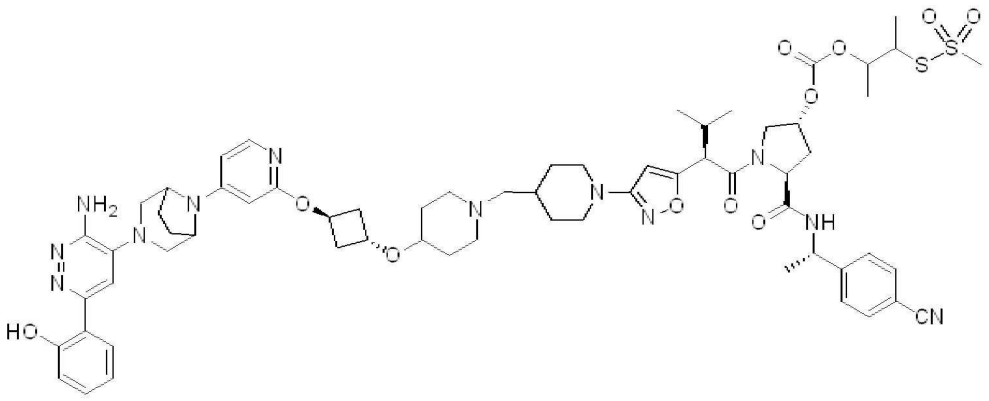
리딘-1-일)이속사졸-5-일)-3-메틸부타노일)피롤리딘-3-일)옥시)카르보닐)옥시)부탄-2-일)메탄술포노티오에이트의 합성



[1112]

[1113] 23° C에서 THF(1 mL) 중 *S*-(3-(((((3*R*,5*S*)-5-(((*S*)-1-(4-시아노페닐)에틸)카르바모일)-1-((*R*)-2-(3-(4-(디메톡시메틸)피페리딘-1-일)이속사졸-5-일)-3-메틸부타노일)피롤리딘-3-일)옥시)카르보닐)옥시)부탄-2-일)메탄설포노티오에이트(100 mg, 0.13 mmol)의 용액에 포름산(1mL) 및 물(3mL)을 첨가하였다. 혼합물을 50° C에서 16시간 동안 교반한 다음, 23° C로 냉각하고 농축하여 표제 화합물(80 mg, 85%)을 황색 오일로서 수득하였다. LCMS (ESI) *m/z*: 732.0 $[M+H]^+$.

[1114] **L1-CIDE-BRM1-6: *S*-(3-(((((3*R*,5*S*)-1-((2*R*)-2-(3-(4-((4-(*트랜스*-3-((4-(3-(3-아미노-6-(2-히드록시페닐)피리다진-4-일)-3,8-디아자비시클로[3.2.1]옥탄-8-일)피리딘-2-일)옥시)시클로부톡시)피페리딘-1-일)메틸)피페리딘-1-일)이속사졸-5-일)-3-메틸부타노일)-5-(((*S*)-1-(4-(4-시아노페닐)에틸)카르바모일)피롤리딘-3-일)옥시)카르보닐)옥시)부탄-2-일)메탄술포노티오에이트의 합성**



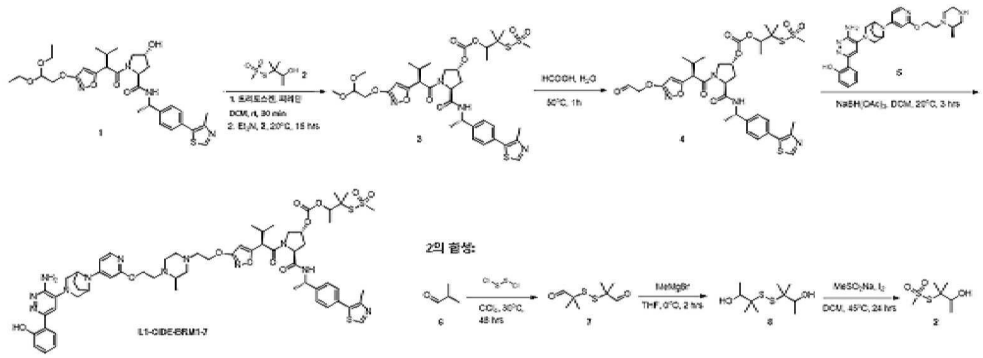
[1115]

[1116] 디클로로메탄(1 mL) 및 메탄올(1 mL) 중 *S*-(3-(((((3*R*,5*S*)-5-(((*S*)-1-(4-시아노페닐)에틸)카르바모일)-1-((*R*)-2-(3-(4-포르밀피페리딘-1-일)이속사졸-5-일)-3-메틸부타노일)피롤리딘-3-일)옥시)카르보닐)옥시)부탄-2-일)메탄술포노티오에이트(80 mg, 0.11 mmol) 및 2-(6-아미노-5-(8-(2-(3-(피페리딘-4-일옥시)시클로부톡시)피리딘-4-일)-3,8-디아자비시클로[3.2.1]옥탄-3-일)피리다진-3-일)페놀 염산염(상기 반응식 6의 화합물 **5**를 참조; US 2020/0038378의 페이지 306-307에서 합성 경로를 참조, 이의 그 전체가 본원에 원용됨)(60 mg, 0.11 mmol) 및 HOAc(0.2 ml)의 23° C 용액에 $NaBH(OAc)_3$(232 mg, 1.09 mmol)를 첨가하였다. 반응 혼합물을 23ºC에서 3시간 동안 교반한 다음, 농축하였다. 잔류물을 분취용 HPLC(보스톤 그린 ODS 150*30 mm*5 um (물(0.225% FA)-ACN, 15-45%))로 정제하여 표제 화합물(35 mg, 26%)을 백색 고체로서 수득하였다. 분취용 HPLC(FA) 후, 원하는 생성물은 FA 염이었다. ^{1}H NMR (400 MHz, DMSO-d_6): δ 8.55 - 8.53 (m, 1H), 8.17 - 8.15 (m, 1H), 7.91 (d, *J* = 7.6 Hz, 1H), 7.81 - 7.75 (m, 3H), 7.51 - 7.44 (m, 3H), 7.23 - 7.20 (m, 1H), 6.89 - 6.82 (m, 2H), 6.54 - 6.51 (m, 1H), 6.12 (d, *J* = 8.8 Hz, 2H), 5.97 (s, 2H), 5.26 - 5.07 (m, 2H), 5.01 - 4.85 (m, 2H), 4.51 - 4.46 (m, 2H), 4.38 - 4.27 (m, 2H), 3.87 - 3.80 (m, 2H), 3.59 - 3.56 (m, 3H), 3.54 - 3.52 (m, 3H), 3.28 - 3.24 (m, 1H), 3.03 - 2.99 (m, 2H), 2.76 - 2.70 (m, 2H), 2.36 - 2.31 (m, 2H), 2.19 - 2.09 (m, 4H), 2.01 - 1.94 (m, 4H), 1.80 - 1.62 (m, 5H), 1.45 - 1.32 (m, 9H), 1.27 - 1.25 (m, 1H), 1.14 - 1.02 (m, 2H), 0.95 - 0.89 (m, 3H), 0.88 - 0.70 (m, 3H); LCMS (ESI) *m/z*: 1259.1 $[M+H]^+$.

[1117] 합성 실시예 7

[1118] L1-CIDE-BRM1-7의 합성

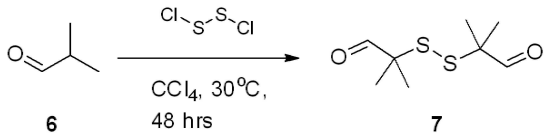
[1119] **반응식 :**



[1120]

[1121] 실험:

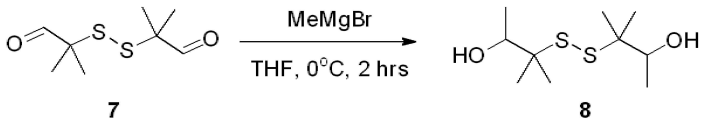
[1122] ***화합물 7의 일반적인 제조 절차:***



[1123]

[1124] 사염화탄소(10 mL) 중 이소부티르알데히드(2.7 mL, 29.6 mmol)의 교반 용액에 디설퍼디클로라이드(1.2 mL, 14.8 mmol)를 50°C에서 질소 분위기하에서 적가하였다. 반응물을 질소의 기류하에 30℃에서 추가 48시간 동안 교반하여 유리된 염화수소를 제거하였다. TLC(석유 에테르 중 25% 에틸 아세테이트, Rf = 0.5)는 반응이 완료되었음을 나타내었다. 용액을 진공하에서 증류하고 석유 에테르 중 25% 에틸 아세테이트로 용출하는 플래시 크로마토그래피로 정제하여 2-[(1,1-디메틸-2-옥소-에틸)디술파닐]-2-메틸-프로파날(3000 mg, 98.2%)을 무색 오일로서 수득하였다. ^{1}H NMR (400MHz, chloroform-d): δ = 9.09 (s, 2H), 1.37 (s, 12H).

[1125] ***화합물 8의 일반적인 제조 절차:***

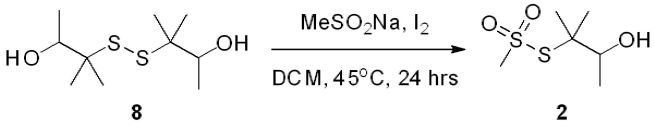


[1126]

[1127] 테트라히드로푸란(30 mL) 중 2,2'-디술판디일비스(2-메틸프로파날)(1500.0 mg, 7.3 mmol)의 용액에 메틸마그네슘브로마이드(9.7 mL, 29.1 mmol)를 0°C에서 5분에 걸쳐 적가하였다. 혼합물을 0°C에서 2시간 동안 교반하였다.

[1128] TLC(석유 에테르 중 20% 에틸 아세테이트, Rf = 0.5)는 반응이 완료되었음을 나타내었다. 혼합물을 포화 NH_4Cl 수용액(10 mL)으로 중지시키고, EtOAc(20 ml x 3)로 추출하였다. 취합한 유기상을 물(20 mL) 및 염수(10 mL)로 세척하고, Na2SO4 상에서 건조하고, 여과 및 농축하여 3-[(2-히드록시-1,1-디메틸-프로필)디술파닐]-3-메틸-부탄-2-올(1370 mg, 79%)을 황색 오일로서 수득하였다. ^{1}H NMR (400MHz, chloroform-d): δ = 3.77 - 3.74 (m, 1H), 1.31 (s, 6H), 1.26 (d, *J* = 2.4 Hz, 3H), 1.19 (d, *J* = 6.4 Hz, 3H).

[1129] ***화합물 2의 일반적인 제조 절차:***

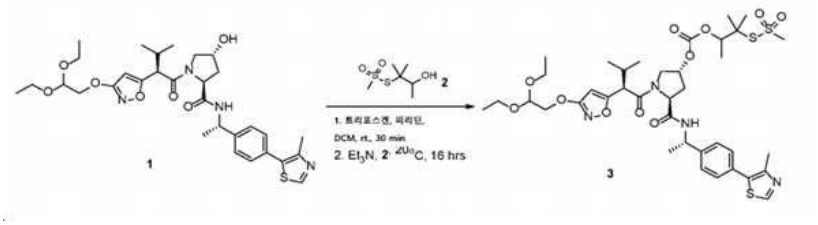


[1130]

[1131] 디클로로메탄(50 mL) 중 2-메틸-2-[(5-니트로-2-피리딜)디술파닐]프로판-1-올(5983.8 mg, 22.99 mmol)의 용액

에 3-[(2-히드록시-1,1-디메틸-프로필)디술파닐]-3-메틸-부탄-2-올(1370.0 mg, 5.75 mmol) 및 요오드(2917 mg, 11.49 mmol)를 25°C에서 첨가하고, 반응 혼합물을 45°C에서 24시간 동안 교반하였다. TLC(석유 에테르 중 33% EtOAc Rf = 0.4)는 반응이 완결되었음을 나타내었다. 혼합물을 여과하고 여액을 진공에서 농축하고 석유 에테르 중 0-50% EtOAc로 용출하는 플래시 크로마토그래피로 정제하여 3-메틸-3-메틸설포닐설파닐-부탄-2-올(460 mg, 40.4% 수율)을 황색 오일로서 수득하였다. ^{1}H NMR (400MHz, chloroform-d): δ = 4.14 - 4.09 (m, 1H), 3.42 (s, 3H), 1.68 (s, 3H), 1.45 (s, 3H), 1.29 (d, *J* = 6.4 Hz, 3H).

[1132] ***화합물 3의 일반적인 제조 절차:***

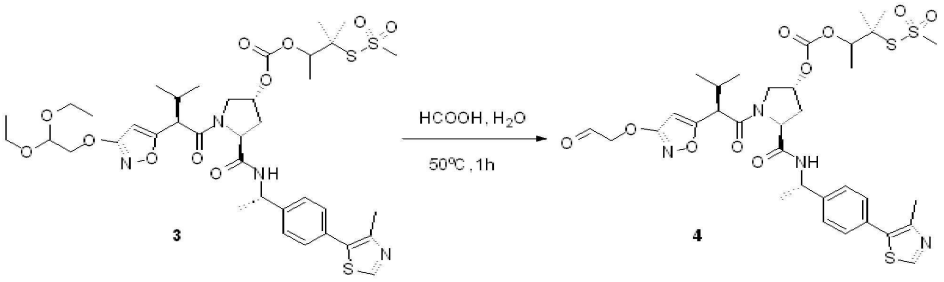


[1133]

[1134] 디클로로메탄(2 mL) 중 트리포스겐(112.3 mg, 0.38 mmol) 용액에 디클로로메탄(2 mL) 중 3-메틸-3-메틸설포닐설파닐-부탄-2-올(150.0 mg, 0.76 mmol) 및 피리딘(239.3 mg, 3.03 mmol)의 용액을 첨가하고, 반응물을 25°C에서 30분 동안 교반하였다. 반응 혼합물을 농축 건조하여 조 생성물을 수득하고 다음 단계에서 직접 사용하였다.

[1135] 무수 디클로로메탄(2 mL) 중 상기 조 생성물에 4Å MS(100 mg)를 첨가한 후, 무수 디클로로메탄(2 mL) 중 트리에틸아민(32.9 mg, 0.33 mmol) 및 ***화합물 1***(50.0 mg, 0.08 mmol)의 용액을 20°C에서 천천히 첨가하고 추가 16시간 동안 교반하였다. 잔류물을 농축하고 석유 에테르 중 0~70% 에틸 아세테이트로 용출하는 실리카겔의 플래시 크로마토그래피로 정제하여 ***화합물 3***(64 mg, 93.8%)을 백색 고체로서 수득하였다. LCMS(5-95, AB, 1.5분): RT = 0.974분, m/z = 839.3 $[M+H]^+$.

[1136] ***화합물 4의 일반적인 제조 절차:***

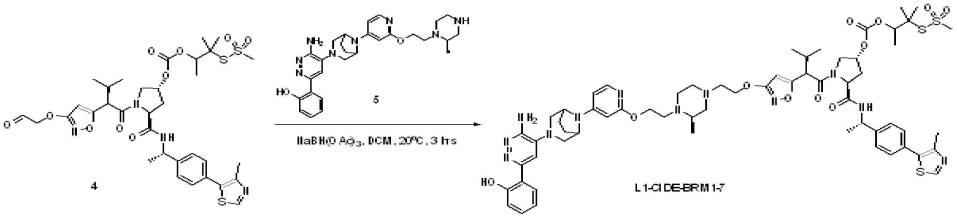


[1137]

[1138] 용액에 포름산(2 mL) 및 물(2 mL) 중 **화합물 3**(50.0 mg, 0.06 mmol)을 첨가하고 50°C에서 1시간 동안 교반하였다. 반응 혼합물을 농축하여 황색 고체로서 **화합물 4**(45 mg, 98.7%)를 수득하여 다음 단계에 직접 사용하였다.

[1139] LCMS(5-95, AB, 1.5분): R_T = 0.848분, m/z = 765.2 $[M+H]^+$.

[1140] ***L1-CIDE-BRM1-7의 일반적인 제조 절차:***



[1141]

[1142] 디클로로메탄(2 mL) 중 **화합물 4**(45.0 mg, 0.06 mmol)의 용액에 **화합물 5**(33.1 mg, 0.06 mmol) 및 *나트륨트리아세톡시보로하이드라이드*(249.4 mg, 1.18 mmol)를 첨가하였다. 반응 혼합물을 20℃에서 3시간 동안 교반하였다. 혼합물을 농축하고 TLC(DCM 중 8% MeOH)로 정제하여 **L1-CIDE-BRM1-7**(15.0 mg, 19.4%)을 백색 고체

로서 수득하였다.

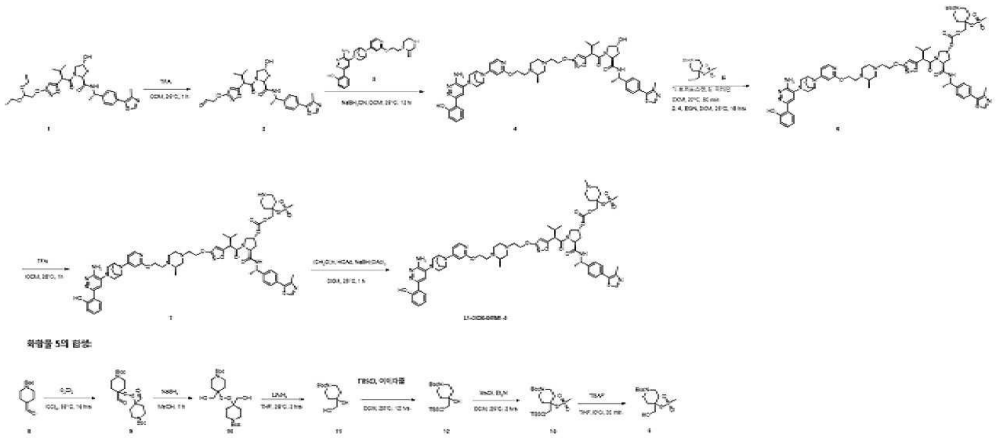
[1143] ^{1}H NMR (400MHz, methanol-d4): δ = 8.88 (s, 1H), 7.81 - 7.75 (m, 2H), 7.49 - 7.41 (m, 5H), 7.24 - 7.20 (m, 1H), 6.92 - 6.87 (m, 2H), 6.57 (d, *J* = 4.0 Hz, 1H), 6.22 (d, J = 2.0 Hz, 1H), 6.01 (d, *J* = 3.2 Hz, 1H), 5.28 - 5.24 (m, 1H), 5.05 - 5.02 (m, 1H), 4.61 (s, 2H), 4.53 - 4.49 (m, 3H), 4.36 - 4.31 (m, 4H), 4.04 - 3.90 (m, 2H), 3.67 - 3.65 (m, 1H), 3.46 - 3.43 (m, 1H), 3.39 (s, 3H), 3.16 - 3.03 (m, 4H), 2.95 - 2.91 (m, 2H), 2.78 - 2.72 (m, 3H), 2.68 - 2.63 (m, 2H), 2.49 (s, 3H), 2.39 - 2.33 (m, 2H), 2.26 - 2.23 (m, 2H), 2.19 - 2.06 (m, 4H), 1.59 - 1.52 (m, 7H), 1.46 (d, *J* = 4.0 Hz, 2H), 1.40 - 1.29 (m, 6H), 1.14 (d, *J* = 6.4 Hz, 3H), 1.05 (d, *J* = 6.4 Hz, 3H), 0.88 (d, *J* = 6.4 Hz, 3H).

[1144] LCMS(5-95, AB, 1.5분): R_T = 0.829분, m/z= 633.5 $[M/2+H]^+$. HRMS (5-95AB): m/z = 1265.5126 $[M+H]^+$.

[1145] 합성 실시예 8

[1146] L1-CIDE-BRM1-8의 합성

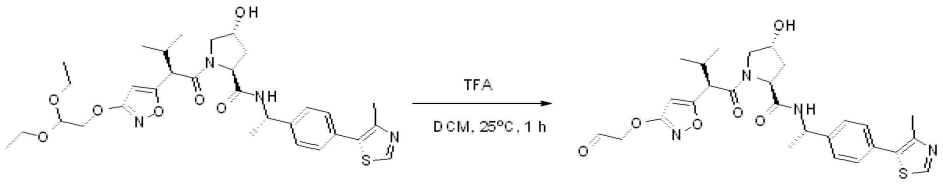
[1147] 반응식 :



[1148]

[1149] 실험:

[1150] ***화합물 2의 일반적인 제조 절차:***

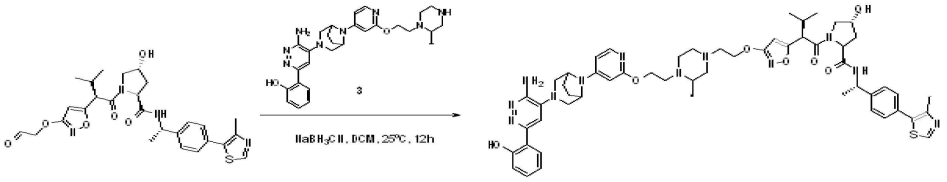


1 2

[1151]

[1152] 디클로로메탄(2.00 mL) 및 트리플루오로아세트산(0.40 mL) 중 ***화합물 1***(120.00 mg, 0.20 mmol)의 용액을 25°C에서 1시간 동안 교반하였다. TLC(DCM에서 10% MeOH, Rf = 0.6)는 대부분의 출발 물질이 소비되었고 새로운 반점이 형성되었음을 보여주었다. 이후, 혼합물에 물(3.00 mL)을 첨가하고 포화 $NaHCO_3$(8.00 mL)을 이용하여 pH = 9로 조정하였다. 이후, 혼합물을 디클로로메탄(15 mL × 3)으로 추출하였다. 유기층을 농축하여 조 **화합물 2**(90.00 mg, 85.3%)를 백색 고체로서 수득하였다. LCMS(5-95, AB, 1.5분): R_T = 0.789분, m/z = 541.3 $[M+H]^+$.

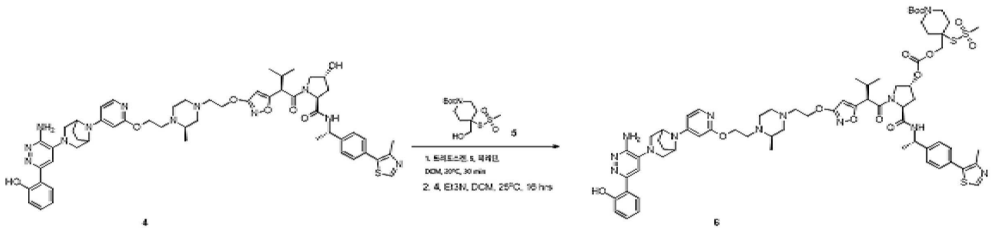
[1153] ***화합물 4의 일반적인 제조 절차:***



[1154]

[1155] 메틸 알코올(5.00 mL) 및 디클로로메탄(5.00 mL) 중 ***화합물 3***(75.50 mg, 0.14 mmol) 및 ***화합물 2***(90.00 mg, 0.14 mmol)의 용액에 나트륨시아노보로하이드라이드(12.9 mg, 0.20 mmol) 및 아세트산나트륨(16.80 mg, 0.20 mmol)을 첨가하였다. 혼합물을 25℃에서 12시간 동안 교반하였다. TLC(DCM 중 12% MeOH, Rf=0.6)는 대부분의 출발 물질이 소비되었고 새로운 반점이 형성되었음을 보여주었다. 혼합물을 여과하고 여액을 농축하고 분취용 TLC(DCM 중 12% MeOH)로 정제하여 ***화합물 4***(40.00 mg, 28.1%)를 백색 고체로서 수득하였다. LCMS(5-95, AB, 1.5분): R_T = 0.755분, m/z = 1041.2 $[M+H]^+$.

[1156] ***화합물 6의 일반적인 제조 절차:***

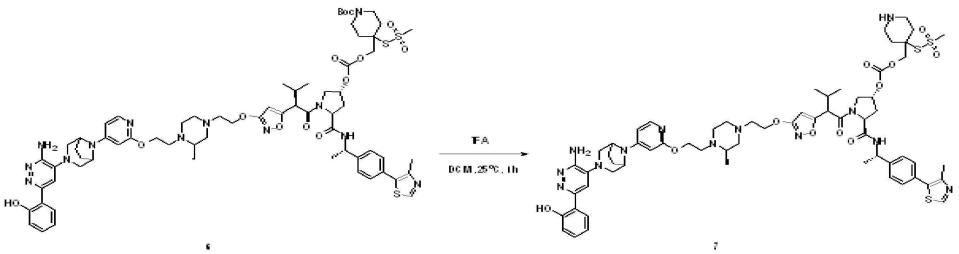


[1157]

[1158] 디클로로메탄(2.0 mL) 중 트리포스겐(18.3 mg, 0.062 mmol) 및 4A 분자체의 혼합물에 디클로로메탄(2.0 mL) 중 tert-부틸 4-(히드록시메틸)-4-메틸술포닐술파닐-피페리딘-1-카르복실레이트(20.0 mg, 0.062 mmol) 및 피리딘(0.02 mL, 0.184 mmol)의 용액을 첨가하였다. 반응 혼합물을 20°C에서 30분 동안 교반하였다. 반응 혼합물을 농축하여 조 생성물을 수득하고, 이를 다음 단계에서 직접 사용하였다.

[1159] 무수 디클로로메탄(5.00 mL) 중 상기 조 생성물 및 4Å Ms(100 mg)에 무수 N,N-디메틸포름아미드(2.00 mL) 중 N,N-디이소프로필에틸아민(0.02 mL, 0.09 mmol) 및 ***화합물 4***(30.00 mg, 0.03 mmol)의 용액을 첨가하였다. 혼합물을 25°C에서 16시간 동안 교반하였다. TLC(DCM 중 11% MeOH, Rf=0.6)는 대부분의 출발 물질이 소비되었고 새로운 반점이 형성되었음을 보여주었다. 혼합물을 여과하고 농축하여 조 생성물을 수득하고, 이를 분취용 TLC(DCM 중 11% MeOH)로 정제하여 ***화합물 6***(25.00 mg, 62.3%)를 연황색 고체로서 수득하였다. LCMS(10-80, AB, 7.0분): R_T = 3.096분, m/z = 697.1 $[M/2+H]^+$

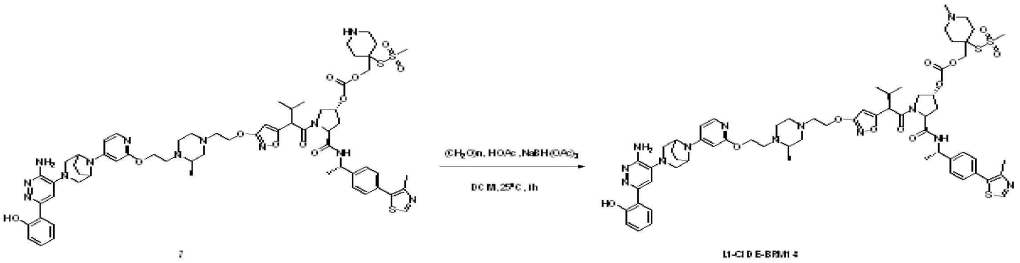
[1160] ***화합물 7의 일반적인 제조 절차:***



[1161]

[1162] 디클로로메탄(1.00 mL) 중 ***화합물 6***(20.00 mg, 0.01 mmol)의 용액에 트리플루오로아세트산(0.80 mL, 10.38 mmol)을 첨가하였다. 혼합물을 25℃에서 1시간 동안 교반하였다. 혼합물을 농축하여 조 생성물 7을 TFA 염으로서 수득하고, 이를 다음 단계에 직접 사용하였다.

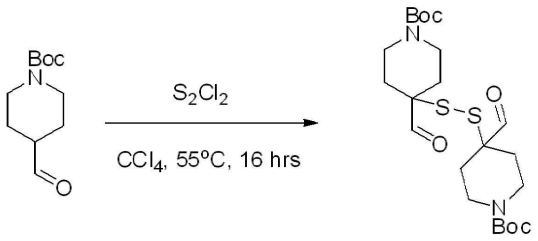
[1163] *L1-CIBE-BRM1-8의 일반적인 제조 절차:*

[1164] 

[1165] 디클로로메탄(2 mL) 및 메틸 알코올(1 mL) 중 포름알데히드(4.3 mg, 0.14 mmol) 및 ***화합물 7***(20.20 mg, 0.01 mmol)의 용액에 아세트산(1.00 mg)을 첨가하였다. 혼합물을 25℃에서 30분 동안 첨가하였다. 이후, 나트륨트리아세톡시보로하이드라이드(9.2 mg, 0.04 mmol)를 첨가하였다. 혼합물을 25℃에서 1시간 동안 교반하였다. 이후, 혼합물을 DCM(15 mL)으로 희석하고 염으로 세척하였다. $NaHCO_3$(5 mL) 및 유기층을 농축하고 잔류물을 역상 크로마토그래피(수중 아세토니트릴 14-44/0.225% FA)로 정제하여 **L1-CIDE-BRM1-8**(3.60 mg, 18.2%)을 백색 고체로서 수득하였다.

[1166] ^{1}H NMR (400MHz, DMSO-d6): δ = 8.99 (s, 1H), 8.49 (d, *J* = 8.0 Hz, 1H), 8.15 (s, 1H), 7.91 (d, *J* = 8.0 Hz, 1H), 7.78 (d, *J* = 6.0 Hz, 1H), 7.49 - 7.36 (m, 6H), 7.22 - 7.20 (m, 1H), 6.88 - 6.85 (m, 2H), 6.54 - 6.52 (m, 1H), 6.13 (d, *J* = 8.0 Hz, 2H), 5.97 - 5.94 (m, 2H), 5.25 - 5.21 (m, 1H), 4.93 - 4.89 (m, 1H), 4.52 - 4.43 (m, 6H), 4.26 - 4.21 (m, 6H), 3.87 (br s, 1H), 3.72 (d, *J* = 9.2 Hz, 1H), 3.52 (s, 3H), 3.02 - 2.96 (m, 4H), 2.61 (br s, 4H), 2.46 - 2.33 (m, 10H), 2.20 - 2.14 (m, 6H), 1.96 - 1.89 (m, 10H), 1.38 (d, *J* = 7.2 Hz, 3H), 0.99 - 0.95 (m, 6H), 0.81 (d, *J* = 6.4 Hz, 3H). LCMS(5-95, AB, 1.5분): R_T =0.781분, m/z = 1306.5 $[M+H]^+$.

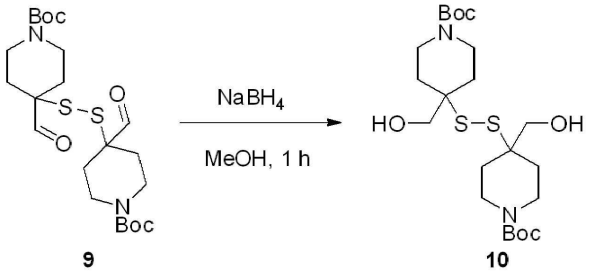
[1167] *화합물 9의 일반적인 제조 절차:*

[1168] 

8 9

[1169] 사염화탄소(150 mL) 중 tert-부틸 4-포르밀-1-피페리딘카르복실레이트(9870.7 mg, 46.28 mmol)의 혼합물에 디설퍼디클로라이드(1.48 mL, 18.51 mmol)를 55°C에서 첨가하였고, 혼합물을 55℃에서 16시간 동안 교반하였으며, TLC(디클로로메탄 중 10% 메틸 알코올, Rf = 0.5)는 반응이 완료되었음을 나타내었다. 혼합물을 여과하고 유기층을 진공에서 농축하였다. 잔류물에 물(30 mL)을 첨가하고 디클로로메탄(3 x 50 mL)으로 추출하고, 유기층을 취합하고 Na_2SO4 상에서 건조하고 여과하고 농축하여 조 물질을 수득하였으며, 이를 분취용 TLC(디클로로메탄 중 10% 메틸 알코올, R_f = 0.5)로 정제하여 tert-부틸 4-[(1-tert-부톡시카르보닐-4-포르밀-4-피페리딜)디술파닐]-4-포르밀-피페리딘-1-카르복실레이트(5.5 g, 60.8%)를 밴색 고체로서 수득하였다. ^{1}H NMR (400 MHz, chloroform-d): δ = 9.06 (s, 2H), 3.73 (br s, 4H), 3.18 - 3.11 (m, 4H), 2.07 - 2.02 (m, 4H), 1.74 - 1.69 (m, 4H), 1.46 (s, 18 H).

[1170] ***화합물 10의 일반적인 제조 절차:***

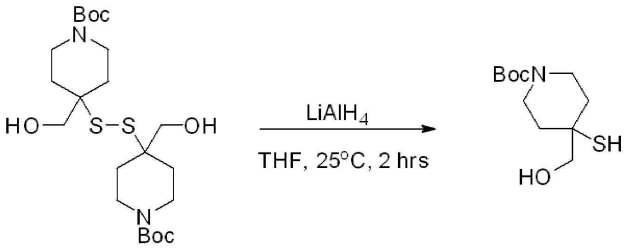


9 10

[1171]

[1172] 메틸 알코올(40 mL) 중 tert-부틸 4-[(1-tert-부톡시카르보닐-4-포르밀-4-피페리딜)디술파닐]-4-포르밀-피페리딘-1-카르복실레이트(3000.0 mg, 6.14 mmol)의 혼합물에 수소화붕소나트륨(696.7 mg, 18.42 mmol)을 첨가하고, 혼합물을 25℃에서 1시간 동안 교반하고, TLC(디클로로메탄 중 10% 메틸 알코올, Rf=0.5)가 새로운 반점을 나타내고, 반응을 물(30 mL)을 첨가하여 켄칭하고 생성된 혼합물을 디클로로메탄(3 x 30 mL)으로 추출하고, 유기층을 취합하고 Na_2SO4로 건조하고, 여과하고 농축하여 조 생성물을 수득하고, 이를 디클로로메탄 중 0-3% 메틸 알코올로 용출하는 실리카 상의 크로마토그래피로 정제하여 tert-부틸 4-[[1-tert-부톡시카르보닐-4-(히드록시메틸)-4-피페리딜]디술파닐]-4-(히드록시메틸)피페리딘-1-카르복실레이트(3000 mg, 99%)를 백색 고체로서 수득하였다. ^{1}H NMR (400 MHz, chloroform-d): δ = 3.75 - 3.72 (m, 4H), 3.59 (s, 4H), 3.32 - 3.26 (m, 4H), 1.75 - 1.67 (m, 8H), 1.46 (s, 18H).

[1173] ***화합물 11의 일반적인 제조 절차:***

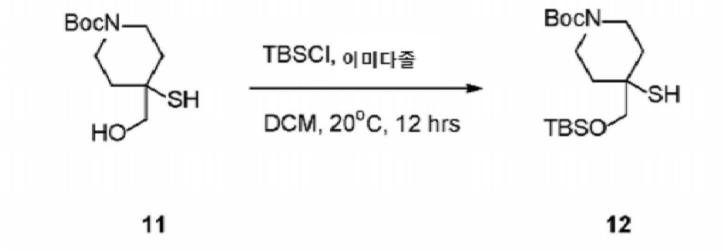


10 11

[1174]

[1175] 테트라히드로푸란(40 mL) 중 수소화알루미늄리튬(1232.4 mg, 32.47 mmol)의 현탁액에 테트라히드로푸란(40 mL) 중 tert-부틸 4-[[1-tert-부톡시카르보닐-4-(히드록시메틸)-4-피페리딜]디술파닐]-4-(히드록시메틸)피페리딘-1-카르복실레이트 (3200.0 mg, 6.49 mmol)의 용액을 적가하였다. 형성된 혼합물을 질소하에 25℃에서 2시간 동안 교반하였다. 반응물을 수성 NH_4Cl(10 mL)으로 켄칭하고, 에틸 아세테이트(30 mL x 3)로 추출하였다. 유기층을 무수 황산나트륨 상에서 건조하고 진공 농축하여 조 생성물 tert-부틸 4-(히드록시메틸)-4-술파닐-피페리딘-1-카르복실레이트(2700 mg, 100%)로 수득하여, 이를 다음 단계에서 직접 사용하였다. ^{1}H NMR (400 MHz, chloroform-d): δ = 3.96 - 3.92 (m, 2H), 3.52 (s, 2H) 3.27 - 3.21 (m, 2H), 1.64 - 1.61 (m, 4H), 1.47 (s, 9H).

[1176] ***화합물 12의 일반적인 제조 절차:***



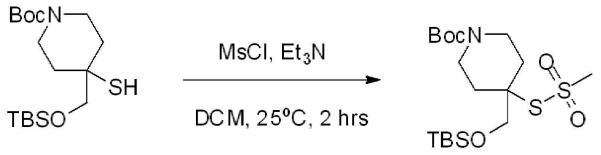
11 12

[1177]

[1178] 디클로로메탄(40 mL) 중 이미다졸(1783.5 mg, 26.2 mmol) 및 tert-부틸 4-(히드록시메틸)-4-술파닐-피페리딘-1-카르복실레이트(2700.0 mg, 10.92 mmol)의 용액에 디클로로메탄(40 mL) 중 tert-부틸디메틸클로로실란

(2467.8 mg, 16.37 mmol)을 첨가하였다. 혼합물을 20°C에서 12시간 동안 계속 교반하였다. TLC(석유 에테르 중 20 % 에틸 아세테이트, Rf=0.58)는 반응이 완료되었음을 나타내었다. 이후, 혼합물을 물(20 mL)로 세척하고, 유기층을 무수 황산나트륨 상에서 건조시키고 진공하에 농축시키고, 조 생성물을 실리카의 크로마토그래피로 정제하여(석유 에테르 중 10% 에틸 아세테이트, Rf = 0.58) tert-부틸 4-[[tert-부틸(디메틸)실릴]옥시메틸]-4-술파닐-피페리딘-1-카르복실레이트(3800 mg, 96.3%)를 수득하였다. ^{1}H NMR (400 MHz, chloroform-d): δ = 3.96 - 3.92 (m, 2H), 3.52 (s, 2H), 3.20 - 3.13 (m, 2H), 1.72 - 1.65 (m, 2H), 1.52 - 1.49 (m, 2H), 1.45 (s, 9H), 0.90 (s, 9H), 0.06 (s, 6H).

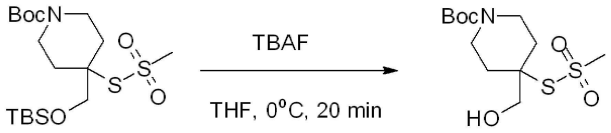
[1179] ***화합물 13의 일반적인 제조 절차:***



[1180] **12** **13**

[1181] N2 보호하에 디클로로메탄(20 mL) 중 메탄설포닐 클로라이드(2.51 g, 21.91 mmol)의 용액에 디클로로메탄(20 mL) 중 tert-부틸 4-[[tert-부틸(디메틸)실릴]옥시메틸]-4-술파닐-피페리딘-1-카르복실레이트(3.8 g, 10.51 mmol) 및 트리에틸아민(5.45 mL, 42.03 mmol)의 용액을 적가하였다. 혼합물을 25°C에서 2시간 동안 교반하였다. TLC(석유 에테르 중 20% 에틸 아세테이트, Rf = 0.3)는 새로운 반점을 나타내었다. 반응물을 물(30 mL)로 퀜칭하고 디클로로메탄(30 mL × 3)으로 추출하였다. 유기층을 농축하고 석유 에테르 중 0-10% 에틸 아세테이트로 용출하는 실리카 상의 컬럼으로 정제하여 tert-부틸 4-[[tert-부틸(디메틸)실릴]옥시메틸]-4-메틸술포닐술파닐-피페리딘-1-카르복실레이트(1670 mg, 36.1%)를 백색 고체로서 수득하였다. ^{1}H NMR (400 MHz, chloroform-d): δ = 3.94 - 3.88 (m, 4H), 3.39 (s, 3H), 3.26 - 3.20 (m, 1H), 1.99 - 1.95 (m, 2H), 1.86 - 1.80 (m, 2H), 1.46 (s, 9H), 0.91 (s, 9H), 0.10 (s, 6H). LCMS(5-95, AB, 1.5분): R_T = 1.126분, m/z = 340.1[M-100+H]$^+$.

[1182] ***화합물 5의 일반적인 제조 절차:***

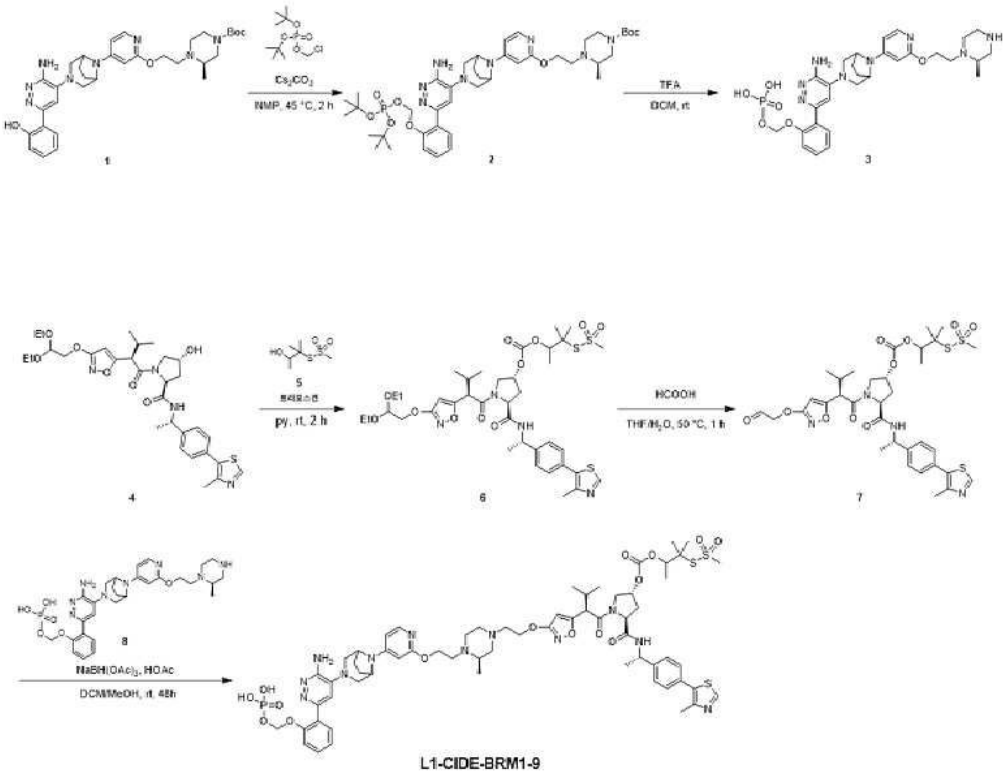


[1183] **13** **5**

[1184] 테트라히드로푸란(10.0 mL) 중 tert-부틸 4-[[tert-부틸(디메틸)실릴]옥시메틸]-4-메틸술포닐술파닐-피페리딘-1-카르복실레이트(1500.00 mg, 3.41 mmol)의 용액에 테트라부틸암모늄플루오라이드(5.12 mL, 5.12 mmol, THF 중 1 mol/L)를 첨가하였다. 혼합물을 0℃에서 20분 동안 교반하였다. TLC(석유 에테르 중 60% EtOAc, Rf=0.4)는 대부분의 출발 물질이 소모되었음을 보여주었다. 혼합물에 EtOAc(70 mL)를 첨가하고, 유기층을 물(25 mL x 2), 염수(25 mL)로 세척하고 유기층을 농축하여 조 생성물을 수득하였고, 이를 석유 에테르 중 0-60% EtOAc로 용출하는 실리카 상의 플래시 컬럼으로 정제하여 tert-부틸 4-(히드록시메틸)-4-메틸술포닐술파닐-피페리딘-1-카르복실레이트(670.00 mg, 60.4%)를 무색 오일로서 수득하였다. ^{1}H NMR (400MHz, chloroform-d): δ = 3.96 (s, 2H), 3.89 - 3.85 (m, 2H), 3.43 (s, 3H), 3.31 - 3.28 (m, 2H), 2.12 - 2.08 (m, 2H), 1.82 - 1.76 (m, 2H), 1.47 (s, 9H).

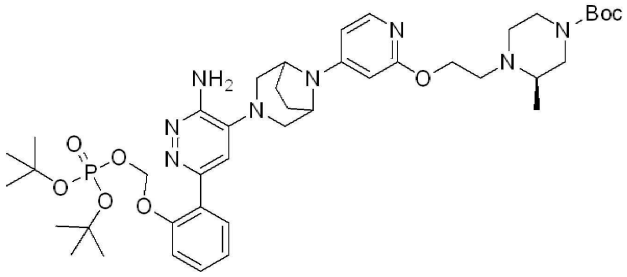
[1185] 합성 실시예 9

[1186] L1-CIDE-BRM1-9의 합성



[1187]

[1188] **단계 1: (3*R*)-tert-부틸 4-(2-((4-(3-(3-아미노-6-(2-(((디-tert-부톡시포스포릴)옥시)메톡시)페닐)피리다진-4-일)-3,8-디아자비시클로[3.2.1]옥탄-8-일)피리딘-2-일)옥시)에틸)-3-메틸피페라진-1-카르복실레이트**

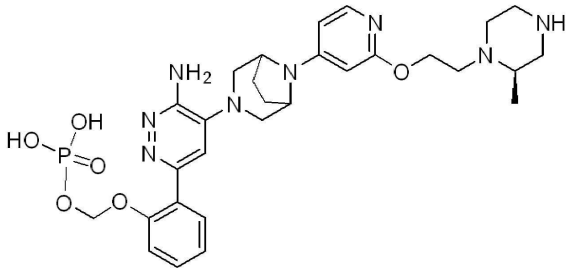


[1189]

[1190] 1-메틸피롤리딘-2-온(8.0 mL) 중 (3*R*)-tert-부틸 4-(2-((4-(3-(3-아미노-6-(2-히드록시페닐)피리다진-4-일)-3,8-디아자비시클로[3.2.1]옥탄-8-일)피리딘-2-일)옥시)에틸)-3-메틸피페라진-1-카르복실레이트(300 mg, 0.49 mmol)의 용액에 탄산세슘(0.32 g, 0.97 mmol) 및 디-*tert*-부틸(클로로메틸)포스페이트(0.19 g, 0.73 mmol)를 첨가하였다. 반응 혼합물을 45℃에서 12시간 동안 교반하였다. 반응 혼합물을 물(20 mL)로 퀜칭하고 에틸 아세테이트(20 mL x 3)로 추출하였다. 취합한 유기층을 염수(10 mL x 2)로 세척하고, 무수 황산나트륨 상에서 건조하고, 여과하고, 감압 하에 농축하여 잔류물을 수득하였다. 잔류물을 실리카겔 크로마토그래피(디클로로메탄 중 실리카겔, 100-200 메시, 0-2% 메탄올)로 정제하여 표제 화합물(200 mg, 49% 수율)을 황색 오일로서 수득하였다.

[1191] LCMS (ESI) *m/z*: 839.3 $[M+H]^+$.

[1192] **단계 2: (2-(6-아미노-5-(8-(2-(2-((*R*)-2-메틸피페라진-1-일)에톡시)피리딘-4-일)-3,8-디아자비시클로[3.2.1]옥탄-3-일)피리다진-3-일)페녹시)메틸 디히드로겐 포스페이트**

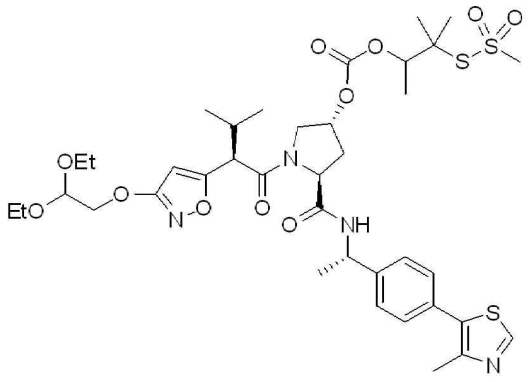


[1193]

[1194] (3*R*)-tert-부틸 4-(2-((4-(3-(3-아미노-6-(2-(((디-tert-부톡시포스포릴)옥시)메톡시)페닐)피리다진-4-일)-3,8-디아자비시클로[3.2.1]옥탄-8-일)피리딘-2-일)옥시)에틸)-3-메틸피페라진-1-카르복실레이트(200 mg, 0.24 mmol)의 용액에 헥사플루오로이소프로판올(5.0 mL) 중 5% 트리플루오로아세트산을 첨가하였다. 반응 혼합물을 20°C에서 3시간 동안 교반하였다. 반응물을 농축하고 컬럼 보스턴 그린 ODS 150*30 mm*5 um 조건 물(0.225% 포름산)-아세토니트릴(5%-35%)로 정제하여 표제 화합물(100 mg, 56.6% 수율)을 황색 고체로 수득하였다.

[1195] LCMS (ESI) m/z: 627.3 $[M+H]^+$.

[1196] **단계 3: S-(3-(((((3*R*,5*S*)-1-((*R*)-2-(3-(2,2-디에톡시에톡시)이속사졸-5-일)-3-메틸부타노일)-5-(((*S*)-1-(4-(4-메틸티아졸-5-일)페닐)에틸)카르바모일)피롤리딘-3-일)옥시)카르보닐)옥시)-2-메틸부탄-2-일)메탄술포노티오에이트**

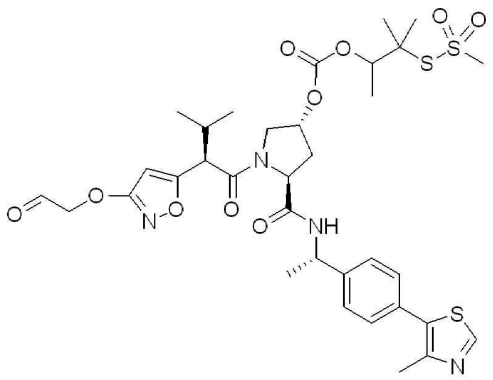


[1197]

[1198] 무수 디클로로메탄(5.0 mL) 중 (2*S*,4*R*)-1-((*R*)-2-(3-(2,2-디에톡시에톡시)이속사졸-5-일)-3-메틸부타노일)-4-히드록시-*N*-((*S*)-1-(4-(4-메틸티아졸-5-일)페닐)에틸)피롤리딘-2-카르복스아미드(380 mg, 0.62 mmol) 및 트리에틸아민(250 mg, 2.47 mmol) 및 4Å MS(50 mg)의 혼합물에 *S*-(3-((클로로카보닐)옥시)-2-메틸부탄-2-일)메탄설포노티오에이트(322 mg, 1.24 mmol)를 20°C에서 16시간 동안 천천히 첨가하였다. 혼합물을 분취용 TLC(디클로로메탄 중 7% 메탄올)로 정제하여 표제 화합물(150 mg, 28.9%)을 백색 고체로서 수득하였다.

[1199] LCMS (ESI) m/z: 839.7 $[M+H]^+$.

[1200] **단계 4: *S*-(2-메틸-3-(((((3*R*,5*S*)-1-((*R*)-3-메틸-2-(3-(2-옥소에톡시)이속사졸-5-일)부타노일)-5-(((*S*)-1-(4-(4-메틸티아졸-5-일)페닐)에틸)카르바모일)피롤리딘-3-일)옥시)카르보닐)옥시)부탄-2-일)메탄술포노티오에이트의 합성**

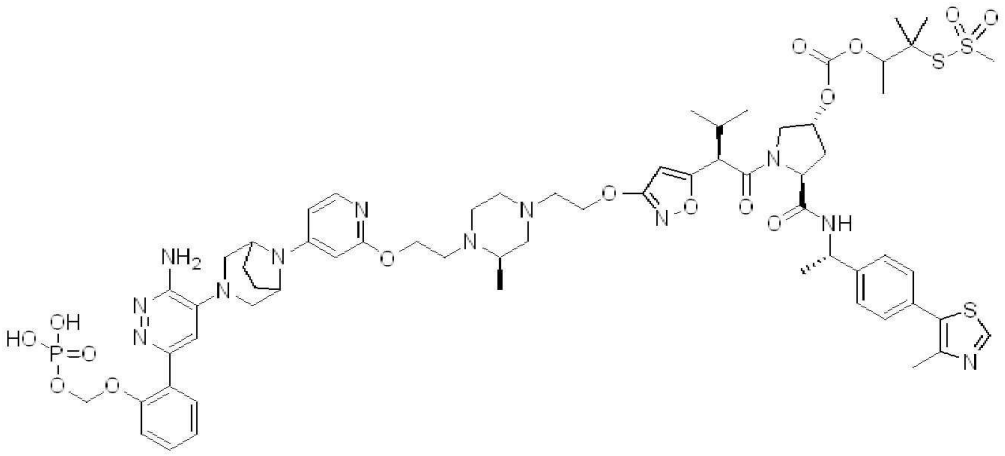


[1201]

[1202] 물(3.0 mL) 및 포름산(8.0 mL) 중 *S*-(3-(((((3*R*,5*S*)-1-((*R*)-2-(3-(2,2-디에톡시에톡시)이속사졸-5-일)-3-메틸부타노일)-5-(((*S*)-1-(4-(4-메틸티아졸-5-일)페닐)에틸)카르바모일)피롤리딘-3-일)옥시)카르보닐)옥시)-2-메틸부탄-2-일)메탄술포노티오에이트(150 mg, 0.18 mmol)의 용액을 50°C에서 2시간 동안 교반하였다. 반응 혼합물을 농축 건조하여 표제 화합물(135 mg, 98.7% 수율)을 백색 고체로서 수득하였다.

[1203] LCMS (ESI) m/z: 765.5 $[M+H]^+$.

[1204] **단계 5: S-(3-(((((3*R*,5*S*)-1-((2*R*)-2-(3-(2-((3*R*)-4-(2-((4-(3-(3-아미노-6-(2-((포스포노옥시)메톡시)페닐)피리다진-4-일)-3,8-디아자비시클로[3.2.1]옥탄-8-일)피리딘-2-일)옥시)에틸)-3-메틸피페라진-1-일)에톡시)이속사졸-5-일)-3-메틸부타노일)-5-(((*S*)-1-(4-(4-메틸티아졸-5-일)페닐)에틸)카르바모일)피롤리딘-3-일)옥시)카르보닐)옥시)-2-메틸부탄-2-일)메탄술포노티오에이트**



[1205]

[1206] 디클로로메탄(5.0 mL) 및 메탄올(5.0 mL) 중 (2-(6-아미노-5-(8-(2-(2-((*R*)-2-메틸피페라진-1-일)에톡시)피리딘-4-일)-3,8-디아자비시클로[3.2.1]옥탄-3-일)피리다진-3-일)페녹시)인산이수소메틸(138 mg, 0.19 mmol) 및 *S*-(2-메틸-3-(((((3*R*,5*S*)-1-((*R*)-3-메틸-2-(3-(2-옥소에톡시)이속사졸-5-일)부타노일)-5-(((*S*)-1-(4-(4-메틸티아졸-5-일)페닐)에틸)카르바모일)피롤리딘-3-일)옥시)카르보닐)옥시)부탄-2-일)메탄술포노티오에이트(130 mg, 0.17 mmol)의 용액에 트리아세톡시수소화붕소나트륨(720 mg, 3.40 mmol)을 첨가하였다. 반응 혼합물을 40°C에서 48시간 동안 교반하였다. 반응 혼합물을 컬럼 웰치(Welch) 엑스티메이트(Xtimate) C18 150*25 mm*5 um 조건 물(0.225% 포름산)-아세토니트릴 20-50%)로 정제하여 표제 화합물(54.2 mg, 21.3%)을 백색 고체로서 수득하였다.

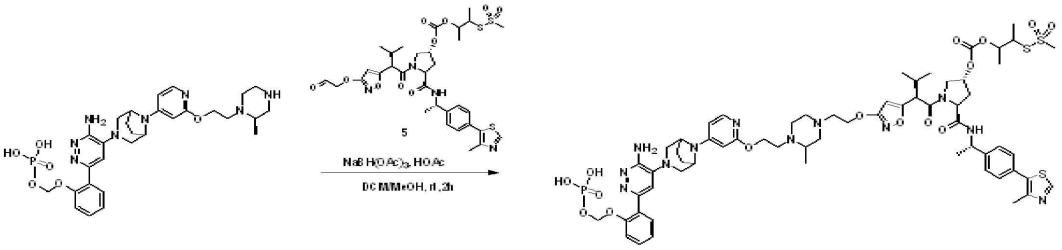
[1207] LCMS (ESI) m/z: 1375.5 $[M+H]^+$.

[1208] ^{1}H NMR (400 MHz, DMSO - d_6) δ (ppm) 8.98 (s, 1H), 8.52 (d, J = 8.0 Hz, 1H), 8.14 (s, 2H), 7.74 (d, J = 6.0 Hz, 1H), 7.61 (d, J = 8.0 Hz, 1H), 7.47 - 7.30 (m, 5H), 7.29 - 7.24 (m, 1H), 7.03 (t, J = 7.2 Hz, 1H), 6.50 (d, J = 6.0 Hz, 1H), 6.26 (s, 1H), 6.12 (d, J = 2.4 Hz, 1H), 5.79 -5.75 (m, 1H), 5.51 - 5.46 (m, 2H), 5.23 - 5.18 (m, 1H), 5.06 - 4.85 (m, 3H), 4.48 - 4.35 (m, 5H), 4.26 - 4.23 (m, 2H), 3.89 - 3.83 (m, 2H), 3.75 - 3.71 (m, 2H), 3.09 - 2.99 (m, 5H), 2.97 - 2.87 (m, 4H), 2.84 - 2.77 (m, 3H), 2.73

- 2.71 (m, 2H), 2.46 - 2.44 (m, 3H), 2.30 - 2.11 (m, 5H), 2.05 - 1.94 (m, 3H), 1.57 - 1.35 (m, 9H), 1.33 - 1.22 (m, 6H), 1.11 - 1.04 (m, 4H), 0.98 - 0.91 (m, 3H), 0.86 - 0.77 (m, 3H).

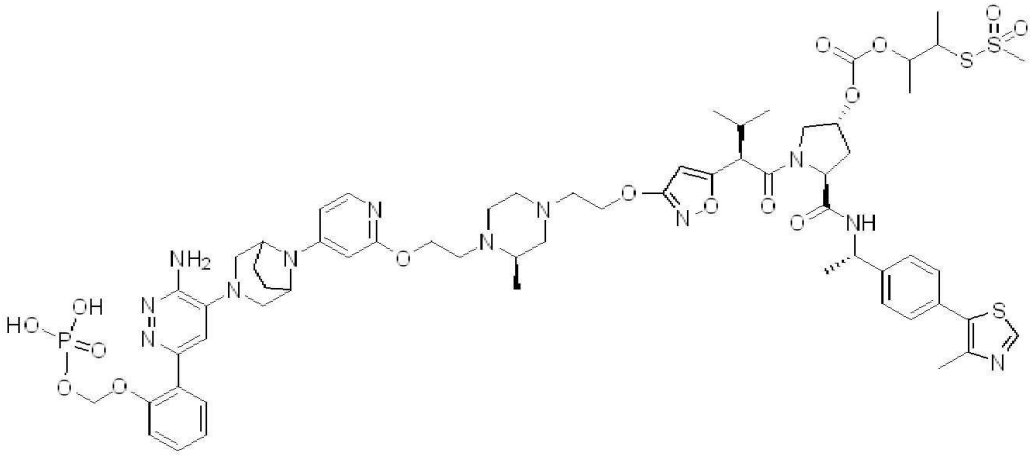
[1209] 합성 실시예 10

[1210] L1-CIDE-BRM1-10의 합성



[1211] 1 L1-CIDE-BRM1-10

[1212] **단계 1: *S*-(3-(((((3*R*,5S)-1-((2R)-2-(3-(2-((3R)-4-(2-((4-(3-(3-아미노-6-(2-((포스포노옥시)메톡시)페닐)피리다진-4-일)-3,8-디아자비시클로[3.2.1]옥탄-8-일)피리딘-2-일)옥시)에틸)-3-메틸피페라진-1-일)에톡시)이속사졸-5-일)-3-메틸부타노일)-5-(((*S*)-1-(4-(4-메틸티아졸-5-일)페닐)에틸)카르바모일)피롤리딘-3-일)옥시)카르보닐)옥시)부탄-2-일)메탄술포노티오에이트**



[1213]

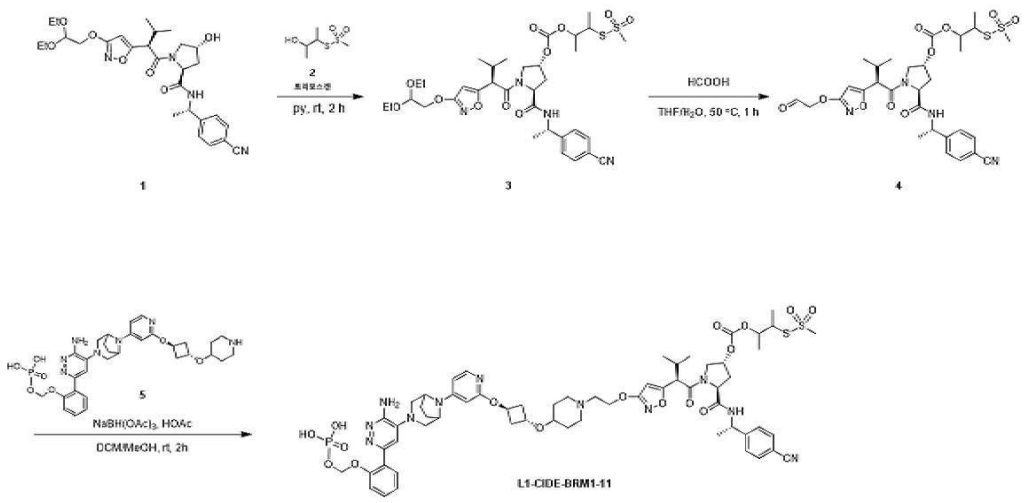
[1214] 디클로로메탄(1.00 mL) 및 메탄올(1.00 mL) 중 S-(3-(((((3*R*,5*S*)-1-((*R*)-3-메틸-2-(3-(2-옥소에톡시)이속사졸-5-일)부타노일)-5-(((*S*)-1-(4-(4-메틸티아졸-5-일)페닐)에틸)카르바모일)피롤리딘-3-일)옥시)카르보닐)옥시)부탄-2-일)메탄술포노티오에이트(100 mg, 0.13 mmol) 및 2-(6-아미노-5-(8-(2-(2-((*R*)-2-메틸피페라진-1-일)에톡시)피리딘-4-일)-3,8-디아자비시클로[3.2.1]옥탄-3-일)피리다진-3-일)페녹시)인산이수소메틸(99.2 mg, 0.16 mmol)의 용액에 트리아세톡시수소화붕소나트륨(615 mg, 2.9 mmol)을 첨가하였다. 반응 혼합물을 20°C에서 3시간 동안 교반하였다. 혼합물을 컬럼 페노메넥스 제미니-NX C18 75*30 mm*3 um 조건 물(0.225% 포름산)-아세토니트릴 10%-40%)로 정제하여 표제 화합물(110 mg, 51.4%)을 백색 고체로서 수득하였다.

[1215] LCMS (ESI) m/z: 1375.5 $[M+H]^+$.

[1216] ^{1}H NMR (400 MHz, DMSO - d_6) δ (ppm) 8.99 (s, 1H), 8.51 (d, J = 6.4 Hz, 1H), 8.15 (s, 2H), 7.82 - 7.72 (m, 1H), 7.64 (d, J = 7.6 Hz, 1H), 7.52 - 7.32 (m, 6H), 7.30 - 7.24 (m, 1H), 7.08 - 7.03 (m, 1H), 6.56 - 6.46 (m, 1H), 6.33 - 6.30 (m, 1H), 6.14 (s, 1H), 5.91 - 5.86 (m, 1H), 5.55-5.50 (m, 2H), 5.21 - 5.18 (m, 1H), 4.98 - 4.87 (m, 2H), 4.51 - 4.31 (m, 5H), 4.30 - 4.22 (m, 2H), 3.91 - 3.84 (m, 2H), 3.77 - 3.73 (m, 2H), 3.58 - 3.51 (m, 2H), 3.18 - 3.11 (m, 4H), 3.07 - 2.97 (m, 4H), 2.95 - 2.81 (m, 5H), 2.79 - 2.72 (m, 2H), 2.47 - 2.45 (m, 3H), 2.37 - 2.14 (m, 5H), 2.10 - 1.88 (m, 3H), 1.48 - 1.23 (m, 9H), 1.20 - 1.05 (m, 3H), 0.98 - 0.93 (m, 3H), 0.88 - 0.76 (m, 3H).

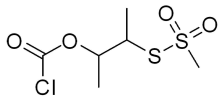
[1217] 합성 실시예 11

[1218] L1-CIDE-BRM1-11의 합성



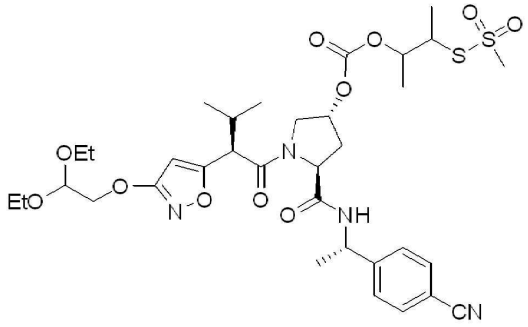
[1219]

[1220] **단계 1: *S*-(3-((클로로카르보닐)옥시)부탄-2-일)메탄술포노티오에이트**

[1221] 

[1222] 디클로로메탄(4.0 mL) 중 *S*-(3-히드록시부탄-2-일)메탄술포노티오에이트(200 mg, 1.09 mmol) 및 피리딘(343 mg, 4.34 mmol)의 용액에 디클로로메탄(2.0 mL) 중 트리포스겐(129 mg, 0.43 mmol)을 첨가하였다. 반응 혼합물을 25℃에서 30분 동안 교반하였다. 반응 혼합물을 농축 건조시켜 표제 화합물(250 mg, 93.4% 수율)을 황색 오일로서 수득하고, 이를 다음 단계에서 직접 사용하였다.

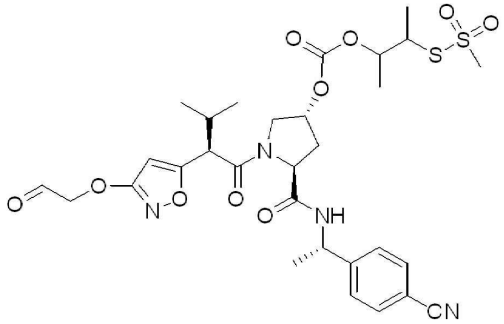
[1223] **단계 2: *S*-(3-(((((3*R*,5*S*)-5-(((*S*)-1-(4-시아노페닐)에틸)카르바모일)-1-((*R*)-2-(3-(2,2-디에톡시에톡시)이속사졸-5-일)-3-메틸부타노일)피롤리딘-3-일)옥시)카르보닐)옥시)부탄-2-일)메탄술포노티오에이트**

[1224] 

[1225] 무수 DCM(4.0 mL) 중 (2*S*,4*R*)-*N*-((*S*)-1-(4-시아노페닐)에틸)-1-((*R*)-2-(3-(2,2-디에톡시에톡시)이속사졸-5-일)-3-메틸부타노일)-4-히드록시피롤리딘-2-카르복스아미드(260 mg, 0.48 mmol), 트리에틸아민(194 mg, 1.92 mmol) 및 4 Å MS(80 mg)의 혼합물에 무수 디클로로메탄(2.0 mL) 중 *S*-(3-((클로로카르보닐)옥시)부탄-2-일)메탄설포노티오에이트(250 mg, 1.01 mmol)를 20°C에서 16시간 동안 천천히 적가하였다. 반응 혼합물을 여과하고 여액을 플래시 크로마토그래피(실리카겔, 100-200 메쉬, 석유 에테르 중 0-70% 에틸 아세테이트)로 정제하여 표제 화합물(150 mg, 41.6%)을 황색 오일로서 수득하였다.

[1226] LCMS (ESI) m/z: 752.9 $[M+H]^+$.

[1227] **단계 3: *S*-(3-(((((3*R*,5*S*)-5-(((*S*)-1-(4-시아노페닐)에틸)카르바모일)-1-((*R*)-3-메틸-2-(3-(2-옥소에톡시)이속사졸-5-일)부타노일)피롤리딘-3-일)옥시)카르보닐)옥시)부탄-2-일) 메탄술포노티오에이트**

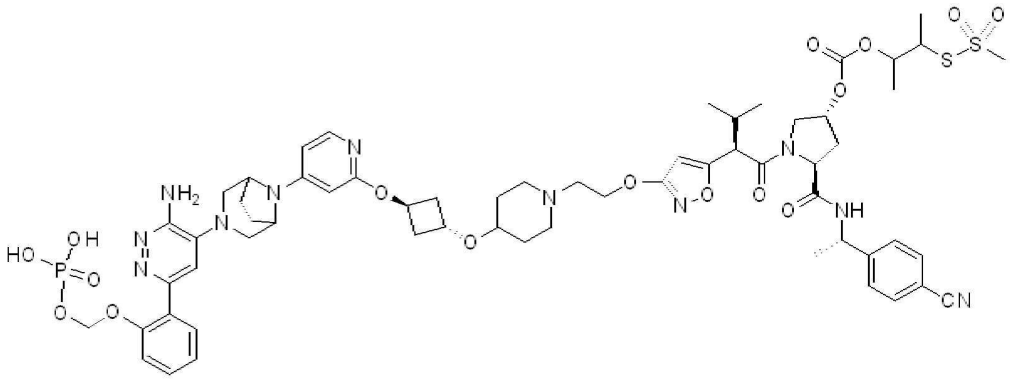


[1228]

[1229] 포름산(5.0 mL) 및 물(1.0 mL) 중 *S*-(3-(((((3*R*,5*S*)-5-(((*S*)-1-(4-시아노페닐)에틸)카르바모일)-1-((*R*)-2-(3-(2,2-디에톡시에톡시)이속사졸-5-일)-3-메틸부타노일)피롤리딘-3-일)옥시)카르보닐)옥시)부탄-2-일)메탄설포노티오에이트(150 mg, 0.20 mmol)의 용액을 50°C에서 16시간 동안 교반하였다. 반응 혼합물을 농축 건조하여 표제 화합물(100 mg, 73.9% 수율)을 황색 오일로서 수득하였다.

[1230] LCMS (ESI) m/z: 679.5 $[M+H]^+$.

[1231] **단계 4: *S*-(3-(((((3*R*,5*S*)-1-((2*R*)-2-(3-(2-(4-((1r,3r)-3-((4-(3-(3-아미노-6-(2-((포스포노옥시)메톡시)페닐)피리다진-4-일)-3,8-디아자비시클로[3.2.1]옥탄-8-일)피리딘-2-일)옥시)시클로부톡시)피페리딘-1-일)에톡시)이속사졸-5-일)-3-메틸부타노일)-5-(((*S*)-1-(4-시아노페닐)에틸)카르바모일)피롤리딘-3-일)옥시)카르보닐)옥시)부탄-2-일) 메탄술포노티오에이트**



[1232]

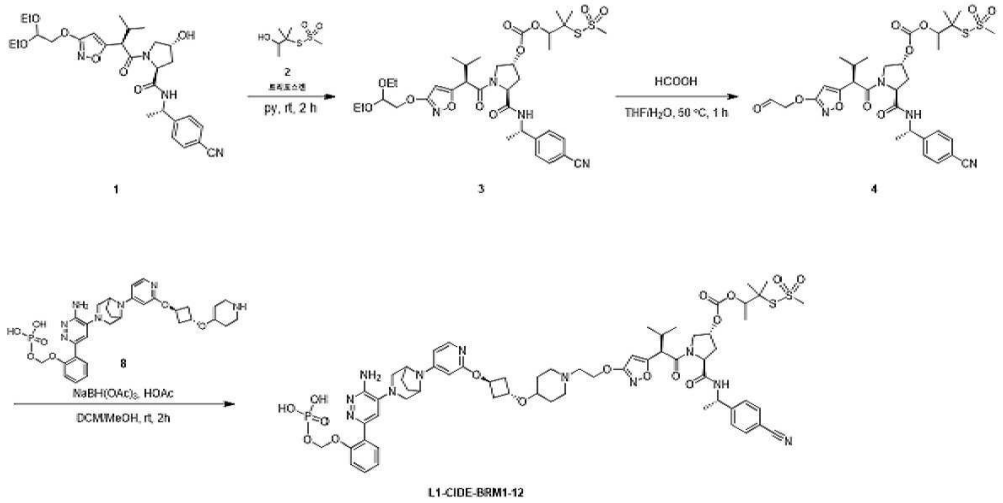
[1233] 디클로로메탄(5.0 mL) 및 메탄올(5.0 mL) 중 (2-(6-아미노-5-(8-(2-((1r,3r)-3-(피페리딘-4-일옥시)시클로부톡시)피리딘-4-일)-3,8-디아자비시이클로[3.2.1]옥탄-3-일)피리다진-3-일)페녹시)인산이수소메틸(169 mg, 0.22 mmol) 및 *S*-(3-(((((3*R*,5*S*)-5-(((*S*)-1-(4-시아노페닐)에틸)카르바모일)-1-((*R*)-2-(3-(2,2-디에톡시에톡시)이속사졸-5-일)-3-메틸부타노일)피롤리딘-3-일)옥시)카르보닐)옥시)부탄-2-일)메탄 술포노티오에이트(150 mg, 0.22 mmol)의 용액에 트리아세톡시수소화붕소나트륨(1.40 g, 6.63 mmol)을 첨가하였다. 반응 혼합물을 20°C에서 48시간 동안 교반하였다. 반응 혼합물을 컬럼 페노메넥스 제미니-NX C18 75*30 mm*3 um 조건 물(0.225% 포름산)-아세토니트릴 10-40%)로 정제하여 표제 화합물(25.6 mg, 8.8% 수율)을 백색 고체로서 수득하였다.

[1234] LCMS (ESI) m/z: 659.1 $[M/2+H]^+$.

[1235] ^{1}H NMR (400 MHz, DMSO - d_6) δ (ppm) 8.58 (d, *J* = 8.0 Hz, 1H), 8.14 (s, 1H), 7.82 - 7.74 (m, 3H), 7.55 (d, *J* = 8.0 Hz, 1H), 7.50 - 7.43 (m, 3H), 7.39 - 7.34 (m, 1H), 7.22 (s, 1H), 7.15 - 7.09 (m, 1H), 6.54 - 6.51 (m, 1H), 6.37 - 6.21 (m, 2H), 6.16 - 6.10 (m, 2H), 5.57 - 5.52 (m, 2H), 5.18 - 5.12 (m, 2H), 4.99 - 4.87 (m, 2H), 4.52 - 4.44 (m, 2H), 4.40 - 4.22 (m, 4H), 3.87 - 3.82 (m, 2H), 3.74 - 3.70 (m, 1H), 3.60 - 3.50 (m, 2H), 3.15 - 3.00 (m, 2H), 2.96 - 2.79 (m, 4H), 2.69 - 2.64 (m, 1H), 2.35 - 2.18 (m, 9H), 2.16 - 2.09 (m, 2H), 2.02 - 1.74 (m, 6H), 1.53 - 1.23 (m, 12H), 0.95 - 0.91 (m, 3H), 0.85 - 0.74 (m, 3H).

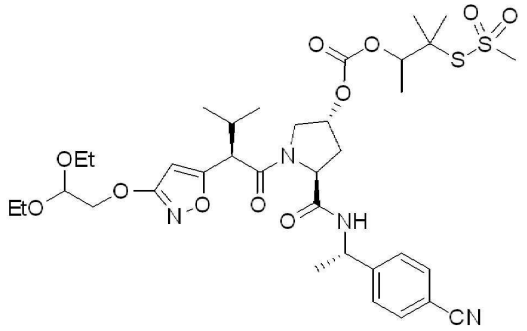
[1236] 합성 실시예 12

[1237] L1-CIDE-BRM1-12의 합성



[1238]

[1239] **단계 1: *S*-(3-(((((3*R*,5*S*)-5-(((*S*)-1-(4-시아노페닐)에틸)카르바모일)-1-((*R*)-2-(3-(2,2-디에톡시에톡시)이속사졸-5-일)-3-메틸부타노일)피롤리딘-3-일)옥시)카르보닐)옥시)-2-메틸부탄-2-일)메탄술포노티오에이트**

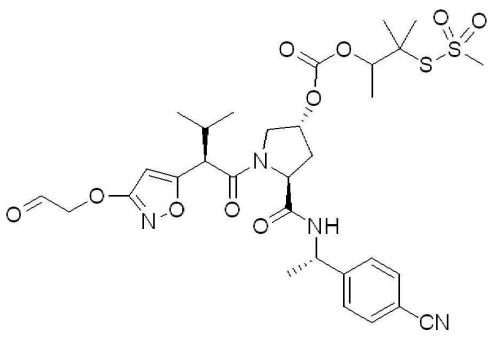


[1240]

[1241] 무수 디클로로메탄(5.0 mL) 중 (2*S*,4*R*)-*N*-((*S*)-1-(4-시아노페닐)에틸)-1-((*R*)-2-(3-(2,2-디에톡시에톡시)이속사졸-5-일)-3-메틸부타노일)-4-히드록시피롤리딘-2-카르복스아미드(300 mg, 0.55 mmol), 피리딘(175 mg, 2.21 mmol) 및 4 Å MS(100 mg)의 혼합물에 무수 디클로로메탄(2 mL) 중 *S*-(3-((클로로카보닐)옥시)-2-메틸부탄-2-일)메탄 설포노티오에이트(259 mg, 1.00 mmol)를 20°C에서 16시간 동안 천천히 적가하였다. 반응 혼합물을 분취용 TLC(디클로로메탄 중 7% 메탄올)로 정제하여 표제 화합물(60.0 mg, 14.2%)을 백색 고체로서 수득하였다.

[1242] LCMS (ESI) m/z: 722.1 $[M+H]^+$.

[1243] **단계 3: *S*-(3-(((((3*R*,5*S*)-5-(((*S*)-1-(4-시아노페닐)에틸)카르바모일)-1-((*R*)-3-메틸-2-(3-(2-옥소에톡시)이속사졸-5-일)부타노일)피롤리딘-3-일)옥시)카르보닐)옥시)-2-메틸부탄-2-일) 메탄술포노티오에이트**

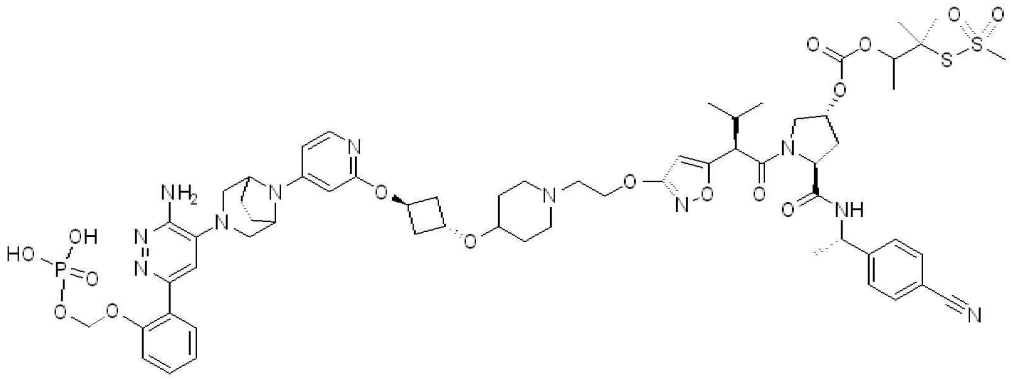


[1244]

[1245] 물(1.00 mL) 및 포름산(5.00 mL)

[1246] 중 *S*-(3-(((((3*R*,5*S*)-5-(((*S*)-1-(4-시아노페닐)에틸)카르바모일)-1-((*R*)-2-(3-(2,2-디에톡시에톡시)이속사졸-5-일)-3-메틸부타노일)피롤리딘-3-일)옥시)카르보닐)옥시)-2-메틸부탄-2-일)메탄술포노티오에이트(60.0 mg, 0.08 mmol)의 용액. 반응 혼합물을 50° C에서 2시간 동안 교반하였다. 생성된 잔류물을 농축하여 표제 화합물(50 mg, 92.2%)을 백색 고체로서 수득하였다. LCMS (ESI) m/z: 693.2 $[M+H]^+$.

[1247] **단계 4: *S*-(3-(((((3*R*,5*S*)-1-((2*R*)-2-(3-(2-(4-((1r,3r)-3-((4-(3-(3-아미노-6-(2-((포스포노옥시)메톡시)페닐)피리다진-4-일)-3,8-디아자비시클로[3.2.1]옥탄-8-일)피리딘-2-일)옥시)시클로부톡시)피페리딘-1-일)에톡시)이속사졸-5-일)-3-메틸부타노일)-5-(((*S*)-1-(4-시아노페닐)에틸)카르바모일)피롤리딘-3-일)옥시)카르보닐)옥시)-2-메틸부탄-2-일)메탄술포노티오에이트**



[1248]

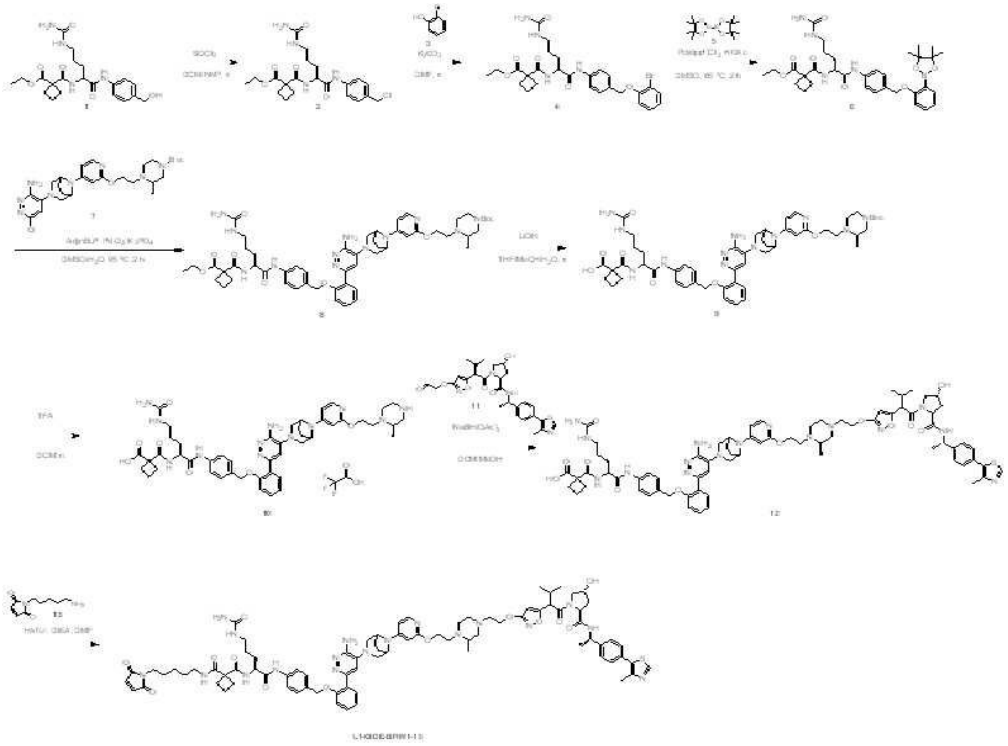
[1249] 디클로로메탄(5.00 mL) 및 메탄올(5.00 mL) 중 (2-(6-아미노-5-(8-(2-((1r,3r)-3-(피페리딘-4-일옥시)시클로부톡시)피리딘-4-일)-3,8-디아자비시클로[3.2.1]옥탄-3-일)피리다진-3-일)페녹시)인산이수소메틸(138.51 mg, 0.18 mmol) 및 *S*-(3-(((((3*R*,5*S*)-5-(((*S*)-1-(4-시아노페닐)에틸)카르바모일)-1-((R)-3-메틸-2-(3-(2-옥소에톡시)이속사졸-5-일)부타노일)피롤리딘-3-일)옥시)카르보닐)옥시)-2-메틸부탄-2-일)메탄술포노티오에이트(125 mg, 0.18 mmol)의 용액에 트리아세톡시수소화붕소나트륨(38.0 mg, 0.18 mmol)을 첨가하였다. 반응 혼합물을 20°C에서 36시간 동안 교반하였다. 반응 혼합물을 컬럼 웰치(Welch) 엑스티메이트(Xtimate) C18 150*25 mm*5 um 조건 물(0.225% 포름산)-아세토니트릴 17-47%)로 정제하여 표제 화합물(15.9 mg, 50.4% 수율)을 백색 고체로서 수득하였다.

[1250] LCMS (ESI) m/z: 666.1 $[M/2+H]^+$.

[1251] ^{1}H NMR (400 MHz, DMSO - d_6) δ (ppm) 8.61 - 8.56 (m, 1H), 7.81 - 7.73 (m, 3H), 7.57 - 7.42 (m, 4H), 7.38 - 7.32 (m, 1H), 7.22 (s, 1H), 7.15 - 7.08 (m, 1H), 6.54 - 6.50 (m, 1H), 6.29 - 6.25 (m, 2H), 6.15 - 6.10 (m, 2H), 5.58 - 5.52 (m, 2H), 5.22 - 5.11 (m, 2H), 5.04 - 5.01 (m, 1H), 4.94 - 4.91 (m, 1H), 4.49 - 4.45 (m, 2H), 4.41 - 4.36 (m, 1H), 4.28 - 4.25 (m, 3H), 3.90 - 3.82 (m, 2H), 3.75 - 3.71 (m, 2H), 3.56 - 3.51 (m, 1H), 3.10 - 2.82 (m, 5H), 2.31 - 2.18 (m, 7H), 2.16 - 2.09 (m, 2H), 2.02 - 1.77 (m, 5H), 1.56 - 1.40 (m, 11H), 1.39 - 1.20 (m, 8H), 1.16 - 1.12 (m, 1H), 0.95 - 0.91 (m, 3H), 0.85 - 0.76 (m, 4H).

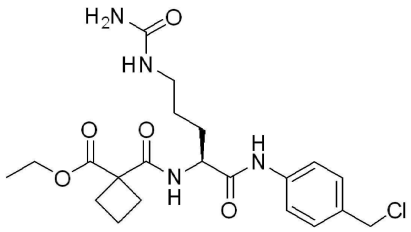
[1252] 합성 실시예 13

[1253] L1-CIDE-BRM1-13의 합성



[1254]

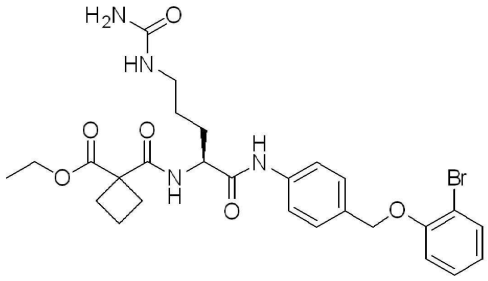
[1255] **단계 1: (*S*)-에틸 1-((1-((4-(클로로메틸)페닐)아미노)-1-옥소-5-우레이도펜탄-2-일)카르바모일)시클로부탄카르복실레이트**



[1256]

[1257] 디클로로메탄(50.0 mL) 및 NMP(1.0 mL) 중 (*S*)-에틸 1-((1-((4-(히드록시메틸)페닐)아미노)-1-옥소-5-우레이도펜탄-2-일)카르바모일)시클로부탄카르복실레이트(1.4 g, 3.22 mmol)의 용액에 티오닐 클로라이드(0.70 mL, 9.67 mmol)를 25°C에서 첨가하였다. 반응 혼합물을 25°C에서 3시간 동안 교반하였다. 반응 혼합물을 플래시 크로마토그래피(실리카겔, 100-200 메쉬, 디클로로메탄 중 0-5% 메탄올)로 정제하여 표제 화합물(1.40 g, 96% 수율)을 황색 오일로서 수득하였다.

[1258] **단계 2: (*S*)-에틸 1-((1-((4-((2-브로모페녹시)메틸)페닐)아미노)-1-옥소-5-우레이도펜탄-2-일)카르바모일)시클로부탄카르복실레이트**



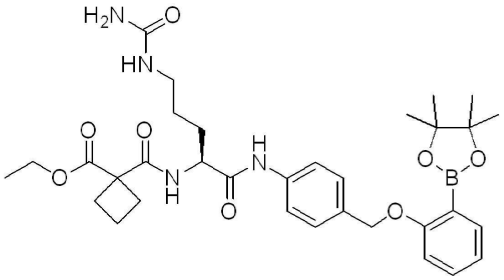
[1259]

[1260] N,N-디메틸포름아미드(60 mL) 중 (*S*)-에틸 1-((1-((4-(클로로메틸)페닐)아미노)-1-옥소-5-우레이도펜탄-2-일)카르바모일)시클로부탄카르복실레이트(1.40 g, 3.09 mmol) 및 탄산칼륨$_3$(1.07 g, 7.73 mmol)의 용액에 2-브로모페

놀(0.54 mL, 4.64 mmol)을 25°C에서 첨가하였다. 반응물을 25℃에서 3시간 동안 교반하였다. 반응물을 물(30.0 mL)로 희석하고 디클로로메탄(50.0 mL x 3)으로 추출하였다. 취합한 유기층을 염수(20.0 mL × 2)로 세척하고, 황산 나트륨 상에서 건조하고, 여과하고 농축 건조하였다. 잔류물을 플래시 크로마토그래피(디클로로메탄 중 실리카겔, 100-200 메시, 0-5% 메탄올)로 정제하여 표제 화합물(1.1 g, 60% 수율)을 백색 고체로서 수득하였다.

[1261] LCMS (ESI) *m/z*: 590.7 $[M+H]^+$.

[1262] **단계 3: (*S*)-에틸 1-((1-옥소-1-((4-((2-(4,4,5,5-테트라메틸-1,3,2-디옥사보롤란-2-일)페녹시)메틸)페닐)아미노)-5-우레이도펜탄-2-일)카르바모일)시클로부탄카르복실레이트**

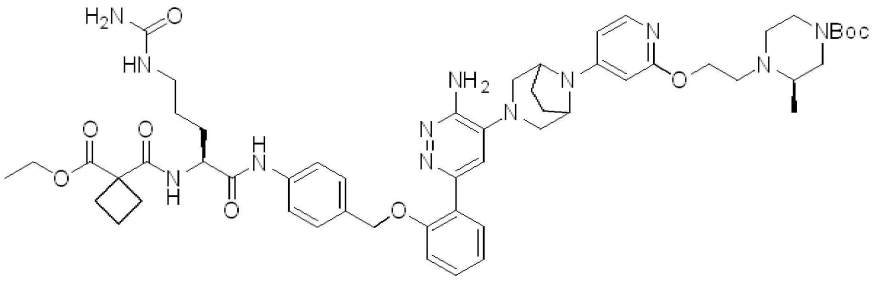


[1263]

[1264] 디메틸 설폭시드(20.0 mL) 중 (*S*)-에틸 1-((1-((4-((2-브로모페녹시)메틸)페닐)아미노)-1-옥소-5-우레이도펜탄-2-일)카르바모일)시클로부탄카르복실레이트(1.10 g, 1.87 mmol) 및 비스(피나콜라토)디보론(711 mg, 2.80 mmol)의 용액에 $Pd(dppf)Cl_2$(137 mg, 0.19 mmol) 및 아세트산 칼륨(549 mg, 5.60 mmol)를 첨가하였다. 혼합물을 100°C에서 N_2 하에 3시간 동안 교반하였다. 조 혼합물을 다음 단계에서 직접 사용하였다.

[1265] LCMS (ESI) *m/z*: 637.1 $[M+H]^+$.

[1266] **단계 4: (3*R*)-tert-부틸 4-(2-((4-(3-(3-아미노-6-(2-((4-((*S*)-2-(1-(에톡시카르보닐)시클로부탄카르복사미도)-5)-우레이도펜탄아미도)벤질)옥시)페닐)피리다진-4-일)-3,8-디아자비시클로[3.2.1]옥탄-8-일)피리딘-2-일)옥시)에틸)-3-메틸피페라진-1-카르복실레이트**

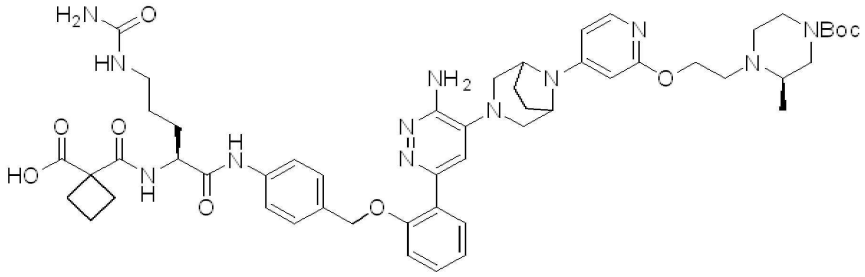


[1267]

[1268] 디메틸 설폭시드(15.0 mL) 및 H_2O(1.00 mL) 중 (3*R*)-tert-부틸 4-(2-((4-(3-(3-아미노-6-클로로피리다진-4-일)-3,8-디아자비시클로[3.2.1]옥탄-8-일)피리딘-2-일)옥시)에틸)-3-메틸피페라진-1-카르복실레이트(750 mg, 1.28 mmol) 및 오르토인산 삼칼륨(814 mg, 3.84 mmol)의 용액에 클로로[(디(1-아다만틸)-*n*-부틸포스핀)-2-(2-아미노비페닐)]팔라듐(II)(171 mg, 0.26 mmol) 및 (*S*)-에틸 1-((1-옥소-1-((4-((2-(4,4,5,5-테트라메틸-1,3,2-디옥사보롤란-2-일)페녹시)메틸)페닐)아미노)-5-우레이도펜탄-2-일)카르바모일)시클로부탄카르복실레이트(832 mg, 1.31mmol)를 첨가하였다. 혼합물을 100°C에서 N_2 하에 3시간 동안 교반하였다. 반응물을 실리카겔 컬럼(실리카겔, 100-200 메쉬, 디클로로메탄 중 0-15% 메탄올)로 정제하여 표제 화합물(400 mg, 28% 수율)을 어두운 오일로서 수득하였다.

[1269] LCMS (ESI) *m/z*: 1251.0 $[M+H]^+$.

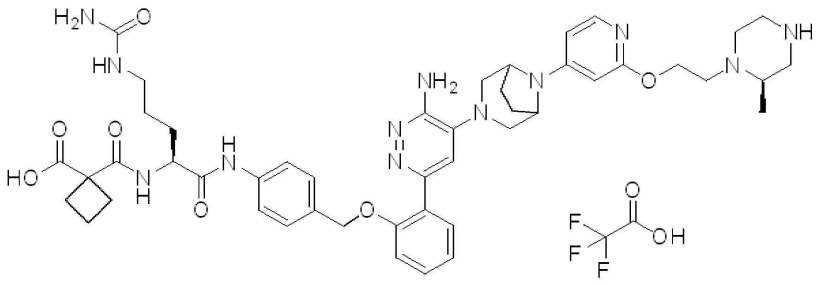
[1270] **단계 5: 1-(((2*S*)-1-((4-((2-(6-아미노-5-(8-(2-(2-((*R*)-4-(tert-부톡시카르보닐)-2-메틸피페라진)-1-일)에톡시)피리딘-4-일)-3,8-디아자비시클로[3.2.1]옥탄-3-일)피리다진-3-일)페녹시)메틸)페닐)아미노)-1-옥소-5-우레이도펜탄-2-일)카르바모일)시클로부탄카르복실산**



[1271]

[1272] 메탄올(5.0 mL) 및 물(2.0 mL) 중 (3*R*)-tert-부틸 4-(2-((4-(3-(3-아미노-6-(2-((4-((*S*)-2-(1-(에톡시카르보닐)시클로부탄카르복사미도)-5)-우레이도펜탄아미도)벤질)옥시)페닐)피리다진-4-일)-3,8-디아자비시클로[3.2.1]옥탄-8-일)피리딘-2-일)옥시)에틸)-3-메틸피페라진-1-카르복실레이트(400 mg, 0.39 mmol)의 용액에 수산화리튬 일수화물(92.7 mg, 3.87 mmol)을 첨가하였다. 혼합물을 25°C에서 N_2 하에 3시간 동안 교반하였다. 반응 혼합물을 농축 건조하여 표제 화합물(300 mg, 77.1% 수율)을 어두운 고체로서 수득하였다. LCMS (ESI) *m/z*: 1005.6 $[M+H]^+$.

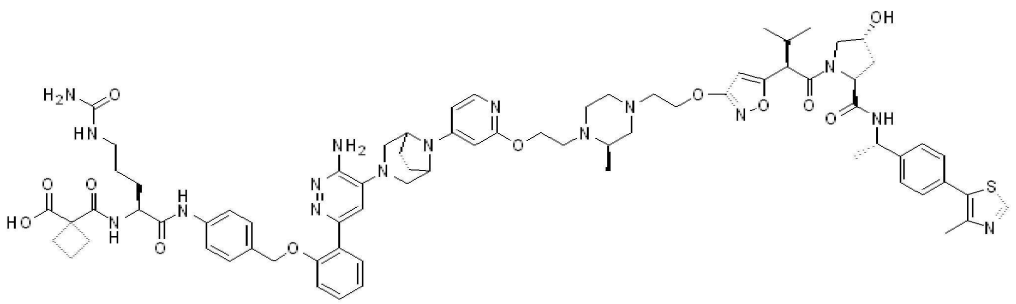
[1273] **단계 6: 1-(((2*S*)-1-((4-((2-(6-아미노-5-(8-(2-(2-((*R*)-2-메틸피페라진)-1-일)에톡시)피리딘-4-일)-3,8-디아자비시클로[3.2.1]옥탄-3-일)피리다진-3-일)페녹시)메틸)페닐)아미노)-1-옥소-5-우레이도펜탄-2-일)카르바모일)시클로부탄카르복실산 2,2,2-트리플루오로아세테이트**



[1274]

[1275] 디클로로메탄(20.0 mL) 중 1-(((2*S*)-1-((4-((2-(6-아미노-5-(8-(2-(2-((*R*)-4-(tert-부톡시카르보닐)-2-메틸피페라진)-1-일)에톡시)피리딘-4-일)-3,8-디아자비시클로[3.2.1]옥탄-3-일)피리다진-3-일)페녹시)메틸)페닐)아미노)-1-옥소-5-우레이도펜탄-2-일)카르바모일)시클로부탄카르복실산(300 mg, 0.3 mmol)의 용액에 트리플루오로아세트산(0.20 mL, 3.00 mmol)을 첨가하였다. 상기 용액을 20°C에서 5시간 동안 교반하고 농축 건조하였다. 조 생성물을 하기의 조건(컬럼: 웰치 엑스티메이트 C18 100*40 mm*3 um; 이동상: 12-42% 물(0.075% 트리플루오로아세트산)-아세토니트릴)으로 분취용 HPLC로 정제하여 표제 화합물(89 mg, 32.9%)을 백색 고체로서 수득하였다. LCMS (ESI) *m/z*: 905.5 $[M+H]^+$.

[1276] **단계 7: 1-(((2*S*)-1-((4-((2-(6-아미노-5-(8-(2-(2-((*R*)-4-(2-((5-((*R*)-1-((2*S*,4*R*)-4-히드록시-2-(((*S*)-1-(4-(4-메틸티아졸-5-일)페닐)에틸)카르바모일)피롤리딘-1-일)-3-메틸-1-옥소부탄-2-일)이속사졸-3-일)옥시)에틸)-2-메틸피페라진-1-일)에톡시)피리딘-4-일)-3,8-디아자비시클로[3.2.1]옥탄-3-일)피리다진-3-일)페녹시)메틸)페닐)아미노)-1-옥소-5-우레이도펜탄-2-일)카르바모일)시클로부탄카르복실산**

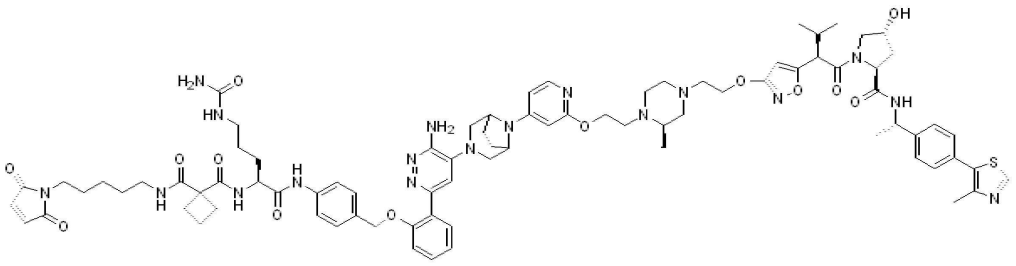


[1277]

[1278] 디클로로메탄(1.50 mL) 및 메탄올(1.50 mL) 중 (2*S*,4*R*)-4-히드록시-1-((*R*)-3-메틸-2-(3-(2-옥소에톡시)이속사졸-5-일)부타노일)-*N*-((*S*)-1-(4-(4-메틸티아졸-5-일)페닐)에틸)피롤리딘-2-카르복스아미드(86.02 mg, 0.16

mmol) 및 1-(((2*S*)-1-((4-((2-(6-아미노-5-(8-(2-(2-((*R*)-2-메틸피페라진-1-일)에톡시)피리딘-4-일)-3,8-디아자비시클로[3.2.1]옥탄-3-일)피리다진-3-일)페녹시)메틸)페닐)아미노)-1-옥소-5-우레이도펜탄-2-일)카르바모일)시클로부탄카르복실산 2,2,2-트리플루오로아세테이트(96.0 mg, 0.11 mmol)의 용액에 나트륨 시아노보로하이드라이드(13.6 mg, 0.21 mmol)를 첨가하였다. 반응 혼합물을 20°C에서 3시간 동안 교반하였다. 생성된 용액을 페노메넥스 제미니-NX C18 80*40 mm*3 um(물 중 아세토니트릴 17-47%/0.05% NH_3H_2O)로 정제하여 표제 화합물(89.0 mg, 58.7% 수율)을 백색 고체로서 수득하였다. LCMS (ESI) *m/z*: 1429.9 $[M+H]^+$.

[1279] **단계 8: *N*-((2*S*)-1-((4-((2-(6-아미노-5-(8-(2-(2-((*R*)-4-(2-((5-((*R*)-1-((2*S*,4*R*)-4-히드록시-2-(((*S*)-1-(4-(4-메틸티아졸-5-일)페닐)에틸)카르바모일)피롤리딘-1-일)-3-메틸-1-옥소부탄-2-일)이속사졸-3-일)옥시)에틸)-2-메틸피페라진-1-일)에톡시)피리딘-4-일)-3,8-디아자비시클로[3.2.1]옥탄-3-일)피리다진-3-일)페녹시)메틸)페닐)아미노)-1-옥소-5-우레이도펜탄-2-일)-*N*-(5-(2,5-디옥소-2,5-디히드로-1*H*-피롤-1-일)펜틸)시이클로부탄-1,1-디카르복스아미드**



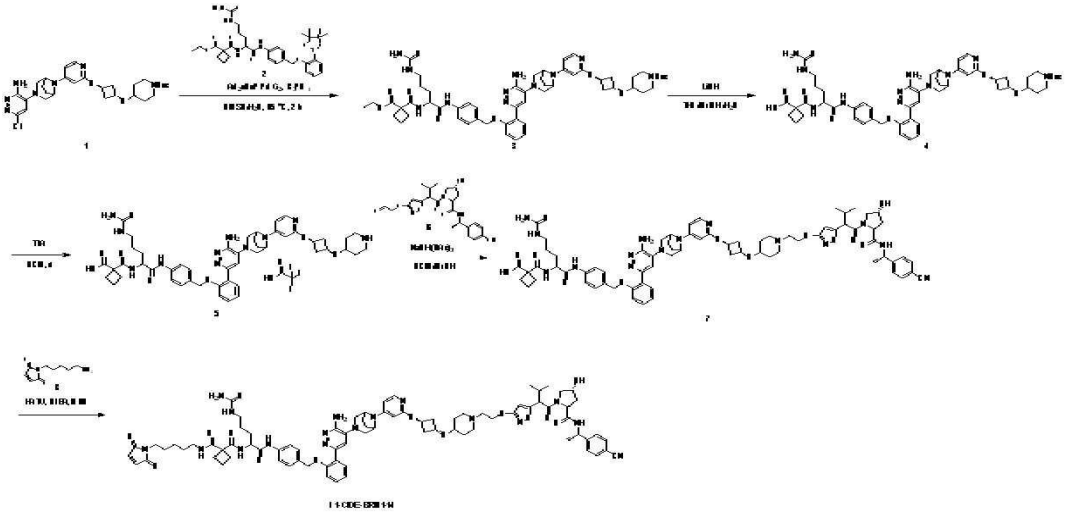
[1280]

[1281] *N*,*N*-디메틸포름아미드(4.0 mL) 중 1-(((2*S*)-1-((4-((2-(6-아미노-5-(8-(2-(2-((*R*)-4-(2-((5-((*R*)-1-((2*S*,4*R*)-4-히드록시-2-(((*S*)-1-(4-(4-메틸티아졸-5-일)페닐)에틸)카르바모일)피롤리딘-1-일)-3-메틸-1-옥소부탄-2-일)이속사졸-3-일)옥시)에틸)-2-메틸피페라진-1-일)에톡시)피리딘-4-일)-3,8-디아자비시클로[3.2.1]옥탄-3-일)피리다진-3-일)페녹시)메틸)페닐)아미노)-1-옥소-5-우레이도펜탄-2-일)카바모일)시클로뷰테인카르복실산(50.0 mg, 0.03 mmol) 및 1-(5-아미노펜틸)-1*H*-피롤-2,5-디온 2,2,2-트리플루오로아세트산(12.4 mg, 0.04 mmol)의 혼합물에 *N*,*N*-디이소프로필에틸아민(0.02 mL, 0.10 mmol) 및 2-(7-아자벤조트리아졸-1-일)-*N*,*N*,*N*′,*N*′-테트라메틸우로늄 헥사플루오로포스페이트(16.0 mg, 0.04 mmol)를 첨가하였다. 혼합물을 25℃에서 3시간 동안 교반하였다. 반응 혼합물을 오일 펌프로 농축 건조시켰다. 잔류물을 분취용 HPLC(보스톤 그린 ODS 150*30 mm*5 um, 물(0.075% 트리플루오로아세트산)-아세토니트릴, 20-50%)로 정제하여 표제 화합물(33.6 mg, 59.7% 수율)을 백색 고체로서 수득하였다. ^{1}H NMR (400 MHz, DMSO - d_6): δ (ppm) 10.19 (s, 1H), 9.02 - 8.86 (m, 1H), 8.39 (d, *J* = 8.0 Hz, 1H), 7.94 (d, *J* = 6.8 Hz, 1H), 7.87 - 7.78 (m, 2H), 7.65 (d, *J* = 8.0 Hz, 2H), 7.51 - 7.41 (m, 5H), 7.36 (d, *J* = 6.8 Hz, 5H), 7.29 - 7.09 (m, 1H), 6.97 (s, 2H), 6.76 (s, 1H), 6.42 (s, 1H), 6.15 - 5.96 (m, 2H), 5.07 (s, 2H), 4.93 - 4.86 (m, 1H), 4.71 - 4.60 (m, 2H), 4.52 - 4.24 (m, 9H), 3.66 (s, 4H), 3.33 (d, *J* = 7.2 Hz, 5H), 3.09 - 2.96 (m, 8H), 2.45 (s, 3H), 2.42 - 2.34 (m, 4H), 2.29 - 2.14 (m, 2H), 2.04 (d, *J* = 11.2 Hz, 3H), 1.91 (s, 2H), 1.83 - 1.55 (m, 5H), 1.51 - 1.30 (m, 9H), 1.19 (d, *J* = 5.8 Hz, 5H), 0.96 (d, *J* = 6.4 Hz, 3H), 0.86 - 0.75 (m, 3H).

[1282] LCMS (ESI) *m/z*: 797.5 $[M/2+H]^+$.

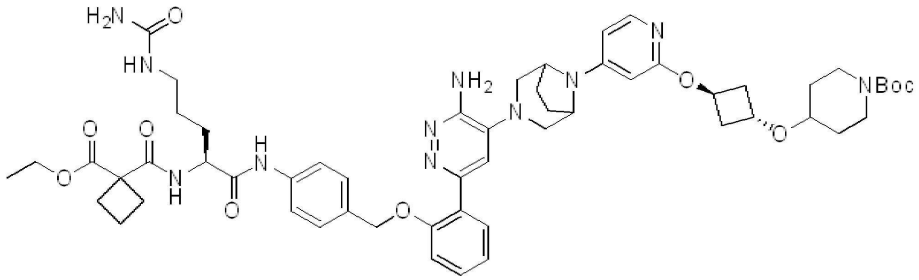
[1283] 합성 실시예 14

[1284] L1-CIDE-BRM1-14의 합성



[1285]

[1286] **단계 1: tert-부틸 4-((1r,3r)-3-((4-(3-(3-아미노-6-(2-((4-((*S*)-2-(1-(에톡시카르보닐)시클로부탄카르복사미도)-5)-우레이도펜탄아미도)벤질)옥시)페닐)피리다진-4-일)-3,8-디아자비시클로[3.2.1]옥탄-8-일)피리딘-2-일)옥시)시클로부톡시)피페리딘-1-카르복실레이트**

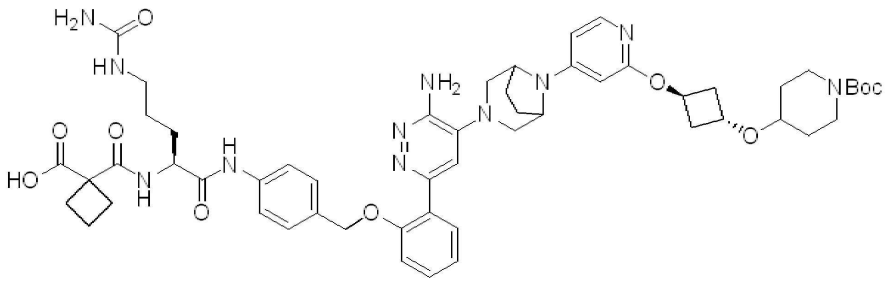


[1287]

[1288] 디메틸 설폭시드(20 mL) 중 tert-부틸 4-((1r,3r)-3-((4-(3-(3-아미노-6-클로로피리다진-4-일)-3,8-디아자비시클로[3.2.1]옥탄-8-일)피리딘-2-일)옥시)시클로부톡시)피페리딘-1-카르복실레이트(450 mg, 0.77 mmol) 및 오르토인산 삼칼륨(0.19 mL, 2.3 mmol)의 용액에 클로로[(디(1-아다만틸)-*n*-부틸포스핀)-2-(2-아미노비페닐)]팔라듐(II)(103 mg, 0.15 mmol) 및 (*S*)-에틸 1-((1-옥소-1-((4-((2-(4,4,5,5-테트라메틸-1,3,2-디옥사보롤란-2-일)페녹시)메틸)페닐)아미노)-5-우레이도펜탄-2-일)카르바모일)시클로부탄카르복실레이트(977 mg, 1.54 mmol)를 첨가하였다. 혼합물을 100℃에서 N_2 하에 3시간 동안 교반하였다. 반응 혼합물을 물(10 mL)로 희석하고 디클로로메탄(20 mL x 3)으로 추출하였다. 유기물을 염수로 세척하고(30 mL x 2), 황산 나트륨 상에서 건조시키고, 여과하고 농축시켜 표제 화합물(400 mg, 49.1%)을 어두운 고체로서 수득하였다.

[1289] LCMS (ESI) *m/z*: 1060.7 $[M+H]^+$.

[1290] **단계 2: 1-(((2*S*)-1-((4-((2-(6-아미노-5-(8-(2-((1r,3r)-3-((1-(tert-부톡시카르보닐)피페리딘-4-일)옥시)시클로부톡시)피리딘-4-일)-3,8-디아자비시클로[3.2.1]옥탄-3-일)피리다진-3-일)페녹시)메틸)페닐)아미노)-1-옥소-5-우레이도펜탄-2-일)카르바모일)시클로부탄카르복실산**

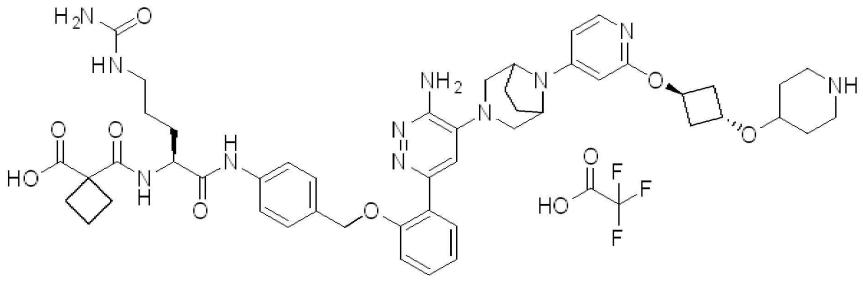


[1291]

[1292] 메탄올(5.0 mL) 및 물(2.0 mL) 중 tert-부틸 4-((1r,3r)-3-((4-(3-(3-아미노-6-(2-((4-((*S*)-2-(1-(에톡시카르

보닐)시클로부탄카르복사미도)-5)-우레이도펜탄아미도)벤질)옥시)페닐)피리다진-4-일)-3,8-디아자비시클로[3.2.1]옥탄-8-일)피리딘-2-일)옥시)시클로부톡시)피페리딘-1-카르복실레이트(450 mg, 0.42 mmol)의 용액에 수산화리튬 일수화물(102 mg, 4.24 mmol)을 첨가하였다. 혼합물을 25℃에서 3시간 동안 교반하였다. 반응 혼합물을 농축시켜 표제 화합물(438 mg, 97.5% 수율)을 어두운 고체로서 수득하였다. LCMS (ESI) *m/z*: 1032.6 $[M+H]^+$.

[1293] **단계 3: 1-(((2*S*)-1-((4-((2-(6-아미노-5-(8-(2-((1r,3r)-3-(피페리딘-4-일옥시)시클로부톡시)피리딘-4-일)-3,8-디아자비시클로[3.2.1]옥탄-3-일)피리다진-3-일)페녹시)메틸)페닐)아미노)-1-옥소-5-우레이도펜탄-2-일)카르바모일)시클로부탄카르복실산 2,2,2-트리플루오로아세테이트**

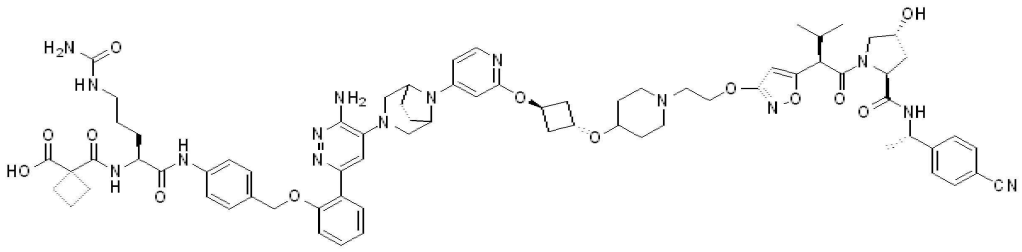


[1294]

[1295] 디클로로메탄(4.0 mL) 중 1-(((2*S*)-1-((4-((2-(6-아미노-5-(8-(2-((1r,3r)-3-((1-(tert-부톡시카르보닐)피페리딘)-4-일)옥시)시클로부톡시)피리딘-4-일)-3,8-디아자비시클로[3.2.1]옥탄-3-일)피리다진-3-일)페녹시)메틸)페닐)아미노)-1-옥소-5-우레이도펜탄-2-일)카르바모일)시클로부탄카르복실산(400 mg, 0.39 mmol)의 혼합물에 트리플루오로아세트산(0.30 mL, 3.90 mmol)을 첨가하였다. 혼합물을 20°C에서 5시간 동안 교반하였다. 반응물을 농축 건조시키고 잔류물을 분취용 HPLC(보스톤 그린 ODS 150*30 mm*5 um, 물(0.075% 트리플루오로아세트산)-아세토니트릴 12%-42%)로 정제하여 표제 화합물(360 mg, 88.9% 수율)을 수득하였다.

[1296] LCMS (ESI) *m/z*: 932.6 $[M+H]^+$.

[1297] **단계 4: 1-(((2*S*)-1-(((4-((2-(6-아미노-5-(8-(2-((1r,3r)-3-((1-(2-((5-((*R*)-1-((2*S*,4*R*)-2-(((*S*)-1-(4-시아노페닐)에틸)카르바모일)-4-히드록시피롤리딘-1-일)-3-메틸-1-옥소부탄-2-일)이속사졸-3-일)옥시)에틸)피페리딘-4-일)옥시)시클로부톡시)피리딘-4-일)-3,8-디아자비시클로[3.2.1]옥탄-3-일)피리다진-3-일)페녹시)메틸)페닐)아미노)-1-옥소-5-우레이도펜탄-2-일)카르바모일)시클로부탄카르복실산**



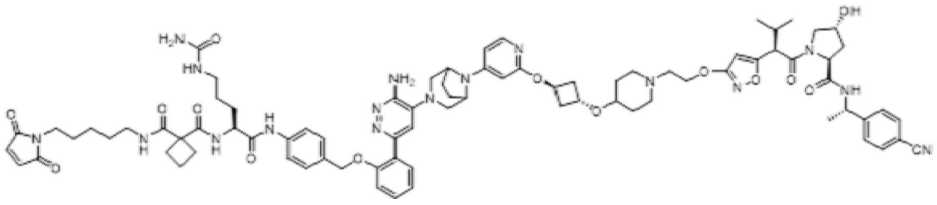
[1298]

[1299] 디클로로메탄(0.50 mL) 및 메탄올(0.50 mL) 중 (2*S*,4*R*)-*N*-((*S*)-1-(4-시아노페닐)에틸)-4-히드록시-1-((*R*)-3-메틸-2-(3-(2-옥소에톡시)이속사졸-5-일)부타노일)피롤리딘-2-카르복사미드(313.21 mg, 0.5800 mmol) 및 1-(((2*S*)-1-((4-((2-(6-아미노-5-(8-(2-((1r,3r)-3-(피페리딘-4-일옥시)시클로부톡시)피리딘-4-일)-3,8-디아자비시클로[3.2.1]옥탄-3-일)피리다진-3-일)페녹시)메틸)페닐)아미노)-1-옥소-5-우레이도펜탄-2-일)카르바모일)시클로부탄카르복실산 2,2,2-트리플루오로아세테이트(360 mg, 0.39 mmol)의 용액에 나트륨 시아노보로하이드라이드(49.3 mg, 0.77 mmol) 및 아세트산나트륨(6.00 mg, 0.07 mmol)을 첨가하였고, 아세트산 한 방울을 첨가하였다. 반응 혼합물을 20°C에서 3시간 동안 교반하였다. 생성된 잔류물을 페노메넥스 제미니-NX 80*40 mm*3 um(물 중 아세토니트릴 17-47/0.05% NH_3H_2O, 20%-50%)로 정제하여 표제 화합물(250 mg, 46.7%)을 백색 고체로서 수득하였다.

[1300] LCMS (ESI) *m/z*: 1384.8 $[M+H]^+$.

[1301] **단계 5: *N*-((2*S*)-1-((4-((2-(6-아미노-5-(8-(2-((1r,3r)-3-((1-(2-((5-((*R*)-1-((2*S*,4*R*)-2-(((*S*)-1-(4-시아노페닐)에틸)카르바모일)-4-히드록시피롤리딘-1-일)-3-메틸-1-옥소부탄-2-일)이속사졸-3-일)옥시)에틸)피페리딘-**

4-일)옥시)시클로부톡시)피리딘-4-일)-3,8-디아자비시클로[3.2.1]옥탄-3-일)피리다진-3-일)페녹시)메틸)페닐)아미노)-1-옥소-5-우레이도펜탄-2-일)-*N*-(5-(2,5-디옥소-2,5-디히드로-1*H*-피롤-1-일)펜틸)시이클로부탄-1,1-디카르복스아미드



[1302]

[1303] L1-CIDE-BRM1-14

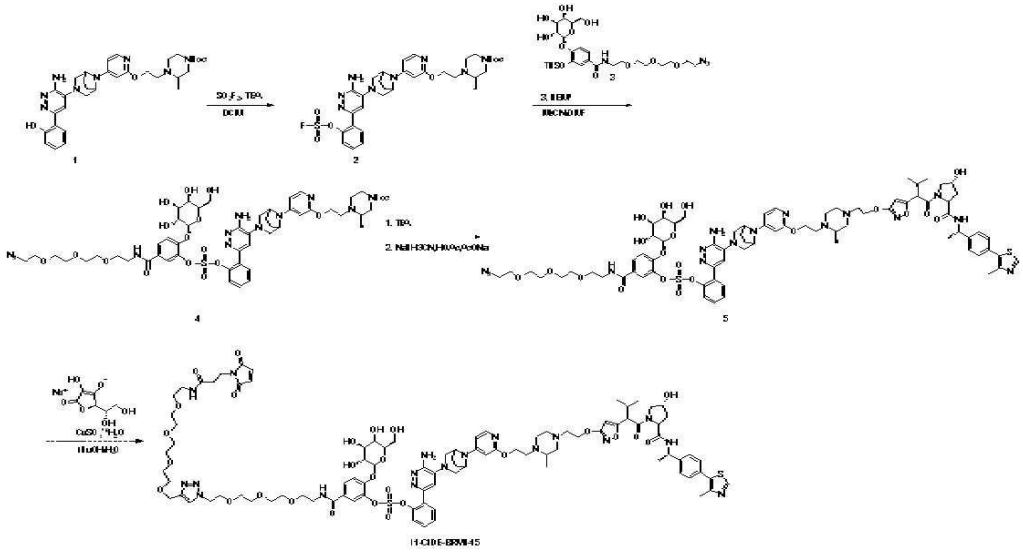
[1304] *N*,*N*-디메틸포름아미드(4.00 mL) 중 1-(((2*S*)-1-((4-((2-(6-아미노-5-(8-(2-((1r, 3r)-3-((1-(2-((5-((*R*)-1-((2*S*, 4*R*)-2-(((*S*)-1-(4-시아노페닐)에틸)카르바모일)-4-히드록시피롤리딘-1-일)-3-메틸-1-옥소부탄-2-일)이속사졸-3-일)옥시)에틸)피페리딘-4-일)옥시)시클로부톡시)피리딘- 4-일)-3,8-디아자비시클로[3.2.1]옥탄-3-일)피리다진-3-일)페녹시)메틸)페닐)아미노)-1-옥소-5-우레이도펜탄-2-일)카르바모일)시클로부탄카르복실산(50.0 mg, 0.04 mmol) 및 1-(5-아미노펜틸)-1*H*-피롤-2,5-디온 2,2,2-트리플루오로아세테이트(12.8 mg, 0.04 mmol)의 혼합물에 *N*,*N*-디이소프로필에틸아민(0.02 mL, 0.1100 mmol), 2-(7-아자벤조트리아졸-1-일)-*N*,*N*,*N*′,*N*′-테트라메틸우로늄 헥사플루오로포스페이트(16.5 mg, 0.04 mmol)를 첨가하였다. 혼합물을 25°C에서 3시간 동안 교반하였다. 혼합물을 오일 펌프로 농축한다. 잔류물을 분취용 HPLC(보스톤 그린 ODS 150*30 mm*5 um, 물(0.075% 트리플루오로아세트산)-아세토니트릴 20%-50%)로 정제하여 표제 화합물(38.5 mg, 65.4%)을 백색 고체로서 수득하였다.

[1305] LCMS (ESI) *m/z*: 775.3 $[M/2+H]^+$.

[1306] ^{1}H NMR (400 MHz, DMSO - d_6) δ (ppm) 10.19 (s, 1H), 9.02 - 8.86 (m, 1H), 8.39 (d, *J* = 8.0 Hz, 1H), 7.94 (d, *J* = 6.8 Hz, 1H), 7.87 - 7.78 (m, 2H), 7.65 (d, *J* = 8.0 Hz, 2H), 7.51 - 7.41 (m, 5H), 7.36 (d, *J* = 6.8 Hz, 5H), 7.29 - 7.09 (m, 1H), 6.97 (s, 2H), 6.76 (s, 1H), 6.42 (s, 1H), 6.15 - 5.96 (m, 2H), 5.07 (s, 2H), 4.93 - 4.86 (m, 1H), 4.71 - 4.60 (m, 2H), 4.52 - 4.24 (m, 9H), 3.66 (s, 4H), 3.33 (d, *J* = 7.2 Hz, 5H), 3.09 - 2.96 (m, 8H), 2.45 (s, 3H), 2.42 - 2.34 (m, 4H), 2.29 - 2.14 (m, 2H), 2.04 (d, *J* = 11.2 Hz, 3H), 1.91 (s, 2H), 1.83 - 1.55 (m, 5H), 1.51 - 1.30 (m, 9H), 1.19 (d, *J* = 5.8 Hz, 5H), 0.96 (d, *J* = 6.4 Hz, 3H), 0.86 - 0.75 (m, 3H).

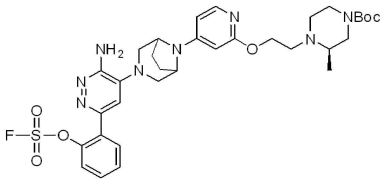
[1307] 합성 실시예 15

[1308] L1-CIDE-BRM1-15의 합성



[1309]

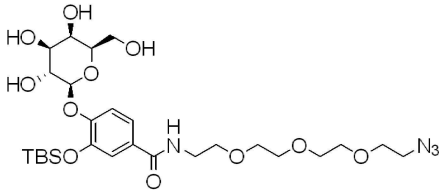
[1310] 단계 1: (*3R*)-tert-부틸 4-(2-((4-(3-(3-아미노-6-(2-((플루오로술포닐)옥시)페닐)피리다진-4-일)-3,8-디아자비시클로[3.2.1]옥탄-8-일)피리딘-2-일)옥시)에틸)-3-메틸피페라진-1-카르복실레이트



[1311]

[1312] 디클로로메탄(3.0 mL) 중 (3*R*)-*tert*-부틸 4-(2-((4-(3-(3-아미노-6-(2-히드록시페닐)피리다진-4-일)-3,8-디아자비시클로[3.2.1]옥탄-8-일)피리딘-2-일)옥시)에틸)-3-메틸피페라진-1-카르복실레이트(500 mg, 0.81 mmol)의 용액을 SO_2F_2 풍선하에서 16시간 동안 0°C에서 교반하였다. 혼합물을 농축시켜 표제 화합물(566 mg, 99.8%)을 황색 오일로서 수득하였다. 조 물질을 다음 단계에서 직접 사용하였다. LCMS (ESI) *m/z*: 713.5 $[M+Na]^+$.

[1313] **단계 2: *N*-(2-(2-(2-(2-아지도에톡시)에톡시)에톡시)에틸)-3-((*tert*-부틸디메틸실릴)옥시)-4-(((2*S*,3*R*,4*S*,5*R*,6*R*)-3,4,5-트리히드록시-6-(히드록시메틸)테트라히드로-2*H*-피란-2-일)옥시)벤즈아마이드**

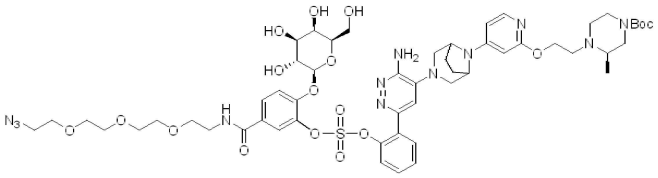


[1314]

[1315] 디클로로메탄(10.0 mL) 중 *N*-(2-(2-(2-(2-아지도에톡시)에톡시)에톡시)에틸)-3-히드록시-4-(((2*S*, 3*R*, 4*S*, 5*R*, 6*R*)-3,4,5-트리히드록시-6-(히드록시메틸)테트라히드로-2H-피란-2-일)옥시)벤즈아미드(320 mg, 0.70 mmol)의 용액에 2,6-루티딘(0.24 mL, 2.09 mmol) 및 *tert*-부틸디메틸실릴 트리플루오로메탄설포네이트(0.32 mL, 1.40 mmol)를 첨가하고 0°C에서 2시간 동안 교반하였다. 반응물을 농축하고 잔류물을 컬럼 페노메넥스 제미니-NX C18 75*30 mm*3 um 조건 물(0.05% NH_3H_2O+10 mM NH_4HCO_3)-아세토니트릴(35%-65%)로 정제하여 표제 화합물(140 mg, 35%)을 백색 고체로서 수득하였다.

[1316] LCMS (ESI) *m/z*: 573.4 $[M+H]^+$.

[1317] **단계 3: (3*R*)-*tert*-부틸 4-(2-((4-(3-(3-아미노-6-(2-(((5-((2-(2-(2-(2-아지도에톡시)에톡시)에톡시)에틸)카르바모일)-2-(((2*S*,3*R*,4*S*,5*R*,6*R*)-3,4,5-트리히드록시-6-(히드록시메틸)테트라히드로-2*H*-피란-2-일)옥시)페녹시)술포닐)옥시)페닐)피리다진-4-일)-3,8-디아자비시클로[3.2.1]옥탄-8-일)피리딘-2-일)옥시)에틸)-3-메틸피페라진-1-카르복실레이트**



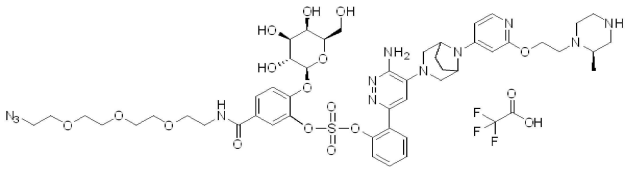
[1318]

[1319] 아세토니트릴(0.86 mL, 0.86 mmol) 중 1 M 2-tert-부틸이미노-2-디에틸아미노-1,3-디메틸-퍼히드로-1,3,2-디아자포스포린, 아세토니트릴(5.0 mL) 중 (3*R*)-tert-부틸 4-(2-((4-(3-(3-아미노-6-(2-((플루오로술포닐)옥시)페닐)피리다진-4-일)-3,8-디아자비시클로[3.2.1]옥탄-8-일)피리딘-2-일)옥시)에틸)-3-메틸피페라진-1-카르복실레이트(300 mg, 0.43 mmol) 및 *N*-(2-(2-(2-(2-아지도에톡시)에톡시)에톡시)에틸)-3-((tert-부틸디메틸실릴)옥시)-4-(((2*S*,3*R*,4*S*,5*R*,6*R*)-3,4,5-트리히드록시-6-(히드록시메틸)테트라히드로-2*H*-피란-2-일)옥시)벤즈아미드(274 mg, 0.43 mmol) 및 N,N-디메틸포름아미드(1.00 mL)의 용액을 24°C에서 16시간 동안 교반하였다. 조 혼합물을 농축 건조시키고 잔류물을 분취용 HPLC(웰치 엑스티메이트 C18 150*25 mm*5 um/물(10 mM NH_4HCO_3)-아세토니트릴/40-70%)로 정제하여 표제 화합물(200 mg, 39% 수율)을 백색 고체로서 수득하였다.

[1320] LCMS (ESI) *m/z*: 1195.6 $[M+H]^+$.

[1321] **단계 4: 2-(6-아미노-5-(8-(2-(2-((*R*)-2-메틸피페라진-1-일)에톡시)피리딘-4-일)-3,8-디아자비시클로[3.2.1]옥탄-3-일)피리다진-3-일)페닐(5-((2-(2-(2-(2-아지도에톡시)에톡시)에톡시)에틸)카르바모일)-2-**

(((2*S*,3*R*,4*S*,5*R*,6*R*)-3,4,5-트리히드록시-6-(히드록시메틸)테트라히드로-2*H*-피란-2-일)옥시)페닐)설페이트 2,2,2-트리플루오로아세테이트

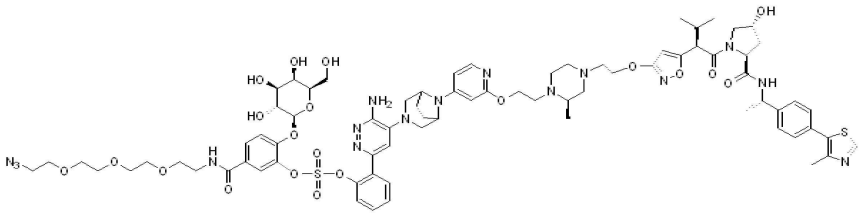


[1322]

[1323] 헥사플루오로이소프로판올(6.00 mL)의 5% 트리플루오로아세트산 중 (3*R*)-*tert*-부틸 4-(2-((4-(3-(3-아미노-6-(2-(((5-((2-(2-(2-(2-아지도에톡시)에톡시)에톡시)에틸)카르바모일)-2-(((2*S*, 3*R*, 4*S*, 5*R*, 6*R*)-3,4,5-트리히드록시-6-(히드록시메틸)테트라히드로-2*H*-피란-2-일)옥시)페녹시)술포닐)옥시)페닐)피리다진-4-일)-3,8-디아자비시클로[3.2.1]옥탄-8-일)피리딘-2-일)옥시)에틸)-3-메틸피페라진-1-카르복실레이트(205 mg, 0.17 mmol)의 용액을 15°C에서 2시간 동안 교반하였다. 혼합물을 농축하여 표제 화합물(207 mg, 99.8%)을 백색 고체로서 수득하였다. 조 물질을 다음 단계에서 직접 사용하였다.

[1324] LCMS (ESI) *m/z*: 1095.4 $[M+H-TFA]^+$.

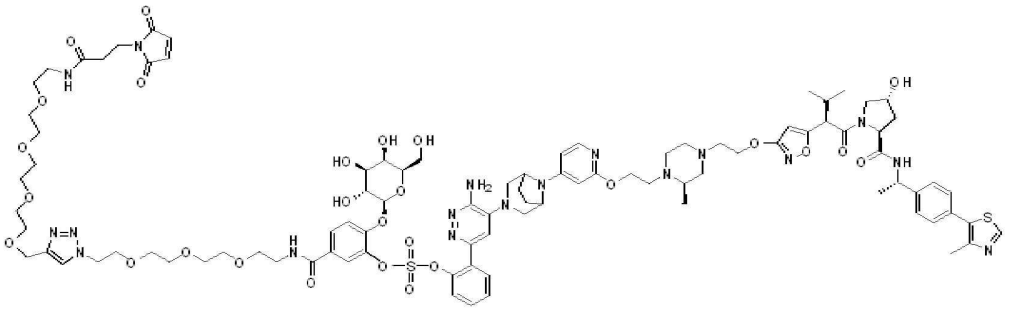
[1325] **단계 4: 2-(6-아미노-5-(8-(2-(2-((*R*)-4-(2-((5-((*R*)-1-((2*S*,4*R*)-4-히드록시-2-(((*S*)-1-(4-(4-메틸티아졸-5-일)페닐)에틸)카르바모일)피롤리딘-1-일)-3-메틸-1-옥소부탄-2-일)이속사졸-3-일)옥시)에틸)-2-메틸피페라진-1-일)에톡시)피리딘-4-일)-3,8-디아자비시클로[3.2.1]옥탄-3-일)피리다진-3-일)페닐(5-((2-(2-(2-(2-아지도에톡시)에톡시)에톡시)에틸)카르바모일)-2-(((2*S*,3*R*,4*S*,5*R*,6*R*)-3,4,5-트리히드록시-6-(히드록시메틸)테트라히드로-2*H*-피란-2-일)옥시)페닐)황산염**



[1326]

[1327] 메탄올(1.00 mL) 및 디클로로메탄(1.00 mL) 중 2-(6-아미노-5-(8-(2-(2-((*R*)-2-메틸피페라진-1-일)에톡시)피리딘-4-일)-3,8-디아자비시클로[3.2.1]옥탄-3-일)피리다진-3-일)페닐 (5-((2-(2-(2-(2-아지도에톡시)에톡시)에톡시)에틸)카르바모일)-2-(((2*S*,3*R*,4*S*,5*R*,6*R*)-3,4,5-트리히드록시-6-(히드록시메틸)테트라히드로-2*H*-피란-2-일)옥시)페닐)황산염 2,2,2-트리플루오로아세테이트(207 mg, 0.17 mmol) 및 (2*S*,4*R*)-4-히드록시-1-((*R*)-3-메틸-2-(3-(2-옥소에톡시)이속사졸-5-일)부타노일)-*N*-((*S*)-1-(4-(4-메틸티아졸-5-일)페닐)에틸)피롤리딘-2-카르복스아미드(184 mg, 0.34 mmol)의 용액에 나트륨시아노보로하이드라이드(11.8 mg, 0.19 mmol) 및 아세톡시나트륨(42.1 mg, 0.51 mmol)을 첨가하였다. 반응물을 20°C에서 3시간 동안 교반하였다. 조 물질을 분취용 HPLC(웰치 엑스티메이트 C18 150*25 mm*5 um/물(10 mM NH_4HCO_3)-아세토니트릴/30-60%)로 정제하여 표제 화합물(145 mg, 52.3%)을 백색 고체로서 수득하였다. LCMS (ESI) m/z: 810.9 [1/2M+H]+.

[1328] **단계 5: 2-(6-아미노-5-(8-(2-(2-((*R*)-4-(2-((5-((*R*)-1-((2*S*,4*R*)-4-히드록시-2-(((*S*)-1-(4-(4-메틸티아졸-5-일)페닐)에틸)카르바모일)피롤리딘-1-일)-3-메틸-1-옥소부탄-2-일)이속사졸-3-일)옥시)에틸)-2-메틸피페라진-1-일)에톡시)피리딘-4-일)-3,8-디아자비시클로[3.2.1]옥탄-3-일)피리다진-3-일)페닐(5-((2-(2-(2-(2-(4-(17-(2,5-디옥소-2,5-디히드로-1*H*-피롤-1-일)-15-옥소-2,5,8,11-테트라옥사-14-아자헵타데실)-1*H*-1,2,3-트리아졸-1-일)에톡시)에톡시)에톡시)에틸)카르바모일)-2-(((2*S*,3*R*,4*S*,5*R*,6*R*)-3,4,5-트리히드록시-6-(히드록시메틸)테트라히드로-2*H*-피란-2-일)옥시)페닐) 황산염**



L1-CIDE-BRM1-15

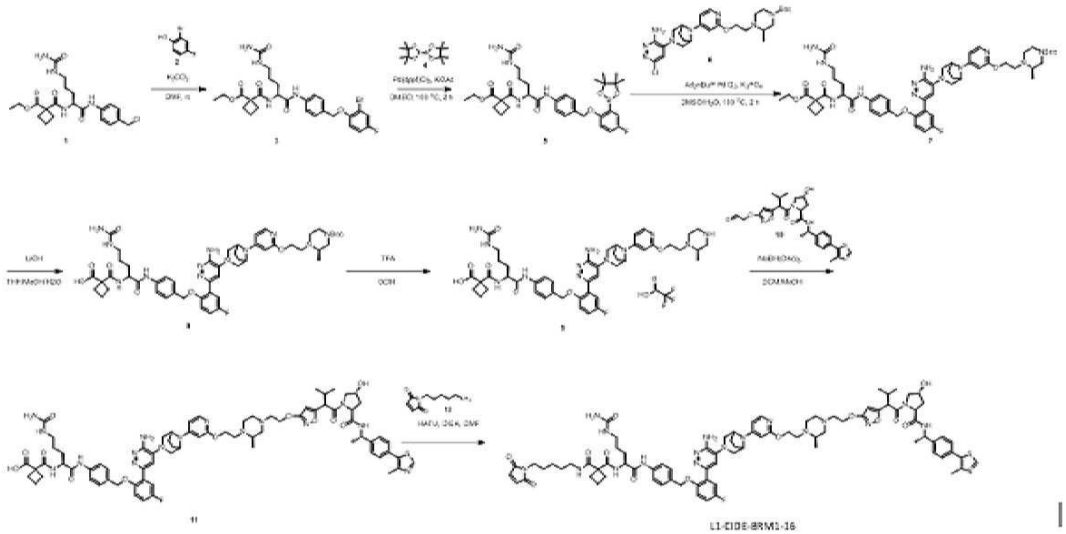
[1329]

[1330] 디메틸 설폭시드(1.00 mL) 및 물(1.00 mL) 중 2-(6-아미노-5-(8-(2-(2-((*R*)-4-(2-((5-((*R*)-1-((2*S*,4*R*)-4-히드록시-2-(((*S*)-1-(4-(4-메틸티아졸-5-일)페닐)에틸)카르바모일)피롤리딘-1-일)-3-메틸-1-옥소부탄-2-일)이속사졸-3-일)옥시)에틸)-2-메틸피페라진-1-일)에톡시)피리딘-4-일)-3,8-디아자비시클로[3.2.1]옥탄-3-일)피리다진-3-일)페닐 (5-((2-(2-(2-(2-아지도에톡시)에톡시)에톡시)에틸)카르바모일)-2-(((2*S*,3*R*,4*S*,5*R*,6*R*)-3,4,5-트리히드록시-6-(히드록시메틸)테트라히드로-2*H*-피란-2-일)옥시)페닐) 황산염(45.0 mg, 0.03 mmol) 및 3-(2,5-디옥소피롤-1-일)-*N*-[2-[2-[2-(2-프로프-2-이녹시에톡시)에톡시]에톡시]에틸]프로판아미드(20.0 mg, 0.05 mmol)의 용액에 물(0.2 mL) 중 황산구리(12.4 mg, 0.06 mmol) 용액 및 물(0.2 mL) 중 아스코르브산나트륨(11.01 mg, 0.06 mmol) 용액을 0°C에서 첨가하였다. 반응물을 N_2의 분위기 하에 26℃에서 1시간 동안 교반하였다. 조 물질을 분취용 HPLC(웰치 엑스티메이트 C18 100*40 mm*3 um/물(0.075% 트리플루오로아세트산)-아세토니트릴/15-45%)로 정제하여 표제 화합물(22.6 mg, 40.6%을 백색 고체로서 수득하였다.

[1331] LCMS (ESI) m/z: 1001.9 $[1/2M+H]^+$.

[1332] 합성 실시예 16

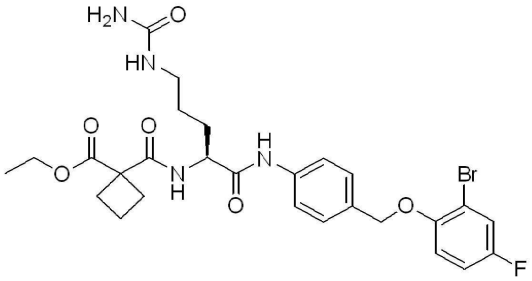
[1333] L1-CIDE-BRM1-16의 합성



L1-CIDE-BRM1-16

[1334]

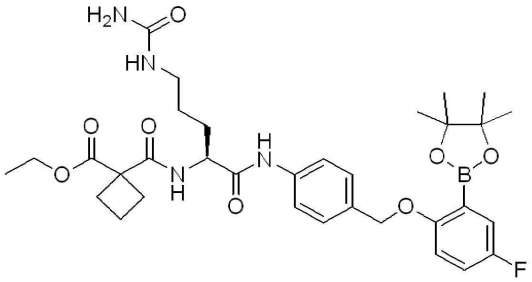
[1335] **단계 1: (*S*)-에틸 1-((1-((4-((2-브로모-4-플루오로페녹시)메틸)페닐)아미노)-1-옥소-5-우레이도펜탄-2-일)카르바모일)시클로부탄카르복실레이트**



[1336]

[1337] N,N-디메틸포름아미드(60.0 mL) 중 (*S*)-에틸 1-((1-((4-(클로로메틸)페닐)아미노)-1-옥소-5-우레이도펜탄-2-일)카르바모일)시클로부탄카르복실레이트(1.00 g, 2.21 mmol) 및 탄산칼륨(0.76 g, 5.52 mmol)의 용액에 2-브로모-4-플루오로-페놀(0.63 g, 3.31 mmol)을 25°C에서 첨가하였다. 반응물을 25℃에서 3시간 동안 교반하였다. 반응 혼합물을 물(30.0 mL)로 희석하고 디클로로메탄(50 mL x 3)으로 추출하였다. 취합한 유기물을 염수(20 mL × 2)로 세척하고, 황산 나트륨 상에서 건조하고, 여과하고 농축 건조하였다. 잔류물을 플래시 크로마토그래피(디클로로메탄 중 실리카겔, 100-200 메시, 0-5% 메탄올)로 정제하여 표제 화합물(1.2 g, 89.5%)을 백색 고체로서 수득하였다.

[1338] **단계 2: (*S*)-에틸 1-((1-((4-((4-플루오로-2-(4,4,5,5-테트라메틸-1,3,2-디옥사보롤란-2-일)페녹시)메틸)페닐)아미노)-1-옥소-5-우레이도펜탄-2-일)카르바모일)시클로부탄카르복실레이트**

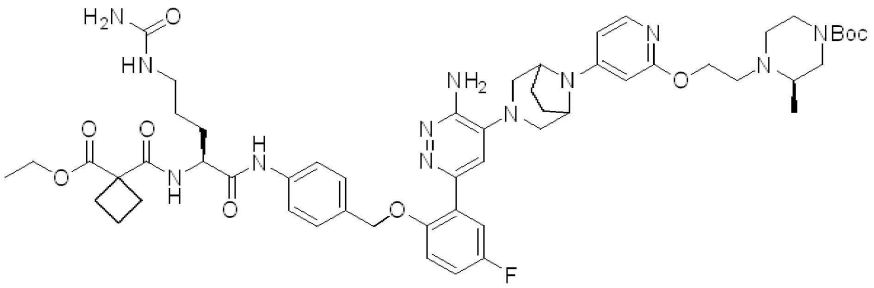


[1339]

[1340] 1,4-디옥산(5.0 mL) 중 (*S*)-에틸 1-((1-((4-((2-브로모-4-플루오로페녹시)메틸)페닐)아미노)-1-옥소-5-우레이도펜탄-2-일)카르바모일)시클로부탄카르복실레이트(1.00 g, 1.65 mmol) 및 4,4,4',4',5,5,5',5'-옥타메틸-2,2'-비(1,3,2-디옥사보롤란)(627 mg, 2.47 mmol)의 용액에 1,1'-비스(디페닐포스피노)페로센 팔라듐 디클로라이드(120 mg, 0.16 mmol) 및 아세트산나트륨(485 mg, 4.94 mmol)을 첨가하였다. 혼합물을 100°C에서 N_2 하에 3시간 동안 교반하였다. 조 혼합물을 다음 단계에서 직접 사용하였다.

[1341] LCMS (ESI) *m/z*: 655.4 $[M+H]^+$.

[1342] **단계 3: (3*R*)-tert-부틸 4-(2-((4-(3-(3-아미노-6-(2-((4-((*S*)-2-(1-(에톡시카르보닐)시클로부탄카르복사미도)-5)-우레이도펜탄아미도)벤질)옥시)-5-플루오로페닐)피리다진-4-일)-3,8-디아자비시클로[3.2.1]옥탄-8-일)피리딘-2-일)옥시)에틸)-3-메틸피페라진-1-카르복실레이트**



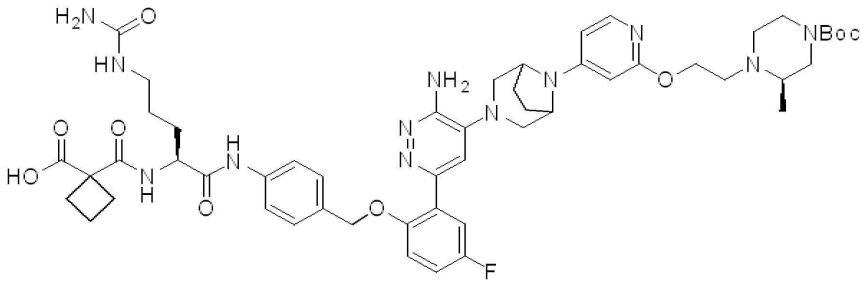
[1343]

[1344] 디메틸 설폭시드(5 mL) 중 (3*R*)-tert-부틸 4-(2-((4-(3-(3-아미노-6-클로로피리다진-4-일)-3,8-디아자비시클로[3.2.1]옥탄-8-일)피리딘-2-일)옥시)에틸)-3-메틸피페라진-1-카르복실레이트(1.11 g, 1.99 mmol) 및 탄산칼륨(0.38 mL, 4.58 mmol)의 용액에 [2-(2-아미노페닐)페닐]-클로로-팔라듐;비스(1-아다만틸)-부틸-포스판(102.15 mg, 0.15 mmol) 및 (*S*)-에틸 1-((1-((4-((4-플루오로-2-(4,4,5,5-테트라메틸-1,3,2-디옥사보롤란-2-일)페녹

시)메틸)페닐)아미노)-1-옥소-5-우레이도펜탄-2-일)카르바모일)시클로부탄카르복실레이트(1.00 g, 1.53 mmol)를 첨가하였다. 반응 혼합물을 100°C에서 N_2 하에 3시간 동안 교반하였다. 반응물을 플래시 크로마토그래피(실리카겔, 100-200 메쉬, 디클로로메탄 중 0-10% 메탄올)로 정제하여 표제 화합물(360 mg, 22.4% 수율)을 어두운 고체로서 수득하였다.

[1345] LCMS (ESI) *m/z*: 1095 $[M+H]^+$.

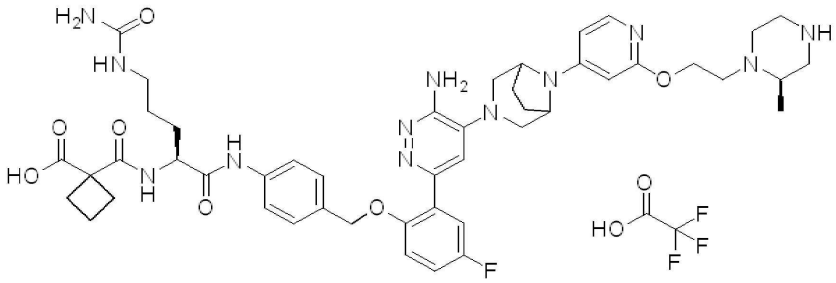
[1346] **단계 4: 1-(((2*S*)-1-((4-((2-(6-아미노-5-(8-(2-(2-((*R*)-4-(tert-부톡시카르보닐)-2-메틸피페라진)-1-일)에톡시)피리딘-4-일)-3,8-디아자비시클로[3.2.1]옥탄-3-일)피리다진-3-일)-4-플루오로페녹시)메틸)페닐)아미노)-1-옥소-5-우레이도펜탄-2-일)카르바모일)시클로부탄카르복실산**



[1347]

[1348] 테트라히드로푸란(2.00 mL), 메탄올(5.0 mL) 및 물(2.00 mL) 중 (3*R*)-tert-부틸 4-(2-((4-(3-(3-아미노-6-(2-((4-((*S*)-2-(1-(에톡시카르보닐)시클로부탄카르복사미도)-5)-우레이도펜탄아미도)벤질)옥시)-5-플루오로페닐)피리다진-4-일)-3,8-디아자비시클로[3.2.1]옥탄-8-일)피리딘-2-일)옥시)에틸)-3-메틸피페라진-1-카르복실레이트(360 mg, 0.34 mmol)의 용액에 수산화리튬 일수화물(41.0 mg, 1.71 mmol)을 첨가하였다. 반응 혼합물을 100°C에서 N_2 분위기하에 3시간 동안 교반하였다. 반응 혼합물을 농축 건조하여 표제 화합물(350 mg, 99.9%)을 백색 고체로서 수득하였다.

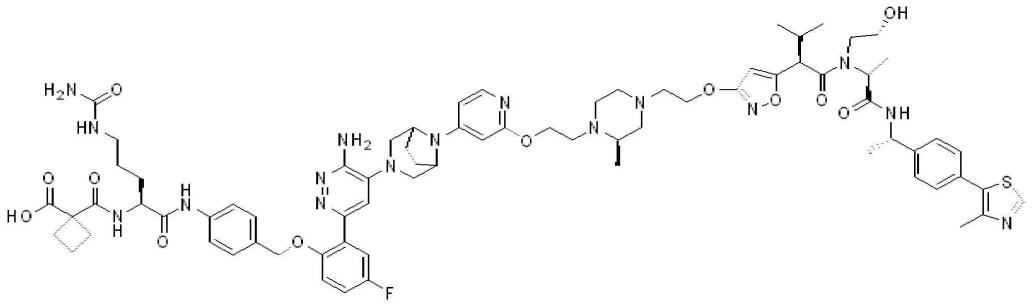
[1349] **단계 5: 1-(((2*S*)-1-((4-((2-(6-아미노-5-(8-(2-(2-((*R*)-2-메틸피페라진)-1-일)에톡시)피리딘-4-일)-3,8-디아자비시클로[3.2.1]옥탄-3-일)피리다진-3-일)-4-플루오로페녹시)메틸)페닐)아미노)-1-옥소-5-우레이도펜탄-2-일)카르바모일)시클로부탄카르복실산 2,2,2-트리플루오로아세테이트**



[1350]

[1351] 디클로로메탄(5.0 mL) 중 1-(((2*S*)-1-((4-((2-(6-아미노-5-(8-(2-(2-((*R*)-4-(tert-부톡시카르보닐)-2-메틸피페라진)-1-일)에톡시)피리딘-4-일)-3,8-디아자비시클로[3.2.1]옥탄-3-일)피리다진-3-일)-4-플루오로페녹시)메틸)페닐)아미노)-1-옥소-5-우레이도펜탄-2-일)카르바모일)시클로부탄카르복실산(340 mg, 0.33 mmol)의 용액에 트리플루오로아세트산(0.05 mL, 0.66 mmol)을 첨가하였다. 반응 혼합물을 20°C에서 3시간 동안 교반하였다. 반응 혼합물을 농축 건조시키고 잔류물을 분취용 HPLC(보스톤 그린 ODS 150*30 mm*5 um, 물(0.075% 트리플루오로아세트산)-아세토니트릴 12%-42%)로 정제하여 표제 화합물(80 mg, 26.1%)을 백색 고체로서 수득하였다.

[1352] **단계 6: 1-(((2*S*)-1-((4-((2-(6-아미노-5-(8-(2-(2-((*R*)-4-(2-((5-((*R*)-1-((2*S*,4*R*)-4-히드록시-2-(((*S*)-1-(4-(4-메틸티아졸-5-일)페닐)에틸)카르바모일)피롤리딘-1-일)-3-메틸-1-옥소부탄-2-일)이속사졸-3-일)옥시)에틸)-2-메틸피페라진-1-일)에톡시)피리딘-4-일)-3,8-디아자비시클로[3.2.1]옥탄-3-일)피리다진-3-일)-4-플루오로페녹시)메틸)페닐)아미노)-1-옥소-5-우레이도펜탄-2-일)카르바모일)시클로부탄카르복실산**

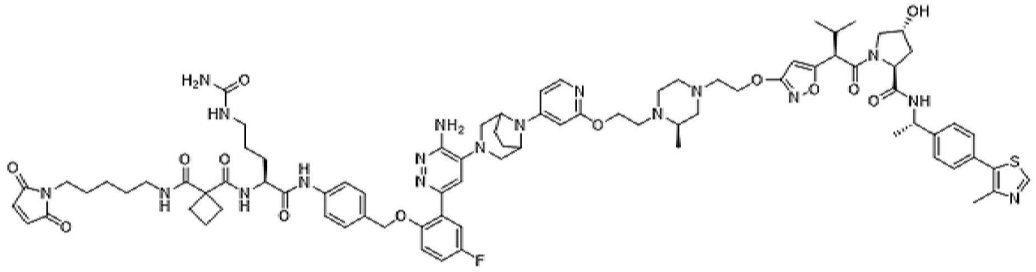


[1353]

[1354] 디클로로메탄(0.6 mL) 및 메탄올(0.6 mL) 중 (2*S*,4*R*)-4-히드록시-1-((*R*)-3-메틸-2-(3-(2-옥소에톡시)이속사졸-5-일)부타노일)-*N*-((*S*)-1-(4-(4-메틸티아졸-5-일)페닐)에틸)피롤리딘-2-카르복스아미드(70.3 mg, 0.13 mmol) 및 1-(((2*S*)-1-((4-((2-(6-아미노-5-(8-(2-(2-((*R*)-2-메틸피페라진-1-일)에톡시)피리딘-4-일)-3,8-디아자비시클로[3.2.1]옥탄-3-일)피리다진-3-일)-4-플루오로페녹시)메틸)페닐)아미노)-1-옥소-5-우레이도펜탄-2-일)카르바모일)시클로부탄카르복실산 2,2,2-트리플루오로아세테이트(80.0 mg, 0.09 mmol)의 용액에 나트륨 시아노보로하이드라이드(11.1 mg, 0.17 mmol) 및 나트륨 아세테이트(6.0 mg, 0.07 mmol) 및 한 방울의 아세트산을 첨가하였다. 반응 혼합물을 20°C에서 3시간 동안 교반하였다. 생성된 잔류물을 페노메넥스 제미니-NX C18 80*40 mm*3 um(물 중 아세토니트릴 17-47/0.05% NH_3H_2O)로 정제하여 표제 화합물(80 mg, 63.8% 수율)을 백색 고체로서 수득하였다.

[1355] LCMS (ESI) *m/z*: 1448.8 $[M+H]^+$.

[1356] **단계 7: *N*-((2*S*)-1-((4-((2-(6-아미노-5-(8-(2-(2-((*R*)-4-(2-((5-((*R*)-1-((2*S*,4*R*)-4-히드록시-2-(((*S*)-1-(4-(4-메틸티아졸-5-일)페닐)에틸)카르바모일)피롤리딘-1-일)-3-메틸-1-옥소부탄-2-일)이속사졸-3-일)옥시)에틸)-2-메틸피페라진-1-일)에톡시)피리딘-4-일)-3,8-디아자비시클로[3.2.1]옥탄-3-일)피리다진-3-일)-4-플루오로페녹시)메틸)페닐)아미노)-1-옥소-5-우레이도펜탄-2-일)*N*-(5-(2,5-디옥소-2,5-디히드로-1H-피롤-1-일)펜틸)시클로부탄-1,1-디카르복스아미드**



[1357] L1-CIDE-BRM1-16

[1358] N,N-디메틸포름아미드(4.00 mL) 중 1-(((2*S*)-1-((4-((2-(6-아미노-5-(8-(2-(2-((*R*)-4-(2-((5-((*R*)-1-((2*S*,4*R*)-4-히드록시-2-(((*S*)-1-(4-(4-메틸티아졸-5-일)페닐)에틸)카르바모일)피롤리딘-1-일)-3-메틸-1-옥소부탄-2-일)이속사졸-3-일)옥시)에틸)-2-메틸피페라진-1-일)에톡시)피리딘-4-일)-3,8-디아자비시클로[3.2.1]옥탄-3-일)피리다진-3-일)-4-플루오로페녹시)메틸)페닐)아미노)-1-옥소-5-우레이도펜탄-2-일)카바모일)시클로뷰테인카르복실산(80.0 mg, 0.06 mmol) 및 1-(5-아미노펜틸)피롤-2,5-디온, 2,2,2-트리플루오로아세트산(19.6 mg, 0.07 mmol)의 혼합물에 2-(7-아자벤조트리아졸-1-yl)-N,N,N',N'-테트라메틸우로늄헥사플루오로포스페이트(25.2 mg, 0.07 mmol), N,N-디이소프로필에틸아민(0.03 mL, 0.1700 mmol)을 첨가하였다. 반응 혼합물을 25℃에서 3시간 동안 교반하였다. 반응 혼합물을 오일 펌프로 농축 건조시켰다. 잔류물을 분취용 HPLC(보스톤 그린 ODS 150*30 mm*5 um, 물(0.075% 트리플루오로아세트산)-아세토니트릴 20%-50%)로 정제하여 표제 화합물(68.2 mg, 75% 수율)을 백색 고체로서 수득하였다.

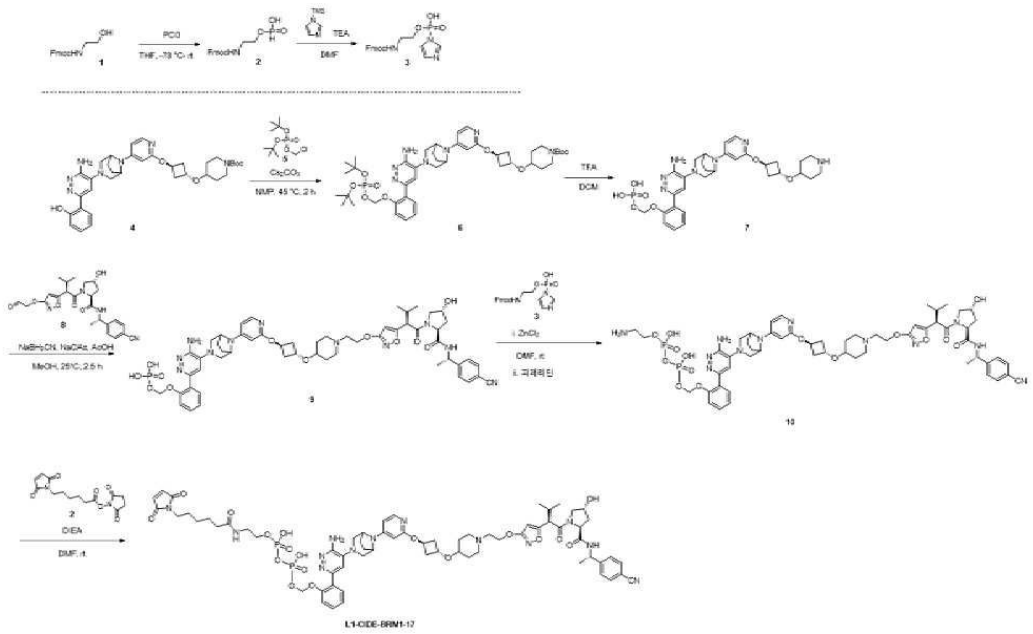
[1359] LCMS (ESI) m/z: 806.7 $[M/2+H]^+$.

[1360] ^1H NMR (400 MHz, DMSO - d_6) δ (ppm) 10.19 (s, 1H), 9.02 - 8.86 (m, 1H), 8.39 (d, *J* = 8.0 Hz, 1H), 7.94 (d, *J* = 6.8 Hz, 1H), 7.87 - 7.78 (m, 2H), 7.65 (d, *J* = 8.0 Hz, 2H), 7.51 - 7.41 (m, 5H), 7.36 (d, *J* =

6.8 Hz, 5H), 7.29 - 7.09 (m, 1H), 6.97 (s, 2H), 6.76 (s, 1H), 6.42 (s, 1H), 6.15 - 5.96 (m, 2H), 5.07 (s, 2H), 4.93 - 4.86 (m, 1H), 4.71 - 4.60 (m, 2H), 4.52 - 4.24 (m, 9H), 3.66 (s, 4H), 3.33 (d, *J* = 7.2 Hz, 5H), 3.09 - 2.96 (m, 8H), 2.45 (s, 3H), 2.42 - 2.34 (m, 4H), 2.29 - 2.14 (m, 2H), 2.04 (d, *J* = 11.2 Hz, 3H), 1.91 (s, 2H), 1.83 - 1.55 (m, 5H), 1.51 - 1.30 (m, 9H), 1.19 (d, *J* = 5.8 Hz, 5H), 0.96 (d, *J* = 6.4 Hz, 3H), 0.86 - 0.75 (m, 3H).

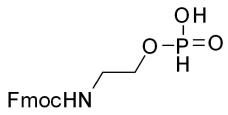
[1361] 합성 실시예 17

[1362] L1-CIDE-BRM1-17의 합성



[1363]

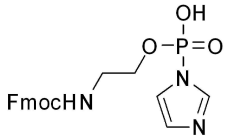
[1364] **단계 1: (9H-플루오렌-9-일)메틸 (2-((히드록시히드로포스포릴)옥시)에틸)카르바메이트**

[1365] 

[1366] 테트라히드로푸란(3.00 mL) 중 (9H-플루오렌-9-일)메틸(2-히드록시에틸)카르바메이트(1.0 g, 3.53 mmol)의 용액에 테트라히드로푸란(5.0 mL) 중 삼염화인(0.73 mL, 8.44 mmol) 및 테트라히드로푸란(3.0 mL) 중 트리에틸아민(1.1 mL, 7.89 mmol)을 -78°C에서 첨가하였다. 반응 혼합물을 -78°C에서 20분 동안 교반한 다음, 25°C로 가온하였다. 생성된 혼합물을 25℃에서 12시간 동안 교반하였다. 반응물을 물(20 mL)로 희석하고 에틸 아세테이트(10 mL x 3)로 추출하였다. 유기물을 염수로 세척하고(20 mL x 2), 황산 나트륨 상에서 건조시키고, 여과하고 농축시켜 표제 화합물(1.20 g, 97.9%)을 백색 고체로서 수득하였다.

[1367] LCMS (ESI) *m/z*: 695.3 $[2M+H]^+$.

[1368] **단계 2: (9H-플루오렌-9-일)메틸(2-((히드록시(1H-이미다졸-1-일)포스포릴)옥시)에틸)카르바메이트**

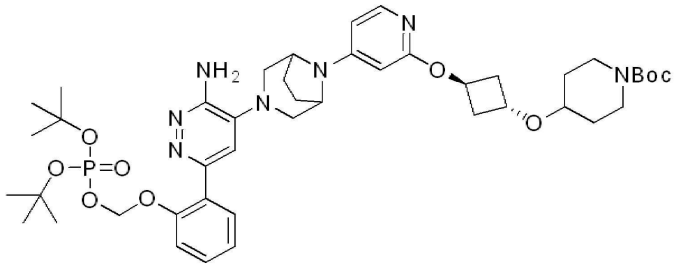
[1369] 

[1370] 사염화탄소(5.0 mL) 및 아세토니트릴(5.0 mL) 중 (9H-플루오렌-9-일)메틸(2-((히드록시히드로포스포릴)옥시)에틸)카르바메이트(0.50 g, 1.44 mmol) 및 트리에틸아민(0.6 mL, 4.32 mmol)의 용액에 1-(트리메틸실릴)-1H-이미다졸(0.61 g, 4.32 mmol)을 25℃에서 첨가하였다. 반응 혼합물을 25°C에서 40분 동안 교반하였다. 혼합물을 메탄올(0.1 mL)로 처리하고 25°C에서 10분 동안 교반하였다. 용매를 제거하고 잔류물을 메틸 tert-부틸 에테르/에

틸 아세테이트 = 5/1(3.0 mL)로 세척하고, 침전물을 여과하고 tert-부틸 에테르(3.00 mL)로 세척하여 표제 화합물(590 mg, 99.1% 수율) 황색 오일로서 수득하였다.

[1371] LCMS (ESI) *m/z*: 414.3 $[M+H]^+$.

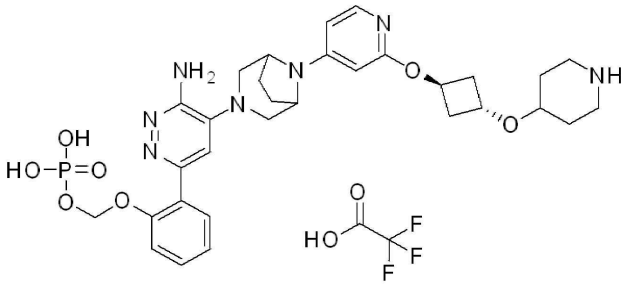
[1372] **단계 3: tert-부틸 4-((1r,3r)-3-((4-(3-(3-아미노-6-(2-(((디-tert-부톡시포스포릴)옥시)메톡시)페닐)피리다진-4-일)-3,8-디아자비시클로[3.2.1]옥탄-8-일)피리딘-2-일)옥시)시클로부톡시)피페리딘-1-카르복실레이트**

[1373] 

[1374] N,N-디메틸포름아미드(36.0 mL) 중 tert-부틸 4-((1r, 3r)-3-((4-(3-(3-아미노-6-(2-히드록시페닐)피리다진-4-일)-3,8-디아자비시클로[3.2.1]옥탄-8-일)피리딘-2-일)옥시)시클로부톡시)피페리딘-1-카르복실레이트(1.70 g, 2.64 mmol)의 용액에 탄산세슘(1.72 g, 5.28 mmol) 및 디-tert-부틸(클로로메틸)포스페이트(1.02 g, 3.96 mmol)를 첨가하였다. 반응 혼합물을 70℃에서 12시간 동안 교반하였다. 반응 혼합물을 물(150 mL)로 퀜칭하고 에틸 아세테이트(80 mL x 3)로 추출하였다. 취합한 유기층을 염수(100 mL × 2)로 세척하고, 무수 황산 나트륨 상에서 건조하고, 여과하고, 감압하에 농축 건조하였다. 잔류물을 실리카겔 크로마토그래피(석유 에테르:에틸 아세테이트 = 100 : 1 내지 50 : 1)로 정제하여 표제 화합물(1.05 g, 45.9% 수율)을 무색 오일로서 수득하였다.

[1375] LCMS (ESI) *m/z*: 866.4 $[M+H]^+$.

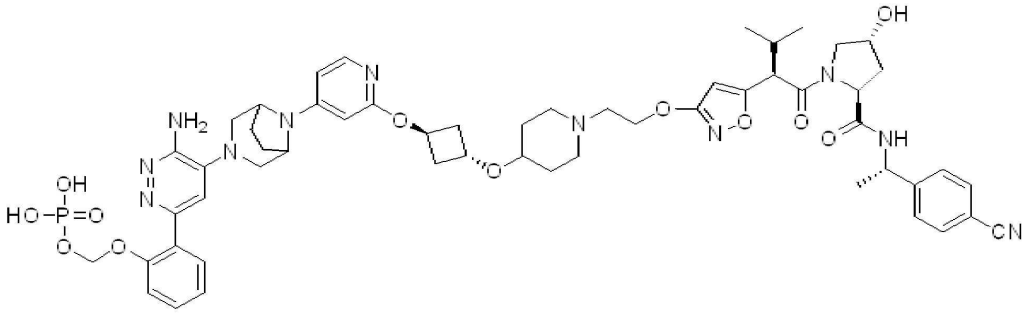
[1376] **단계 4: (2-(6-아미노-5-(8-(2-((1r,3r)-3-(피페리딘-4-일옥시)시클로부톡시)피리딘-4-일)-3,8-디아자비시클로[3.2.1]옥탄-3-일)피리다진-3-일)페녹시)메틸 디히드로겐 포스페이트 2,2,2-트리플루오로아세트산**

[1377] 

[1378] 디클로로메탄(36.0 mL) 중 tert-부틸 4-((1r,3r)-3-((4-(3-(3-아미노-6-(2-(((디-tert-부톡시포스포릴)옥시)메톡시)페닐)피리다진-4-일)-3,8-디아자비시클로[3.2.1]옥탄-8-일)피리딘-2-일)옥시)시클로부톡시)피페리딘-1-카르복실레이트(1.05 g, 1.21 mmol)의 용액에 트리플루오로아세트산(0.09 mL, 1.21 mmol)을 첨가하였다. 반응 혼합물을 20°C에서 12시간 동안 교반하였다. 반응물을 농축하여 표제 화합물(930 mg, 99%)을 황색 오일로서 수득하였다.

[1379] LCMS (ESI) *m/z*: 654.4 $[M+H]^+$.

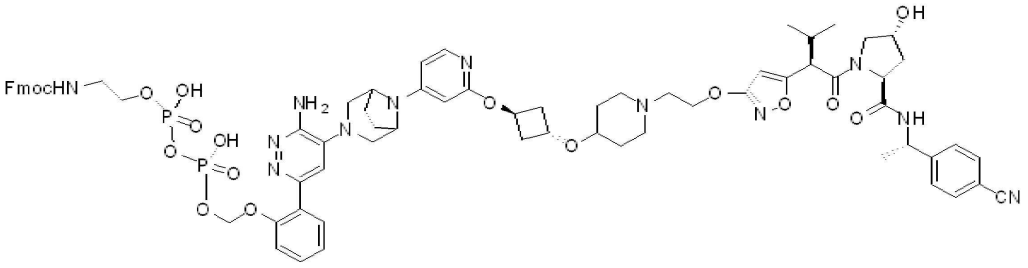
[1380] **단계 5: (2-(6-아미노-5-(8-(2-((1r,3r)-3-((1-(2-((5-((*R*)-1-((2*S*,4*R*)-2-(((*S*)-1-(4-시아노페닐)에틸)카르바모일)-4-히드록시피롤리딘-1-일)-3-메틸-1-옥소부탄-2-일)이속사졸-3-일)옥시)에틸)피페리딘-4-일)옥시)시클로부톡시)피리딘-4-일)-3,8-디아자비시클로[3.2.1]옥탄-3-일)피리다진-3-일)페녹시)인산이수소메틸**



[1381]

[1382] 디클로로메탄(0.6 mL) 및 메탄올(0.6 mL) 중 (2*S*,4*R*)-*N*-((*S*)-1-(4-시아노페닐)에틸)-4-히드록시-1-((*R*)-3-메틸-2-(3-(2-옥소에톡시)이속사졸-5-일)부타노일)피롤리딘-2-카르복스아미드(568 mg, 1.21 mmol)의 용액에 (2-(6-아미노-5-(8-(2-((1r,3r)-3-(피페리딘-4-일옥시)시클로부톡시)피리딘-4-일)-3,8-디아자비시클로[3.2.1]옥탄-3-일)피리다진-3-일)페녹시)인산이수소메틸 2,2,2-트리플루오로아세트산(930 mg, 1.21 mmol), 나트륨 시아노보로하이드라이드(155 mg, 2.42 mmol) 및 아세트산나트륨(596 mg, 7.26 mmol)을 첨가하고, 한 방울을 아세트산을 첨가하였다. 반응 혼합물을 20℃에서 3시간 동안 교반하였다. 반응물을 하기의 조건: 컬럼, 페노메넥스 제미니-NX 80*40 mm*3 um; 이동상: 11-41%(물(0.05%NH_3H_2O)-아세토니트릴); 검출기, UV 254 nm을 갖는 분취용 HPLC로 정제하여 표제 화합물(700 mg, 52.2% 수율)을 백색 고체로서 수득하였다. LCMS (ESI) *m/z*: 1106.5 $[M+H]^+$.

[1383] **단계 6: (9*H*-플루오렌-9-일)메틸 (2-((((((2-(6-아미노-5-(8-(2-((1r,3r)-3-((1-(2-((5-((*R*)-1-((2*S*,4*R*)-2-(((*S*)-1-(4-시아노페닐)에틸)카르바모일)-4-히드록시피롤리딘-1-일)-3-메틸-1-옥소부탄-2-일)이속사졸-3-일)옥시)에틸)피페리딘-4-일)옥시)시클로부톡시)피리딘-4-일)-3,8-디아자비시클로[3.2.1]옥탄-3-일)피리다진-3-일)페녹시)메톡시)(히드록시)포스포릴)옥시)(히드록시)포스포릴)옥시)에틸)카바메이트**

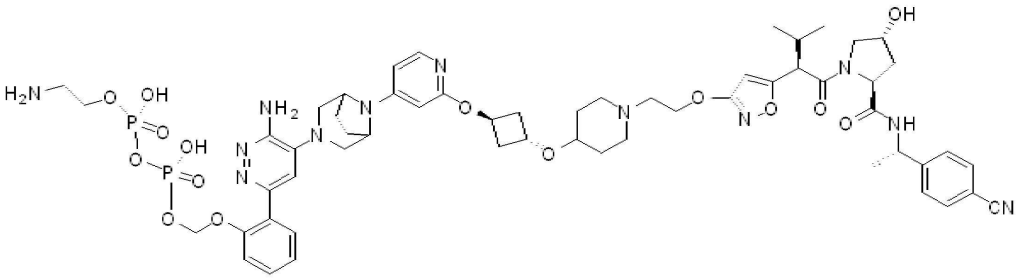


[1384]

[1385] N,N-디메틸포름아미드(36.0 mL) 중 (2-(6-아미노-5-(8-(2-((1r, 3r)-3-((1-(2-((5-((*R*)-1-((2*S*,4*R*)-2-(((*S*)-1-(4-시아노페닐)에틸)카르바모일)-4-히드록시피롤리딘-1-일)-3-메틸-1-옥소부탄-2-일)이속사졸-3-일)옥시)에틸)피페리딘-4-일)옥시)시클로부톡시)피리딘-4-일)-3,8-디아자비시클로[3.2.1]옥탄-3-일)피리다진-3-일)페녹시)인산이수소메틸(200 mg, 0.18 mmol)의 용액에 테트라히드로푸란(1.45 mL, 1.45 mmol) 중 1 M 아연 이염화물 및 (9H-플루오렌-9-일)메틸(2-((히드록시(1H-이미다졸-1-일)포스포릴)옥시)에틸)카르바메이트(149 mg, 0.36 mmol)를 첨가하였다. 반응 혼합물을 20℃에서 12시간 동안 교반하였다. 조 생성물을 하기의 조건: 컬럼, 페노메넥스 제미니-NX 80*40 mm*3 um; 이동상: 9-39% 물(0.05% NH_3H_2O)-아세토니트릴); 검출기, UV 254 nm을 갖는 분취용 HPLC로 정제하여 표제 화합물(200 mg, 76.2% 수율)을 백색 고체로서 수득하였다.

[1386] LCMS (ESI) *m/z*: 726.7 $[M/2+H]^+$.

[1387] **단계 7: 2-아미노에톡시(히드록시)포스포릴][2-[6-아미노-5-[8-[2-[3-[[1-[2-[5-[rac-(1*R*)-2-메틸-1-[rac-(2*S*,4*R*)-4-히드록시-2-[[rac-(1*S*)-1-(4-시아노페닐)에틸]카르바모일]피롤리딘-1-카르보닐]프로필]이속사졸-3-일]옥시에틸]-4-피페리딜]옥시]시클로부톡시]-4-피리딜]-3,8-디아자비시클로[3.2.1]옥탄-3-일]피리다진-3-일]페녹시]메틸수소인산염**

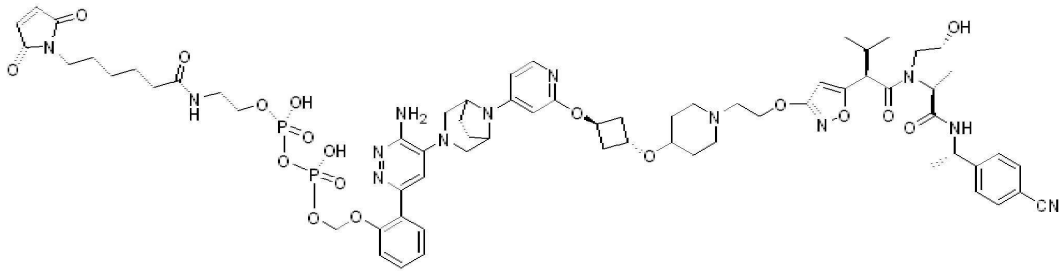


[1388]

[1389] N,N-디메틸포름아미드(10.0 mL) 중 (9H-플루오렌-9-일)메틸 (2-((((((2-(6-아미노-5-(8-(2-((1r,3r)-3-((1-(2-((5-((*R*)-1-((2*S*,4*R*)-2-(((*S*)-1-(4-시아노페닐)에틸)카르바모일)-4-히드록시피롤리딘-1-일)-3-메틸-1-옥소부탄-2-일)이속사졸-3-일)옥시)에틸)피페리딘-4-일)옥시)시클로부톡시)피리딘-4-일)-3,8-디아자비시클로[3.2.1]옥탄-3-일)피리다진-3-일)페녹시)메톡시)(히드록시)포스포릴)옥시)(히드록시)포스포릴)옥시)에틸)카바메이트(200 mg, 0.14 mmol)의 용액에 피페리딘(0.10 mL, 1.40 mmol)을 첨가하였다. 반응 혼합물을 20°C에서 12시간 동안 교반하였다. 1 N HCl(1.00 ml)로 켄칭하고 생성된 잔류물을 페노메넥스 제미니-NX 80*40 mm*3 um(아세토니트릴 19-49/물(0.05% NH_3H_2O)-아세토니트릴, 20-50%)로 정제하여 표제 화합물(40.0 mg, 22.4% 수율)을 백색 고체로서 수득하였다.

[1390] LCMS (ESI) *m/z*: 1229.7 $[M+H]^+$.

[1391] **단계 8: (2*S*,4*R*)-*tert*-부틸 2-(((S)-1-(4-시아노페닐)에틸)카르바모일)-4-(((1-(4-((*S*)-2-(1-((5-(2,5-디옥소-2,5-디히드로-1*H*-피롤-1-일)펜틸)카르바모일)시클로부탄카르복사미도)-5-우레이도펜탄아미도)페닐)-2-(4-메틸피페라진-1-일)-2-옥소에톡시)카르보닐)옥시)피롤리딘-1-카르복실레이트**



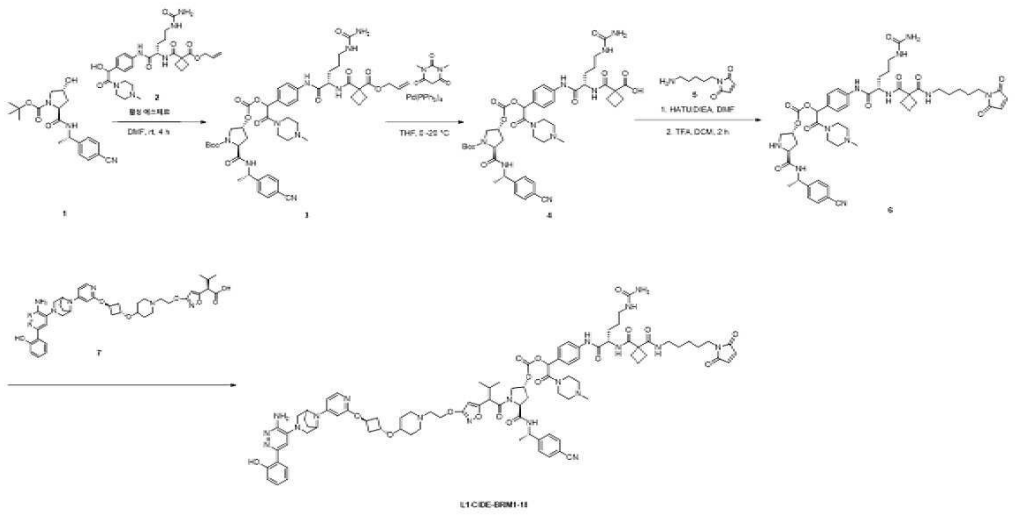
[1392] L1-CIDEBRM1-17

[1393] 무수 테트라히드로푸란(12.0 mL) 중 2-아미노에톡시(히드록시)포스포릴][2-[6-아미노-5-[8-[2-[3-[[1-[2-[5-[rac-(1*R*)-2-메틸-1-[rac-(2*S*,4*R*)-4-히드록시-2-[[rac-(1*S*)-1-(4-시아노페닐)에틸]카르바모일]피롤리딘-1-카르보닐]프로필]이속사졸-3-일]옥시에틸]-4-피페리딜]옥시]시클로부톡시]-4-피리딜]-3,8-디아자비시클로[3.2.1]옥탄-3-일]피리다진-3-일]페녹시]메틸수소인산염(120 mg, 0.10 mmol)의 혼합물에 *N*,*N*-디이소프로필에틸아민(18.7 uL, 0.11 mmol)에 이어서 2,5-디옥소피롤리딘-1-일 6-(2,5-디옥소-2,5-디히드로-1H-피롤-1-일)헥사노에이트(33.1 mg, 0.11 mmol)를 첨가하였다. 반응 용액을 25℃에서 16시간 동안 교반하였다. 용액을 여과하고, 농축 건조시켰다. 잔류물을 분취용 HPLC(보스톤 그린 ODS 150*30 mm*5 um, 물(0.075% 트리플루오로아세트산)-아세토니트릴 20%-50%)로 정제하여 표제 화합물(60.8 mg, 36.8%)을 백색 고체로서 수득하였다.

[1394] LCMS (ESI) m/z: 1423.0 [M+H]+.

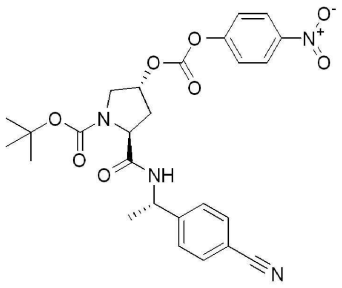
[1395] 실시예 18의 합성

[1396] L1-CIDE-BRM1-18의 합성



[1397]

[1398] **단계 1: (2*S*,4*R*)-tert-부틸 2-(((*S*)-1-(4-시아노페닐)에틸)카르바모일)-4-(((4-니트로페녹시)카르보닐)옥시)피롤리딘-1-카르복실레이트**

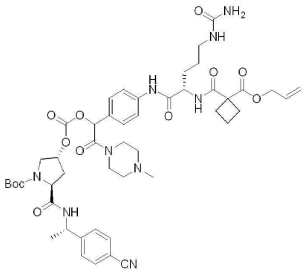


[1399]

[1400] 디클로로메탄(10.0 mL) 중 (2*S*, 4*R*)-*tert*-부틸 2-(((*S*)-1-(4-시아노페닐)에틸)카바모일)-4-히드록시피롤리딘-1-카복실레이트(1.00 g, 2.78 mmol)의 혼합물에 2,6-루티딘(0.49 mL, 4.17 mmol) 및 4-니트로페닐클로로포르메이트(673 mg, 3.34 mmol)를 첨가하였다. 반응 혼합물을 25°C에서 18시간 동안 교반하였다. 조 혼합물을 농축하여 표제 화합물(1.46 g, 36.8%)을 황색 고체로서 수득하였다. 조 물질을 다음 단계에서 즉시 사용하였다.

[1401] LCMS (ESI) *m/z*: 425.1 $[M-Boc+H]^+$.

[1402] **단계 2: (*2S,4R*)-tert-부틸 4-(((1-(4-((*S*)-2-(1-((알릴옥시)카르보닐)시클로부탄카르복사미도)-5-우레이도펜탄아미도)페닐)-2-(4-메틸피페라진-1-일)-2-옥소에톡시)카르보닐)옥시)-2-(((*S*)-1-(4-시아노페닐)에틸)카르바모일)피롤리딘-1-카르복실레이트**

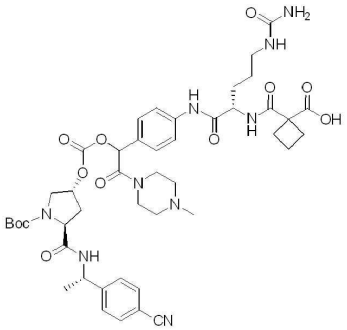


[1403]

[1404] *N,N*-디메틸포름아미드(15.0 mL) 중 (2*S*,4*R*)-*tert*-부틸 2-(((*S*)-1-(4-시아노페닐)에틸)카르바모일)-4-(((4-니트로페녹시)카르보닐)옥시)피롤리딘-1-카르복실레이트(1.46 g, 2.78 mmol) 및 알릴 1-(((2*S*)-1-((4-(1-히드록시-2-(4-메틸피페라진-1-일)-2-옥소에틸)페닐)아미노)-1-옥소-5-우레이도펜탄-2-일)카르바모일)시클로부탄카르복실레이트(1.59 g, 2.78 mmol)의 혼합물에 4-디메틸아미노피리딘(680 mg, 5.56 mmol)을 첨가하였다. 반응 혼합물을 25°C에서 18시간 동안 교반하였다. 조 물질을 분취용 HPLC(페노메넥스 제미니-NX 80*30 mm*3 um/물(10 mM

NH_4HCO_3)-아세토니트릴/10%-80%)로 여과 및 정제하여 표제 화합물(400 mg, 15%)을 황색 고체로서 수득하였다. LCMS (ESI) *m/z*: 958.5 $[M+H]^+$.

[1405] **단계 3: 1-(((2*S*)-1-((4-(1-(((((3*R*,5*S*)-1-(tert-부톡시카르보닐)-5-(((*S*)-1-(4-시아노페닐)에틸)카르바모일)피롤리딘-3-일)옥시)카르보닐)옥시)-2-(4-메틸피페라진-1-일)-2-옥소에틸)페닐)아미노)-1-옥소-5-우레이도펜탄-2-일)카르바모일)시클로부탄카르복실산**

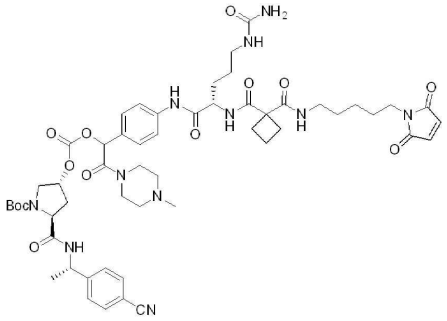


[1406]

[1407] 디클로로메탄(2.00 mL) 및 메탄올(2.00 mL) 중 (2*S*,4*R*)-tert-부틸 4-(((1-(4-((*S*)-2-(1-((알릴옥시)카르보닐)시클로부탄카르복사미도)-5-우레이도펜탄아미도)페닐)-2-(4-메틸피페라진-1-일)-2-옥소에톡시)카르보닐)옥시)-2-(((*S*)-1-(4-(4-시아노페닐)에틸)카르바모일)피롤리딘-1-카르복실레이트(260 mg, 0.27 mmol) 및 1,3-디메틸피리미딘-2,4,6(1*H*,3*H*,5*H*)-트리온(212 mg, 1.36 mmol)의 용액에 25° C에서 테트라키스(트리페닐포스핀)팔라듐(62.7 mg, 0.05 mmol)을 첨가하였다. 반응 혼합물을 질소 분위기하에 25℃에서 16시간 동안 교반하였다. 조 물질을 농축하고 하기의 조건: 칼럼: 페노메넥스 제미니-NX 80*30 mm*3 um, 이동상: 물(10 mM NH_4HCO_3)-아세토니트릴 10%-80%을 갖는 분취용 HPLC로 정제하여 표제 화합물(110 mg, 44.2% 수율)을 황색 고체로서 수득하였다.

[1408] LCMS (ESI) *m/z*: 918.6 $[M+H]^+$.

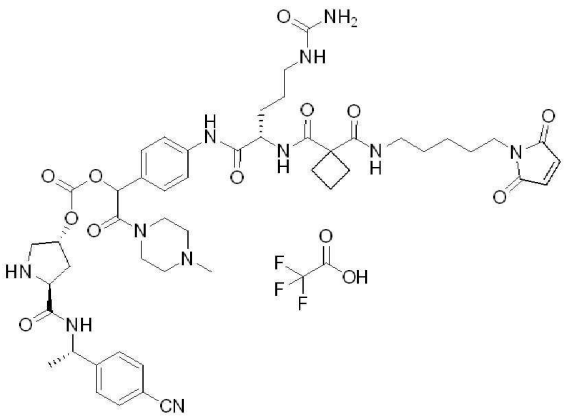
[1409] **단계 4: (2*S*,4*R*)-*tert*-부틸 2-(((*S*)-1-(4-시아노페닐)에틸)카르바모일)-4-(((1-(4-((*S*)-2-(1-((5-(2,5-디옥소-2,5-디히드로-1*H*-피롤-1-일)펜틸)카르바모일)시클로부탄카르복사미도)-5-우레이도펜탄아미도)페닐)-2-(4-메틸피페라진-1-일)-2-옥소에톡시)카르보닐)옥시)피롤리딘-1-카르복실레이트**



[1410]

[1411] *N*,*N*-디메틸포름아미드(3 mL) 중 1-(((2*S*)-1-((4-(1-(((((3*R*,5*S*)-1-(*tert*-부톡시카르보닐)-5-(((*S*)-1-(4-시아노페닐)에틸)카르바모일)피롤리딘-3-일)옥시)카르보닐)옥시)-2-(4-메틸피페라진-1-일)-2-옥소에틸)페닐)아미노)-1-옥소-5-우레이도펜탄-2-일)카르바모일)시클로부탄카르복실산(110 mg, 0.12 mmol) 및 1-(5-아미노펜틸)-1*H*-피롤-2,5-디온 2,2,2-트리플루오로아세트산(43.0 mg, 0.05 mmol)의 혼합물에 *N*,*N*-디이소프로필에틸아민(0.06 mL, 0.36 mmol) 및 2-(7-아자벤조트리아졸-1-일)-*N*,*N*,*N*',*N*'-테트라메틸우로늄 헥사플루오로포스페이트(54.7 mg, 0.14 mmol)를 첨가하였다. 반응 혼합물을 25℃에서 3시간 동안 교반하였다. 혼합물을 오일 펌프로 농축하였다. 잔류물을 분취용 HPLC(보스톤 그린 ODS 150*30 mm*5 um, 물(0.075% TFA)-아세토니트릴 28%-58%)로 정제하여 표제 화합물(90 mg, 69.4%)을 백색 고체로서 수득하였다. LCMS (ESI) *m/z*: 1082.6 $[M+H]^+$.

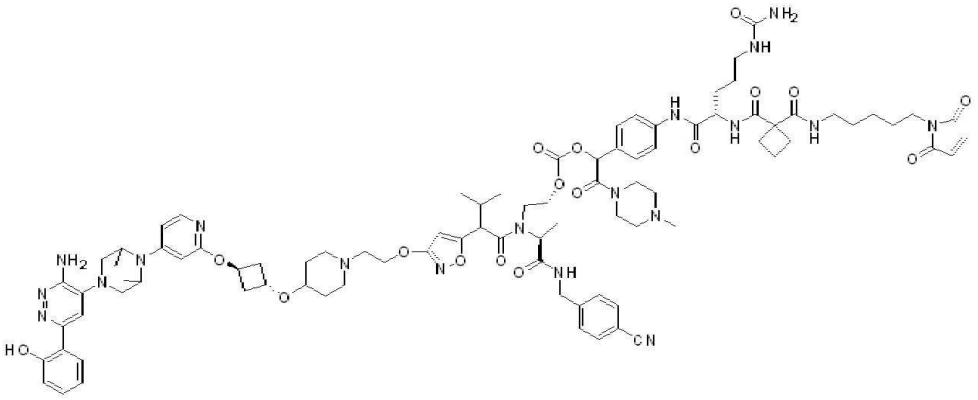
[1412] **단계 5: (3*R*,5*S*)-5-(((*S*)-1-(4-시아노페닐)에틸)카르바모일)피롤리딘-3-일(1-(4-((*S*)-2-(1-((5-(2,5-디옥소-2,5-디히드로-1*H*-피롤-1-일)펜틸)카르바모일)시클로부탄카르복사미도)-5-우레이도펜탄아미도)페닐)-2-(4-메틸피페라진-1-일)-2-옥소에틸)카보네이트 2,2,2-트리플루오로아세테이트**



[1413]

[1414] 헥사플루오로이소프로판올(5 mL)의 5% 트리플루오로아세트산 중 (2*S*,4*R*)-*tert*-부틸 2-(((S)-1-(4-시아노페닐)에틸)카르바모일)-4-(((1-(4-((*S*)-2-(1-((5-(2,5-디옥소-2,5-디히드로-1*H*-피롤-1-일)펜틸)카르바모일)시클로부탄카르복사미도)-5-우레이도펜탄아미도)페닐)-2-(4-메틸피페라진-1-일)-2-옥소에톡시)카르보닐)옥시)피롤리딘-1-카르복실레이트의 용액(90 mg, 0.08 mmol)을 25℃에서 2시간 동안 교반하였다. 혼합물을 농축하여 표제 화합물(91.0 mg, 99.8% 수율)을 황색 오일로서 수득하였다. LCMS (ESI) *m/z*: 982.4 $[M-TFA+H]^+$.

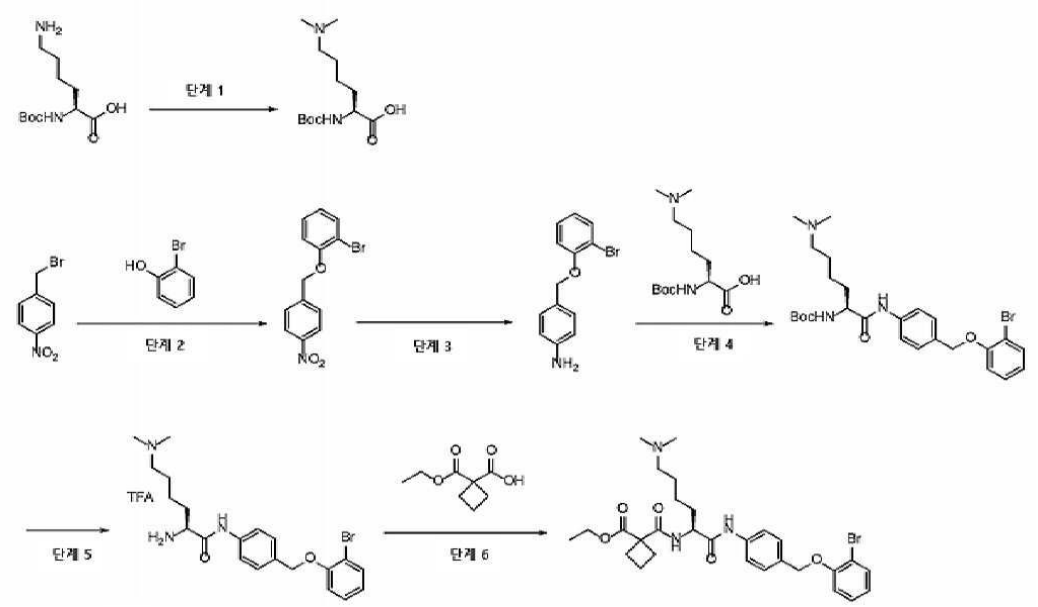
[1415] **단계 6: (3*R*,5*S*)-1-(2-(3-(2-(4-((1r,3r)-3-((4-(3-(3-아미노-6-(2-히드록시페닐)피리다진-4-일)-3,8-디아자비시클로[3.2.1]옥탄-8-일)피리딘-2-일)옥시)시클로부톡시)피페리딘-1-일)에톡시)이속사졸-5-일)-3-메틸부타노일)-5-(((*S*)-1-(4-시아노페닐)에틸)카르바모일)피롤리딘-3-일(1-(4-((*S*)-2-(1-((5-(2,5-디옥소)-2,5-디히드로-1*H*-피롤-1-일)펜틸)카르바모일)시클로부탄카르복사미도)-5-우레이도펜탄아미도)페닐)-2-(4-메틸피페라진-1-일)-2-옥소에틸)카르보네이트**



[1416] L1-CIDE-BRM1-18

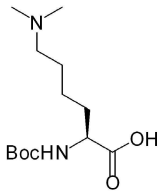
[1417] *N*,*N*-디메틸포름아미드(2.50 mL) 중 (3*R*,5*S*)-5-(((*S*)-1-(4-시아노페닐)에틸)카르바모일)피롤리딘-3-일(1-(4-((*S*)-2-(1-((5-(2,5-디옥소-2,5-디히드로-1*H*-피롤-1-일)펜틸)카르바모일)시클로부탄카르복사미도)-5-우레이도펜탄아미도)페닐)-2-(4-메틸피페라진-1-일)-2-옥소에틸)카보네이트 2,2,2-트리플루오로아세테이트(91.0 mg, 0.08 mmol) 및 2-(3-(2-(4-((1r,3r)-3-((4-(3-(3-아미노-6-(2-히드록시페닐)피리다진-4-일)-3,8-디아자비시클로[3.2.1]옥탄-8-일)피리딘-2-일)옥시)시클로부톡시)피페리딘-1-일)에톡시)이속사졸-5-일)- 3-메틸부탄산(81.5 mg, 0.11 mmol)의 혼합물에 *N*,*N*-디이소프로필에틸아민(0.08 mL, 0.50 mmol) 및 2-(7-아자벤조트리아졸-1-일)-*N*,*N*,*N*',*N*'-테트라메틸우로늄 헥사플루오로포스페이트(41.0 mg, 0.11 mmol)를 첨가하였다. 혼합물을 25℃에서 16시간 동안 교반하였다. 농축 후, 조 물질을 하기의 조건: 칼럼: 웰치 엑스티메이트 C18 100*40 mm*3 um 조건 물(0.075% 트리플루오로아세트산)-아세토니트릴 15-45%)을 갖는 분취용 HPLC로 정제하여 표제 화합물(80.6 mg, 52% 수율)을 백색 고체로서 수득하였다. LCMS (ESI) *m/z*: 860.4 $[1/M+H]^+$

[1418] **중간체 1**: 에틸 (*S*)-1-((1-((4-((2-브로모페녹시)메틸)페닐)아미노)-6-(디메틸아미노)-1-옥소헥산-2-일)카르바모일)시클로부탄-1-카르복실레이트



[1419]

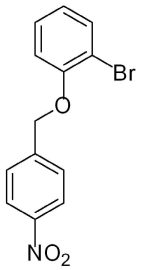
[1420] **단계 1: N^2-(tert-부톡시카르보닐)-N^6,N^6-디메틸-*L*-리신**



[1421]

[1422] 수소(3 atm) 하에, 메틸 알코올(100 mL) 중 (*tert*-부톡시카르보닐)-*L*-리신(20.0 g, 81.2 mmol), CH_2O(12.2 g, 162 mmol) 및 Pd/C(2.00 g)의 용액을 실온에서 4시간 동안 교반하였다. 여과 후, 여액을 감압하에서 농축하였다. 잔류물을 Et_2O을 세척하였다. 고체를 여과에 의해 수집하고 20.6 g(92% 수율)의 표제 화합물을 백색 고체로서 수득하였다. LCMS (ESI) $[M+H]^+$ =275.

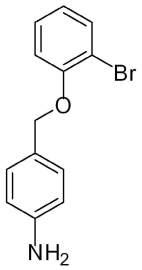
[1423] **단계 2: 1-브로모-2-((4-니트로벤질)옥시)벤젠**



[1424]

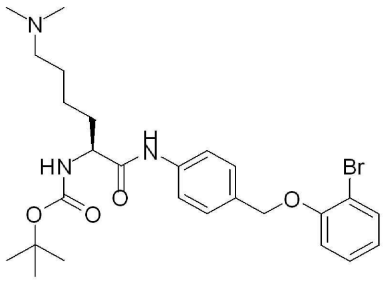
[1425] DMF(700 mL) 중 2-브로모페놀(52.6 g, 304 mmol), 1-(브로모메틸)-4-니트로벤젠(65.7 g, 304 mmol) 및 K_2CO_3(83.9 g, 608 mmol)의 혼합물을 실온에서 1시간 동안 교반하였다. EtOAc를 첨가하고 물을 사용하여 3회 세척하였다. 유기층을 무수 Na_2SO_4 상에서 건조시키고 진공하에 농축하여 73.8 g(78% 수율)의 표제 화합물을 황색 고체로서 수득하였다. ^1H NMR (300 MHz, DMSO-*d6*) δ 8.34 - 8.24 (m, 2H), 7.81 - 7.70 (m, 2H), 7.62 (dd, J = 7.9, 1.6 Hz, 1H), 7.36 (ddd, J = 8.3, 7.3, 1.6 Hz, 1H), 7.20 (dd, J = 8.3, 1.5 Hz, 1H), 6.94 (td, J = 7.6, 1.4 Hz, 1H), 5.39 (s, 2H).

[1426] **단계 3: 4-((2-브로모페녹시)메틸)아닐린**

[1427] 

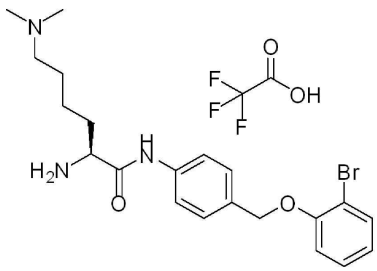
[1428] 질소하에, 아세토니트릴(800 mL) 및 물(400 mL) 중 1-브로모-2-((4-니트로벤질)옥시)벤젠(43.0 g, 139.5 mmol) 및 K_2CO_3(115 g, 837 mmol)의 용액에 0°C에서 $Na_2S_2O_4$(242 g, 1395 mmol)를 나누어서 첨가하였다. 혼합물을 실온에서 6시간 동안 교반하였다. EtOAc를 사용하여 생성물을 1회 추출하였다. 유기층을 무수 Na_2SO_4 상에서 건조시키고 진공하에 농축하여 35 g(조)의 표제 화합물을 황색 고체로서 수득하였다. LCMS (ESI) $[M+H]^+$ = 278.

[1429] **단계 4: *tert*-부틸 (*S*)-(1-((4-((2-브로모페녹시)메틸)페닐)아미노)-6-(디메틸아미노)-1-옥소헥산-2-일)카르바메이트**

[1430] 

[1431] 질소하에, 테트라히드로푸란(200 mL) 중 N^2-(*tert*-부톡시카르보닐)-N^6,N^6-디메틸-*L*-리신(13.3 g, 48.4 mmol) 및 NMM(10.3 g, 96.9 mmol)의 용액에 이소-부틸 클로로포르메이트(7.91 g, 58.1 mmol)를 -25°C에서 적가하였다. 반응물을 -25°C에서 0.5시간 동안 교반하였다. 이후, 테트라히드로푸란(120 mL) 중 4-((2-브로모페녹시)메틸)아닐린(16.1 g, 조)의 용액을 -25°C에서 적가하였다. 반응물을 실온에서 4시간 동안 교반하였다. 용매를 진공하에 농축하였다. DCM을 첨가하고 물로 세척하였다. 유기층을 무수 Na_2SO_4 상에서 건조하고 진공하에 농축하였다. 잔류물을 실리카겔의 플래시 크로마토그래피로 정제하여(구배: 0-9% MeOH/DCM) 6.70 g(25% 수율)의 표제 화합물을 백색 고체로서 수득하였다. LCMS (ESI) $[M+H]^+$ = 534.

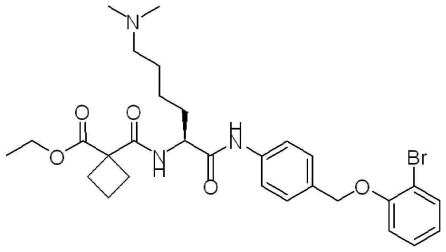
[1432] **단계 5: (*S*)-2-아미노-*N*-(4-((2-브로모페녹시)메틸)페닐)-6-(디메틸아미노)헥산아미드(2,2,2-트리플루오로아세트산염)**

[1433] 

[1434] 5% TFA/HFIP(50 mL) 중 *tert*-부틸 (*S*)-(1-((4-((2-브로모페녹시)메틸)페닐)아미노)-6-(디메틸아미노)-1-옥소헥산-2-일)카르바메이트(4.00 g, 7.48 mmol)의 용액을 실온에서 3시간 동안 교반하였다. 용매를 진공하에서 농축하고 다음 단계에서 직접 사용하였다. LCMS (ESI) $[M+H]^+$ = 434.

[1435] **단계 6: 에틸 (*S*)-1-((1-((4-((2-브로모페녹시)메틸)페닐)아미노)-6-(디메틸아미노)-1-옥소헥산-2-일)카르바모**

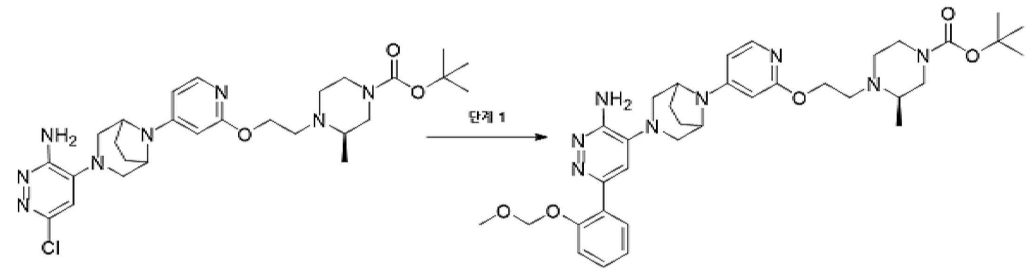
일)시클로부탄-1-카르복실레이트



[1436]

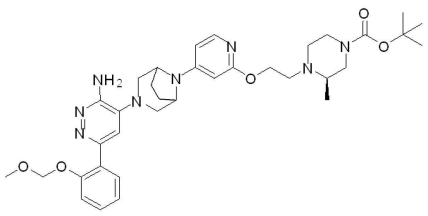
[1437] DMF(20 mL) 중 (*S*)-2-아미노-*N*-(4-((2-브로모페녹시)메틸)페닐)-6-(디메틸아미노)헥산아미드(2,2,2-트리플루오로아세트산 염)(단계 5로부터의 조 물질), 1-(에톡시카르보닐)시클로부탄-1-카르복실산(1.55 g, 8.98 mmol) 및 DIPEA(9.65 g, 74.8 mmol)의 용액에 0°C에서 HATU(3.41 g, 8.98 mmol)를 첨가하였다. 혼합물을 실온에서 0.5시간 동안 교반하였다. 조 물질을 미리 채워진 C18 컬럼(구배: 물 중 0-100% MeOH(0.05% NH_4HCO_3)으로 정제하여 2.70 g(61% 수율)의 표제 화합물을 적색 고체로서 수득하였다. LCMS (ESI) $[M+H]^+$ = 588. ^1H NMR (300 MHz, DMSO-*d6*) δ 9.87 (s, 1H), 7.72 (d, J = 7.9 Hz, 1H), 7.54 - 7.42 (m, 3H), 7.30 (d, J = 8.6 Hz, 2H), 7.21 (ddd, J = 8.8, 7.3, 1.6 Hz, 1H), 7.07 (dd, J = 8.4, 1.5 Hz, 1H), 6.77 (td, J = 7.6, 1.4 Hz, 1H), 5.02 (s, 2H), 4.30 (q, J = 8.0 Hz, 1H), 4.00 (q, J = 7.1 Hz, 2H), 2.35 - 2.21 (m, 2H), 2.03 (t, J = 6.8 Hz, 2H), 1.96 (s, 6H), 1.80-1.41 (m, 4H), 1.30-1.14 (m, 6H), 1.06 (t, J = 7.1 Hz, 3H).

[1438] **중간체 5: *tert*-부틸 (3*R*)-4-(2-((4-(3-(3-아미노-6-(2-(메톡시메톡시)페닐)피리다진-4-일)-3,8-디아자비시클로[3.2.1]옥탄-8-일)피리딘-2-일)옥시)에틸)-3-메틸피페라진-1-카르복실레이트**



[1439]

[1440] **단계 1: *tert*-부틸 (3*R*)-4-(2-((4-(3-(3-아미노-6-(2-(메톡시메톡시)페닐)피리다진-4-일)-3,8-디아자비시클로[3.2.1]옥탄-8-일)피리딘-2-일)옥시)에틸)-3-메틸피페라진-1-카르복실레이트**



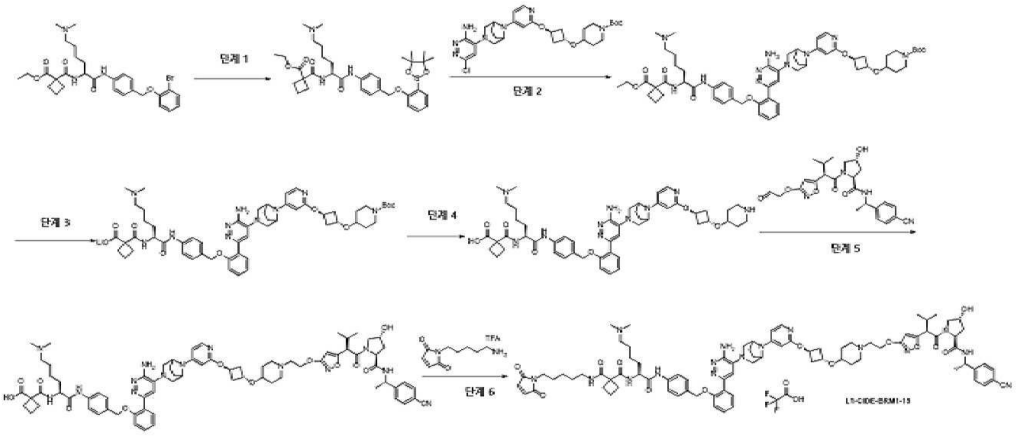
[1441]

[1442] 질소하에, 디옥산(10 mL) 및 물(2 mL) 중 *tert*-부틸 (3*R*)-4-(2-((4-(3-(3-아미노-6-클로로피리다진-4-일)-3,8-디아자비시클로[3.2.1]옥탄-8-일)피리딘-2-일)옥시)에틸)-3-메틸피페라진-1-카르복실레이트(1.00 g, 1.79 mmol), (2-(메톡시메톡시)페닐)보론산(391 mg, 2.15 mmol), $Pd(PPh_3)_4$(413 mg, 0.358 mmol) 및 K_2CO_3(741 mg, 5.37 mmol)의 용액을 100°C에서 1시간 동안 교반하였다. 반응물을 물로 희석하고 디클로로메탄으로 추출하였다. 유기층을 취합하고, 무수 황산나트륨 상에서 건조시키고 진공하에서 농축하였다. 잔류물을 실리카겔의 플래시 크로마토그래피로 정제하여(구배: 0%-10% 메탄올/디클로로메탄) 670 mg(57% 수율)의 표제 화합물을 황색 고체로서 수득하였다. LC-MS: (ESI, m/z): $[M+H]^+$ = 661. ^1H NMR (300 MHz, DMSO-d_6) δ 7.76 (d, *J* = 5.9 Hz, 1H), 7.58 (dd, *J* = 7.6, 1.8 Hz, 1H), 7.34 (ddd, *J* = 9.0, 7.3, 1.8 Hz, 1H), 7.18 - 7.01 (m, 3H), 6.51 (dd, *J* = 6.1, 2.0 Hz, 1H), 6.12 (d, *J* = 2.0 Hz, 1H), 5.72 (s, 2H), 5.14 (s, 2H), 4.47 (s, 2H), 4.25 (t, *J* = 6.1 Hz, 2H), 3.53 (d, *J* = 12.8 Hz, 2H), 3.22 (s, 3H), 3.14 - 2.67 (m, 8H), 2.64-2.56 (m, 1H),2.46-2.36(m, 1 H), 2.32-2.22 (m, 1H), 2.22-2.13 (m, 2H), 2.00-1.90 (m, 2H), 1.38 (s, 9H), 0.96 (d, *J* = 6.2

Hz, 3H).

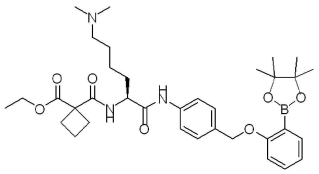
[1443] 실시예 19의 합성

[1444] L1-CIDE-BRM1-19의 합성



[1445]

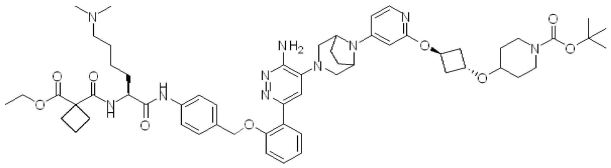
[1446] **단계 1: 에틸 (*S*)-1-((6-(디메틸아미노)-1-옥소-1-((4-((2-(4,4,5,5-테트라메틸-1,3,2-디옥사보롤란-2-일)페녹시)메틸)페닐)아미노)헥산-2-일)카르바모일)시클로부탄-1-카르복실레이트**



[1447]

[1448] 질소하에서, 1,4-디옥산(5 mL) 중 에틸 (*S*)-1-((1-((4-((2-브로모페녹시)메틸)페닐)아미노)-6-(디메틸아미노)-1-옥소헥산-2-일)카르바모일)시클로부탄-1-카르복실레이트(500 mg, 0.852 mmol), B_2Pin_2(649 mg, 2.55 mmol), Pd(dppf)Cl_2(124 mg, 0.170 mmol) 및 KOAc(250 mg, 2.55 mmol)의 용액을 80°C에서 2시간 동안 교반하였다. 반응물을 DCM으로 희석하고 물로 세척하였다. 유기층을 무수 황산나트륨 상에서 건조시키고 진공하에서 농축하였다. 잔류물을 실리카겔의 플래시 크로마토그래피로 정제하여(구배: 0%-20% MeOH/DCM(0.3% 7 M NH_3/MeOH를 함유)) 390 mg(72% 수율)의 표지 화합물을 황색 고체로서 수득하였다. LC-MS: (ESI, m/z): $[M+H]^+$ = 636.

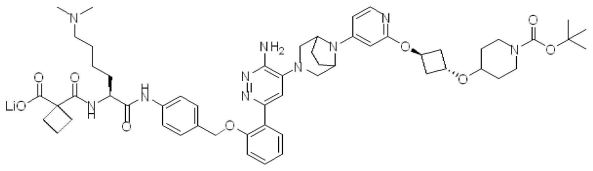
[1449] **단계 2: *tert*-부틸 44-((1*r*,3*r*)-3-((4-(3-(3-아미노-6-(2-((4-((*S*)-6-(디메틸아미노)-2-(1-(에톡시카르보닐)시클로부탄-1-카르복스아미도)헥사나미도)벤질)옥시)페닐)피리다진-4-일)-3,8-디아자비시클로[3.2.1]옥탄-8-일)피리딘-2-일)옥시)시클로부톡시)피페리딘-1-카르복실레이트**



[1450]

[1451] 질소하에서, 디옥산(5.0 mL) 및 H_2O(1.2 mL) 중 에틸 (*S*)-1-((6-(디메틸아미노)-1-옥소-1-((4-((2-(4,4,5,5-테트라메틸-1,3,2-디옥사보롤란-2-일)페녹시)메틸)페닐)아미노)헥산- 2-일)카르바모일)시클로부탄-1-카르복실레이트(390 mg, 0.614 mmol), *tert*-부틸 4-((1r,3r)-3-((4-(3-(3-아미노-6-클로로피리다진-4-일)-3,8-디아자비시클로[3.2.1]옥탄-8-일)피리딘-2-일)옥시)시클로부톡시)피페리딘-1-카르복실레이트(395 mg, 0.676 mmol), $Ad_2nBuPPdG2$(41.0 mg, 0.061 mmol) 및 K_2CO_3(260 mg, 1.22 mmol)의 용액을 95°C에서 2시간 동안 교반하였다. 생성된 용액을 물로 희석하고 EtOAc로 추출하였다. 유기층을 진공하에서 농축하였다. 잔류물을 미리 채워진 C18 컬럼(용매 구배: 물 중 0-100% MeOH(0.1% NH_4HCO_3))으로 정제하여 310 mg(47% 수율)의 표제 화합물을 백색 고체로서 수득하였다. LC-MS: (ESI, m/z): $[M+H]^+$ = 1060.

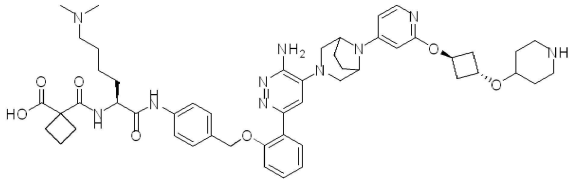
[1452] **단계 3: 리튬 1-(((2S)-1-((4-((2-(6-아미노-5-(8-(2-((1r,3r)-3-((1-(tert-부톡시카르보닐)피페리딘-4-일)옥시)시클로부톡시)피리딘-4-일)-3,8-디아자비시클로[3.2.1]옥탄-3-일)피리다진-3-일)페녹시)메틸)페닐)아미노)-6-(디메틸아미노)-1-옥소헥산-2-일)카르바모일)시클로부탄-1-카르복실레이트**



[1453]

[1454] THF(2 mL) 및 H_2O(2 mL) 중 *tert*-부틸 4-((1*r*,3*r*)-3-((4-(3-(3-아미노-6-(2-((4-((*S*)-6-(디메틸아미노)-2-(1-(에톡시카르보닐)시클로부탄-1-카르복사미도)헥사나미도)벤질)옥시)페닐)피리다진-4-일)-3,8-디아자비시클로[3.2.1]옥탄-8-일)피리딘-2-일)옥시)시클로부톡시)피페리딘-1-카르복실레이트(270 mg, 0.255 mmol) 및 LiOH.H_2O(32.1 mg, 0.765 mmol)의 용액을 실온에서 1시간 동안 교반하였다. 생성된 혼합물을 진공하에 농축하였다. 조 물질을 다음 단계에서 직접 사용하였다. LC-MS: (ESI, m/z): $[M+H]^+$ = 1032.

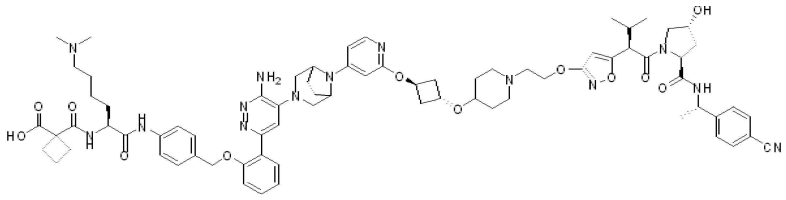
[1455] **단계 4: 1-(((2*S*)-1-((4-((2-(6-아미노-5-(8-(2-((1*r*,3*r*)-3-(피페리딘-4-일옥시)시클로부톡시)피리딘-4-일)-3,8-디아자비시클로[3.2.1]옥탄-3-일)피리다진-3-일)페녹시)메틸)페닐)아미노)-6-(디메틸아미노)-1-옥소헥산-2-일)카르바모일)시클로부탄-1-카르복실산**



[1456]

[1457] TFA(0.75 mL) 및 HFIP(14 mL) 중 리튬 1-(((2S)-1-((4-((2-(6-아미노-5-(8-(2-((1r,3r)-3-((1-(tert-부톡시카르보닐)피페리딘-4-일)옥시)시클로부톡시)피리딘-4-일)-3,8-디아자비시클로[3.2.1]옥탄-3-일)피리다진-3-일)페녹시)메틸)페닐)아미노)-6-(디메틸아미노)-1-옥소헥산-2-일)카르바모일)시클로부탄-1-카르복실레이트(최종 단계로부터의 조 물질)의 용액을 실온에서 30분 동안 교반하였다. 생성된 혼합물을 진공하에 농축하였다. 수득한 조 생성물을 미리 채워진 C18 컬럼(용매 구배: 물 중 0-100% MeOH(0.1% NH_4HCO_3))으로 정제하여 170 mg(71% 수율)의 표제 화합물을 황색 고체로서 수득하였다. LC-MS: (ESI, m/z): $[M+H]^+$ = 932.

[1458] **단계 5: 1-(((2*S*)-1-((4-((2-(6-아미노-5-(8-(2-((1*R*,3*r*)-3-((1-(2-((5-((*R*)-1-((2*S*,4*R*)-2-(((*S*)-1-(4-시아노페닐)에틸)카르바모일)-4-히드록시피롤리딘-1-일)-3-메틸-1-옥소부탄-2-일)이속사졸-3-일)옥시)에틸)피페리딘-4-일)옥시)시클로부톡시)피리딘-4-일)-3,8-디아자비시클로[3.2.1]옥탄-3-일)피리다진-3-일)페녹시)메틸)페닐)아미노)-6-(디메틸아미노)-1-옥소헥산-2-일)카르바모일)시클로부탄-1-카르복실산**

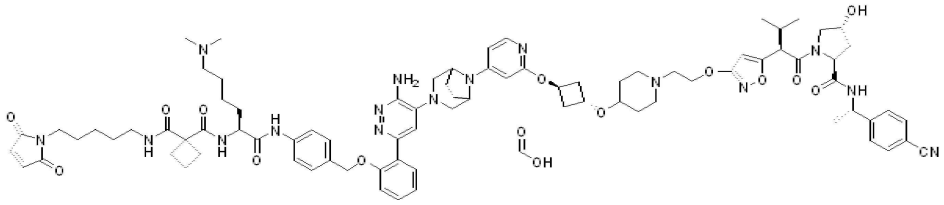


[1459]

[1460] 질소하에서, DCM(1.5 mL) 및 MeOH(0.5 mL) 중 1-(((2S)-1-((4-((2-(6-아미노-5-(8-(2-((1r,3r)-3-(피페리딘-4-일옥시)시클로부톡시)피리딘-4-일)-3,8-디아자비시클로[3.2.1]옥탄-3-일)피리다진-3-일)페녹시)메틸)페닐)아미노)-6-(디메틸아미노)-1-옥소헥산-2-일)카르바모일)시클로부탄-1-카르복실산(170.0 mg, 0.183 mmol), (2*S*,4*R*)-*N*-((*S*)-1-(4-시아노페닐)에틸)-4-히드록시-1-((R)-3-메틸-2-(3-(2-옥소에톡시)이속사졸-5-일)부타노일)피롤리딘-2-카르복스아미드(111 mg, 0.237 mmol), HOAc(21.9 mg, 0.365 mmol)의 용액을 실온에서 1시간 동안 교반하였다. 이후, $NaBH_3CN$(17.3 mg, 0.274 mmol)을 0°C에서 첨가하고 실온에서 30분 동안 교반하였다. 반응물을 물로 켄칭하였다. 생성된 용액을 진공하에 농축하였다. 수득한 조 생성물을 미리 채워진 C18 컬럼(구배: 물 중 0~100% MeOH(0.05% NH_4HCO_3))으로 정제하여 180 mg(71% 수율)의 표제 화합물을 백색 고체로서

수득하였다. LC-MS: (ESI, m/z): $[M+H]^+$ = 1384.

[1461] **단계 5: *N*-((2*S*)-1-((4-((2-(6-아미노-5-(8-(2-((1*R*,3*r*)-3-((1-(2-((5-((*R*)-1-((2*S*,4*R*)-2-(((*S*)-1-(4-시아노페닐)에틸)카르바모일)-4-히드록시피롤리딘-1-일)-3-메틸-1-옥소부탄-2-일)이속사졸-3-일)옥시)에틸)피페리딘-4-일)옥시)시클로부톡시)피리딘-4-일)-3,8-디아자비시클로[3.2.1]옥탄-3-일)피리다진-3-일)페녹시)메틸)페닐)아미노)-6-(디메틸아미노)-1-옥소헥산-2-일)-*N*-(5-(2,5-디옥소-2,5-디히드로-1*H*-피롤-1-일)펜틸)시클로부탄-1,1-디카르복스아미드(포름산염)**



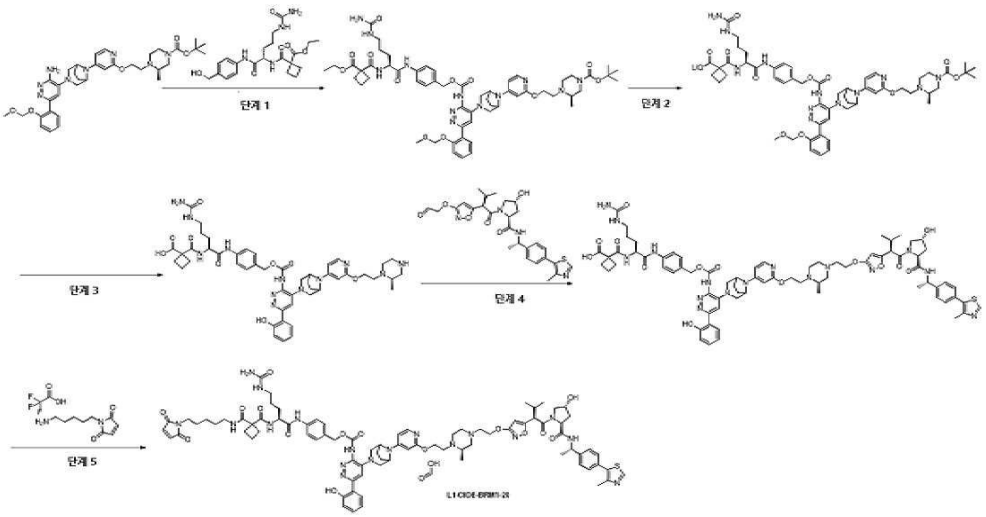
[1462]

[1463] DMF(1.5 mL) 중 1-(((2*S*)-1-((4-((2-(6-아미노-5-(8-(2-((1*R*,3*r*)-3-((1-(2-((5-((*R*)-1-((2*S*,4*R*)-2-(((*S*)-1-(4-시아노페닐)에틸)카르바모일)-4-히드록시피롤리딘-1-일)-3-메틸-1-옥소부탄-2-일)이속사졸-3-일)옥시)에틸)피페리딘-4-일)옥시)시클로부톡시)피리딘-4-일)-3,8-디아자비시클로[3.2.1]옥탄-3-일)피리다진-3-일)페녹시)메틸)페닐)아미노)-6-(디메틸아미노)-1-옥소헥산-2-일)카르바모일)시클로부탄-1-카르복실산(65.0 mg, 0.047 mmol), 1-(5-아미노펜틸)-1*H*-피롤-2,5-다이온(2,2,2-트리플루오로아세트산염)(25.6 mg, 조), DIPEA(90.9 mg, 0.705 mmol)의 용액에 HATU(21.4 mg, 0.056 mmol)를 실온에서 첨가하였다. 생성된 용액을 실온에서 30분 동안 교반하였다.생성된 용액을 분취용 HPLC(엑스셀렉트(Xselect) CSH F-페닐 OBD 컬럼, 19 x 250 mm 5 μm; 이동상 A: 물(0.05% FA), 이동상 B: ACN; 유량: 60 mL/분; 구배: 7분 내 2% B 내지 29% B; 254 nm; R_{T1}: 6.5분)으로 정제하여 5.9 mg(8% 수율)의 **L1-CIDE-BRM1-19**를 백색 고체로서 수득하였다. LC-MS: (ESI, m/z): $[M+H]^+$ = 1548. ^{1}H NMR (300 MHz, DMSO-d_6) δ 10.24 (s, 1H), δ 8.47 (d, *J* = 7.4 Hz, 1H), 8.17 (s, 1H), 7.93 - 7.54 (m, 8H), 7.55-7.30 (m, 5H), 7.26 - 7.09 (m, 2H), 7.08 - 6.87 (m, 3H), 6.43 - 5.88 (m, 3H), 5.59 (s, 2H), 5.22 - 4.86 (m, 5H), 4.50 - 4.12 (m, 8H), 3.72 - 3.54 (m, 3H), 3.13 - 2.97 (m, 4H), 2.63 (s, 6H), 2.45-2.35 (m, 5H), 2.25-2.02 (m, 16H), 2.02 - 1.56 (m, 11H), 1.57 - 1.25 (m, 13H), 1.29-1.12 (m, 4H), 0.95 (d, *J* = 6.8 Hz, 3H), 0.79 (d, *J* = 6.8 Hz, 3H).

[1464] 실시예 20의 합성

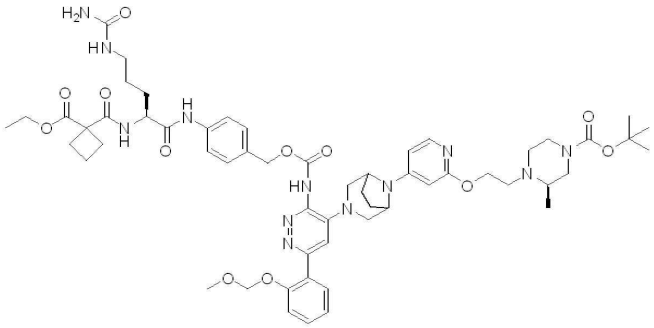
[1465] L1-CIDE-BRM1-20의 합성

[1466] 4-((*S*)-2-(1-((5-(2,5-디옥소-2,5-디히드로-1*H*-피롤-1-일)펜틸)카르바모일)시클로부탄-1-카르복사미도)-5-우레이도펜탄아미도)벤질 (4-(8-(2-(2-((*R*)-4-(2-((5-((*R*)-1-((2*S*,4*R*)-4-히드록시-2-(((*S*)-1-(4-(4-메틸티아졸-5-일)페닐)에틸)카르바모일)피롤리딘-1-일)-3-메틸-1-옥소부탄-2-일)이속사졸-3-일)옥시)에틸)-2-메틸피페라진-1-일)에톡시)피리딘-4-일)-3,8-디아자비시클로[3.2.1]옥탄-3-일)-6-(2-히드록시페닐)피리다진-3-일)카르바메이트(포름산염)



[1467]

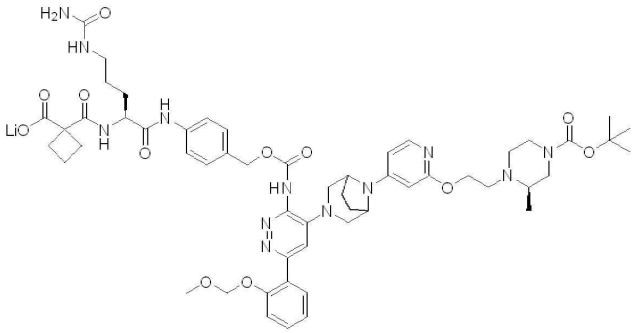
[1468] **단계 1: *tert*-부틸 (3*R*)-4-(2-((4-(3-(3-((((4-((*S*)-2-(1-(에톡시카르보닐)시클로부탄-1-카르복스아미도)-5-우레이도펜탄아미도)벤질)옥시)카르보닐)아미노)-6-(2-(메톡시메톡시)페닐)피리다진-4-일)-3,8-디아자비시클로[3.2.1]옥탄-8-일)피리딘-2-일)옥시)에틸)-3-메틸피페라진-1-카르복실레이트**



[1469]

[1470] 질소하에, THF(25 mL) 중 *tert*-부틸 (3*R*)-4-(2-((4-(3-(3-아미노-6-(2-(메톡시메톡시)페닐)피리다진-4-일)-3,8-디아자비시클로[3.2.1]옥탄-8-일)피리딘-2-일)옥시)에틸)-3-메틸피페라진-1-카르복실레이트(500 mg, 0.756 mmol, 제네텍(Genetech)에 의해 제공됨), 에틸 (*S*)-1-((1-((4-(히드록시메틸)페닐)아미노)-1-옥소-5-우레이도펜탄-2-일)카르바모일)시클로부탄-1-카르복실레이트(986 mg, 2.26 mmol, 제네텍에 의해 제공됨) 및 DIPEA(488 mg, 3.78 mmol)의 용액에 0°C에서 트리포스겐(85.5 mg, 0.288 mmol)을 첨가하였다. 반응물을 실온에서 0.5시간 동안 교반하였다. 용매를 증발시키고 잔류물을 실리카겔 상의 플래시 크로마토그래피로 정제한 다음(구배: 0%-13% 메탄올/디클로로메탄), 미리 채워진 C18 컬럼(용매 구배: 물 중 0~100% ACN(0.05% NH_4HCO_3))으로 정제하여 191 mg(22%)의 표제 화합물을 백색 고체로서 수득하였다. LC-MS: (ESI, m/z): $[M+H]^+$ = 1122.

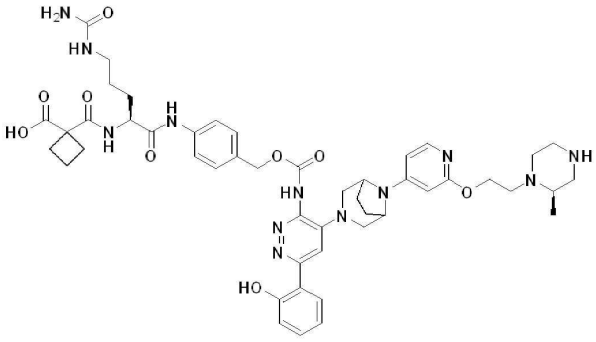
[1471] **단계 2: 리튬 1-(((2S)-1-((4-((((4-(8-(2-(2-((R)-4-(tert-부톡시카르보닐)-2-메틸피페라진-1-일)에톡시)피리딘-4-일)-3,8-디아자비시클로[3.2.1]옥탄-3-일)-6-(2-(메톡시메톡시)페닐)피리다진-3-일)카르바모일)옥시)메틸)페닐)아미노)-1-옥소-5-우레이도펜탄-2-일)카르바모일)시클로부탄-1-카르복실레이트**



[1472]

[1473] THF(3 mL) 및 물(3 mL) 중 *tert*-부틸 (3*R*)-4-(2-((4-(3-(3-((((4-((*S*)-2-(1-(에톡시카르보닐)시클로부탄-1-카르복스아미도)-5-우레이도펜탄아미도)벤질)옥시)카르보닐)아미노)-6-(2-(메톡시메톡시)페닐)피리다진-4-일)-3,8-디아자비시클로[3.2.1]옥탄-8-일)피리딘-2-일)옥시)에틸)-3-메틸피페라진-1-카르복실레이트(130 mg, 0.115 mmol) 및 LiOH(14.0 mg, 0.350 mmol)의 용액을 실온에서 1시간 동안 교반하였다. THF를 진공하에서 제거한 다음, 동결 건조하여 표제 화합물 140 mg(조)을 백색 고체로서 수득하였다. LC-MS: (ESI, m/z): $[M+H]^+$ = 1094.

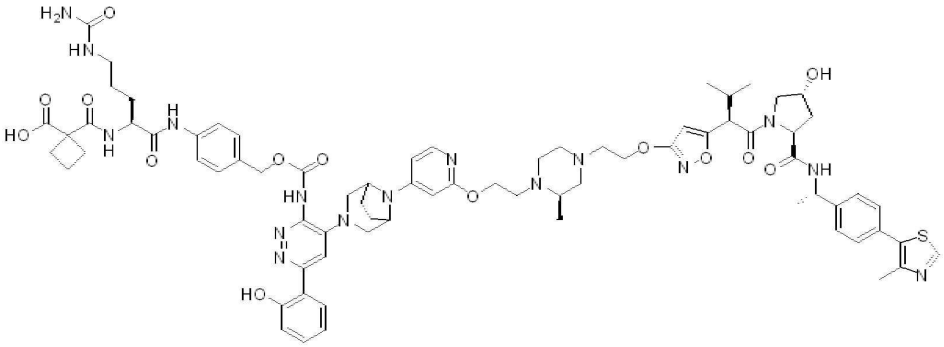
[1474] **단계 3: 1-(((2*S*)-1-((4-((((6-(2-히드록시페닐)-4-(8-(2-(2-((*R*)-2-메틸피페라진-1-일)에톡시)피리딘-4-일)-3,8-디아자비시클로[3.2.1]옥탄-3-일)피리다진-3-일)카르바모일)옥시)메틸)페닐)아미노)-1-옥소-5-우레이도펜탄-2-일)카르바모일)시클로부탄-1-카르복실산**



[1475]

[1476] 질소하에, 농축 HCl(2 ml), THF(2 ml) 및 *i*-이소프로판올(2 mL) 중 리튬 1-(((2S)-1-((4-((((4-(8-(2-(2-((R)-4-(tert-부톡시카르보닐)-2-메틸피페라진-1-일)에톡시)피리딘-4-일)-3,8-디아자비시클로[3.2.1]옥탄-3-일)-6-(2-(메톡시메톡시)페닐)피리다진-3-일)카르바모일)옥시)메틸)페닐)아미노)-1-옥소-5-우레이도펜탄-2-일)카르바모일)시클로부탄-1-카르복실레이트(240 mg, 0.219 mmol)의 용액을 실온에서 0.5시간 동안 교반하였다. 반응 용액을 진공하에서 농축하고 남아 있는 수용액을 미리 채워진 C18 컬럼(용매 구배: 물 중 0~100% ACN(0.05% NH_4HCO_3))으로 정제하여 150 mg의 표제 화합물을 황색 고체로서 수득하였다. LC-MS: (ESI, *m/z*): $[M+H]^+$= 949.

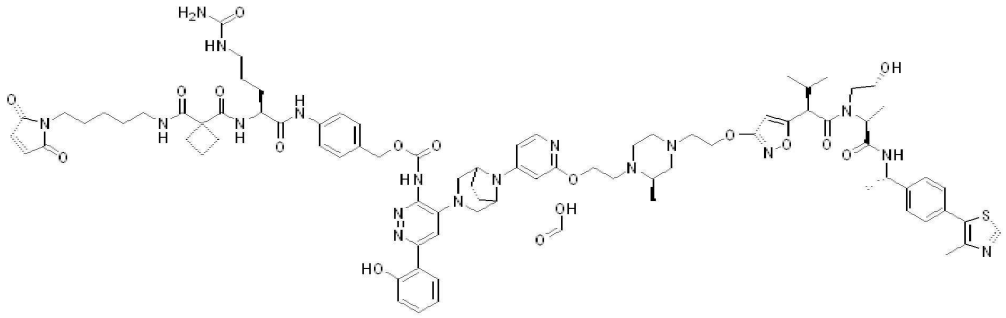
[1477] **단계 4 : 1-(((2*S*)-1-((4-((((4-(8-(2-(2-((*R*)-4-(2-((5-((*R*)-1-((2*S*,4*R*)-4-히드록시-2-(((*S*)-1-(4-(4-메틸티아졸-5-일)페닐)에틸)카르바모일)피롤리딘-1-일)-3-메틸-1-옥소부탄-2-일)이속사졸-3-일)옥시)에틸)-2-메틸피페라진-1-일)에톡시)피리딘-4-일)-3,8-디아자비시클로[3.2.1]옥탄-3-일)-6-(2-히드록시페닐)피리다진-3-일)카르바모일)옥시)메틸)페닐)아미노)-1-옥소-5-우레이도펜탄-2-일)카르바모일)시클로부탄-1-카르복실산**



[1478]

[1479] 질소하에, 메탄올(3 mL) 및 DCM(1 ml) 중 1-(((2*S*)-1-((4-((((6-(2-히드록시페닐)-4-(8-(2-(2-((*R*)-2-메틸피페라진-1-일)에톡시)피리딘-4-일)-3,8-디아자비시클로[3.2.1]옥탄-3-일)피리다진-3-일)카르바모일)옥시)메틸)페닐)아미노)-1-옥소-5-우레이도펜탄-2-일)카르바모일)시클로부탄-1-카르복실산(150 mg, 0.158 mmol), (2*S*,4*R*)-4-히드록시-1-((*R*)-3-메틸-2-(3-(2-옥소에톡시)이속사졸-5-일)부타노일)-*N*-((*S*)-1-(4-(4-메틸티아졸-5-일)페닐)에틸)피롤리딘-2-카르복스아미드(112 mg, 0.207mmol), CH_3COOH(19.8 mg, 0.329 mmol)의 용액을 30℃에서 1시간 동안 교반하였다. 이후, $NaBH_3CN$(19.5 mg, 0.513 mmol)을 첨가하고 30℃에서 0.5시간 동안 교반하였다. 반응 용액을 진공하에 농축시켰다. 잔류물을 미리 채워진 C18 컬럼(용매 구배: 물 중 0~100% 메탄올(0.05% NH_4HCO_3))으로 정제하여 180 mg(77%)의 표제 화합물을 황색 고체로서 수득하였다. LC-MS: (ESI, m/z): $[M+H]^+$ = 1474.

[1480] **단계 5: 4-((*S*)-2-(1-((5-(2,5-디옥소-2,5-디히드로-1*H*-피롤-1-일)펜틸)카르바모일)시클로부탄-1-카르복사미도)-5-우레이도펜탄아미도)벤질 (4-(8-(2-(2-((*R*)-4-(2-((5-((*R*)-1-((2*S*,4*R*)-4-히드록시-2-(((*S*)-1-(4-(4-메틸티아졸-5-일)페닐)에틸)카르바모일)피롤리딘-1-일)-3-메틸-1-옥소부탄-2-일)이속사졸-3-일)옥시)에틸)-2-메틸피페라진-1-일)에톡시)피리딘-4-일)-3,8-디아자비시클로[3.2.1]옥탄-3-일)-6-(2-히드록시페닐)피리다진-3-일)카르바메이트(포름산염)**



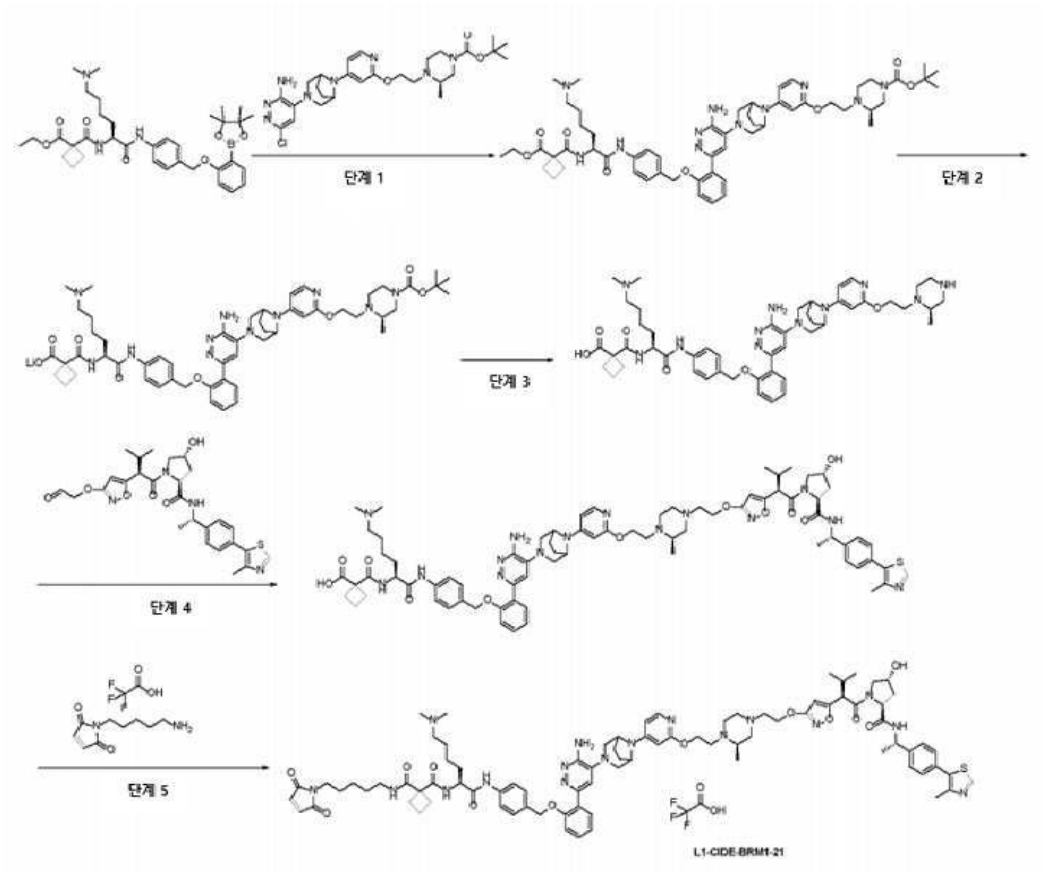
[1481]

[1482] DMF(3 mL) 중 1-(((2*S*)-1-((4-((((4-(8-(2-(2-((*R*)-4-(2-((5-((*R*)-1-((2*S*,4*R*)-4-히드록시-2-(((*S*)-1-(4-(4-메틸티아졸-5-일)페닐)에틸)카르바모일)피롤리딘-1-일)-3-메틸-1-옥소부탄-2-일)이속사졸-3-일)옥시)에틸)-2-메틸피페라진-1-일)에톡시)피리딘-4-일)-3,8-디아자비시클로[3.2.1]옥탄-3-일)-6-(2-히드록시페닐)피리다진-3-일)카르바모일)옥시)메틸)페닐)아미노)-1-옥소-5-우레이도펜탄-2-일)카르바모일)시클로부탄-1-카르복실산(180 mg, 0.122 mmol), 1-(5-아미노펜틸)-1*H*-피롤-2,5-다이온(2,2,2-트리플루오로아세트산염)(67 mg, 조) 및 DIPEA(158 mg, 1.22 mmol)의 용액에 실온에서 HATU(67.0 mg, 0.176 mmol)를 첨가하였다. 반응물을 실온에서 1시간 동안 교반하였다. 생성된 용액을 분취용 HPLC(컬럼: XBridge Prep OBD C18 컬럼, 30*150 mm, 5 μm; 이동상 A: 물(0.1% FA), 이동상 B: ACN; 유량: 60 mL/분; 구배: 7분 내 8% B 내지 38% B; 파장: 254 nm; R_{T1}(분): 6.5분)으로 정제하여 49.7 mg(24.0% 수율)의 **L1-CIDE-BRM1-20**를 백색 고체로서 수득하였다. LC-MS: (ESI, m/z): $[M+H]^+$ = 1638. ^{1}H NMR (300 MHz, DMSO-d_6) δ 13.39 (s, 1H), 10.13 (s, 1H), 9.94 (s, 1H), 8.99 (s, 1H), 8.40 (d, J = 7.7 Hz, 1H), 8.14 (s, 1H), 8.03 (d, J = 7.9 Hz, 1H), 7.82 (dd, J = 8.0, 5.8 Hz, 3H), 7.70 - 7.61 (m, 3H), 7.51 - 7.41 (m, 2H), 7.41 - 7.28 (m, 5H), 6.96 (d, J = 16.1 Hz, 4H), 6.54 (d, J = 6.1 Hz, 1H), 6.17 (s, 1H), 6.10 (s, 1H), 5.96 (dd, J = 10.3, 4.5 Hz, 1H), 5.41 (s, 2H), 5.09 (d, J = 5.3 Hz, 3H), 4.91 (t, J = 7.1 Hz, 1H), 4.50 - 4.34 (m, 4H), 4.32-4.28 (m, 5H), 3.74 - 3.61 (m, 2H), 3.55-3.40 (m, 4H), 3.39-3.35 (m, 3H), 3.19 - 2.89 (m, 9H), 2.70-2.60 (m, 2H), 2.48-2.38 (m, 9H), 2.23-2.12 (m, 1H), 2.10-1.95 (m, 2H), 1.88 (s, 4H), 1.80-1.70 (m, 4H), 1.68 - 1.57 (m, 1H), 1.52-1.30 (m, 10H), 1.28 - 1.16 (m, 2H), 1.10-0.90 (m, 6H), 0.82 (d, J = 6.6 Hz, 3H).

[1483] 실시예 21의 합성

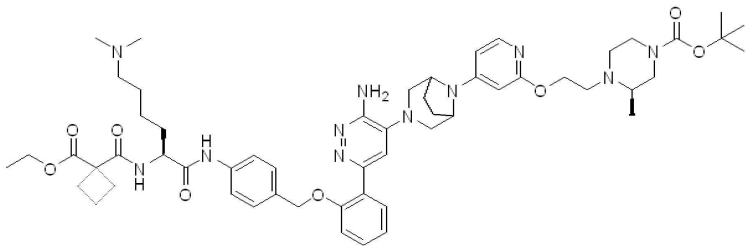
[1484] L1-CIDE-BRM1-21의 합성

[1485] *N*-((2*S*)-1-((4-((2-(6-아미노-5-(8-(2-(2-((*R*)-4-(2-((5-((*R*)-1-((2*S*,4*R*)-4-히드록시-2-(((*S*)-1-(4-(4-메틸티아졸-5-일)페닐)에틸)카르바모일)피롤리딘-1-일)-3-메틸-1-옥소부탄-2-일)이속사졸-3-일)옥시)에틸)-2-메틸피페라진-1-일)에톡시)피리딘-4-일)-3,8-디아자비시클로[3.2.1]옥탄-3-일)피리다진-3-일)페녹시)메틸)페닐)아미노)-6-(디메틸아미노)-1-옥소헥산-2-일)-*N*-(5-(2,5-디옥소-2,5-디히드로-1*H*-피롤-1-일)펜틸)시클로부탄-1,1-디카르복스아미드 ; 2,2,2-트리플루오로아세트산



[1486]

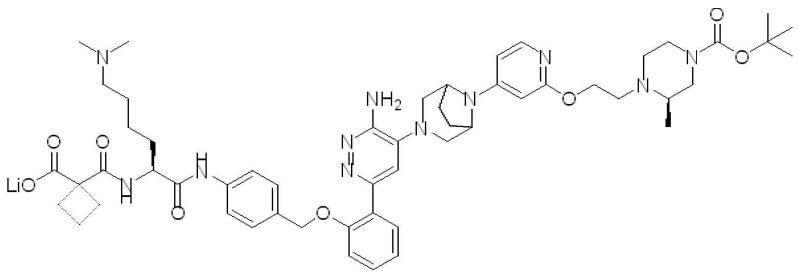
[1487] **단계 1: *tert*-부틸 (3*R*)-4-(2-((4-(3-(3-아미노-6-(2-((4-((*S*)-6-(디메틸아미노)-2-(1-(에톡시카르보닐)시클로부탄-1-카르복스아미도)헥사나미도)벤질)옥시)페닐)피리다진-4-일)-3,8-디아자비시클로[3.2.1]옥탄-8-일)피리딘-2-일)옥시)에틸)-3-메틸피페라진-1-카르복실레이트**



[1488]

[1489] 질소하에서, 1,4-디옥산(4 mL) 및 물(1 mL) 중 에틸 (*S*)-1-((6-(디메틸아미노)-1-옥소-1-((4-((2-(4,4,5,5-테트라메틸-1,3,2-디옥사보롤란-2-일)페녹시)메틸)페닐)아미노)헥산-2-일)카르바모일)시클로부탄-1-카르복실레이트(316 mg, 0.570 mmol), *tert*-부틸 (3*R*)-4-(2-((4-(3-(3-아미노-6-클로로피리다진-4-일)-3,8-디아자비시클로[3.2.1]옥탄-8-일)피리딘-2-일)옥시)ethyl)-3-methyl피페리딘-1-카르복실레이트(538.8 mg, 0.850 mmol), K_3PO_4(240 mg, 1.13 mmol) 및 $Ad_2nBuPPdG2$(37.8 mg, 0.0600 mmol)의 용액을 95°C에서 3시간 동안 교반하였다. 물을 첨가하고 EtOAc를 사용하여 3회 추출하였다. 유기 용매를 취합하고 진공하에 농축하였다. 잔류물을 미리 채워진 C18 컬럼(용매 구배: 물 중 0-100% ACN(0.05% NH_4HCO_3))으로 정제하여 230 mg(39% 수율)의 표제 화합물을 적색 고체로서 수득하였다. LCMS (ESI) $[M+H]^+$ = 1032

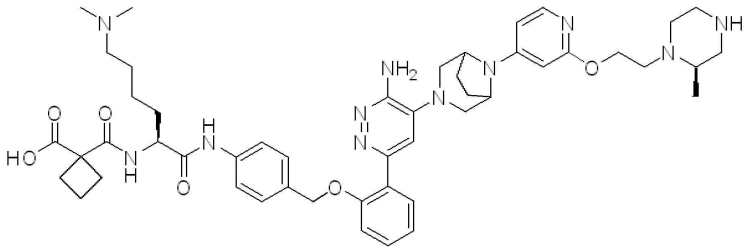
[1490] **단계 2: 리튬 1-(((2*S*)-1-((4-((2-(6-아미노-5-(8-(2-(2-((*R*)-4-(tert-부톡시카르보닐)-2-메틸피페라진)-1-일)에톡시)피리딘-4-일)-3,8-디아자비시클로[3.2.1]옥탄-3-일)피리다진-3-일)페녹시)메틸)페닐)아미노)-6-(디메틸아미노)-1-옥소헥산-2-일)카르바모일)시클로부탄-1-카르복실레이트**



[1491]

[1492] 테트라히드로푸란(3 mL) 및 물(1 mL) 중 tert-부틸 (3*R*)-4-(2-((4-(3-(3-아미노-6-(2-((4-((*S*)-6-(디메틸아미노)-2-(1-(에톡시카르보닐)시클로부탄-1-카르복사미도)헥사나미도)벤질)옥시)페닐)피리다진-4-일)-3,8-디아자비시클로[3.2.1]옥탄-8-일)피리딘-2-일)옥시)에틸)-3-메틸피페라진-1-카르복실레이트(210 mg, 0.200 mmol) 및 $LiOH.H_2O$(25.6 mg, 0.610 mmol)의 용액을 실온에서 1시간 동안 교반하였다. 용매를 진공하에 농축하여 254 mg (조)의 표제 화합물을 황색 고체로서 수득하였다.

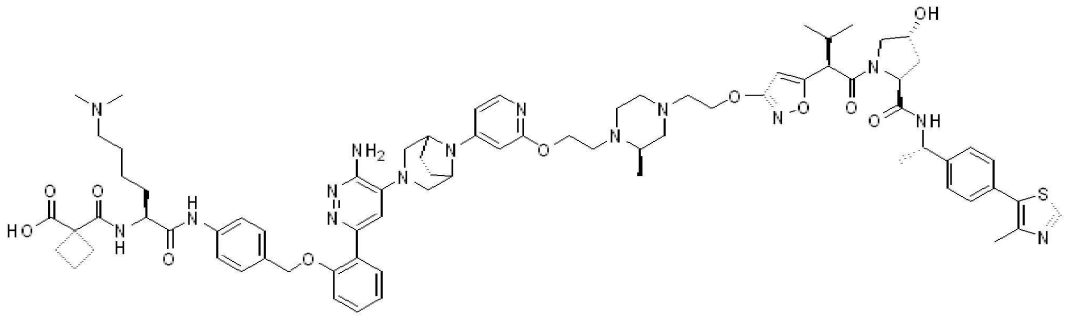
[1493] **단계 3: 1-(((2*S*)-1-((4-((2-(6-아미노-5-(8-(2-(2-((*R*)-2-메틸피페라진-1-일)에톡시)피리딘-4-일)-3,8-디아자비시클로[3.2.1]옥탄-3-일)피리다진-3-일)페녹시)메틸)페닐)아미노)-6-(디메틸아미노)-1-옥소헥산-2-일)카르바모일)시클로부탄-1-카르복실산**



[1494]

[1495] 5% TFA/HFIP(20 mL) 중 리튬 1-(((2*S*)-1-((4-((2-(6-아미노-5-(8-(2-(2-((*R*)-4-(tert-부톡시카르보닐)-2-메틸피페라진)-1-일)에톡시)피리딘-4-일)-3,8-디아자비시클로[3.2.1]옥탄-3-일)피리다진-3-일)페녹시)메틸)페닐)아미노)-6-(디메틸아미노)-1-옥소헥산-2-일)카르바모일)시클로부탄-1-카르복실레이트(254 mg, 0.250 mmol)의 용액을 실온에서 3시간 동안 교반하였다. 용매를 진공하에 농축하였다. 잔류물을 미리 채워진 C18 컬럼(용매 구배: 물 중 0-100% MeOH(0.05% NH_4HCO_3))으로 정제하여 102 mg(44% 수율)의 표제 화합물을 적색 고체로서 수득하였다. LCMS (ESI) $[M+H]^+$ = 905.

[1496] **단계 4: 1-(((2*S*)-1-((4-((2-(6-아미노-5-(8-(2-(2-((*R*)-4-(2-((5-((*R*)-1-((2*S*,4*R*)-4-히드록시-2-(((*S*)-1-(4-(4-메틸티아졸-5-일)페닐)에틸)카르바모일)피롤리딘-1-일)-3-메틸-1-옥소부탄-2-일)이속사졸-3-일)옥시)에틸)-2-메틸피페라진-1-일)에톡시)피리딘-4-일)-3,8-디아자비시클로[3.2.1]옥탄-3-일)피리다진-3-일)페녹시)메틸)페닐)아미노)-6-(디메틸아미노)-1-옥소헥산-2-일)카르바모일)시클로부탄-1-카르복실산**

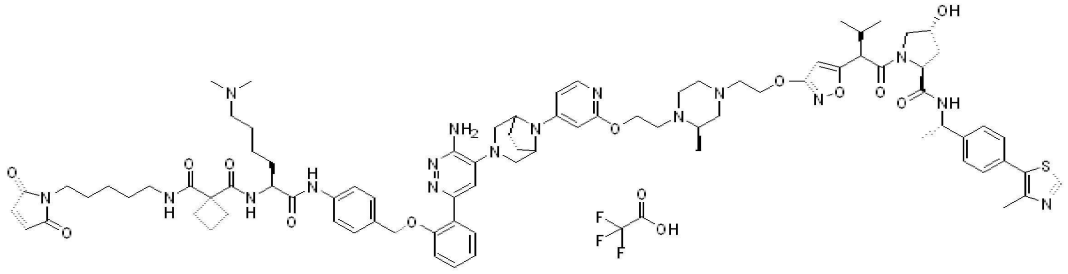


[1497]

[1498] 메틸 알코올(1.2 mL) 및 디클로로메탄(0.4 mL) 중 1-(((2*S*)-1-((4-((2-(6-아미노-5-(8-(2-(2-((*R*)-2-메틸피페라진-1-일)에톡시)피리딘-4-일)-3,8-디아자비시클로[3.2.1]옥탄-3-일)피리다진-3-일)페녹시)메틸)페닐)아미노)-6-(디메틸아미노)-1-옥소헥산-2-일)카르바모일)시클로부탄-1-카르복실산(102 mg, 0.110 mmol), (2*S*,4*R*)-4-히드록시-1-((*R*)-3-메틸-2-(3-(2-옥소에톡시)이속사졸-5-일)부타노일)-*N*-((*S*)-1-(4-(4-메틸티아졸-5-일)페닐)에틸)피롤리딘-2-카르복스아미드(61.0 mg, 0.110 mmol) 및 CH3COOH(13.6 mg, 0.230 mmol)의 용액을 실온에서 1시

간 동안 교반하였다. 이후, $NaBH_3CN$(21.3 mg, 0.340 mmol)을 첨가하고 실온에서 0.5시간 동안 교반하였다. 물을 첨가하여 반응을 퀜칭하였다. 용매를 진공하에 농축하였다. 잔류물을 미리 채워진 C18 컬럼(용매 구배: 물 중 0-100% MeOH(0.05% NH_4HCO_3))으로 정제하여 80.0 mg(49% 수율)의 표제 화합물을 황색 고체로서 수득하였다. LCMS (ESI) $[M+H]^+$ = 1429.

[1499] **단계 4: *N*-((2*S*)-1-((4-((2-(6-아미노-5-(8-(2-(2-((*R*)-4-(2-((5-((*R*)-1-((2*S*,4*R*)-4-히드록시-2-(((*S*)-1-(4-(4-메틸티아졸-5-일)페닐)에틸)카르바모일)피롤리딘-1-일)-3-메틸-1-옥소부탄-2-일)이속사졸-3-일)옥시)에틸)-2-메틸피페라진-1-일)에톡시)피리딘-4-일)-3,8-디아자비시클로[3.2.1]옥탄-3-일)피리다진-3-일)페녹시)메틸)페닐)아미노)-6-(디메틸아미노)-1-옥소헥산-2-일)-*N*-(5-(2,5-디옥소-2,5-디히드로-1*H*-피롤-1-일)펜틸)시클로부탄-1,1-디카르복사미드(2,2,2-트리플루오로아세트산염)**



[1500]

[1501] DMF(2 mL) 중 1-(((2*S*)-1-((4-((2-(6-아미노-5-(8-(2-(2-((*R*)-4-(2-((5-((*R*)-1-((2*S*,4*R*)-4-히드록시-2-(((*S*)-1-(4-(4-메틸티아졸-5-일)페닐)에틸)카르바모일)피롤리딘-1-일)-3-메틸-1-옥소부탄-2-일)이속사졸-3-일)옥시)에틸)-2-메틸피페라진-1-일)에톡시)피리딘-4-일)-3,8-디아자비시클로[3.2.1]옥탄-3-일)피리다진-3-일)페녹시)메틸)페닐)아미노)-6-(디메틸아미노)-1-옥소헥산-2-일)카르바모일)시클로부탄-1-카르복실산(60.0 mg, 0.0400 mmol), 1-(5-아미노펜틸)-1*H*-피롤-2,5-다이온(2,2,2-트리플루오로아세트산염)(23.0 mg, 조) 및 DIPEA(163 mg, 1.26 mmol)의 용액에 실온에서 HATU(24.0 mg, 0.0600 mmol)를 첨가하였다. 반응물을 실온에서 0.5시간 동안 교반하였다. 생성물을 분취용 HPLC(컬럼: 엑스브리지(XBridge) 분취용 페닐 OBD 컬럼 19*250 mm, 5 μm; 이동상 A: 물(0.05% FA), 이동상 B: ACN; 유량: 25 mL/분; 구배: 10분 내 17% B 내지 25% B; 파장: 254 nm; RT_1(분): 8.77)으로 정제하였다. 이후, 이를 분취용 HPLC(컬럼: 엑스셀렉트(Xselect) CSH C18 OBD 컬럼 30*150 mm, 5 μm; 이동상 A: 물(0.05% TFA), 이동상 B: ACN; 유량: 60 mL/min; 기울기: 8분 내 13% B 내지 38% B; 파장: 254/220 nm; RT_1(분): 8)로 정제하여 5.0 mg(7% 수율)의 **L1-CIDE-BRM1-21**을 황색 고체로서 수득하였다. LCMS (ESI) $[M+H]^+$ = 1593. ^1H NMR (300 MHz, DMSO-d6) δ 10.21 (s, 1H), 9.53 (s, 1H), 8.99 (s, 1H), 8.39 (d, J = 7.8 Hz, 1H), 7.95-7.80 (m, 3H), 7.67 (d, J = 8.1 Hz, 2H), 7.63-7.50 (m, 2H), 7.50-7.43 (m, 8H), 7.19 - 7.08 (m, 1H), 7.10-6.90 (m, 3H), 6.64 (s, 1H), 6.25 (s, 1H), 6.11 (s, 1H), 5.09 (s, 2H), 4.91 (t, J = 7.1 Hz, 1H), 4.48 (br, 4H), 4.41 - 4.30 (m, 4H), 3.73-3.65 (m, 6H), 3.47 - 3.31 (m, 7H), 3.13 - 2.88 (m, 12H), 2.75 (d, J = 4.4 Hz, 7H), 2.48-2.38 (m, 8H), 2.25-2.15(m, 1H), 2.05 - 1.59 (m, 11H), 1.50 - 1.29 (m, 8H), 1.31-1.11 (m, 6H), 0.96 (d, J = 6.4 Hz, 3H), 0.87 - 0.76 (m, 3H).

[1502] 실시예 22의 합성

[1503] 항체에 대한 L1-CIDE의 접합

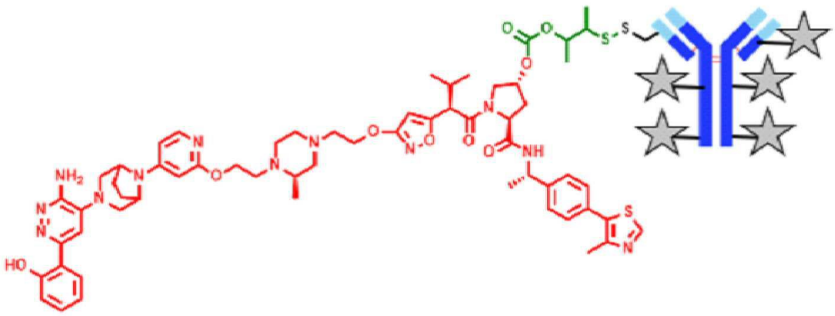
[1504] 10 mM 석시네이트, pH 5, 150 mM NaCl, 2 mM EDTA 중의 시스테인 조작된 항체(THIOMAB™)는 1 M Tris를 사용하여 pH 7.5-8.5로 pH 조정한다. 3-16 당량의 L1-CIDE(티올 반응성 말레이미드기를 함유함)를 DMF 또는 DMA(농도 = 10 mM)에 용해하고 환원, 재산화 및 pH 조정된 항체에 첨가한다. 반응은 실온 또는 37℃에서 배양하고 반응 혼합물의 LC-MS 분석에 의해 결정되는 바와 같이 완료될 때까지(1 내지 약 24시간) 모니터링한다. 반응이 완료되면, Ab-CIDE는 여러 방법 중 하나 또는 임의의 조합으로 정제하며, 목표는 남아있는 미반응 링커-약물 중간체 및 응집된 단백질(유의적 수준으로 존재하는 경우)을 제거하는 것이다. 일례로서, Ab-CIDE는 최종 pH가 대략 5.5가 될 때까지 pH 5.5인 10 mM 히스티딘-아세테이트로 희석되고 Akta 정제 시스템(GE 헬스케어(Healthcare))에 연결된 HiTrap S 컬럼 또는 S maxi 스핀 컬럼(피어스(Pierce))을 사용하는 S 양이온 교환 크로마토그래피로 정제한다. 대안적으로, Ab-CIDE는 Akta 정제 시스템 또는 Zeba 스핀 컬럼에 연결된 S200 컬럼을 사용하는 겔 여과 크로마토그래피에 의해 정제한다. 투석은 접합체를 정제하는 데 사용한다.

[1505] THIOMAB™ Ab-CIDE는 겔 여과 또는 투석을 사용하여 240 mM 수크로스와 함께 20 mM His/아세테이트, pH 5로 제형화한다. 정제된 Ab-CIDE는 원심 한외여과로 농축하고 무균 상태에서 0.2-μm 필터를 통해 여과한 후 -20° C에서 냉동하여 보관한다.

[1506] 생물학적 실시예 1

[1507] 세포 기반 분석

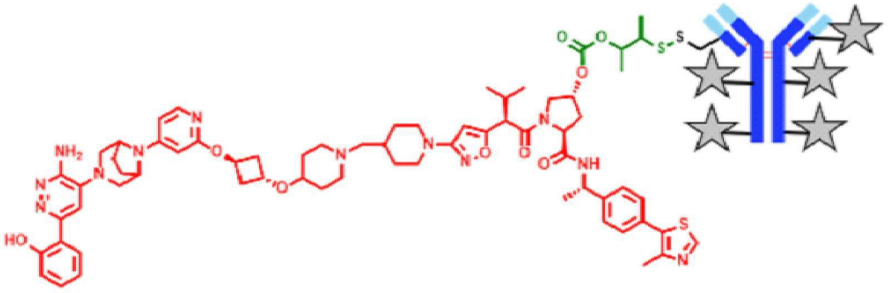
[1508] BRM의 면역형광 검출



[1509]

[1510] Ab-L1a-CIDE-BRM1-1

[1511] CD22에 대한 접합은 DAR이 5.8이었다. EpCAM에 대한 접합은 DAR이 5.9이었다.



[1512]

[1513] Ab-L1a-CIDE-BRM1-3

[1514] CD22에 대한 접합은 DAR이 5.8이었다. EpCAM에 대한 접합은 DAR이 5.9이었다. CD-22: 티오(Thio) Hu 항 CD22 10F4v3 고 DAR [LC:K149C HC: Y373C HC:L174C] MeMe 이황화물 BRM CIDE; EpCAM: 티오 Hu 항 Her2 7C2 고 DAR [LC:K149C HC:L174C HC:Y373C] MeMe 이황화물 BRM CIDE

[1515] 도 1a 및 도 1b는 Ab-L1a-CIDE-BRM1-1의 활성을 도시한다. 도 2a 및 도 2b는 Ab-L1a-CIDE-BRM1-3의 활성을 도시한다.

[1516] 생물학적 실시예 2

[1517] PK/PD BJAB 종양 분석

[1518] BJAB-luc 인간 비호지킨 림프종의 마우스 이종이식 모델에서 항 CD22-BRM Ab-CIDE의 PK/PD 효과를 평가하였다. BJAB-luc는 제넨텍(Genentech) 세포주 저장소에서 입수하였다. 이 세포주는 프로메가 파워플렉스(Promega PowerPlex) 16 시스템을 사용하여 STR(Short Tandem Repeat) 프로파일링으로 인증하였으며 세포주의 혈통을 확인하기 위해 세포주의 외부 STR 프로파일과 비교하였다.

[1519] 모델을 확립하기 위해, 종양 세포(Hank's Balanced Salt Solution 0.2 mL 중 2천만 개)를 암컷 C.B-17 SCID 마우스(Charles River Laboratories)의 옆구리에 피하로 접종하였다. 종양이 원하는 부피(300-400 mm3)에 도달했을 때, 마우스를 유사한 종양 크기 분포를 갖는 n=5 군으로 무작위 배정하고 비히클(히스티딘 완충제) 또는 시험 물품을 꼬리 정맥을 통해 1회 정맥 주사하였다. 모든 항 CD22-BRM Ab-CIDE 및 접합되지 않은 항체는 히스티딘 완충액(20 mM 히스티딘 아세테이트 pH 5.5, 240 mM 수크로스, 0.02% 트윈(Tween) 20)에서 제형화되었다. 접합되지 않은 BRM CIDE는 10% 히드록시프로필-베타-시클로덱스트린, 50 mM 아세트산나트륨, pH4에서 제형화되었

다.

[1520] 투여 4일 후, 마우스를 안락사시키고 종양 및 전혈을 수집하였다. 종양을 절제하고 액체 질소에서 순간 동결시키기 전에 두 개의 분취량으로 나누었다. 한 분취량은 방출된 BRM CIDE의 수준을 측정하는 데 사용하였고 다른 분취량은 하류 PD 마커의 변조를 평가하는 데 사용하였다. 전혈은 마취 수술면 하에서 말단 심장 천자에 의해 리튬 헤파린을 포함하는 튜브로 수집하였다. 혈액을 원심분리할 때까지(수집 후 15분 이내) 젖은 얼음 위에 방치하였다. 샘플을 4° C에서 5분 동안 10,000 rpm으로 원심분리하고, 혈장을 수집하고, 드라이아이스 위에 놓고, 링커 안정성 및 전체 항체 약동학에 대한 분석까지 -70° C에서 보관하였다.

[1521] 이종이식 조직의 웨스턴 블롯팅(Western blotting)

[1522] 드라이아이스에서 냉동 조직을 15-30 mg 조각으로 자른 다음 3.2 mm(NextAdvance(3.2 mm, SSB32)) 스테인리스 스틸 비드 1개가 있는 1.5 mL 에펜도르프 안전 잠금(Eppendorf Safe-Lock) 튜브로 옮겼다. 0.5 M NaCl이 보충된 RIPA 완충액(350 uL)과 새로 추가된 1x Halt 프로테아제 및 포스파타제 억제제를 첨가하고 튜브를 불렛 블렌더(Bullet Blender) 조직 균질기에 넣었다. 샘플을 최고 속도로 3분 동안 균질화하였다. 튜브를 벤치탑 원심분리기에서 5분 동안 최고 속도로 4° C에서 회전시키고 용해물을 새로운 튜브로 옮겼다. 피어스(Pierce) BCA 단백질 분석을 사용하여 단백질 농도를 결정하였다. 단백질 용해물은 시료 완충액과 환원 시약으로 제조하고 95° C에서 3분 동안 배양하였다. 단백질(12 ug)을 트리스-아세테이트 런닝 버퍼로 3-8% 트리스 아세테이트 겔에서 분리한 다음 iBlot 전달 장치(25V, 10분)를 사용하여 니트로셀룰로스 막으로 옮겼다. 30분 동안 TBS-T 내 5% 밀크(Milk)로 막을 차단한 후, 1차 항체를 1/1000으로 첨가하였다. 막을 SMARCA2(BRM)(토끼, 세포 신호전달 기술 Cat#11966) 및 HDAC1(마우스, 세포 신호전달 기술 Cat#5356)에 대해 블롯팅하고 로커(rocker)에서 4° C에서 밤새 배양하였다. 다음날 막을 실온에서 TBS-T로 30분 동안 로커에서 세척하고, 세척 완충액을 3회 이상 교체하였다. 이후, 멤브레인을 로커에서 실온에서 1시간 동안 TBS-T에서 1/5000에서 2차 Licor와 함께 배양하였다. 블롯을 TBS-T로 1시간 동안 세척하고, 세척 완충액을 6회 이상 교체하였다. 이미지는 Licor 이미징 시스템에서 캡처하였다.

[1523] 쥐 종양 검정을 실시하였다. 표 1은 연구군 및 매개변수를 나타낸다.

표 1. BJAB 종양(CB17-SCID 마우스), PK/PD 연구

군	화합물	mg/kg	빈도	경로	PD 시점	# 마우스
1	비히클 대조군	NA	1회	IV	96 h	5
2	비접합 mAb 대조군	10	1회	IV	96 h	5
3	CD22-L1a-CIDE-BRM1-1 DAR6	1	1회	IV	96 h	5
4	EpCAM-L1a-CIDE-BRM1-1 DAR6	1	1회	IV	96 h	5
5	CD22-L1a-CIDE-BRM1-1 DAR6	10	1회	IV	96 h	5
6	EpCAM-L1a-CIDE-BRM1-1 DAR6	10	1회	IV	96 h	5
7	CD22-L1a-CIDE-BRM1-3 DAR6	1	1회	IV	96 h	5
8	HER2-L1a-CIDE-BRM1-3 DAR6	1	1회	IV	96 h	5
9	CD22-L1a-CIDE-BRM1-3 DAR6	10	1회	IV	96 h	5
10	HER2-L1a-CIDE-BRM1-3 DAR6	10	1회	IV	96 h	5
11	CIDE-BRM1-3 비접합 대조군	20	1회	IV	96 h	5

[1524]

[1525] • (1) BRM, BRG, PBRM1 PD 및 (2) 종양 PK에 대한 분할 종양 조직 2가지 방식

[1526] • 상기 나열된 PD에 대한 것과 동일한 혈장 PK 시점

[1527] • 항체 접합체, IV 제제: 히스티딘 완충액, 용량 부피 = 5 mL/kg

[1528] • CIDE-BRM1-3, IV 제제: 10% HP-b-CD 및 50 mM 아세트산나트륨 pH 4.0 용량 부피 = 5 mL/kg

[1529] Ab-L1a-CIDE-BRM1-1에 대한 용량 및 항원 의존성 항종양 활성은 도 3a-도 3l에, Ab-L1a-CIDE-BRM1-3에 대해서는 도 4a-도 4l에 나타내었다.

[1530] 생물학적 실시예 3

[1531] 표적 단백질 분해 분석

[1532] 개선된 PD 반응에 대한 데이터 보고서. 도 5는 Ab-L1a-CIDE-BRM1-1의 경우 BRM 및 BRG1 분해가 항종양 활성과

관련이 있음을 보여주는 데이터를 도시한다. 도 6은 Ab-L1a-CIDE-BRM1-3의 경우 BRM 및 BRG1 분해가 항종양 활성과 덜 관련이 있음을 보여주는 데이터를 도시한다. 도 7은 항체 접합 전략이 분해 활성을 증가시킴을 보여주는 데이터를 도시한다. 상기 모든 데이터의 시점은 96시간이다. Ab-L1a-CIDE-BRM1-1은 접합되지 않은 CIDE-BRM1-3보다 더 잘 분해되는 반면, 두 화합물은 접합되지 않은 형태의 세포 분석에서 유사한 BRM 분해 특성을 나타낸다(WO2019195201에 기재된 CIDE-BRM1-3 대 CIDE-BRM1-1 분석). 이러한 효과는 본원에 기재된 연결 전략이 분해 특성을 조절할 수 있음을 입증한다.

[1533] 생물학적 실시예 4

[1534] DC50 및 Dmax를 결정하기 위한 세포 검정

[1535] Ab-L1-CIDE의 DC50 및 Dmax를 결정하기 위해 세포 기반 검정을 2개의 세포주에서 실시하였다. BJAB, HCC515 및 H1944 세포를 384웰 플레이트에 각각 5000, 4000 및 2500 세포/웰로 분주하였다. 다음날 Ab-CIDE를 첨가하였다. 약물 처리 24시간 후, 세포를 4% 포름알데히드로 15분 동안 고정시켰다. 플레이트를 PBS로 3회 세척하였다. 세포를 IF 차단 용액(PBS 중 10% FCS, 1% BSA, 0.1% 트리톤(Triton), 0.01% 아지드(Azide), X-100)과 함께 배양하였다. 1.5시간 후, IF 차단 완충액에 희석된 1차 항체의 2X 용액: BRM(세포 신호전달(Cell signaling) Cat#11966, 1:2000)을 첨가하였다. 플레이트를 4° C에서 밤새 배양하였다. 다음날 아침 세포를 PBS로 3회 세척하였다. 이후, 세포를 2차 항체(rabbit-Alexa 488 A21206(1:2000))와 함께 암실의 실온에서 1시간 동안 배양하였다. 1:5000의 희흐스트(Hoechst) H3570을 웰에 첨가하고 플레이트를 추가로 30분 동안 배양하였다. 플레이트를 3x PBS로 세척하고 오페라 피닉스(Opera Phenix)™ 고함량 스크리닝 시스템(High Content Screening System)에서 이미지화하였다. 핵 염색을 마스크로 사용하여, 핵 BRM 평균 신호 강도를 정량화하였다.

[1536] 데이터는 하기의 표 2에 나타내었다. 데이터는 본원에 개시된 성공적인 항체 표적화 전략을 입증한다. 음성 대조군: 항 gD 및 항 TROP2는 NCI-H1944 세포와 상호작용하지 않는 반면, 항 TfR2는 상호작용한다. 항 gD는 또한 HCC515 세포와 상호작용하지 않는 반면, 항 TfR2 및 항 TROP2는 상호작용합니다. 데이터는 여러 Ab-L1-CIDE가 바람직하게 낮은 DC50과 바람직하게 높은 Dmax 값을 모두 가지고 있음을 보여준다.

표 2.

			NCI-H1944		HCC515	
Ab-L1-CIDE-BRM	표적	DAR	DC50 (μg/mL)	Dmax	DC50 (μg/mL)	Dmax
티오 Hu 항 gD 586 고 DAR [HCL174C HCY373C LCK149C] diMe Me 이황화 BRM 분해자 로스 Ab-L1-CIDE-BRM1-9	gD	5.66	1.56	95	0.59	93
티오 Hu 항 TfR2.NG2LH 고 DAR [HCL174C HCY373C LCK149C] diMe Me 이황화 BRM 분해자 로스 Ab-L1-CIDE-BRM1-9	TfR2	5.87	0.74	94	0.12	96
티오 Hu 항 gD 586 LALA.PG 고 DAR [LCK149C HCY373C HCL174C] MC-sqOt-BRM 분해자 Ab-L1-CIDE-BRM1-20	gD	5.90	9.37	93	2.65	94
티오 Hu 항 TfR2 LALA.PG 고 DAR [LCK149C HCY373C HCA140C] MC-sqOt-BRM 분해자 Ab-L1-CIDE-BRM1-20	TfR2	6.14	0.10	95	0.02	95
티오 Hu 항 TROP2 LALA.PG 고 DAR [LCK149C HCY373C HCA140C] MC-sqOt-BRM 분해자 Ab-L1-CIDE-BRM1-20	TROP2	6.00	6.45	93	<0.01	95
티오 Hu 항 gD 586 LALA.PG 고 DAR [LCK149C HCY373C HCA140C] MC-sqDML-BRM 분해자 Ab-L1-CIDE-BRM1-19	gD	5.89	NA	32	7.60	86
티오 Hu 항 TfR2 LALA.PG 고 DAR [LCK149C HCY373C HCA140C] MC-sqDML-BRM 분해자 Ab-L1-CIDE-BRM1-19	TfR2	5.79	0.36	80	0.33	84
티오 Hu 항 TROP2 LALA.PG 고 DAR [LCK149C HCY373C HCA140C] MC-sqDML-BRM 분해자 Ab-L1-CIDE-BRM1-19	TROP2	5.73	NA	23	>50	82
티오 Hu 항 gD 586 고 DAR [HCL174C HCY373C LCK149C] MC-gluc BRM 분해자 Ab-L1-CIDE-BRM1-15	gD	5.96	>10	NA	>10	NA
티오 Hu 항 TfR2.NG2LH 고 DAR [HCL174C HCY373C LCK149C] MC-gluc BRM 분해자 Ab-L1-CIDE-BRM1-15	TfR2	5.97	>10	NA	>10	NA
티오 Hu 항 TROP2 고 DAR [HCL174C HCY373C LCK149C] MC-gluc BRM 분해자 Ab-L1-CIDE-BRM1-15	TROP2	5.93	>10	NA	>10	NA
티오 Hu 항 TfR1.NG2LH ReSn 루프 고 DAR [HCL174C HCY373C LCK149C] MC-sqOt-BRM CIDE Ab-L1-CIDE-BRM1-13	TfR1	5.96	0.07	77	측정되지 않음	

[1537]

[1538] 생물학적 실시예 5

[1539] 리소좀 방출 분석

[1540] 세포내 환경을 모방한 환경에서 L1 모이어티로부터 분해제의 방출을 측정하기 위해 리소좀 방출 검정을 실시하였다. 분해제가 BRM에 결합하여 유비퀴틴 리가아제로 운반할 때 활성을 나타내려면, 먼저 L1이 방출되어야 한다.

[1541] 분석은 각각의 CIDE에 해당하는 "L1-BRM1-#"으로 명명된 BRM-결합 화합물에 결합된 L1을 사용하여 실시하였다. 상기 시험은 BRM 부분에 대한 L1의 공유 부착의 절단이 발생했는지 여부를 결정한다. 링커-약물(10 μM)을 인간 간 리소좀(0.17 mg/mL) 및 시스테인(5mM)과 함께 100 mM 시트르산 완충액(pH 5.5)에서 24시간 동안 배양하였다. 샘플은 (A) 물 중 0.1% 포름산 및 (B) 아세토니트릴 중 0.1% 포름산의 구배를 함유하는 LC 이동상을 사용하여 Q Exactive Orbitrap 질량 분석기로 분석하였다.

[1542] 상기 연구의 결과는 하기의 표 3에 나타내었다. 결과는 세포 환경에서 BRM 부분에 대한 L1의 직접 연결 전략이 방출됨을 나타낸다. 하나의 접합체인 L1-CIDE-BRM1-15는 본원에 기재된 링커-1 유형의 항체 링커를 포함하지 않는다. 시험한 DAC 중, L1-CIDE-BRM1-15는 리소좀 추출물에서 분해제를 방출하지 않았다. 이러한 발견은 본원에 기재된 링커-1 유형의 L1 링커와 같은 분해제를 Ab로의 선택적 연결 전략의 요건을 뒷받침한다.

표 3.

L1-BRM	리소좀 추출물의 방출
L1-BRM1-15(CIDE-BRM1-15로부터의 BRM)	없음
L1-BRM1-9(CIDE-BRM1-9로부터의 BRM)	있음
L1-BRM1-13(CIDE-BRM1-13으로부터의 BRM)	있음
L1-BRM1-20(CIDE-BRM1-20으로부터의 BRM)	있음

[1543]

[1544] *"없음"은 리소좀 추출물에서 37℃에서 24시간 배양 후 관찰된 15% 미만의 유리 약물을 나타낸다. *"있음"은 리소좀 추출물에서 37℃에서 24시간 배양 후 관찰된 50% 초과의 유리 약물을 나타낸다.

[1545] 사용된 숫자(예를 들어, 양, 온도 등)와 관련하여 정확성을 보장하기 위해 노력했지만 일부 실험적 오차 및 편차가 고려되어야 한다.

[1546] 당업자는 본원에 개시된 요지의 실시에서 사용될 수 있는, 본원에 기재된 것과 유사하거나 동등한 많은 방법 및 재료를 인식할 것이다. 본 개시는 기재된 방법 및 재료에만 제한되지 않는다.

[1547] 달리 정의되지 않는 경우, 본원에 사용된 기술적 및 과학적 용어는 본 요지가 속하는 기술분야의 당업자에 의해 이해되는 바와 동일한 의미를 갖고 이는 하기 문헌과 일치한다: Singleton et al (1994) Dictionary of Microbiology and Molecular Biology, 2nd Ed., J. Wiley & Sons, New York, NY; and Janeway, C., Travers, P., Walport, M., Shlomchik (2001) Immunobiology, 5th Ed., Garland Publishing, New York.

[1548] 본 명세서 및 청구범위 전반에 걸쳐, 용어 “포함하다 (comprise, comprises, comprising)”는 문맥에서 달리 요구하는 경우를 제외하고는 비배타적인 의미로 사용된다. 본원에 기재된 실시예는 "~로 구성된" 및/또는 "본질적으로 구성되는" 구현예를 포함하는 것으로 이해된다.

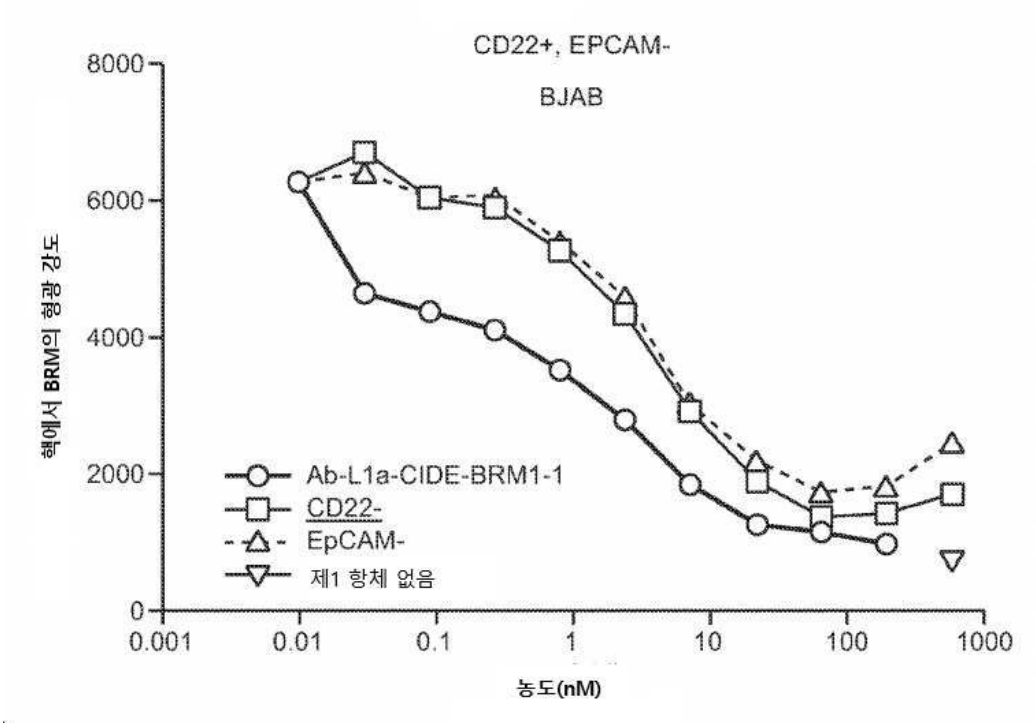
[1549] 본원에 사용된 바와 같이, 값을 지칭할 때의 용어 "약"은, 예를 들어, 명시된 양으로부터, 일부 구현예들에서 ± 50%, 일부 구현예들에서 ± 20%, 일부 구현예들에서 ± 10%, 일부 구현예들에서 ± 5%, 일부 구현예들에서 ± 1%, 일부 구현예들에서 ± 0.5%, 및 일부 구현예들에서 ± 0.1%의 변화를 수반하는 것을 의미하고, 이는 상기 변화는 개시된 방법을 실시하거나 개시된 조성물을 사용하는 데 적절하기 때문이다.

[1550] 값의 범위가 제공되는 경우, 문맥에서 달리 명시하지 않는 한 하한 단위의 10분의 1까지, 해당 범위의 상한 및 하한 사이의 각각의 중간 값 및 언급된 범위 안의 임의의 다른 언급된 또는 중간 값이 포함된다. 더 작은 범위에 독립적으로 포함될 수 있는 이러한 작은 범위의 상한 및 하한이 또한 언급된 범위에서 임의의 구체적으로 제외된 제한에 따라서 포함될 수 있다. 언급된 범위가 한계 중 하나 또는 둘 모두를 포함하는 경우에, 포함된 한계 중 하나 또는 둘 모두를 제외하는 범위도 포함된다.

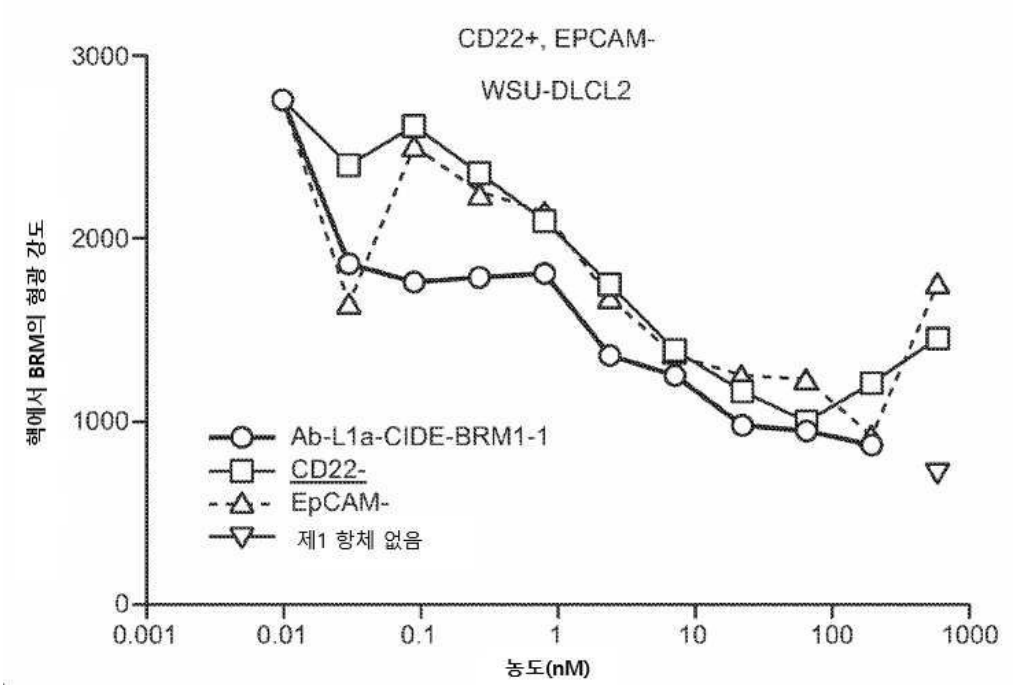
[1551] 전술한 설명 및 관련 도면에 제시된 교시의 이점을 갖는 본원에 제시된 많은 변형 및 기타 구현예들은 본원의 요지가 속하는 기술 분야의 당업자에게 자명할 것이다. 그러므로, 요지는 특정 구현예들에 제한되지 않으며 변형들 그리고 기타 구현예들은 첨부된 청구범위에 속하는 것으로 함을 이해하여야 한다. 비록 본원에 특정 용어가 사용되지만, 이들은 제한적인 목적으로 사용되는 것이 아니라 일반적이고 설명적인 의미로만 사용된다.

도면

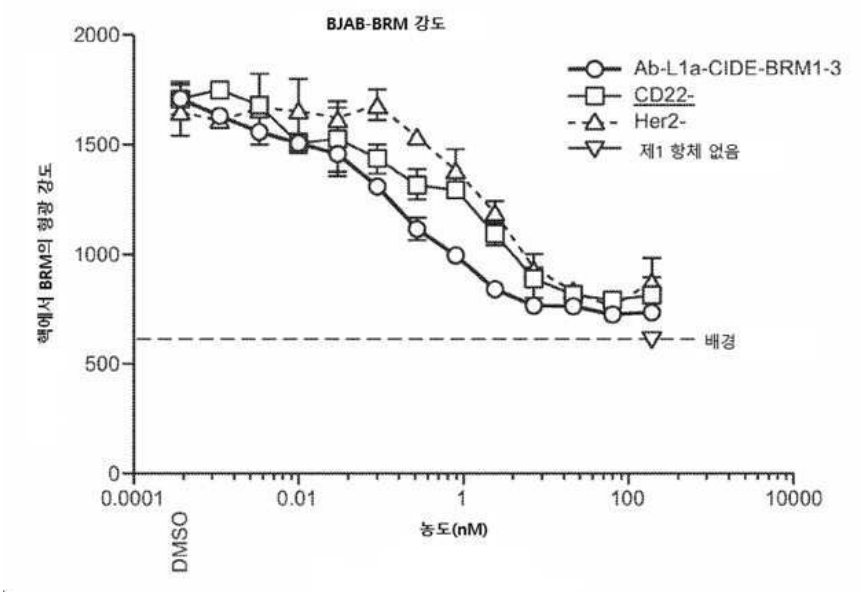
도면1a


CD22+, EPCAM-
BJAB
8000
6000
4000
2000
0
핵에서 BRM의 형광 강도
Ab-L1a-CIDE-BRM1-1
CD22-
EpCAM-
제1 항체 없음
0.001
0.01
0.1
1
10
100
1000
농도(nM)

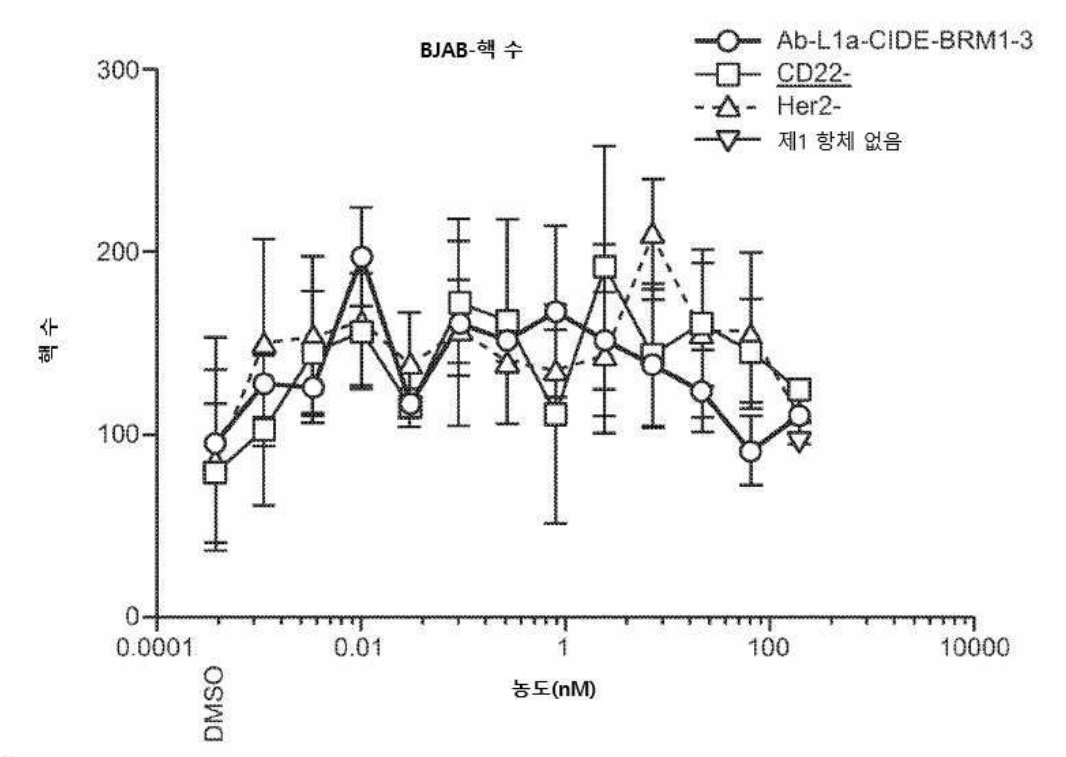
도면1b


CD22+, EPCAM-
WSU-DLCL2
3000
2000
1000
0
핵에서 BRM의 형광 강도
Ab-L1a-CIDE-BRM1-1
CD22-
EpCAM-
제1 항체 없음
0.001
0.01
0.1
1
10
100
1000
농도(nM)

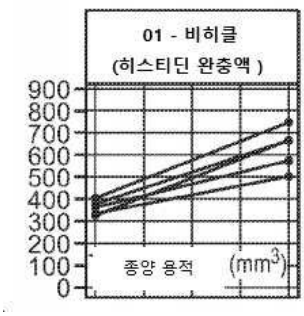
도면2a


BJAB-BRM 강도
Ab-L1a-CIDE-BRM1-3
CD22-
Her2-
제1 항체 없음
배경
핵에서 BRM의 형광 강도
2000
1500
1000
500
0
0.0001
0.01
1
100
10000
DMSO
농도(nM)

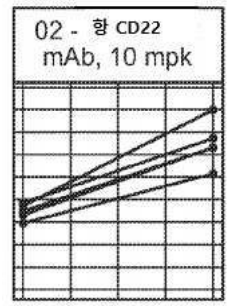
도면2b


BJAB-핵 수
Ab-L1a-CIDE-BRM1-3
CD22-
Her2-
제1 항체 없음
핵 수
300
200
100
0
0.0001
0.01
1
100
10000
DMSO
농도(nM)

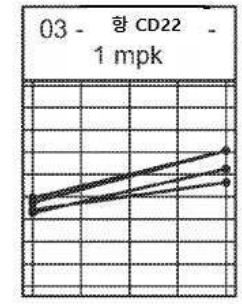
도면3a



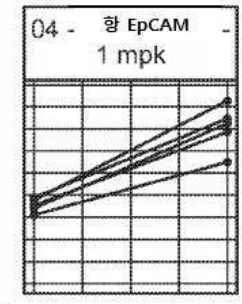
도면3b



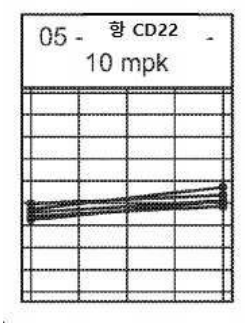
도면3c



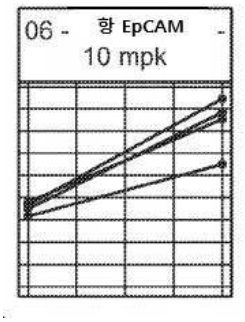
도면3d



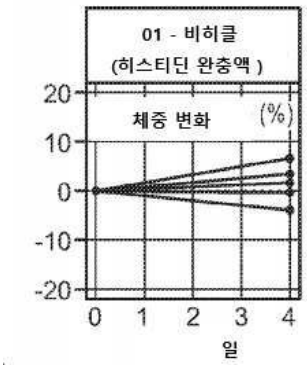
도면3e



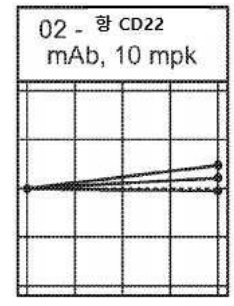
도면3f



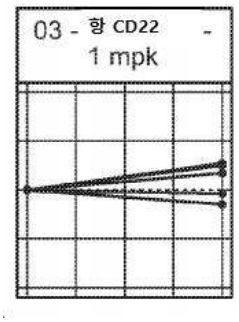
도면3g



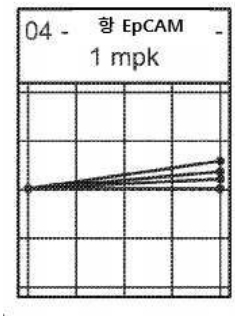
도면3h



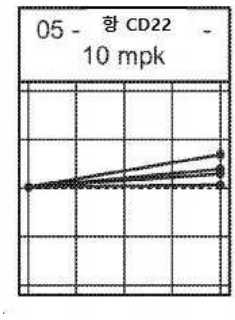
도면3i



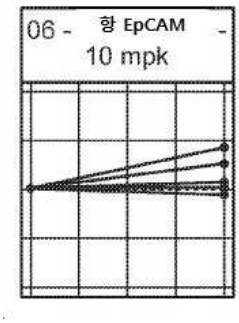
도면3j



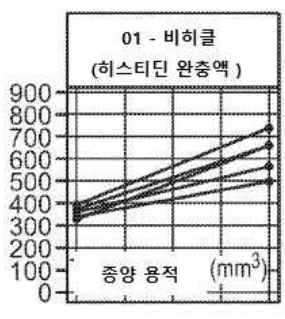
도면3k



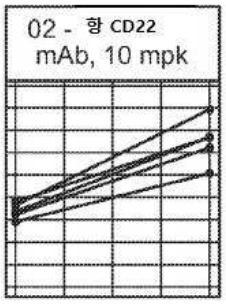
도면3l



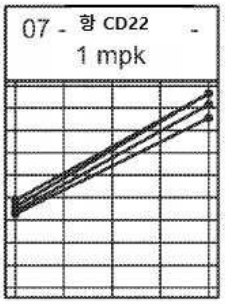
도면4a



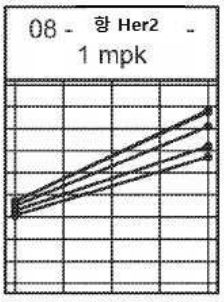
도면4b



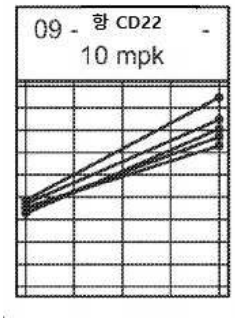
도면4c



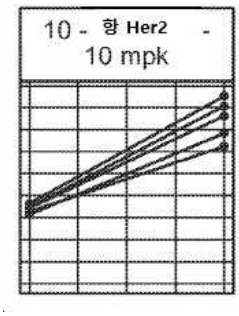
도면4d



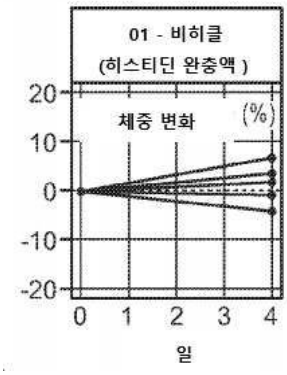
도면4e



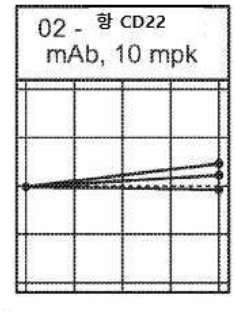
도면4f



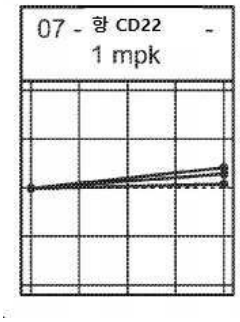
도면4g



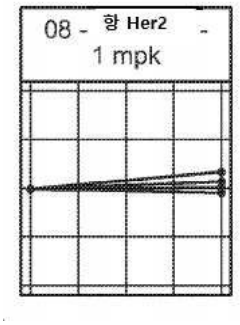
도면4h



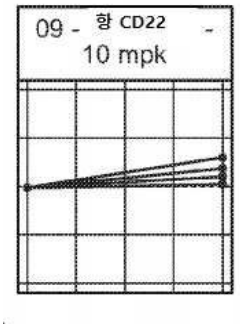
도면4i



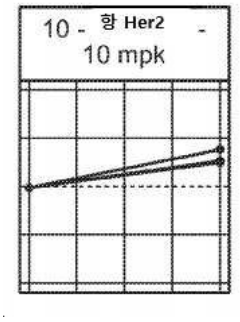
도면4j



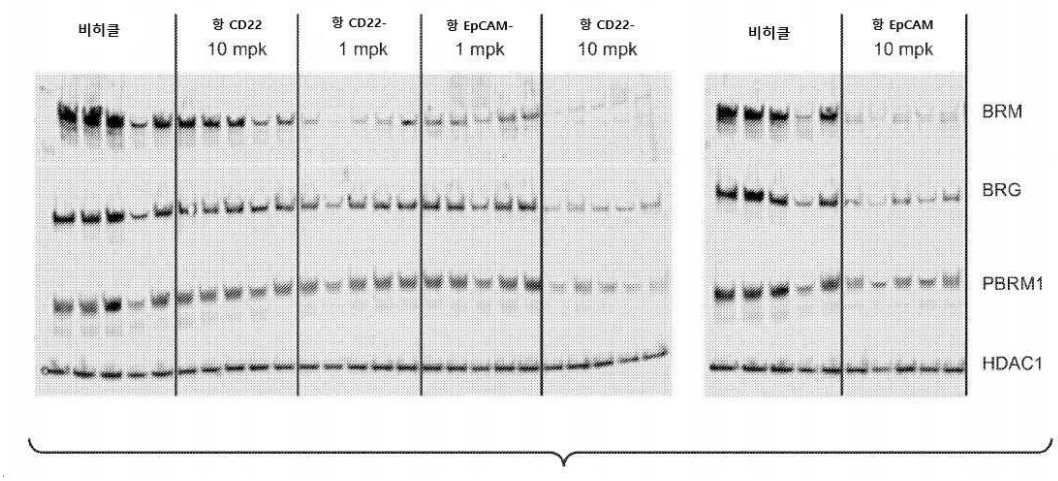
도면4k



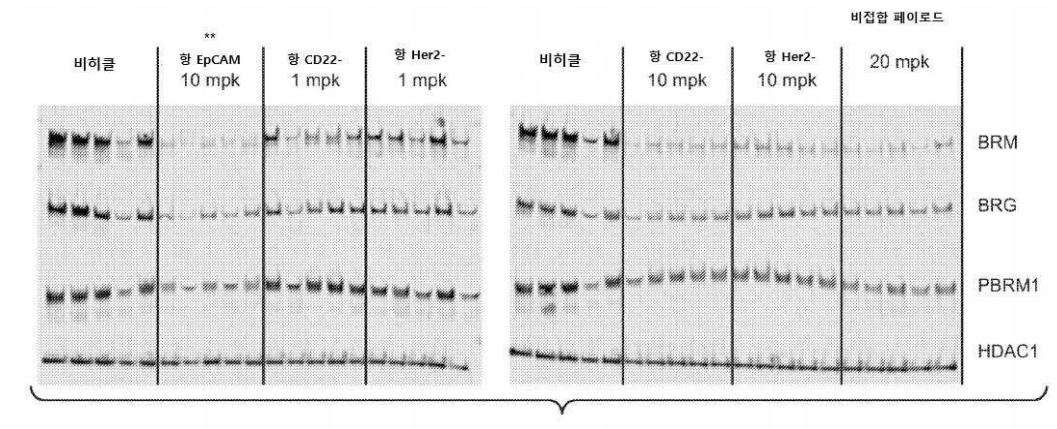
도면4l



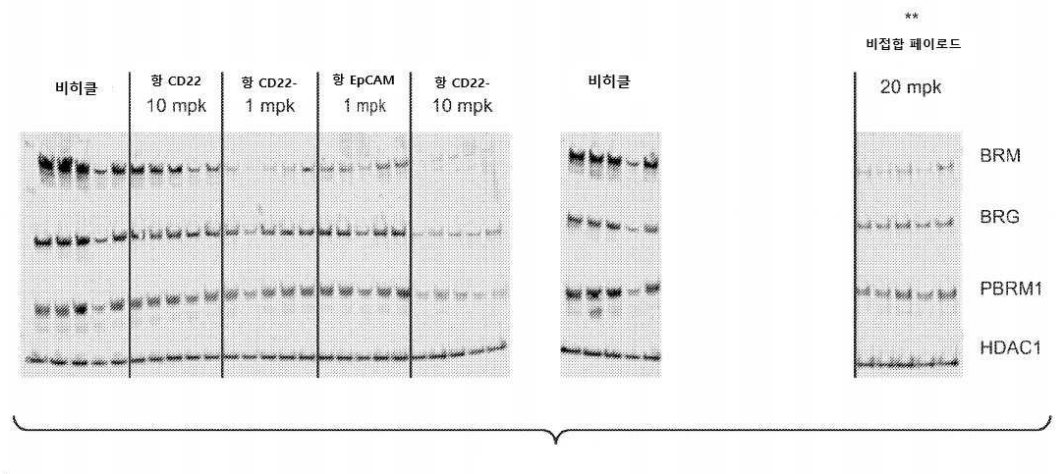
도면5


비히클
항 CD22
10 mpk
항 CD22-
1 mpk
항 EpCAM-
1 mpk
항 CD22-
10 mpk
비히클
항 EpCAM
10 mpk
BRM
BRG
PBRM1
HDAC1

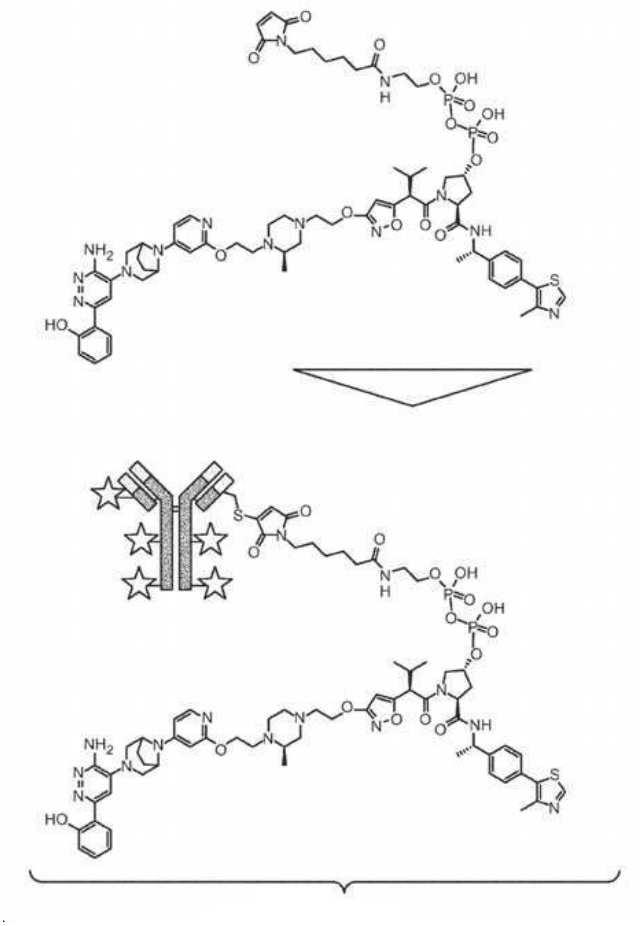
도면6


비접합 페이로드
**
비히클
항 EpCAM
10 mpk
항 CD22-
1 mpk
항 Her2-
1 mpk
비히클
항 CD22-
10 mpk
항 Her2-
10 mpk
20 mpk
BRM
BRG
PBRM1
HDAC1

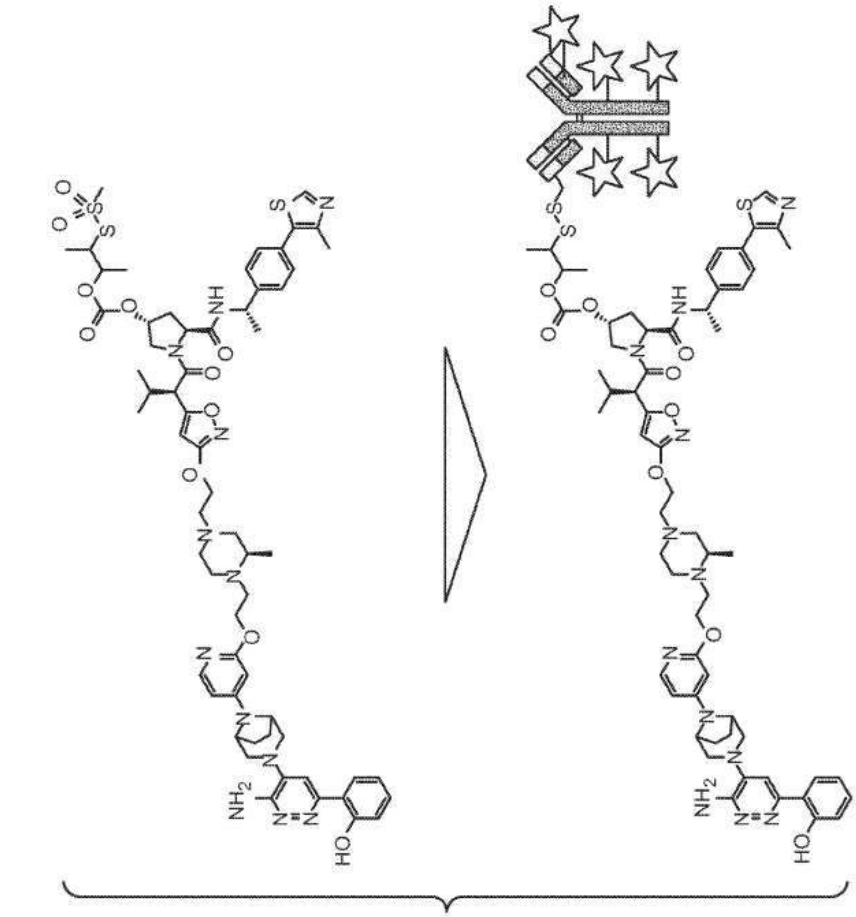
도면7


**
비접합 페이로드
비히클
항 CD22
10 mpk
항 CD22-
1 mpk
항 EpCAM
1 mpk
항 CD22-
10 mpk
비히클
20 mpk
BRM
BRG
PBRM1
HDAC1

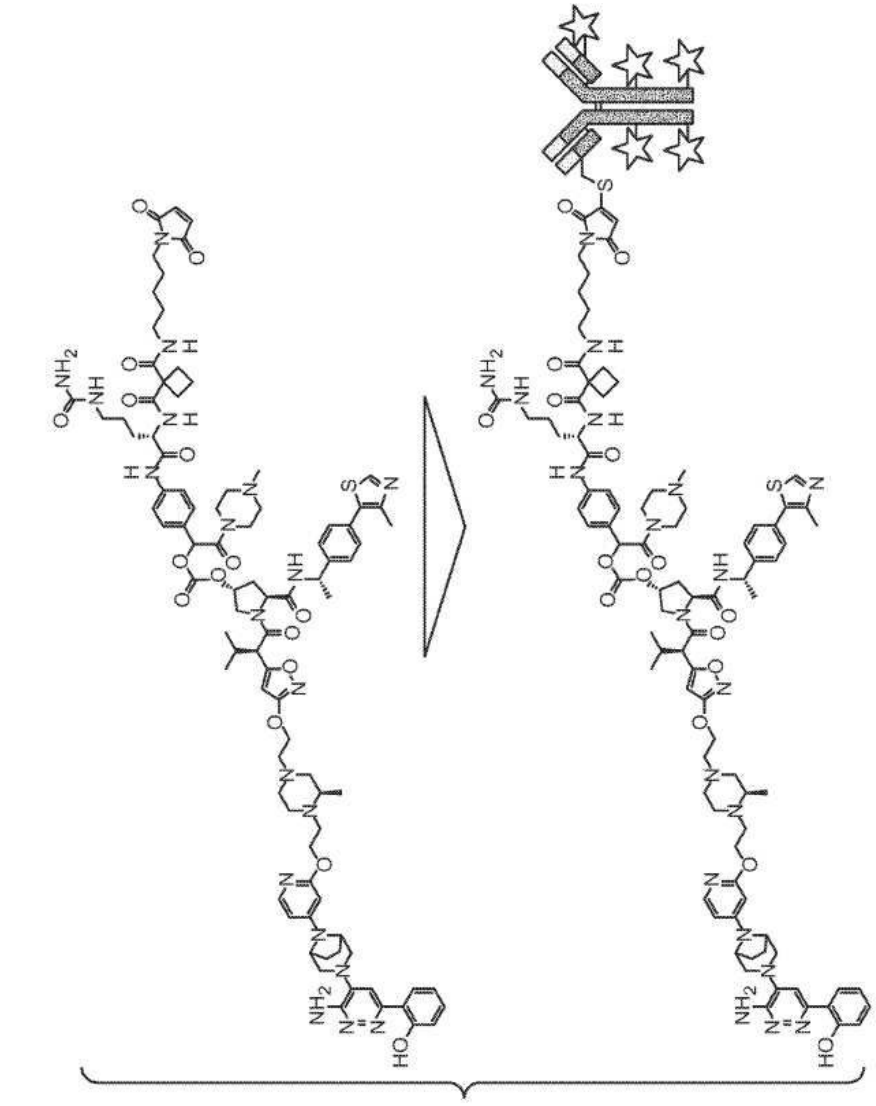
도면8



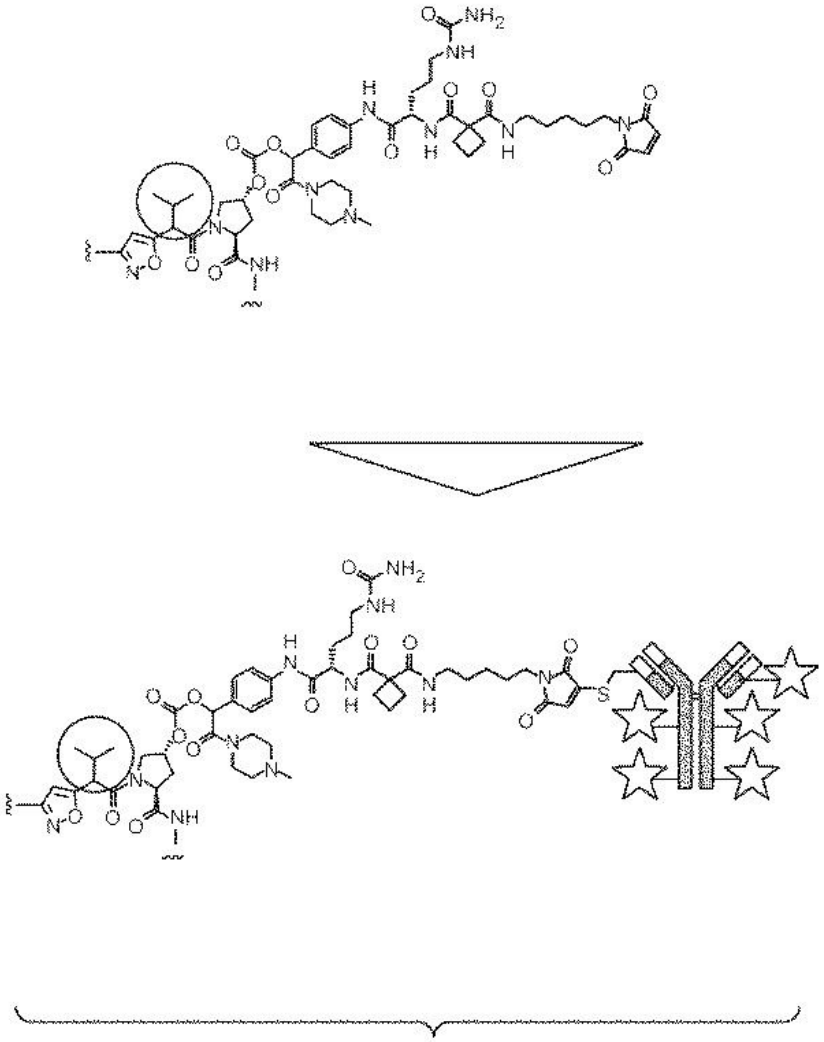
도면9



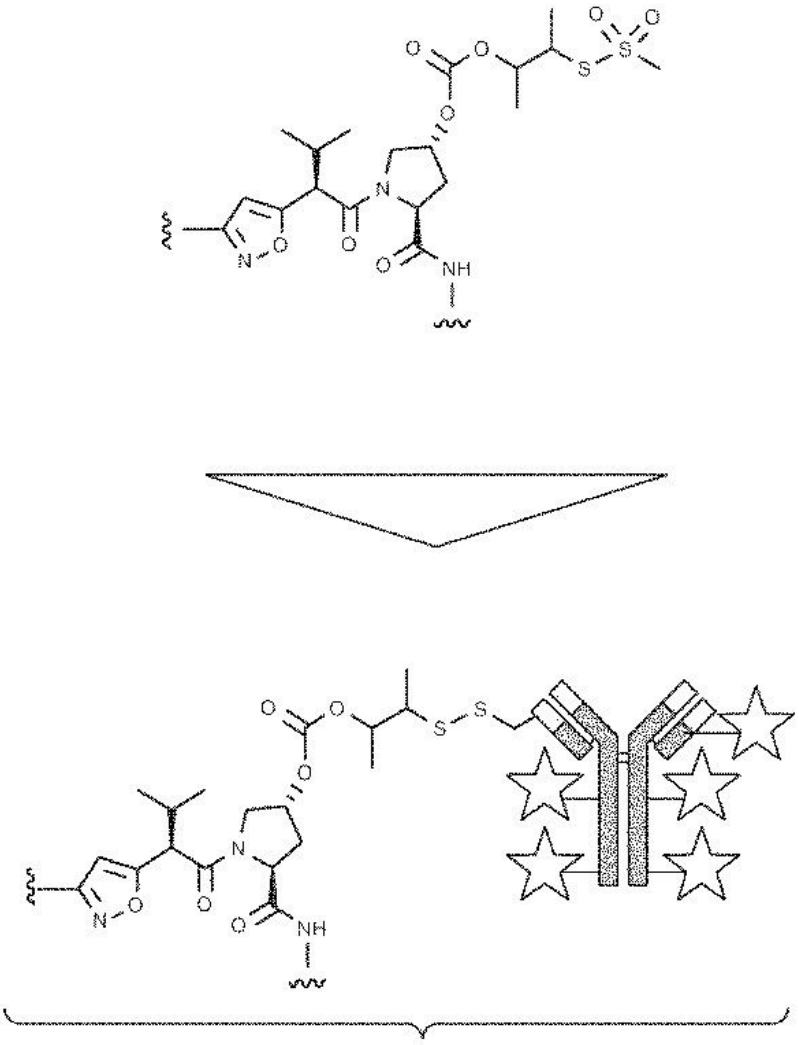
도면10



도면11



도면12



서 열 목 록

SEQUENCE LISTING

<110> Genentech, Inc.

<120> ANTIBODY-CONJUGATED CHEMICAL INDUCERS OF DEGRADATION OF BRM AND METHODS THEREOF

<130> P36010-WO

<140><141><150> 63/054,757

<151> 07-21-2020

<160> 36

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 11

<212> PRT

<213> homo sapiens

<400> 1

Ser Ala Ser Gln Gly Ile Ser Asn Tyr Leu Asn

1 5 10

<210> 2

<211> 7

<212> PRT

<213> homo sapiens

<400> 2

Tyr Thr Ser Asn Leu His Ser

1 5

<210> 3

<211> 9

<212> PRT

<213> homo sapiens

<400> 3

Gln Gln Tyr Ser Glu Leu Pro Trp Thr

1 5

<210> 4

<211> 10

<212> PRT

<213> homo sapiens

<400> 4

Gly Phe Ser Leu Thr Gly Tyr Ser Val Asn

1 5 10

<210> 5

<211> 16

<212> PRT

<213> homo sapiens

<400> 5

Met Ile Trp Gly Asp Gly Ser Thr Asp Tyr Asn Ser Ala Leu Lys Ser

1 5 10 15

<210> 6

<

211> 12

<212> PRT

<213> homo sapiens

<400> 6

Asp Tyr Tyr Val Asn Tyr Ala Ser Trp Phe Ala Tyr

1 5 10

<210> 7

<211> 107

<212> PRT

<213> homo sapiens

<400> 7

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

1 5 10 15

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

20 25 30

Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Thr Val Lys Leu Leu Ile

35 40 45

Tyr Tyr Thr Ser Asn Leu His Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly

50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro

65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Ser Glu Leu Pro Trp

85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys

100 105

<210> 8

<211> 120

<212> PRT

<213> homo sapiens

<400> 8

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

1 5 10 15

Thr Leu Thr Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Phe Ser Leu Thr Gly Tyr

20 25 30

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

35 40 45

Gly Met Ile Trp Gly Asp Gly Ser Thr Asp Tyr Asn Ser Ala Leu Lys

50 55 60

Ser Arg Leu Thr Ile Ser Lys Asp Thr Ser Lys Asn Gln Val Val Leu

65 70 75 80

Thr Met Thr Asn Met Asp Pro Val Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr Cys Ala

85 90 95

Arg Asp Tyr Tyr Phe Asn Tyr Ala Ser Trp Phe Ala Tyr Trp Gly Gln

100 105 110

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser

115 120

<210> 9

<211> 214

<212> PRT

<213> homo sapiens

<400> 9

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

1 5 10 15

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

20 25 30

Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Thr Val Lys Leu Leu Ile

35 40 45

Tyr Tyr Thr Ser Asn Leu His Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly

50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro

65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Ser Glu Leu Pro Trp

85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala

100 105 110

Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly

115 120 125

Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala

130 135 140

Lys Val Gln Trp Cys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln

145 150 155 160

Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser

165 170 175

Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr

180 185 190

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

195 200 205

Phe Asn Arg Gly Glu Cys

210

<210> 10

<211> 450

<212> PRT

<213> homo sapiens

<400> 10

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

1 5 10 15

Thr Leu Thr Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Phe Ser Leu Thr Gly Tyr

20 25 30

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

35 40 45

Gly Met Ile Trp Gly Asp Gly Ser Thr Asp Tyr Asn Ser Ala Leu Lys

50 55 60

Ser Arg Leu Thr Ile Ser Lys Asp Thr Ser Lys Asn Gln Val Val Leu

65 70 75 80

Thr Met Thr Asn Met Asp Pro Val Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr Cys Ala

85 90 95

Arg Asp Tyr Tyr Phe Asn Tyr Ala Ser Trp Phe Ala Tyr Trp Gly Gln
100 105 110
Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val
115 120 125
Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala
130 135 140
Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser

145 150 155 160
Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val
165 170 175
Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro
180 185 190
Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys
195 200 205
Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp

210 215 220
Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly
225 230 235 240
Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile
245 250 255
Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu
260 265 270
Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His

275 280 285
Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg
290 295 300
Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys
305 310 315 320
Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu
325 330 335
Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr

340 345 350

Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu

355 360 365

Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp

370 375 380

Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val

385 390 395 400

Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp

405 410 415

Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His

420 425 430

Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro

435 440 445

Gly Lys

450

<210> 11

<211> 10

<212> PRT

<213> homo sapiens

<400> 11

Gly Phe Ser Phe Ser Asp Phe Ala Met Ser

1 5 10

<210

> 12

<211> 18

<212> PRT

<213> homo sapiens

<400> 12

Ala Thr Ile Gly Arg Val Ala Phe His Thr Tyr Tyr Pro Asp Ser Met

1 5 10 15

Lys Gly

<210> 13

<211> 13

<212> PRT

<213> homo sapiens

<400> 13

Ala Arg His Arg Gly Phe Asp Val Gly His Phe Asp Phe

1 5 10

<210> 14

<211> 16

<212> PRT

<213> homo sapiens

<400> 14

Arg Ser Ser Glu Thr Leu Val His Ser Ser Gly Asn Thr Tyr Leu Glu

1 5 10 15

<210> 15

<211> 7

<212> PRT

<213> homo sapiens

<400> 15

Arg Val Ser Asn Arg Phe Ser

1 5

<210> 16

<211> 9

<212> PRT

<213> homo sapiens

<400> 16

Phe Gln Gly Ser Phe Asn Pro Leu Thr

1 5

<210> 17

<211> 120

<212> PRT

<213> homo sapiens

<400> 17

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

1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Ser Phe Ser Asp Phe
20 25 30
Ala Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45
Ala Thr Ile Gly Arg Val Ala Phe His Thr Tyr Tyr Pro Asp Ser Met
50 55 60
Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95
Ala Arg His Arg Gly Phe Asp Val Gly His Phe Asp Phe Trp Gly Gln
100 105 110
Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 18
<211> 113
<212> PRT
<213> homo sapiens
<400> 18

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ser Ser Glu Thr Leu Val His Ser
20 25 30
Ser Gly Asn Thr Tyr Leu Glu Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala
35 40 45
Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Arg Val Ser Asn Arg Phe Ser Gly Val Pro
50 55 60
Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile
65 70 75 80

Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Phe Gln Gly
85 90 95
Ser Phe Asn Pro Leu Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys

100 105 110

Arg

<210> 19

<211> 16

<212> PRT

<213> homo sapiens

<400> 19

Arg Ser Ser Gln Ser Ile Val His Ser Val Gly Asn Thr Phe Leu Glu

1 5 10 15

<210> 20

<211> 7

<212> PRT

<213> homo sapiens

<400> 20

Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser

1 5

<210> 21

<211> 9

<212> PRT

<213> homo sapiens

<400> 21

Phe Gln Gly Ser Gln Phe Pro Tyr Thr

1 5

<210> 22

<211> 10

<212> PRT

<213> homo sapiens

<400> 22

Gly Tyr Glu Phe Ser Arg Ser Trp Met Asn

1 5 10

<210> 23

<211> 17

<212> PRT

<213> homo sapiens

<400> 23

Arg Ile Tyr Pro Gly Asp Gly Asp Thr Asn Tyr Ser Gly Lys Phe Lys

1 5 10 15

Gly

<210> 24

<211> 11

<212> PRT

<213> homo sapiens

<400> 24

Asp Gly Ser Ser Trp Asp Trp Tyr Phe Asp Val

1 5 10

<210> 25

<211> 113

<212> PRT

<213> homo sapiens

<400> 25

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

1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ser Ser Gln Ser Ile Val His Ser

20 25 30

Val Gly Asn Thr Phe Leu Glu Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala

35 40 45

Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser Gly Val Pro

50 55 60

Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile

65 70 75 80

Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Phe Gln Gly

85 90 95

Ser Gln Phe Pro Tyr Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys

100 105 110

Arg

<210> 26

<211> 120

<212> PRT

<213> homo sapiens

<400> 26

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Tyr Glu Phe Ser Arg Ser
20 25 30

Trp Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45

Gly Arg Ile Tyr Pro Gly Asp Gly Asp Thr Asn Tyr Ser Gly Lys Phe
50 55 60

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

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

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

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 27

<211> 219

<212> PRT

<213> homo sapiens

<400> 27

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ser Ser Gln Ser Ile Val His Ser
20 25 30

Val Gly Asn Thr Phe Leu Glu Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala
35 40 45
Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser Gly Val Pro
50 55 60
Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile
65 70 75 80
Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Phe Gln Gly
85 90 95

Ser Gln Phe Pro Tyr Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100 105 110
Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu
115 120 125
Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe
130 135 140
Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Cys Val Asp Asn Ala Leu Gln
145 150 155 160

Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser
165 170 175
Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu
180 185 190
Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser
195 200 205
Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
210 215
<210> 28
<211> 450

<212> PRT
<213> homo sapiens
<400> 28
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Tyr Glu Phe Ser Arg Ser

20 25 30

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

35 40 45

Gly Arg Ile Tyr Pro Gly Asp Gly Asp Thr Asn Tyr Ser Gly Lys Phe

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

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

100 105 110

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val

115 120 125

Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala

130 135 140

Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser

145 150 155 160

Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val

165 170 175

Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro

180 185 190

Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys

195 200 205

Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp

210 215 220

Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly

225 230 235 240

Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile

245 250 255

Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu

260 265 270

Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His
275 280 285

Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg
290 295 300

Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys
305 310 315 320

Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu
325 330 335

Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr
340 345 350

Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu
355 360 365

Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp
370 375 380

Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val
385 390 395 400

Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp
405 410 415

Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His
420 425 430

Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro
435 440 445

Gly Lys
450

<210> 29

<211> 445

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> anti-huTfR1.hIgG1.LC.K149C.HC.L174C.Y373C.NG2LH heavy chain

<400> 29

Glu Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
1 5 10 15

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr
20 25 30
Trp Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Arg Leu Glu Trp Ile
35 40 45

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

Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala
115 120 125
Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu
130 135 140
Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly
145 150 155 160
Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Cys Gln Ser Ser
165 170 175

Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu
180 185 190
Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr
195 200 205
Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr
210 215 220
Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Pro Val Ala Gly Pro Ser Val Phe Leu
225 230 235 240

Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu
245 250 255
Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys

260 265 270

Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys

275 280 285

Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Gly Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu

290 295 300

Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys

305 310 315 320

Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys

325 330 335

Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser

340 345 350

Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys

355 360 365

Gly Phe Cys Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln

370 375 380

Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly

385 390 395 400

Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln

405 410 415

Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn

420 425 430

His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys

435 440 445

<210> 30

<211> 214

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> anti-huTfR1.hIgG1.LC.K149C.HC.L174C.Y373C.NG2LH light chain

<400> 30

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

1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Asp Asn Leu Tyr Ser Asn

20 25 30

Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ser Pro Lys Leu Leu Val
35 40 45
Tyr Asp Ala Thr Asn Leu Ala Asp Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60
Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80
Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln His Phe Trp Gly Thr Pro Leu
85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala
100 105 110
Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly
115 120 125
Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala
130 135 140
Lys Val Gln Trp Cys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln
145 150 155 160

Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser
165 170 175
Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr
180 185 190
Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser
195 200 205
Phe Asn Arg Gly Glu Cys
210

<210> 31
<211> 445
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220><223> anti-huTfR2.hIgG1.LC.K149C.HC.L174C.Y373C.NG2LH heavy chain
<400> 31

Glu Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
1 5 10 15
Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr
20 25 30
Trp Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Arg Leu Glu Trp Ile
35 40 45
Gly Glu Ile Asn Pro Thr Asn Gly Arg Thr Asn Tyr Ile Glu Lys Phe
50 55 60
Lys Ser Arg Ala Thr Leu Thr Val Asp Lys Ser Ala Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80
Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95
Ala Arg Gly Thr Arg Ala Tyr His Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Met Val
100 105 110
Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala
115 120 125
Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu
130 135 140
Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly
145 150 155 160
Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Cys Gln Ser Ser
165 170 175
Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu
180 185 190
Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr
195 200 205
Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr
210 215 220
Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Pro Val Ala Gly Pro Ser Val Phe Leu
225 230 235 240
Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu

245 250 255

Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys

260 265 270

Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys

275 280 285

Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Gly Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu

290 295 300

Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys

305 310 315 320

Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys

325 330 335

Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser

340 345 350

Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys

355 360 365

Gly Phe Cys Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln

370 375 380

Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly

385 390 395 400

Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln

405 410 415

Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn

420 425 430

His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys

435 440 445

<210> 32

<211> 214

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> anti-huTfR2.hIgG1.LC.K149C.HC.L174C.Y373C.NG2LH light chain

<400> 32

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

1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Asp Asn Leu Tyr Ser Asn

20 25 30

Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ser Pro Lys Leu Leu Val

35 40 45

Tyr Asp Ala Thr Asn Leu Ala Asp Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly

50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro

65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln His Phe Ala Gly Thr Pro Leu

85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala

100 105 110

Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly

115 120 125

Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala

130 135 140

Lys Val Gln Trp Cys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln

145 150 155 160

Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser

165 170 175

Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr

180 185 190

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

195 200 205

Phe Asn Arg Gly Glu Cys

210

<210> 33

<211> 445

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> anti-huTfR1.hIgG1.LC.K149C.NG2LH heavy chain

<

400> 33

Glu Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
1 5 10 15

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr
20 25 30

Trp Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Arg Leu Glu Trp Ile
35 40 45

Gly Glu Ile Asn Pro Thr Asn Gly Arg Thr Asn Tyr Ile Glu Lys Phe
50 55 60

Lys Ser Arg Ala Thr Leu Thr Val Asp Lys Ser Ala Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

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

Ala Arg Gly Thr Arg Ala Tyr His Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Met Val
100 105 110

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

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

Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly
145 150 155 160

Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser
165 170 175

Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu
180 185 190

Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr
195 200 205

Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr
210 215 220

Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Pro Val Ala Gly Pro Ser Val Phe Leu
225 230 235 240

Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu
245 250 255

Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys
260 265 270
Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys
275 280 285
Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Gly Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu
290 295 300
Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys
305 310 315 320

Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys
325 330 335
Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser
340 345 350
Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys
355 360 365
Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln
370 375 380

Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly
385 390 395 400
Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln
405 410 415
Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn
420 425 430
His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
435 440 445

<210> 34

<211> 214
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220><223> anti-huTfR1.hIgG1.LC.K149C.NG2LH light chain

<400> 34

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Asp Asn Leu Tyr Ser Asn
20 25 30

Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ser Pro Lys Leu Leu Val
35 40 45

Tyr Asp Ala Thr Asn Leu Ala Asp Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln His Phe Trp Gly Thr Pro Leu
85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala
100 105 110

Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly
115 120 125

Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala
130 135 140

Lys Val Gln Trp Cys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln
145 150 155 160

Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser
165 170 175

Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr
180 185 190

Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser
195 200 205

Phe Asn Arg Gly Glu Cys
210

<210> 35

<211> 445

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> anti-huTfR2.hIgG1.LC.K149C.NG2LH heavy chain

<400> 35

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

1 5 10 15

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr

20 25 30

Trp Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Arg Leu Glu Trp Ile

35 40 45

Gly Glu Ile Asn Pro Thr Asn Gly Arg Thr Asn Tyr Ile Glu Lys Phe

50 55 60

Lys Ser Arg Ala Thr Leu Thr Val Asp Lys Ser Ala Ser Thr Ala Tyr

65 70 75 80

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

85 90 95

Ala Arg Gly Thr Arg Ala Tyr His Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Met Val

100 105 110

Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala

115 120 125

Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu

130 135 140

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

145 150 155 160

Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser

165 170 175

Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu

180 185 190

Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr

195 200 205

Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr

210 215 220

Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Pro Val Ala Gly Pro Ser Val Phe Leu
225 230 235 240
Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu
245 250 255
Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys

260 265 270
Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys
275 280 285
Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Gly Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu
290 295 300
Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys
305 310 315 320
Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys

325 330 335
Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser
340 345 350
Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys
355 360 365
Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln
370 375 380
Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly

385 390 395 400
Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln
405 410 415
Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn
420 425 430
His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
435 440 445

<210> 36
<211> 214
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220><

223> anti-huTfR2.hIgG1.LC.K149C.NG2LH light chain

<400> 36

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Asp Asn Leu Tyr Ser Asn
20 25 30

Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ser Pro Lys Leu Leu Val
35 40 45

Tyr Asp Ala Thr Asn Leu Ala Asp Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly

50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln His Phe Ala Gly Thr Pro Leu
85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala
100 105 110

Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly

115 120 125

Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala
130 135 140

Lys Val Gln Trp Cys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln
145 150 155 160

Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser
165 170 175

Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr

180 185 190

Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser
195 200 205

Phe Asn Arg Gly Glu Cys
210