(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2022-0010481
(43) 공개일자 2022년01월25일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C07D 487/04 (2006.01) *A61K 31/5517* (2006.01)
A61K 47/68 (2017.01) *A61P 35/00* (2006.01)
(52) CPC특허분류
C07D 487/04 (2013.01)
A61K 31/5517 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2021-7035134
(22) 출원일자(국제) 2020년03월27일
심사청구일자 없음
(85) 번역문제출일자 2021년10월28일
(86) 국제출원번호 PCT/US2020/025341
(87) 국제공개번호 WO 2020/205564
국제공개일자 2020년10월08일
(30) 우선권주장
62/825,954 2019년03월29일 미국(US)

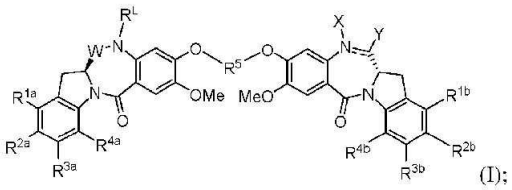
(71) 출원인
이뮤노젠 아이엔씨
미국 02451-1477 메사추세츠주 월섬 윈터 스트리트 830
(72) 발명자
샤리, 라비, 브이.제이.
미국 02461 매사추세츠주 뉴톤 윈체스터 스트리트 174
밀러, 마이클, 루이
미국 01701 매사추세츠주 프레이밍햄 메이몬트 드라이브 4
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
양영준, 이상남

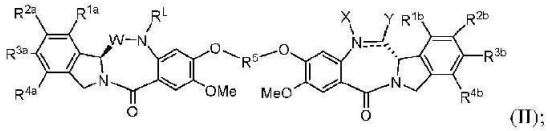
전체 청구항 수 : 총 66 항

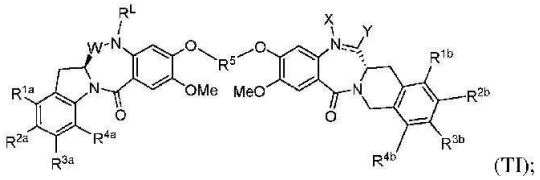
(54) 발명의 명칭 **비정상 세포 성장의 억제 또는 증식성 질환의 치료를 위한 세포독성 비스-벤조디아제핀 유도체 및 세포결합제와 이의 접합체**

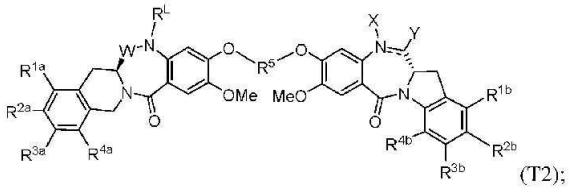
(57) 요 약

본 발명은 항증식 활성을 갖는 신규한 벤조디아제핀 유도체, 보다 구체적으로 화학식 (I), (II), (T1) 또는 (T2)의 신규한 벤조디아제핀 화합물에 관한 것이다. 본 발명은 또한 세포결합제에 연결된 벤조디아제핀 화합물의 접합체를 제공한다. 본 발명은 또한 본 발명의 화합물 또는 접합체를 사용하여 포유동물에서 비정상 세포 성장 억제 또는 증식성 장애 치료에 유용한 조성물 및 방법을 제공한다.


(I);


(II);


(TI);


(T2);

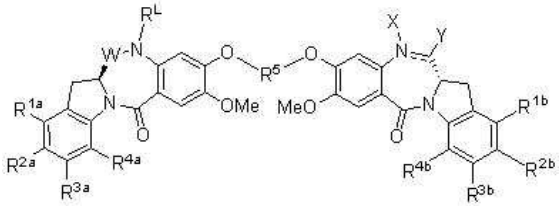
(52) CPC특허분류
A61K 47/6803 (2017.08)
A61K 47/6889 (2017.08)
A61P 35/00 (2018.01)
(72) 발명자
시즈카, 마나미
미국 02478 매사추세츠주 벨몬트 페이슨 로드 253
아처, 케이티, 엘리자베스
미국 02118 매사추세츠주 보스턴 아파트먼트 1 유니온 파크 스트리트 14
레이드, 에밀리, 엘리자베스
미국 02067 매사추세츠주 샤론 낸시 서클 5

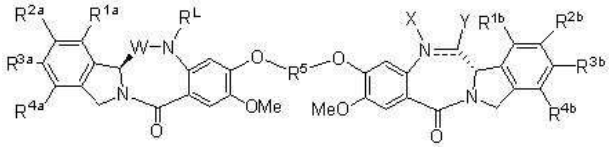
명 세 서

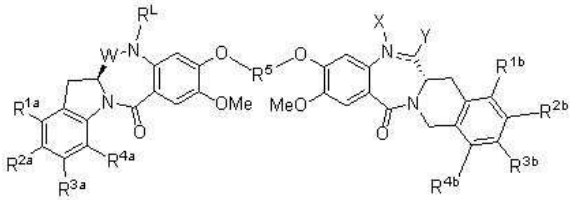
청구범위

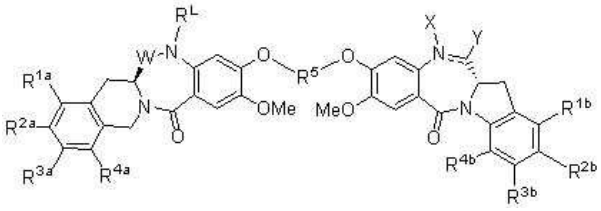
청구항 1

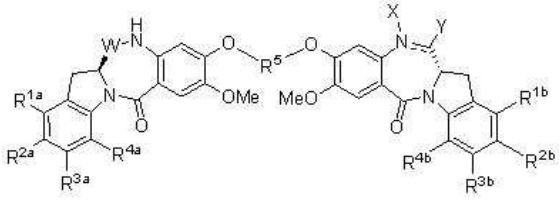
다음 화학식에 의해 표시되는 세포독성 화합물:

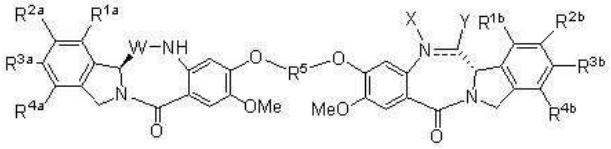

(I);

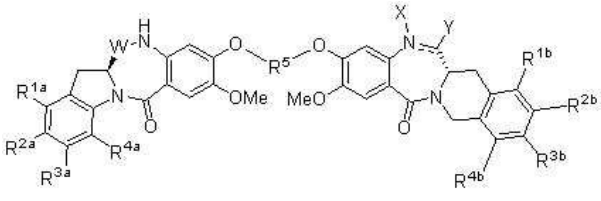

(II);

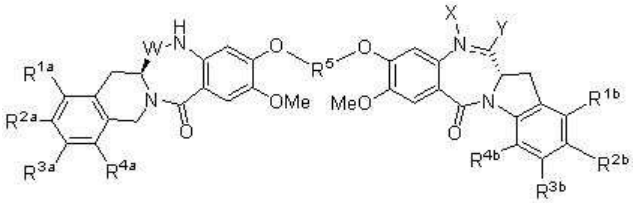

(TI);


(T2);


(I^{m});


(II^{m});


(TI^{m}); 또는



(T2^{m});

또는 이의 약제학적으로 허용되는 염, 여기서:

N과 C 사이의 이중선 ⋯ 은 단일 결합 또는 이중 결합을 나타내고, 이중 결합인 경우 X는 부재하고 Y는 H, 또는 C_{1-4}알킬이고, 단일 결합인 경우, X는 H이고 Y는 -OH 또는 $-SO_3H$이고;

W는 -C(=O)- 또는 -C(Y')-이고;

Y'은 H 또는 C_{1-4}알킬이고;

R^{1a}, R^{2a}, R^{3a}, R^{4a}, R^{1b}, R^{2b}, R^{3b} 및 R^{4b}는 H, C_{1-10}알킬, $-(OCH_2CH_2)_nOR^c$, 할로겐, $-NH(C=NH)NH_2$, -OR, -NR'R'', $-NO_2$, -NR'COR'', -SR, -SOR', $-SO_2R'$, $-SO_3H$, $-OSO_3H$, $-SO_2NR'R''$, -CN, $-N_3$, -COR', -OCOR', 및 -OCONR'R''로 이루어진 군으로부터 각각 독립적으로 선택되고;

R^c는 H 또는 C_{1-4}알킬이고;

n은 1 내지 24의 정수이고;

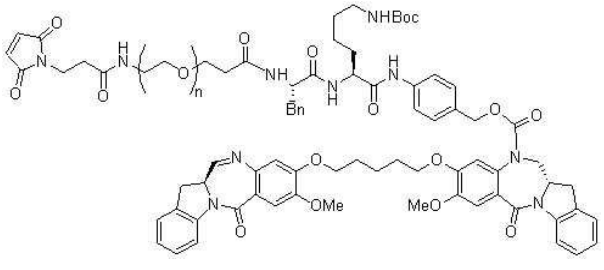
R은, 각각의 경우에, H, $-(CH_2CH_2O)_n-R^c$, C_{1-10}알킬, C_{3-8}사이클로알킬, 6- 내지 18-원 아릴, N, O 및 S로부터 독립적으로 선택된 하나 이상의 헤테로원자를 포함하는 5- 내지 18-원 헤테로아릴 고리, 또는 O, S, N 및 P로부터 독립적으로 선택된 1 내지 6 헤테로원자를 포함하는 3- 내지 18-원 헤테로사이클릭 고리로 이루어진 군으로부터 독립적으로 선택되고;

R' 및 R''은 -H, -OH, -OR, -NHR, $-NR_2$, -COR, C_{1-10}알킬, $-(CH_2CH_2O)_n-R^c$, 및 O, S, N 및 P로부터 독립적으로 선택된 1 내지 6 헤테로원자를 갖는 3- 내지 18-원 헤테로사이클릭 고리로부터 각각 독립적으로 선택되고;

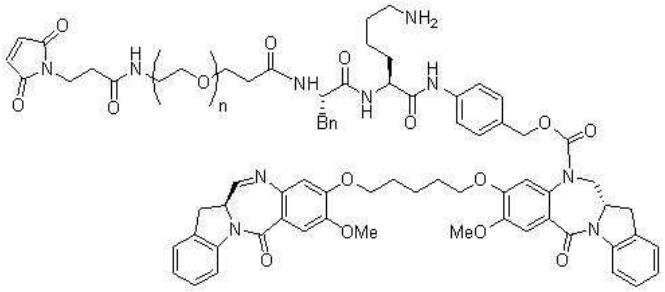
R^5는 C_{3-12}알킬렌이고, 이 사슬은 -O-, -S-, -NH-, -NMe-, 벤젠 고리, 4 내지 7-원 헤테로아릴 고리 및 4 내지 7-원 헤테로사이클릭 고리로부터 선택된 하나 이상의 기에 의해 단절될 수 있고, 여기서 벤젠, 4 내지 7-원 헤테로아릴 고리 및 4 내지 7-원 헤테로사이클릭 고리는 1 내지 4 R^6으로 치환되고;

R^6은 각각의 경우에 H, C_{1-10}알킬, $-(CH_2CH_2O)_n-R^c$, 할로겐, $-NH(C=NH)NH_2$, -OR, -NR'R'', $-NO_2$, -NCO, -NR'COR'', -SR, -SOR', $-SO_2R'$, $-SO_3H$, $-OSO_3H$, $-SO_2NR'R''$, -CN, $-N_3$, -COR', -OCOR', 및 -OCONR'R''로부터 독립적으로 선택되고;

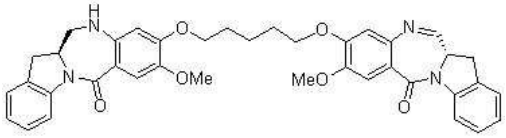
R^L은 세포결합제와 공유 결합을 형성할 수 있는 반응성 기를 포함하는 자가 희생 링커이고, 단 화학식 (I)의 화합물은:



; 또는


이 아니고;

단 화학식 (I^m)의 화합물은:


이 아니다.

청구항 2

제1항에 있어서, 세포독성 화합물은 표 A에 기재된 화학식 중 하나, 또는 이의 약제학적으로 허용되는 염에 의해 표시되는 화합물, 여기서:

AA^1 및 AA^2는 각각 독립적으로 아미노산 잔기이고;

a1은 1 내지 19의 정수이고;

a2는 1 내지 5의 정수이고;

R^a는 H 또는 C_{1-4}알킬이고;

q는 1, 2 또는 3이고;

R^{s1} 및 R^{s2}는 각각 독립적으로 H 또는 C_{1-4}알킬이고, 또는 R^{s1} 및 R^{s2}는 이들이 부착된 탄소 원자와 함께 3 내지 5-원 사이클로알킬 고리를 형성하고, 단 q가 1일 때, R^{s1} 및 R^{s2}는 이들이 부착된 탄소 원자와 함께 3-원 사이클로알킬 고리를 형성할 수 없고;

V는 C(=O) 또는 CH_2

Z^1은 -C(=O)- 또는 $-SO_2$-NH-C(=O)-이고, 여기서 $-SO_2$-NH-C(=O)-에서 $-SO_2$- 기는 P^1에 연결되고;

R^x는 부재, C_{1-10}알킬렌, C_{3-8}사이클로알킬, $-(CH_2CH_2O)_{m1}-C_{1-10}$알킬렌- 또는 C_{1-10}알킬렌-$(OCH_2CH_2)_{m2}$-이고;

m1 및 m2는 각각 독립적으로 1 내지 24의 정수이고;

Z^2는 부재, -C(=O)NH- 또는 -NH-C(=O)-이고;

R^y는 부재, C_{1-10}알킬렌, $-(CH_2CH_2O)_{m3}-C_{1-10}$알킬렌- 또는 C_{1-10}알킬렌-$(OCH_2CH_2)_{m4}$-이고;

m3 및 m4는 각각 독립적으로 1 내지 24의 정수이고;

Z^s는 디설파이드 결합 또는 티오에테르 결합을 통해 세포독성 화합물에 공유적으로 연결된 반응성 기를 보유하는 이작용성 가교제이고;

J는 세포결합제와 공유 결합을 형성할 수 있는 반응성 기(바람직하게는, 아민 반응성 기 또는 티올 반응성 기)를 포함하는 모이어티이다.

청구항 3

제1항 또는 제2항에 있어서, R^{1a}, R^{2a}, R^{3a}, R^{4a}, R^{1b}, R^{2b}, R^{3b} 및 R^{4b}는 모두 H인 화합물.

청구항 4

제1항 내지 제3항 중 어느 한 항에 있어서, R^5는 C_{3-7}알킬렌인 화합물.

청구항 5

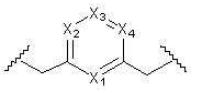
제4항에 있어서, R^5는 $-(CH_2)_3-$, $-(CH_2)_5-$ 또는 $-(CH_2)_7-$인 화합물.

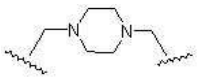
청구항 6

제4항에 있어서, R^5는 $-(CH_2)_5-$인 화합물.

청구항 7

제1항 내지 제3항 중 어느 한 항에 있어서, R^5는 다음 화학식에 의해 표시되는 화합물:



또는


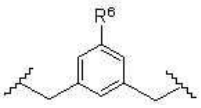
,

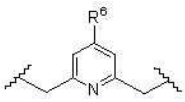
여기서:

X_1, X_2, X_3 및 X_4는 각각 독립적으로 N 또는 CR^6이고, 단 X_1, X_2, X_3 및 X_4 중 적어도 하나는 CR^6이다.

청구항 8

제7항에 있어서, R^5는:

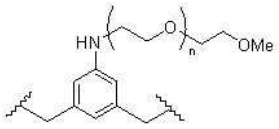


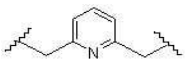
또는


인 화합물.

청구항 9

제8항에 있어서, R^5는:



또는


이고,

여기서 n은 1 내지 8의 정수인 화합물.

청구항 10

제9항에 있어서, n은s 1, 2, 3 또는 4인 화합물.

청구항 11

제2항에 있어서, 화합물은 표 B에 기재된 화학식, 또는 이의 약제학적으로 허용되는 염에 의해 표시되는 화합물.

청구항 12

제2항 내지 제11항 중 어느 한 항에 있어서, Z^1은 -C(=O)-인 화합물.

청구항 13

제2항 내지 제12항 중 어느 한 항에 있어서, R^x는 C_{1-6}알킬렌이고, Z^2 및 R^y는 모두 부재하는 화합물.

청구항 14

제2항 내지 제12항 중 어느 한 항에 있어서, R^x는 $-(CH_2CH_2O)_{m1}-C_{1-6}$알킬렌-이고; Z^2는 -NH-C(=O)- 또는 -C(=O)-NH-이고; R^y는 C_{1-6}알킬렌인 화합물.

청구항 15

제2항 내지 제12항 중 어느 한 항에 있어서, R^x는 C_{1-6}알킬렌이고; Z^2는 -NH-C(=O)- 또는 -C(=O)-NH-이고; R^y는 $-(CH_2CH_2O)_{m2}-C_{1-6}$알킬렌-인 화합물.

청구항 16

제11항에 있어서, 화합물은 표 C에 기재된 화학식 중 하나, 또는 이의 약제학적으로 허용되는 염에 의해 표시되는 화합물, 여기서:

R^6은 $-C(=O)OR^{6a}$ 또는 $NR^{6b}(CH_2CH_2O)_nCH_2CH_2OR^{6c}$이고;

R^{6a}, R^{6b} 및 R^{6c}는 각각 독립적으로 H 또는 C_{1-4}알킬이고;

n은 1 내지 8의 정수이고;

R^a 및 R^b는, 각각의 경우에, 독립적으로 H 또는 C_{1-4}알킬이고;

r, r1 및 r2는 각각 독립적으로 2 내지 6의 정수이고,

s는 2 내지 12의 정수이다.

청구항 17

제16항에 있어서,

R^{6a} 및 R^{6c}은 모두 Me이고;

R^{6b}는 H이고;

n은 1, 2, 3 또는 4이고;

R^a 및 R^b는, 각각의 경우에, 독립적으로 H 또는 Me이고;

r은 4이고;

r1은 4이고;

r2는 2이고;

s는 1, 2, 3 또는 4인 화합물.

청구항 18

제2항 내지 제17항 중 어느 한 항에 있어서, J는 $-COOR^d$ 또는 COE에 의해 표시되는 반응성 에스테르이고, 여기서 R^d는 H 또는 C_{1-4}알킬인 화합물.

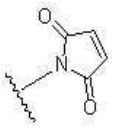
청구항 19

제18항에 있어서, J는 N-하이드록시석신이미드 에스테르, N-하이드록시 설포석신이미드 에스테르, 니트로페닐(*예를 들어*, 2 또는 4-니트로페닐) 에스테르, 디니트로페닐(*예를 들어*, 2,4-디니트로페닐) 에스테르, 설포-테트라플루오로페닐(*예를 들어*, 4-설포-2,3,5,6-테트라플루오로페닐) 에스테르, 및 펜타플루오로페닐 에스테르로부터 선택된 반응성 에스테르인 화합물.

청구항 20

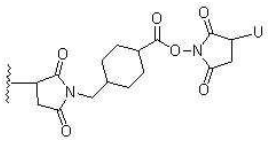
제18항에 있어서, J는 N-하이드록시석신이미드 에스테르인 화합물.

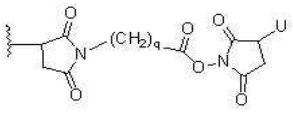
청구항 21

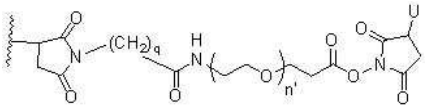
제2항 내지 제17항 중 어느 한 항에 있어서, J는  인 화합물.

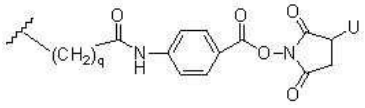
청구항 22

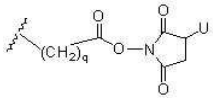
제2항 내지 제17항 중 어느 한 항에 있어서, J는 $-SZ^s$이고, 여기서 Z^s는 H, SR^e, 또는 다음 화학식으로부터 선택되는 화합물:

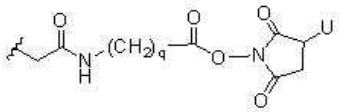
 (a1);

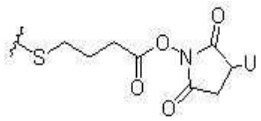
 (a2);

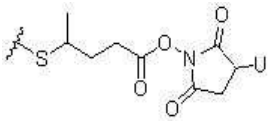
 (a3);

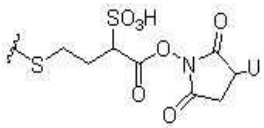
 (a4);

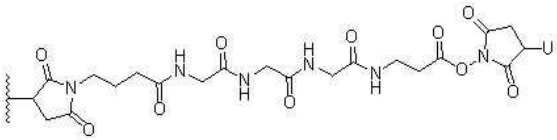
 (a5);

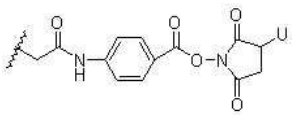
 (a6);

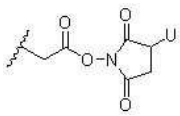
 (a7);

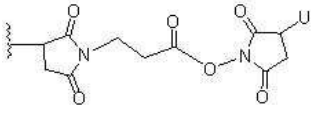
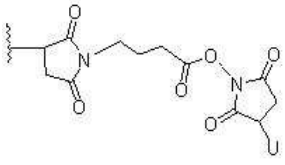
 (a8);

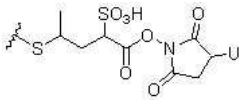
 (a9);

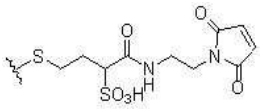
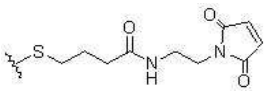
 (a10);

 (a11);

 (a12);


(a13);

(a14);


(a15),


(a16), 또는

(a17)

여기서:

q는 1 내지 5의 정수이고;

n'은 2 내지 6의 정수이고;

U는 -H 또는 SO_3H이고;

R^e는 1 내지 6 탄소 원자를 갖는 선형 또는 분지형 알킬이거나 페닐, 니트로페닐 (*예를 들어*, 2 또는 4-니트로페닐), 디니트로페닐 (*예를 들어*, 2,4-디니트로페닐), 카르복시니트로페닐 (*예를 들어*, 3-카르복시-4-니트로페닐), 피리딜 또는 니트로피리딜 (*예를 들어*, 4-니트로피리딜)로부터 선택됨.

청구항 23

제1항 내지 제22항 중 어느 한 항에 있어서, N과 C 사이의 이중선 ⎓ 은 이중 결합을 나타내고, X는 부재하고 Y는 H인 화합물.

청구항 24

제1항 내지 제22항 중 어느 한 항에 있어서, N과 C 사이의 이중선 ⎓ 은 단일 결합을 나타내고, X는 H이고 Y는 $-SO_3H$인 화합물.

청구항 25

제2항 내지 제24항 중 어느 한 항에 있어서, a1은 1 내지 7의 정수인 화합물.

청구항 26

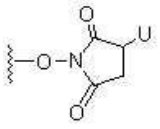
제25항에 있어서, $AA^1-(AA^2)_{a1}$은 Gly-Gly-Gly, Ala-Val, Val-Ala, Val-Cit, Val-Lys, Phe-Lys, Lys-Lys, Ala-Lys, Phe-Cit, Leu-Cit, Lle-Cit, Phe-Ala, Phe-N^9-토실-Arg, Phe-N^9-니트로-Arg, Phe-Phe-Lys, D-Phe-Phe-Lys, Gly-Phe-Lys, Leu-Ala-Leu, Ile-Ala-Leu, Val-Ala-Val, Ala-Leu-Ala-Leu, β-Ala-Leu-Ala-Leu, Gly-Phe-Leu-Gly, Val-Arg, Arg-Val, Arg-Arg, Val-D-Cit, Val-D-Lys, Val-D-Arg, D-Val-Cit, D-Val-Lys, D-Val-Arg, D-Val-D-Cit, D-Val-D-Lys, D-Val-D-Arg, D-Arg-D-Arg, Ala-Ala, Ala-D-Ala, D-Ala-Ala, D-Ala-D-Ala, Ala-Met, Met-Ala, Thr-Thr, Thr-Met, Met-Thr, Leu-Ala, Cit-Val, Gln-Val, Ser-Val, Leu-Gln, Gln-Leu, Phe-Arg, Arg-Phe, Tyr-Arg, Arg-Tyr, Phe-Gln, Gln-Phe, Val-Thr, Thr-Val, Met-Tyr, 및 Tyr-Met로부터 선택되는 화합물.

청구항 27

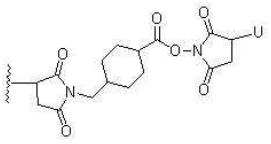
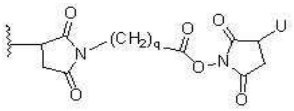
제26항에 있어서, $AA^1-(AA^2)_{a1}$은 Ala-Ala, L-Ala-L-Ala, Ala-Val, L-Ala-L-Val, Gln-Val, L-Gln-L-Val, Gln-Leu, L-Gln-L-Leu, Ser-Val, 또는 L-Ser-L-Val인 화합물.

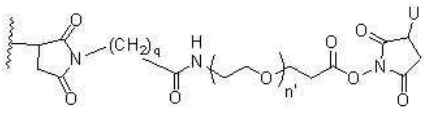
청구항 28

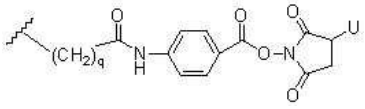
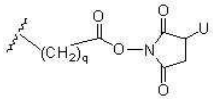
제1항에 있어서, 화합물은 표 D에 기재된 화학식 중 하나, 또는 이의 약제학적으로 허용되는 염으로부터 선택되는 화합물, 여기서:

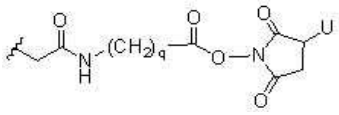
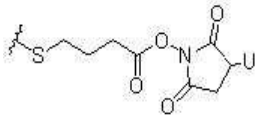
R^{100}은 -OH, -OMe 또는  이고;

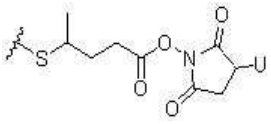
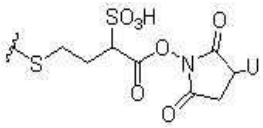
Zs는 H, SRe이고, 또는 다음 화학식 중 하나로부터 선택되고:

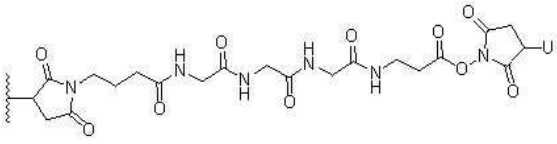
 (a1);  (a2);

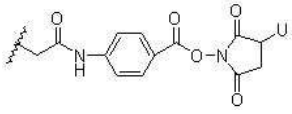
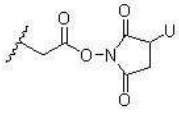
 (a3);

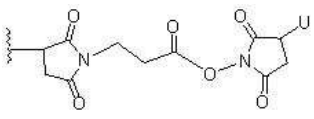
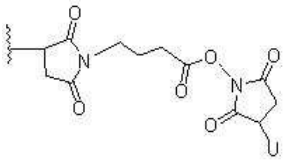
 (a4);  (a5);

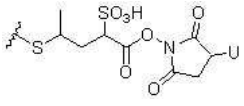
 (a6);  (a7);

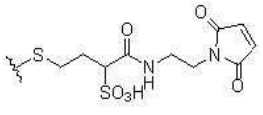
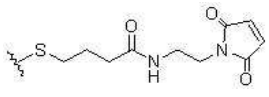
 (a8);  (a9);

 (a10);

 (a11);  (a12);

 (a13);  (a14);

 (a15),

 (a16), 또는  (a17)

여기서:

q는 1 내지 5의 정수이고;

n'은 2 내지 6의 정수이고;

U는 -H 또는 SO_3H이고;

R^e는 1 내지 6 탄소 원자를 갖는 선형 또는 분지형 알킬이거나 페닐, 니트로페닐 (*예를 들어*, 2 또는 4-니트로페닐), 디니트로페닐 (*예를 들어*, 2,4-디니트로페닐), 카르복시니트로페닐 (*예를 들어*, 3-카르복시-4-니트로페닐), 피리딜 또는 니트로피리딜 (*예를 들어*, 4-니트로피리딜)로부터 선택됨.

청구항 29

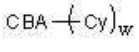
제1항 내지 제28항 중 어느 한 항에 있어서, 약제학적으로 허용되는 염은 소듐 또는 포타슘 염인 화합물.

청구항 30

제1항 내지 제28항 중 어느 한 항에 있어서, 약제학적으로 허용되는 염은 소듐 염인 화합물.

청구항 31

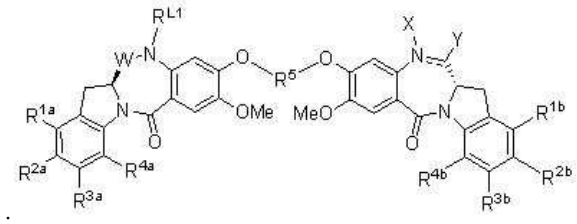
세포독성제에 공유 결합된 세포결합제(CBA)를 포함하는 세포결합제-세포독성제 접합체, 여기서 접합체는 다음 화학식에 의해 표시됨:

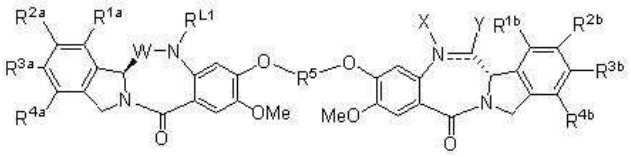
 ,

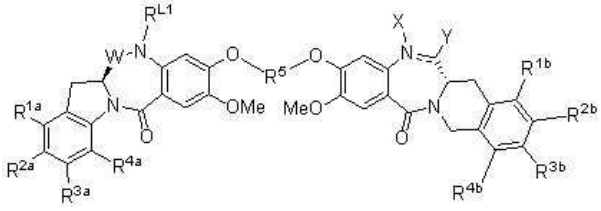
또는 이의 약제학적으로 허용되는 염, 여기서:

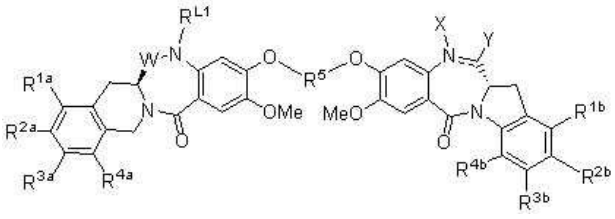
CBA는 세포결합제이고;

Cy는 다음 화학식에 의해 표시되는 세포독성제이다:

 . (V);

 (VI);

 (TC1); 또는



(TC2),

또는 이의 약제학적으로 허용되는 염, 여기서:

N과 C 사이의 이중선 ⎓ 은 단일 결합 또는 이중 결합을 나타내고, 이중 결합인 경우 X는 부재하고 Y는 H, 또는 C_{1-4}알킬이고, 단일 결합인 경우, X는 H이고 Y는 -OH 또는 $-SO_3H$이고;

W는 -C(=O)- 또는 -C(Y')-이고;

Y'은 H 또는 C_{1-4}알킬이고;

R^{1a}, R^{2a}, R^{3a}, R^{4a}, R^{1b}, R^{2b}, R^{3b} 및 R^{4b}는 H, C_{1-10}알킬, $-(OCH_2CH_2)_n-OR^c$, 할로겐, $-NH(C=NH)NH_2$, -OR, -NR'R'', $-NO_2$, -NR'COR'', -SR, -SOR', $-SO_2R'$, $-SO_3H$, $-OSO_3H$, $-SO_2NR'R''$, -CN, $-N_3$, -COR', -OCOR', 및 -OCONR'R''로 이루어진 군으로부터 각각 독립적으로 선택되고;

R^c는 H 또는 C_{1-4}알킬이고;

n은 1 내지 24의 정수이고;

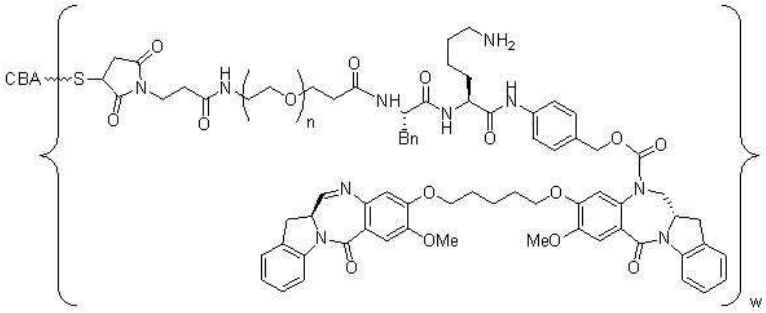
R은, 각각의 경우에, H, $-(CH_2CH_2O)_n-R^c$, C_{1-10}알킬, C_{3-8}사이클로알킬, 6- 내지 18-원 아릴, N, O 및 S로부터 독립적으로 선택된 하나 이상의 헤테로원자를 포함하는 5- 내지 18-원 헤테로아릴 고리, 또는 O, S, N 및 P로부터 독립적으로 선택된 1 내지 6 헤테로원자를 포함하는 3- 내지 18-원 헤테로사이클릭 고리로 이루어진 군으로부터 독립적으로 선택되고;

R' 및 R''은 -H, -OH, -OR, -NHR, $-NR_2$, -COR, C_{1-10}알킬, $-(CH_2CH_2O)_n-R^c$, 및 O, S, N 및 P로부터 독립적으로 선택된 1 내지 6 헤테로원자를 갖는 3- 내지 18-원 헤테로사이클릭 고리로부터 각각 독립적으로 선택되고;

R^5는 C_{3-12}알킬렌이고, 이 사슬은 -O-, -S-, -NH-, -NMe-, 벤젠 고리, 4 내지 7-원 헤테로아릴 고리 및 4 내지 7-원 헤테로사이클릭 고리로부터 선택된 하나 이상의 기에 의해 단절될 수 있고, 여기서 벤젠, 4 내지 7-원 헤테로아릴 고리 및 4 내지 7-원 헤테로사이클릭 고리는 1 내지 4 R^6으로 치환되고;

R^6은 각각의 경우에 H, C_{1-10}알킬, $-(CH_2CH_2O)_n-R^c$, 할로겐, $-NH(C=NH)NH_2$, -OR, -NR'R'', $-NO_2$, -NCO, -NR'COR'', -SR, -SOR', $-SO_2R'$, $-SO_3H$, $-OSO_3H$, $-SO_2NR'R''$, -CN, $-N_3$, -COR', -OCOR', 및 -OCONR'R''로부터 독립적으로 선택되고;

R^{L1}은 CBA에 공유적으로 연결된 자가 희생 링커이고, 단 화학식 (V)의 접합체는:



가 아니다.

청구항 32

제31항에 있어서, Cy는 표 E에 기재된 화학식 중 하나, 또는 이의 약제학적으로 허용되는 염에 의해 표시되는 접합체, 여기서:

AA^1 및 AA^2는 각각 독립적으로 아미노산 잔기이고;

a1은 1 내지 19의 정수이고;

a2는 1 내지 5의 정수이고;

R^a는 H 또는 C_{1-4}알킬이고;

q는 1, 2, 3 또는 4이고;

R^{s1} 및 R^{s2}는 각각 독립적으로 H 또는 C_{1-4}알킬이고, 또는 R^{s1} 및 R^{s2}는 이들의 부착된 탄소 원자와 함께 3 내지 5-원 사이클로알킬 고리를 형성하고, 단 q가 1일 때, R^{s1} 및 R^{s2}는 이들이 부착된 탄소 원자와 함께 4 또는 5-원 사이클로알킬 고리를 형성하고;

V는 C(=O) 또는 CH_2;

Z^1은 -C(=O)- 또는 $-SO_2$-NH-C(=O)-이고, 여기서 $-SO_2$-NH-C(=O)-에서 $-SO_2$- 기는 P^1에 연결되고;

R^x는 부재, C_{1-10}알킬렌, C_{3-8}사이클로알킬, $-(CH_2CH_2O)_{m1}-C_{1-10}$알킬렌- 또는 C_{1-10}알킬렌-$(OCH_2CH_2)_{m2}$-이고;

m1 및 m2는 각각 독립적으로 1 내지 24의 정수이고;

Z^2는 부재, -C(=O)NH- 또는 -NH-C(=O)-이고;

R^y는 부재, C_{1-10}알킬렌, $-(CH_2CH_2O)_{m3}-C_{1-10}$알킬렌- 또는 C_{1-10}알킬렌-$(OCH_2CH_2)_{m4}$-이고;

m3 및 m4는 각각 독립적으로 1 내지 24의 정수이고;

Z^{s1}은 CBA 및 세포독성 화합물에 공유적으로 연결된 이작용성 가교제, 여기서 가교제는 디설파이드 결합 또는 티오에테르 결합을 통해 세포독성 화합물에 공유적으로 연결됨;

J^1은 세포독성제의 아민 반응성 기 또는 티올 반응성 기와 CBA에 위치하는 아민 기 또는 티올 기의 반응에 의해 형성된 모이어티이다.

청구항 33

제31항 또는 제32항에 있어서, R^{1a}, R^{2a}, R^{3a}, R^{4a}, R^{1b}, R^{2b}, R^{3b} 및 R^{4b} 는 모두 H인 접합체.

청구항 34

제31항 내지 제33항 중 어느 한 항에 있어서, R^5는 C_{3-7}알킬렌인 접합체.

청구항 35

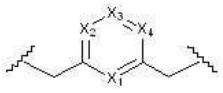
제34항에 있어서, R^5는 $-(CH_2)_3$-, $-(CH_2)_5$- 또는 $-(CH_2)_7$-인 접합체.

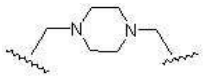
청구항 36

제34항에 있어서, R^5는 $-(CH_2)_5$-인 접합체.

청구항 37

제31항 내지 제33항 중 어느 한 항에 있어서, R^5는 다음 화학식에 의해 표시되는 접합체:



또는 

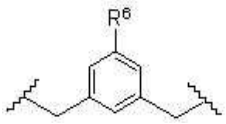
,

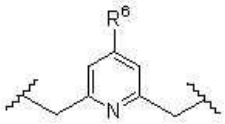
여기서:

X_1, X_2, X_3 및 X_4는 각각 독립적으로 N 또는 CR^6이고, 단 X_1, X_2, X_3 및 X_4 중 적어도 하나는 CR^6이다.

청구항 38

제37항에 있어서, R^5는:

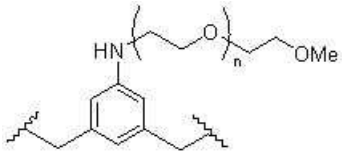


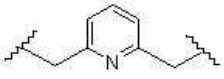
또는 

인 접합체.

청구항 39

제38항에 있어서, R^5는:



또는 

이고,

여기서 n은 1 내지 8의 정수인 접합체.

청구항 40

제39항에 있어서, n은 1, 2, 3 또는 4인 접합체.

청구항 41

제32항에 있어서, Cy는 표 F에 기재된 다음 화학식 중 하나, 또는 이의 약제학적으로 허용되는 염에 의해 표시되는 접합체.

청구항 42

제32항 내지 제41항 중 어느 한 항에 있어서, Z^1은 -C(=O)-인 접합체.

청구항 43

제32항 내지 제42항 중 어느 한 항에 있어서, R^x는 C_{1-6}알킬렌이고, Z^2 및 R^y는 모두 부재하는 접합체.

청구항 44

제32항 내지 제42항 중 어느 한 항에 있어서, R^x는 $-(CH_2CH_2O)_{m1}-C_{1-6}$알킬렌-이고; Z^2는 -NH-C(=O)- 또는 -C(=O)-NH-; R^y is C_{1-6}알킬렌인 접합체.

청구항 45

제32항 내지 제42항 중 어느 한 항에 있어서, R^x는 C_{1-6}알킬렌이고; Z^2는 -NH-C(=O)- 또는 -C(=O)-NH-이고; R^y는

-$(CH_2CH_2O)_{m2}$-C_{1-6}알킬렌-인 접합체.

청구항 46

제41항에 있어서, Cy는 표 G에 기재된 화학식 중 하나, 또는 이의 약제학적으로 허용되는 염에 의해 표시되는 접합체, 여기서:

R^6은 -C(=O)OR^{6a} 또는 -$NR^{6b}(CH_2CH_2O)_nCH_2CH_2OR^{6c}$이고;

R^{6a}, R^{6b} 및 R^{6c}는 각각 독립적으로 H 또는 C_{1-4}알킬이고;

n은 1 내지 8의 정수이고;

R^a 및 R^b는, 각각의 경우에, 독립적으로 H 또는 C_{1-4}알킬이고;

r, r1 및 r2는 각각 독립적으로 2 내지 6의 정수이고,

s는 2 내지 12의 정수이다.

청구항 47

제46항에 있어서,

R^{6a} 및 R^{6c}은 모두 Me이고;

R^{6b}는 H이고;

n은 1, 2, 3 또는 4;

R^a 및 R^b는, 각각의 경우에, 독립적으로 H 또는 Me이고;

r은 4이고;

r1은 4이고;

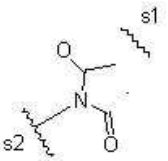
r2는 2이고;

s는 1, 2, 3 또는 4인 접합체.

청구항 48

제32항 내지 제47항 중 어느 한 항에 있어서, J^1은 -C(=O)-인 접합체.

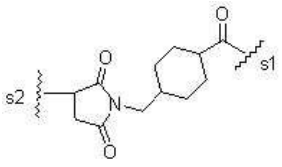
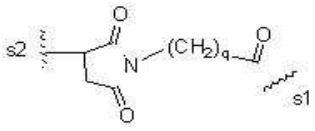
청구항 49

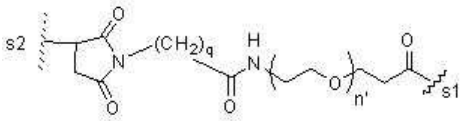
제32항 내지 제47항 중 어느 한 항에 있어서, J^1은 

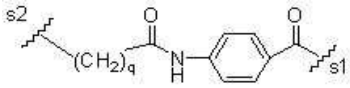
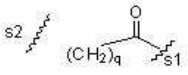
이고, 여기서 s1은 CBA에 연결된 부위이고 s2는 세포독성 화합물의 나머지에 연결된 부위인 접합체.

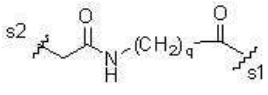
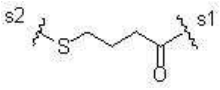
청구항 50

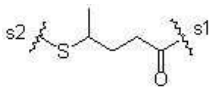
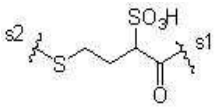
제32항 내지 제47항 중 어느 한 항에 있어서, J^1은 -SZ^{s1}이고, 여기서 Z^{s1}은 다음 화학식으로부터 선택되는 접합체:

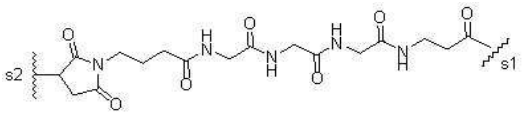
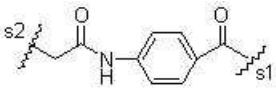

(b1);

(b2);

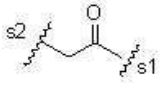

(b3);

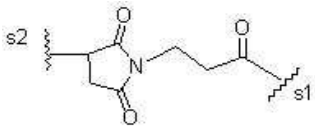
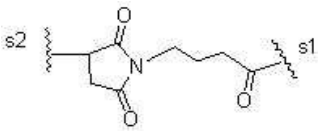

(b4);

(b5);

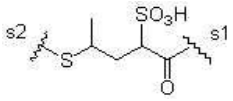

(b6);

(b7);

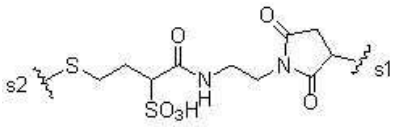
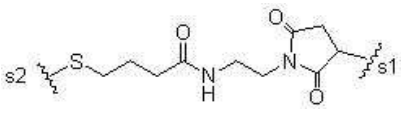

(b8);

(b9);


(b10);

(b11);


(b12);


(b13);

(b14);


(b15),


(b16), 또는

(b17)

여기서:

q는 1 내지 5의 정수이고;

n'은 2 내지 6의 정수이고;

s1은 CBA에 연결된 부위이고;

s2는 세포독성 화합물의 나머지에 연결된 부위이다.

청구항 51

제31항 내지 제50항 중 어느 한 항에 있어서, N과 C 사이의 이중선 ╍ 은 이중 결합을 나타내고, X는 부재하고

Y는 H인 접합체.

청구항 52

제31항 내지 제50항 중 어느 한 항에 있어서, N과 C 사이의 이중선 ⎓ 은 단일 결합을 나타내고, X는 H이고 Y는 $-SO_3H$인 접합체.

청구항 53

제32항 내지 제52항 중 어느 한 항에 있어서, a1은 1 내지 7의 정수인 접합체.

청구항 54

제53항에 있어서, $AA^1-(AA^2)_{a1}$은 Gly-Gly-Gly, Ala-Val, Val-Ala, Val-Cit, Val-Lys, Phe-Lys, Lys-Lys, Ala-Lys, Phe-Cit, Leu-Cit, Lle-Cit, Phe-Ala, Phe-N^9-토실-Arg, Phe-N^9-니트로-Arg, Phe-Phe-Lys, D-Phe-Phe-Lys, Gly-Phe-Lys, Leu-Ala-Leu, Ile-Ala-Leu, Val-Ala-Val, Ala-Leu-Ala-Leu, β-Ala-Leu-Ala-Leu 및 Gly-Phe-Leu-Gly, Val-Arg, Arg-Val, Arg-Arg, Val-D-Cit, Val-D-Lys, Val-D-Arg, D-Val-Cit, D-Val-Lys, D-Val-Arg, D-Val-D-Cit, D-Val-D-Lys, D-Val-D-Arg, D-Arg-D-Arg, Ala-Ala, Ala-D-Ala, D-Ala-Ala, D-Ala-D-Ala, Ala-Met, Met-Ala, Thr-Thr, Thr-Met, Met-Thr, Leu-Ala, Cit-Val, Gln-Val, Ser-Val, Val-Gln, Gln-Val, Leu-Gln, Gln-Leu, Phe-Arg, Arg-Phe, Tyr-Arg, Arg-Tyr, Phe-Gln, Gln-Phe, Val-Thr, Thr-Val, Val-Met, Met-Val, Leu-Met, Met-Leu, Met-Tyr, Tyr-Met, Ala-Asn, Asn-Ala, Phe-Met, Met-Phe, Gly-Gly-Arg, 및 Arg-Gly-Gly로부터 선택되는 접합체.

청구항 55

제54항에 있어서, $AA^1-(AA^2)_{a1}$은 Ala-Ala, L-Ala-L-Ala, Ala-Val, L-Ala-L-Val, Gln-Val, L-Gln-L-Val, Gln-Leu, L-Gln-L-Leu, Ser-Val, 또는 L-Ser-L-Val인 접합체.

청구항 56

제31항에 있어서, 접합체는 표 H에 기재된 접합체 중 하나, 또는 이의 약제학적으로 허용되는 염으로부터 선택되고, 여기서 CBA~~~N(H)— 는 CBA에 위치한 아민 기를 통해 세포독성 화합물에 공유적으로 연결된 세포결합제이고; CBA~~~S— 는 CBA에 위치한 티올 기를 통해 세포독성 화합물에 공유적으로 연결된 세포결합제이고; w_L은 1 내지 20의 정수이고; w_C는 1 내지 4의 정수인 접합체.

청구항 57

제31항 내지 제56항 중 어느 한 항에 있어서, 약제학적으로 허용되는 염은 소듐 또는 포타슘 염인 접합체.

청구항 58

제31항 내지 제56항 중 어느 한 항에 있어서, 약제학적으로 허용되는 염은 소듐 염인 접합체.

청구항 59

제31항 내지 제58항 중 어느 한 항에 있어서, 세포결합제(CBA)는 항체, 단일 사슬 항체, 표적 세포에 특이적으로 결합하는 항체 단편, 단일클론 항체, 단일 사슬 단일클론 항체, 또는 표적 세포에 특이적으로 결합하는 단일클론 항체 단편, 키메라 항체, 표적 세포에 특이적으로 결합하는 키메라 항체 단편, 도메인 항체, 표적 세포에 특이적으로 결합하는 도메인 항체 단편, 프로바디, 나노바디, 림포카인, 호르몬, 비타민, 성장 인자, 집락 자극 인자, 또는 영양 수송 분자인 접합체.

청구항 60

제31항 내지 제59항 중 어느 한 항에 있어서, 세포결합제(CBA)는 종양 세포, 바이러스 감염 세포, 미생물 감염 세포, 기생충 감염 세포, 자가면역 세포, 활성화 세포, 골수 세포, 활성화 T-세포, B 세포, 또는 멜라닌세포;

CA6, CAK1, CD4, CD5, CD6, CD19, CD20, CD22, CD30, CD33, CD37, CD38, CD40, CD44, CD56, CD123, CD138, EpCAM, CanAg, CALLA, CEACAM5, FGFR3, LAMP1, p-카드헤린, Her-2 또는 Her-3 항원을 발현하는 세포; 또는 인슐린 성장 인자 수용체, 표피 성장 인자 수용체, 및 엽산 수용체를 발현하는 세포로부터 선택된 표적 세포에 결합하는 접합체.

청구항 61

제31항 내지 제58항 중 어느 한 항에 있어서, 세포결합제는 항-엽산 수용체 항체 또는 이의 항체 단편, 항-EGFR 항체 또는 이의 항체 단편, 항-CD33 항체 또는 이의 항체 단편, 항-CD19 항체 또는 이의 항체 단편, 항-Muc1 항체 또는 이의 항체 단편, 또는 항-CD37 항체 또는 이의 항체 단편인 접합체.

청구항 62

약제학적으로 허용되는 담체 및 제31항 내지 제61항 중 어느 한 항의 접합체, 또는 이의 약제학적으로 허용되는 염을 포함하는 약제학적 조성물.

청구항 63

포유동물의 비정상 세포 성장 억제 또는 증식성 장애, 자가면역 장애, 파괴성 골 장애, 감염성 질환, 바이러스성 질환, 섬유성 질환, 신경퇴행성 장애, 췌장염 또는 신장 질환 치료 방법으로서, 상기 포유동물에게 치료적 유효량의 제1항 내지 제30항 중 어느 한 항의 화합물 또는 제31항 내지 제61항 중 어느 한 항의 접합체, 및 임의로 화학치료제를 투여하는 것을 포함하는 방법.

청구항 64

제63항에 있어서, 방법은 암을 치료하기 위한 것인 방법.

청구항 65

제64항에 있어서, 암은 자궁내막암, 폐암 (예를 들어, 비소세포 폐암), 결장직장암, 방광암, 위암, 췌장암, 신장 세포 암종, 전립선암, 식도암, 유방암, 두경부암, 자궁암, 난소암, 간암, 자궁경부암, 갑상선암, 고환암, 골수암, 흑색종, 및 림프구암인 방법.

청구항 66

제64항에 있어서, 암은 급성 골수성 백혈병 (AML), 만성 골수성 백혈병 (CML), 골수이형성 증후군 (MDS), 급성 림프모구성 백혈병 (ALL), 급성 B 림프모구성 백혈병 또는 B-세포 급성 림프모구성 백혈병 (B-ALL), 만성 림프구성 백혈병 (CLL), 모세포 백혈병 (HCL), 급성 전골수구성 백혈병 (APL), B-세포 만성 림프증식성 질환 (B-CLPD), 비정형 만성 림프구성 백혈병, 미만성 거대 B-세포 림프종 (DLBCL), 아세포 형질세포양 수지상 세포 신생물 (BPDCN), 비호지킨 림프종 (NHL), 외투 세포 백혈병 (MCL), 소림프구성 림프종 (SLL), 호지킨 림프종, 전신 비만세포증, 및 버킷 림프종인 방법.

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 관련 출원

[0002] 본 출원은 35 U.S.C. §119(e)하에, 2019년 3월 29일에 출원된 미국 특허 가출원 번호 62/825,954의 출원일의 이익을 주장하며, 이의 전체 내용은 본원에 참조로 포함된다.

[0003] 발명의 분야

[0004] 본 발명은 신규한 세포독성 화합물, 및 이러한 세포독성 화합물 및 세포결합제를 포함하는 세포독성 접합체에 관한 것이다. 보다 구체적으로, 본 발명은 의약, 특히 항증식제로서 유용한 신규한 벤조디아제핀 화합물, 이의 유도체, 이의 중간체, 이의 접합체, 및 이의 약제학적으로 허용되는 염에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0005] 발명의 배경

[0006] 벤조디아제핀 유도체는 다양한 장애 치료에 유용한 화합물이며, 항간질제(이미다조 [2,1-b][1,3,5]벤조티아디아제핀, 미국 특허 번호 4,444,688; 미국 특허 번호 4,062,852), 항균제(피리미도[1,2-c][1,3,5]벤조티아디아제핀, GB 1476684), 이뇨제 및 혈압강하제(피롤로(1,2-b)[1,2,5]벤조티아디아제핀 5,5 디옥사이드, 미국 특허 번호 3,506,646), 지질강하제(WO 03091232), 항우울제(미국 특허 번호 3,453,266); 골다공증(JP 2138272)과 같은 의약을 포함한다.

[0007] 동물 종양 모델에서 피롤로벤조디아제핀(PBD)과 같은 벤조디아제핀 유도체가, 항종양제로 작용하는 것으로 나타났다 (N-2-이미다졸릴 알킬 치환된 1,2,5-벤조티아디아제핀-1,1-디옥사이드, 미국 특허 번호 6,156,746), 벤조-피리도 또는 디피리도 티아디아제핀(WO 2004/069843), 피롤로 [1,2-b] [1,2,5] 벤조티아디아제핀 및 피롤로 [1,2-b][1,2,5] 벤조디아제핀 유도체(WO2007/015280), 토마이마이신 유도체(*예를 들어*, 피롤로[1,4]벤조디아제핀), 예컨대 WO 00/12508, WO2005/085260, WO2007/085930, 및 EP 2019104에 기재된 것. 벤조디아제핀은 또한 세포 성장 및 분화에 영향을 미치는 것으로 알려져 있다 (Kamal A., *et al.*, Bioorg. Med. Chem., 2008 Aug 15;16(16):7804-10 (및 이에 인용된 참고문헌); Kumar R, Mini Rev Med Chem. 2003 Jun; 3(4):323-39 (및 이에 인용된 참고문헌); Bednarski J. J., *et al.*, 2004; Sutter A. P, *et al.*, 2002; Blatt N B, *et al.*, 2002), Kamal A. *et al.*, Current Med. Chem., 2002; 2; 215-254, Wang J-J., J. Med. Chem., 2206; 49:1442-1449, Alley M.C. *et al.*, Cancer Res. 2004; 64:6700-6706, Pepper C. J., Cancer Res 2004; 74:6750-6755, Thurston D.E. and Bose D.S., Chem. Rev., 1994; 94:433-465; 및 Tozuka, Z., *et al.*, Journal of Antibiotics, (1983) 36; 1699-1708. PBD의 일반적인 구조는 미국 공개 번호 20070072846에 기재되어 있다. PBD는 방향족 A 고리 및 피롤로 C 고리 모두에서 치환기의 수, 유형 및 위치, 그리고 C 고리의 포화 정도가 상이하다. 이들의 마이너 그루브(minor groove)에서 부가물을 형성하고 DNA를 가교하는 능력은 DNA 프로세싱을 방해하여, 항증식제로서 사용할 가능성이 있게 한다.

[0008] 임상에 도입된 최초의 피롤로벤조디아제핀인 SJG-136 (NSC 694501)은 DNA 가닥간 가교를 일으키는 강력한 세포독성제이다 (S.G Gregson *et al.*, 2001, *J. Med. Chem.*, 44: 737-748; M.C. Alley *et al.*, 2004, *Cancer Res.*, 64: 6700-6706; J.A. Hartley *et al.*, 2004, *Cancer Res.*, 64: 6693-6699; C. Martin *et al.*, 2005, *Biochemistry.*, 44: 4135-4147; S. Arnould *et al.*, 2006, *Mol. Cancer Ther.*, 5: 1602-1509). SJG-136에 대한 1상 임상 평가 결과는 이 약물이 극도로 낮은 용량(45 μg/m^{2}의 최대 허용 용량)에서 독성이고, 혈관 누출 증후군, 말초 부종, 간 독성 및 피로를 포함하는 여러 부작용이 관찰됨을 나타냈다. 순환 림프구에서 모든 용량에서 DNA 손상이 관찰되었다 (D. Hochhauser *et al.*, 2009, *Clin. Cancer Res.*, 15: 2140-2147).

[0009] 따라서, 독성이 덜하고 암과 같은 다양한 증식성 질환을 치료에 여전히 치료적으로 활성인 개선된 벤조디아제핀 유도체에 대한 요구가 존재한다.

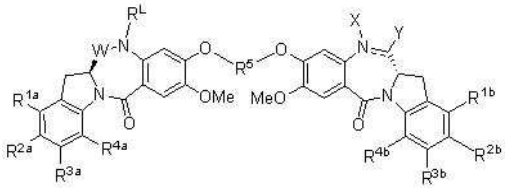
발명의 내용

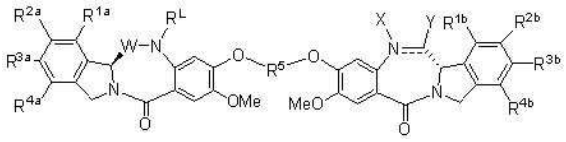
[0010] 발명의 요약

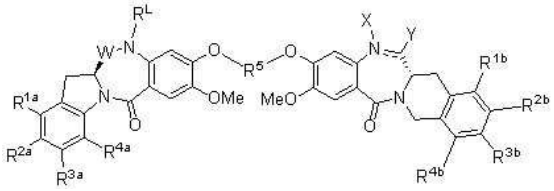
[0011] 본 발명은 신규한 벤조디아제핀 이량체 화합물 및 이의 세포결합제 접합체를 제공한다. 일부 구체예에서, 벤조디아제핀 이량체 화합물은 단량체 중 하나로서 이민 환원된 (즉, N과 C 원자 사이의 단일 결합) 벤조디아제핀을 갖는다. 본 발명의 이량체 화합물은 환원된 벤조디아제핀 단량체의 N-10 아민에서 자가 희생(self-immolative) 링커를 통해 세포결합제에 공유적으로 연결되며, 이는 상응하는 세포결합제 접합체의 개선된 대사, 효능, 내약성 및/또는 용해도를 유발할 수 있다.

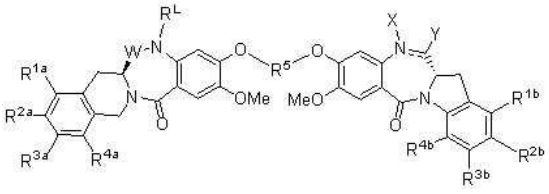
[0012] 특히, 본 발명의 이량체 화합물은 다른 단량체로서 이민 벤조디아제핀을 갖고, 이는 이민 반응성 시약(예를 들어, 소듐 비설파이트)으로 변성되어 수용액에서 증가된 용해도를 갖는 변성된 (*예를 들어*, 설폰화된) 이량체 화합물(*예를 들어*, 본원에 기재된 화합물, 또는 이의 약제학적으로 허용되는 염, 여기서 N과 C 사이의 이중선 ⋯ 은 단일 결합을 나타내고, X는 H이고 Y는 -OH 또는 -SO_3H, 바람직하게는 Y는 -SO_3H)을 생성할 수 있다. 항체 접합 반응은 일반적으로 수용액 또는 수용액과 유기 공용매의 혼합물에서 수행되기 때문에, 이량체 화합물의 용해도 증가는 접합 수율을 향상시키고 생성된 접합체의 더 높은 DAR 및/또는 단량체 백분율을 야기할 수 있다. 이에 비해, 이민 벤조디아제핀 단량체의 N-10 위치에서 자가 희생 링커를 갖는 비교 벤조디아제핀 이량체 화합물은 적어도 부분적으로 수용액에서의 낮은 용해도로 인해 항체에 접합되기 어렵다. 또한, 비교 화합물의 항체 접합체는 본 발명 (실시예 47)의 접합체에 비해 더 낮은 DAR 및 단량체 백분율을 갖는다.

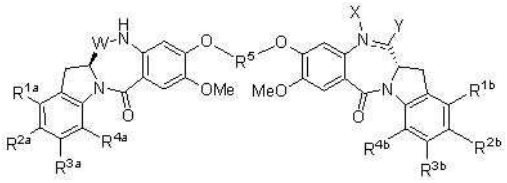
[0013] 제1 양태에서, 본 발명은 다음 화학식으로 표시되는 세포독성 화합물:

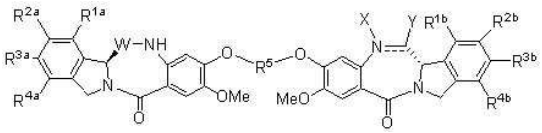
[0014]  (I);

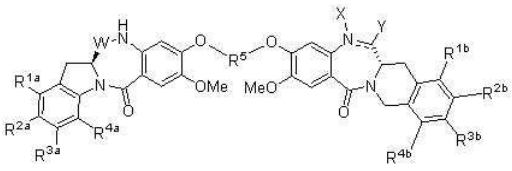
[0015]  (II);

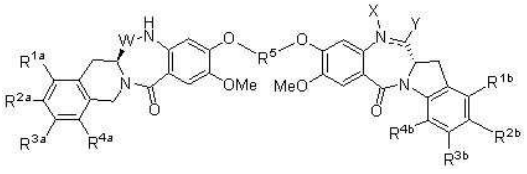
[0016]  (TI);

[0017]  (T2);

[0018]  (I^m);

[0019]  (II^m);

[0020]  (TI^m); 또는

[0021]  ($T2^m$);

[0022] 또는 이의 약제학적으로 허용되는 염에 관한 것이고, 여기서:

[0023] N과 C 사이의 이중선 ┅ 은 단일 결합 또는 이중 결합을 나타내고, 이중 결합인 경우 X는 부재하고 Y는 H, 또는 C_{1-4}알킬이고, 단일 결합인 경우, X는 H이고 Y는 -OH 또는 $-SO_3H$이고;

[0024] W는 -C(=O)- 또는 -C(Y')-이고;

[0025] Y'은 H 또는 C_{1-4}알킬이고;

[0026] R^{1a}, R^{2a}, R^{3a}, R^{4a}, R^{1b}, R^{2b}, R^{3b} 및 R^{4b}는 H, C_{1-10}알킬, $-(OCH_2CH_2)_nOR^c$, 할로겐, $-NH(C=NH)NH_2$, -OR, -NR'R'', $-NO_2$, -NR'COR'', -SR, -SOR', $-SO_2R'$, $-SO_3H$, $-OSO_3H$, $-SO_2NR'R''$, -CN, $-N_3$, -COR', -OCOR', 및 -OCONR'R''로 이루어진 군으로부터 각각 독립적으로 선택되고;

[0027] R^c는 H 또는 C_{1-4}알킬이고;

[0028] n은 1 내지 24의 정수이고;

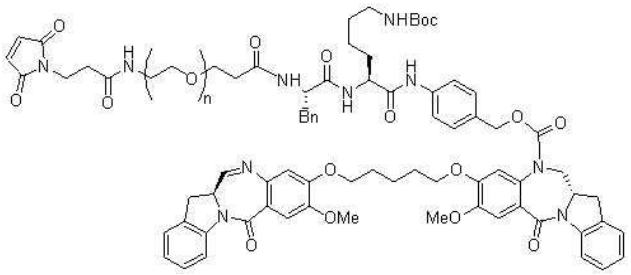
[0029] R은, 각각의 경우에, H, $-(CH_2CH_2O)_n-R^c$, C_{1-10}알킬, C_{3-8}사이클로알킬, 6- 내지 18-원 아릴, N, O 및 S로부터 독립적으로 선택된 하나 이상의 헤테로원자를 포함하는 5- 내지 18-원 헤테로아릴 고리, 또는 O, S, N 및 P로부터 독립적으로 선택된 1 내지 6 헤테로원자를 포함하는 3- 내지 18-원 헤테로사이클릭 고리로 이루어진 군으로부터 독립적으로 선택되고;

[0030] R' 및 R''은 -H, -OH, -OR, -NHR, $-NR_2$, -COR, C_{1-10}알킬, $-(CH_2CH_2O)_n-R^c$, 및 O, S, N 및 P로부터 독립적으로 선택된 1 내지 6 헤테로원자를 갖는 3- 내지 18-원 헤테로사이클릭 고리로부터 각각 독립적으로 선택되고;

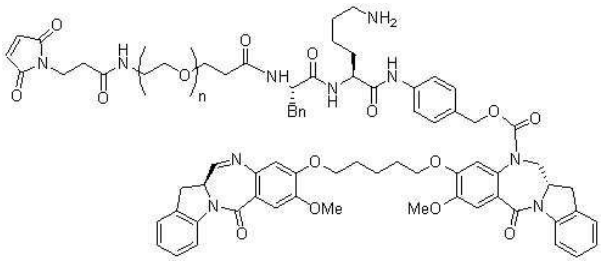
[0031] R^5는 C_{3-12}알킬렌이고, 이 사슬은 -O-, -S-, -NH-, -NMe-, 벤젠 고리, 4 내지 7-원 헤테로아릴 고리 및 4 내지 7-원 헤테로사이클릭 고리로부터 선택된 하나 이상의 기에 의해 단절될 수 있고, 여기서 벤젠, 4 내지 7-원 헤테로아릴 고리 및 4 내지 7-원 헤테로사이클릭 고리는 1 내지 4 R^6으로 치환되고;

[0032] R^6은 각각의 경우에 H, C_{1-10}알킬, $-(CH_2CH_2O)_n-R^c$, 할로겐, $-NH(C=NH)NH_2$, -OR, -NR'R'', $-NO_2$, -NCO, -NR'COR'', -SR, -SOR', $-SO_2R'$, $-SO_3H$, $-OSO_3H$, $-SO_2NR'R''$, -CN, $-N_3$, -COR', -OCOR', 및 -OCONR'R''로부터 독립적으로 선택되고;

[0033] R^L은 세포결합제와 공유 결합을 형성할 수 있는 반응성 기를 포함하는 자가 희생 링커이고, 단 화학식 (I)의 화합물은:

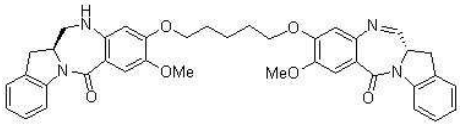
[0034] 

; 또는

[0035] 

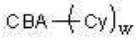
이 아니고;

[0036] 단 화학식 (I^m)의 화합물은:

[0037] 

이 아니다.

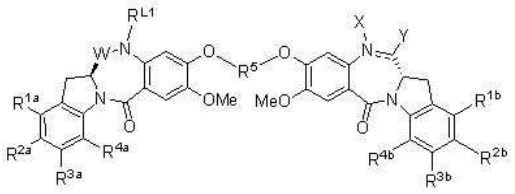
[0038] 제2 양태에서, 본 발명은 다음 화학식에 의해 표시되는 세포결합제-세포독성제 접합체:

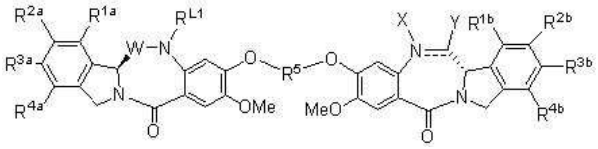
[0039]  ,

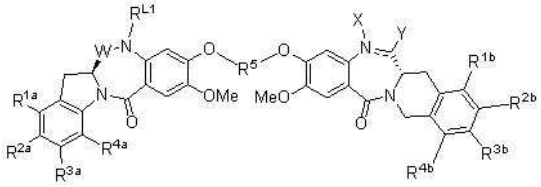
[0040] 또는 이의 약제학적으로 허용되는 염에 관한 것이고, 여기서:

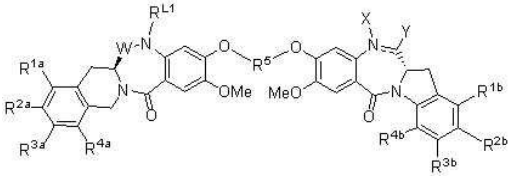
[0041] CBA는 세포결합제이고;

[0042] Cy는 다음 화학식에 의해 표시되는 세포독성제:

[0043]  (V);

[0044]  (VI);

[0045]  (TC1); 또는

[0046]  (TC2),

[0047] 또는 이의 약제학적으로 허용되는 염이고, 여기서:

[0048] N과 C 사이의 이중선 ⎓은 단일 결합 또는 이중 결합을 나타내고, 이중 결합인 경우 X는 부재하고 Y는 H, 또는 C_{1-4}알킬이고, 단일 결합인 경우, X는 H이고 Y는 -OH 또는 $-SO_3H$이고;

[0049] W는 -C(=O)- 또는 -C(Y')-이고;

[0050] Y'은 H 또는 C_{1-4}알킬이고;

[0051] R^{1a}, R^{2a}, R^{3a}, R^{4a}, R^{1b}, R^{2b}, R^{3b} 및 R^{4b}는 H, C_{1-10}알킬, $-(OCH_2CH_2)_n-OR^c$, 할로겐, $-NH(C=NH)NH_2$, -OR, -NR'R'', $-NO_2$, -NR'COR'', -SR, -SOR', $-SO_2R'$, $-SO_3H$, $-OSO_3H$, $-SO_2NR'R''$, -CN, $-N_3$, -COR', -OCOR', 및 -OCONR'R''로 이루어진 군으로부터 각각 독립적으로 선택되고;

[0052] R^c는 H 또는 C_{1-4}알킬이고;

[0053] n은 1 내지 24의 정수이고;

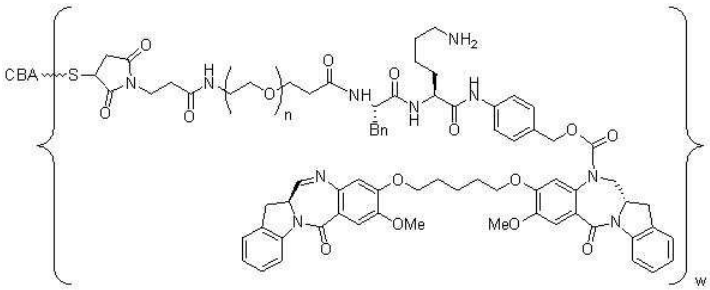
[0054] R은, 각각의 경우에, H, $-(CH_2CH_2O)_n-R^c$, C_{1-10}알킬, C_{3-8}사이클로알킬, 6- 내지 18-원 아릴, N, O 및 S로부터 독립적으로 선택된 하나 이상의 헤테로원자를 포함하는 5- 내지 18-원 헤테로아릴 고리, 또는 O, S, N 및 P로부터 독립적으로 선택된 1 내지 6 헤테로원자를 포함하는 3- 내지 18-원 헤테로사이클릭 고리로 이루어진 군으로부터 독립적으로 선택되고;

[0055] R' 및 R''은 -H, -OH, -OR, -NHR, $-NR_2$, -COR, C_{1-10}알킬, $-(CH_2CH_2O)_n-R^c$, 및 O, S, N 및 P로부터 독립적으로 선택된 1 내지 6 헤테로원자를 갖는 3- 내지 18-원 헤테로사이클릭 고리로부터 각각 독립적으로 선택되고;

[0056] R^5는 C_{3-12}알킬렌이고, 이 사슬은 -O-, -S-, -NH-, -NMe-, 벤젠 고리, 4 내지 7-원 헤테로아릴 고리 및 4 내지 7-원 헤테로사이클릭 고리로부터 선택된 하나 이상의 기에 의해 단절될 수 있고, 여기서 벤젠, 4 내지 7-원 헤테로아릴 고리 및 4 내지 7-원 헤테로사이클릭 고리는 1 내지 4 R^6으로 치환되고;

[0057] R^6은 각각의 경우에 H, C_{1-10}알킬, $-(CH_2CH_2O)_n-R^c$, 할로겐, $-NH(C=NH)NH_2$, -OR, -NR'R'', $-NO_2$, -NCO, -NR'COR'', -SR, -SOR', $-SO_2R'$, $-SO_3H$, $-OSO_3H$, $-SO_2NR'R''$, -CN, $-N_3$, -COR', -OCOR', 및 -OCONR'R''로부터 독립적으로 선택되고;

[0058] R^{L1}은 CBA에 공유적으로 연결된 자가 희생 링커이고, 단 화학식 (V)의 접합체는:

[0059] 

^{w}가 아니다.

[0060] 본 발명은 또한 본원에 기재된 본 발명의 세포독성 화합물 또는 접합체 및 담체(약제학적으로 허용되는 담체)를 포함하는 조성물(*예를 들어*, 약제학적 조성물)을 포함한다. 본 화합물, 접합체 또는 조성물은 비정상 세포 성장 억제 또는 포유동물(*예를 들어*, 인간)의 증식성 장애(*예를 들어*, 암), 자가면역 장애, 파괴성 골 장애, 감염성 질환, 바이러스성 질환, 섬유성 질환, 신경퇴행성 장애, 췌장염 또는 신장 질환 치료에 유용하다.

[0061] 비정상 세포 성장 억제 또는 포유동물(예를 들어, 인간)의 증식성 장애(예를 들어, 암), 자가면역 장애, 파괴성 골 장애, 감염성 질환, 바이러스성 질환, 섬유성 질환, 신경퇴행성 장애, 췌장염 또는 신장 질환 치료를 위한 의약의 제조를 위한 본 발명의 세포독성 화합물, 접합체, 또는 조성물의 용도가 본 발명에 또한 포함된다.

도면의 간단한 설명

[0062] **도 1**은 OV90 이종이식편을 보유하는 SCID 마우스에서 항-FRα-55 접합체의 항종양 활성을 나타낸다.

도 2는 NCI-H2110 이종이식편을 보유하는 SCID 마우스에서 항-FRα-18 접합체의 항종양 활성을 나타낸다.

도 3은 FaDu 이종이식편을 보유하는 SCID 마우스에서 항-EGFR-79 접합체의 항종양 활성을 나타낸다.

도 4는 이시카와 이종이식편을 보유하는 SCID 마우스에서 항-FRα-46 접합체의 항종양 활성을 나타낸다.

도 5는 KB 이종이식편을 보유하는 SCID 마우스에서 항-FRα-18 접합체의 항종양 활성을 나타낸다.

도 6은 KB 이종이식편을 보유하는 SCID 마우스에서 항-FRα-46 접합체의 항종양 활성을 나타낸다.

도 7은 OCI-Ly18 이종이식편을 보유하는 SCID 마우스에서 huCD19-55 접합체의 항종양 활성을 나타낸다.

도 8은 본 발명의 예시적인 화합물의 DNA 결합 친화도를 나타낸다.

도 9는 다량의 DO (비접합 항체) 종 존재를 나타내는, 비교 화합물 **A**의 항체 접합체의 질량 분석법(MS) 데이터이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0063] 발명의 상세한 설명

[0064] 이제 본 발명의 특정 실시양태에 대한 언급이 상세하게 이루어질 것이며, 그 예가 첨부된 구조식 및 화학식에 예시된다. 비록 본 발명이 열거된 실시양태와 관련하여 설명될 것이지만, 본 발명을 그러한 실시양태로 제한하

도록 의도되지 않음이 이해될 것이다. 반대로, 본 발명은 청구범위에 의해 정의된 바와 같이 본 발명의 범위 내에 포함될 수 있는 모든 대안, 변형 및 균등물을 포함하도록 의도된다. 당업자는 본 발명의 실시에서 사용될 수 있는, 본 발명에 기재된 것과 유사하거나 동등한 많은 방법 및 재료를 인식할 것이다.

[0065] 본 발명의 상이한 양태 및 명세서의 상이한 부분에 설명된 것을 포함하여 (실시예에서만 설명된 구체예를 포함하여) 본원에 기재된 임의의 구체예가 명시적으로 부인되거나 부적절하지 않는 한 본 발명의 하나 이상의 다른 구체예와 조합될 수 있음을 이해해야 한다. 구체예의 조합은 다수의 종속 청구항을 통해 청구된 특정 조합으로 제한되지 않는다.

[0066] 정의

[0067] 본원에 사용된 용어 "알킬' 또는 "선형 또는 분지형 알킬"은 포화 선형 또는 분지형 일가 탄화수소 라디칼을 지칭한다. 바람직한 구체예에서, 직쇄 또는 분지쇄 알킬은 삼십 개 이하의 탄소 원자를 갖고 (예를 들어, 직쇄 알킬 기에 대해 C_1-C_{30} 및 분지 알킬에 대해 C_3-C_{30}), 더욱 바람직하게는 이십 개 이하의 탄소 원자를 갖는다. 보다 더 바람직하게는, 직쇄 또는 분지쇄 알킬은 열 개 이하의 탄소 원자를 갖는다 (즉, 직쇄 알킬 기에 대해 C_1-C_{10} 및 분지쇄 알킬에 대해 C_3-C_{10}). 다른 구체예에서, 직쇄 또는 분지쇄 알킬은 여섯 개 이하의 탄소 원자를 갖는다 (즉, 직쇄 알킬 기에 대해 C_1-C_6 또는 분지쇄 알킬에 대해 C_3-C_6). 알킬의 예는 메틸, 에틸, 1-프로필, 2-프로필, 1-부틸, 2-메틸-1-프로필, $-CH_2CH(CH_3)_2$), 2-부틸, 2-메틸-2-프로필, 1-펜틸, 2-펜틸 3-펜틸, 2-메틸-2-부틸, 3-메틸-2-부틸, 3-메틸-1-부틸, 2-메틸-1-부틸, 1-헥실), 2-헥실, 3-헥실, 2-메틸-2-펜틸, 3-메틸-2-펜틸, 4-메틸-2-펜틸, 3-메틸-3-펜틸, 2-메틸-3-펜틸, 2,3-디메틸-2-부틸, 3,3-디메틸-2-부틸, 1-헵틸, 1-옥틸 등을 포함하지만 이에 제한되지 않는다. 더욱이, 명세서, 실시예 및 청구범위 전반에 걸쳐 사용되는 용어 "알킬"은 "비치환 알킬" 및 "치환된 알킬"을 모두 포함하도록 의도되고, 후자는 탄화수소 뼈대의 하나 이상의 탄소에서 수소를 대체하는 치환기를 갖는 알킬 모이어티를 지칭한다. 본원에 사용된 (C_x-C_{xx})알킬 또는 C_{x-xx}알킬은 x-xx 개의 탄소 원자를 갖는 선형 또는 분지형 알킬을 의미한다.

[0068] 본원에 사용된 용어 "알킬렌"은 포화 선형 또는 분지형 이가 탄화수소 라디칼을 지칭한다. 바람직한 구체예에서, 직쇄 또는 분지쇄 알킬렌은 삼십 개 이하의 탄소 원자를 갖고 (예를 들어, 직쇄 알킬렌 기에 대해 C_1-C_{30} 및 분지 알킬렌에 대해 C_3-C_{30}), 더욱 바람직하게는 이십 개 이하의 탄소 원자를 갖는다. 보다 더 바람직하게는, 직쇄 또는 분지쇄 알킬렌은 열 개 이하의 탄소 원자를 갖는다 (즉, 직쇄 알킬렌 기에 대해 C_1-C_{10} 및 분지쇄 알킬렌에 대해 C_3-C_{10}). 다른 구체예에서, 직쇄 또는 분지쇄 알킬렌은 여섯 개 이하의 탄소 원자를 갖는다 (즉, 직쇄 알킬렌 기에 대해 C_1-C_6 또는 분지쇄 알킬렌에 대해 C_3-C_6). 본원에 사용된 (C_x-C_{xx})알킬렌 또는 C_{x-xx}알킬렌은 x-xx 개의 탄소 원자를 갖는 선형 또는 분지형 알킬렌을 의미한다.

[0069] 용어 "알케닐" 또는 "선형 또는 분지형 알케닐"은 적어도 하나의 불포화 부위, 즉, 탄소-탄소 이중 결합이 있는 두 개 내지 스무 개의 탄소 원자의 선형 또는 분지형-사슬 일가 탄화수소 라디칼을 지칭하고, 여기서 알케닐 라디칼은 "시스" 및 "트랜스" 배향, 또는 대안적으로, "E" 및 "Z" 배향을 갖는 라디칼을 포함한다. 예는 에틸렌일 또는 비닐 ($-CH=CH_2$), 알릴 ($-CH_2CH=CH_2$), 등을 포함하지만 이에 제한되지 않는다. 바람직하게는, 알케닐은 두 개 내지 열 개의 탄소 원자를 갖는다. 더욱 바람직하게는, 알킬은 두 개 내지 네 개의 탄소 원자를 갖는다.

[0070] 용어 "알키닐" 또는 "선형 또는 분지형 알키닐"은 적어도 하나의 불포화 부위, 즉, 탄소-탄소, 삼중 결합이 있는 두 개 내지 스무 개의 탄소 원자의 선형 또는 분지형 일가 탄화수소 라디칼을 지칭한다. 예는 에티닐, 프로피닐, 1-부티닐, 2-부티닐, 1-펜티닐, 2-펜티닐, 3-펜티닐, 헥시닐, 등을 포함하지만 이에 제한되지 않는다. 바람직하게는, 알키닐은 두 개 내지 열 개의 탄소 원자를 갖는다. 더욱 바람직하게는, 알키닐은 두 개 내지 네 개의 탄소 원자를 갖는다.

[0071] 용어 "사이클릭 알킬" 및 "사이클로알킬"은 상효 교환적으로 사용될 수 있다. 본원에 사용된 용어는 포화 카르보사이클릭 고리의 라디칼을 지칭한다. 바람직한 구체예에서, 사이클로알킬은 그의 고리 구조에서 3 내지 10 개의 탄소 원자, 더욱 바람직하게는 고리 구조에서 5 내지 7 개의 탄소 원자를 갖는다. 일부 구체예에서, 두 개의 사이클릭 고리는 둘 이상의 원자를 공통으로 가질 수 있고, *예를 들어,* 고리는 "접합 고리"이다. 적합한 사이클로알킬은 사이클로헵틸, 사이클로헥실, 사이클로펜틸, 사이클로부틸 및 사이클로프로필을 포함하지만 이에 제한되지 않는다. 일부 구체예에서, 사이클로알킬은 단환 기이다. 일부 구체예에서, 사이클로알킬은 이환 기이다. 일부 구체예에서, 사이클로알킬은 삼환 기이다.

[0072] 용어 "사이클로알킬알킬"은 사이클로알킬 기로 치환된 상기 기재된 알킬 기를 지칭한다.

[0073] 용어 "사이클릭 알케닐"은 고리 구조에서 적어도 하나의 이중 결합을 갖는 카르보사이클릭 고리 라디칼을 지칭한다.

[0074] 용어 "사이클릭 알키닐"은 고리 구조에서 적어도 하나의 삼중 결합을 갖는 카르보사이클릭 고리 라디칼을 지칭한다.

[0075] 본원에 사용된 용어 "아릴" 또는 "방향족 고리"는 치환 또는 비치환 단일-고리 방향족 기를 포함하고 여기서 고리의 각각의 원자는 탄소이다. 바람직하게는 고리는 5- 내지 7-원 고리, 더욱 바람직하게는 6-원 고리이다. 아릴 기는 페닐, 페놀, 아닐린 등을 포함하지만 이에 제한되지 않는다. 용어 "아릴"은 또한 두 개 이상의 원자가 두 개의 인접한 고리에 공통인 두 개 이상의 고리를 갖는 "폴리사이클릴", "폴리사이클", 및 "폴리사이클릭" 고리 시스템을 포함하고, *예를 들어,* 고리는 "접합 고리"이고, 여기서 고리 중 적어도 하나는 방향족이고, *예를 들어,* 다른 사이클릭 고리는 사이클로알킬, 사이클로알케닐, 사이클로알키닐, 또는 방향족 고리일 수 있다. 일부 바람직한 구체예에서, 폴리사이클은 2-3 개의 고리를 갖는다. 특정한 바람직한 구체예에서, 폴리사이클릭 고리 시스템은 고리가 모두 방향족인 두 개의 사이클릭 고리를 갖는다. 폴리사이클의 각각의 고리는 치환되거나 치환되지 않을 수 있다. 특정 구체예에서, 폴리사이클의 각각의 고리는 고리에 3 내지 10 개, 바람직하게는 5 내지 7 개의 탄소 원자를 포함한다. 예를 들어, 아릴 기는 페닐, 톨릴, 안트라세닐, 플루오레닐, 인데닐, 아줄레닐, 및 나프틸뿐만 아니라 벤조-접합 카르보사이클릭 모이어티, 예컨대 5,6,7,8-테트라하이드로나프틸 등을 포함하지만 이에 제한되지 않는다. 일부 구체예에서, 아릴은 단일-고리 방향족 기이다. 일부 구체예에서, 아릴은 2-고리 방향족 기이다. 일부 구체예에서, 아릴은 3-고리 방향족 기이다.

[0076] 본원에 사용된 용어 "헤테로사이클", "헤테로사이클릴" 및 "헤테로사이클릭 고리"는 고리 구조가 적어도 한 개의 헤테로원자, 바람직하게는 한 개 내지 네 개의 헤테로원자, 더욱 바람직하게는 한 개 또는 두 개의 헤테로원자를 포함하는, 3- 내지 18-원 고리, 바람직하게는 3- 내지 10-원 고리, 더욱 바람직하게는 3- 내지 7-원 고리의 치환 또는 비치환 비-방향족 고리 구조를 지칭한다. 특정 구체예에서, 고리 구조는 두 개의 사이클릭 고리를 가질 수 있다. 일부 구체예에서, 두 개의 사이클릭 고리는 두 개 이상의 원자를 공통으로 가질 수 있고, *예를 들어,* 고리는 "접합 고리"이다. 헤테로사이클릴 기는 예를 들어 피페리딘, 피페라진, 피롤리딘, 모르폴린, 락톤, 락탐 등을 포함한다. 헤테로사이클은 Paquette, Leo A.; "Principles of Modern Heterocyclic Chemistry" (W. A. Benjamin, New York, 1968), 특히 Chapters 1, 3, 4, 6, 7, 및 9; "The Chemistry of Heterocyclic Compounds, A series of Monographs" (John Wiley & Sons, New York, 1950 to present), 특히 Volumes 13, 14, 16, 19, 및 28; 및 J. Am. Chem. Soc. (1960) 82:5566에 기재된다. 헤테로사이클릭 고리의 예는 테트라하이드로퓨란, 디하이드로퓨란, 테트라하이드로티엔, 테트라하이드로피란, 디하이드로피란, 테트라하이드로티오피란, 티오모르폴린, 티옥산, 호모피페라진, 아제티딘, 옥세탄, 티에탄, 호모피페리딘, 피페리딘, 피페라진, 피롤리딘, 모르폴린, 옥세판, 티에판, 옥사제핀, 디아제핀, 티아제핀, 2-피롤린, 3-피롤린, 인돌린, 2H-피란, 4H-피란, 디옥산, 1,3-디옥솔란, 피라졸린, 디티안, 디티올란, 디하이드로피란, 디하이드로티엔, 디하이드로퓨란, 피라졸리디닐이미다졸린, 이미다졸리딘, 3-아자바이사이클로[3.1.0]헥산, 3-아자바이사이클로[4.1.0]헵탄, 및 아자바이사이클로[2.2.2]헥산을 포함하지만 이에 제한되지 않는다. 스피로 모이어티도 이 정의의 범위에 포함된다.

[0077] 고리 원자가 옥소 (=O) 모이어티로 치환된 헤테로사이클릭 기의 예는 피리미디논 및 1,1-디옥소-티오모르폴린이다.

[0078] 본원에 사용된 용어 "헤테로아릴" 또는 "헤테로방향족 고리"는 고리 구조가 적어도 한 개의 헤테로원자 *(예를 들어,* O, N, 또는 S), 바람직하게는 한 개 내지 네 개 또는 한 개 내지 세 개의 헤테로원자, 더욱 바람직하게는 한 개 또는 두 개의 헤테로원자를 포함하는, 치환 또는 비치환 방향족 단일 고리 구조, 바람직하게는 6- 내지 18-원 고리, 바람직하게는 5- 내지 7-원 고리, 더욱 바람직하게는 5- 내지 6-원 고리를 지칭한다. 두 개 이상의 헤테로원자가 헤테로아릴 고리에 존재할 때, 이들은 동일하거나 상이할 수 있다. 용어 "헤테로아릴"은 또한 두 개 이상의 고리 원자가 두 개의 인접한 고리에 공통인 두 개 이상의 사이클릭 고리를 갖는 "폴리사이클릴", "폴리사이클", 및 "폴리사이클릭" 고리 시스템을 포함하고, *예를 들어,* 고리는 "접합 고리"이고, 여기서 고리 중 적어도 하나는 헤테로방향족이고, *예를 들어,* 다른 사이클릭 고리는 사이클로알킬, 사이클로알케닐, 사이클로알키닐, 아릴, 헤테로방향족 및/또는 헤테로사이클릴일 수 있다. 일부 바람직한 구체예에서, 폴리사이클릭 헤테로아릴은 2-3 개의 고리를 갖는다. 특정 구체예에서, 바람직한 폴리사이클릭 헤테로아릴은 고리가 모두 방향족인 두 개의 사이클릭 고리를 갖는다. 특정 구체예에서, 폴리사이클의 각각의 고리는 고리에서 3 내지 10 개의

원자, 바람직하게는 고리에서 5 내지 7 개의 원자를 포함한다. 예를 들어, 헤테로아릴 기는 피롤, 퓨란, 티오펜, 이미다졸, 옥사졸, 티아졸, 피라졸, 피리딘, 피라진, 피리다진, 퀴놀린, 피리미딘, 인돌리진, 인돌, 인다졸, 벤즈이미다졸, 벤조티아졸, 벤조퓨란, 벤조티오펜, 신놀린, 프탈라진, 퀴나졸린, 카르바졸, 페녹사진, 퀴놀린, 퓨린 등을 포함하지만 이에 제한되지 않는다. 일부 구체예에서, 헤테로아릴은 단일-고리 방향족 기이다. 일부 구체예에서, 헤테로아릴은 2-고리 방향족 기이다. 일부 구체예에서, 헤테로아릴은 3-고리 방향족 기이다.

[0079] 헤테로사이클 또는 헤테로아릴 기는 가능한 경우 부착된 탄소(탄소-연결) 또는 질소(질소-연결)일 수 있다. 제한이 아닌 예로서, 탄소 결합된 헤테로사이클 또는 헤테로아릴은 피리딘의 위치 2, 3, 4, 5, 또는 6, 피리다진의 위치 3, 4, 5, 또는 6, 피리미딘의 위치 2, 4, 5, 또는 6, 피라진의 위치 2, 3, 5, 또는 6, 퓨란, 테트라하이드로퓨란, 티오퓨란, 티오펜, 피롤 또는 테트라하이드로피롤의 위치 2, 3, 4, 또는 5, 옥사졸, 이미다졸 또는 티아졸의 위치 2, 4, 또는 5, 이속사졸, 피라졸, 또는 이소티아졸의 위치 3, 4, 또는 5, 아지리딘의 위치 2 또는 3, 아제티딘의 위치 2, 3, 또는 4, 퀴놀린의 위치 2, 3, 4, 5, 6, 7, 또는 8 또는 이소퀴놀린의 위치 1, 3, 4, 5, 6, 7, 또는 8에서 결합된다.

[0080] 제한이 아닌 예로서, 질소 결합된 헤테로사이클 또는 헤테로아릴은 아지리딘, 아제티딘, 피롤, 피롤리딘, 2-피롤린, 3-피롤린, 이미다졸, 이미다졸리딘, 2-이미다졸린, 3-이미다졸린, 피라졸, 피라졸린, 2-피라졸린, 3-피라졸린, 피페리딘, 피페라진, 인돌, 인돌린, 1H-인다졸의 위치 1, 이소인돌, 또는 이소인돌린의 위치 2, 모르폴린의 위치 4, 및 카르바졸 또는 β-카르볼린의 위치 9에서 결합된다.

[0081] 헤테로아릴 또는 헤테로사이클릴에 존재하는 헤테로원자는 NO, SO, 및 SO_2와 같은 산화된 형태를 포함한다.

[0082] 일부 구체예에서, 헤테로방향족 고리는 5- 내지 18-원 고리이다.

[0083] 용어 "할로" 또는 "할로겐"은 플루오린(F), 염소(Cl), 브로민(Br) 또는 아이오딘(I)을 지칭한다. 일부 구체예에서, 할로겐은 플루오린이다. 일부 구체예에서, 할로겐은 염소이다. 일부 구체예에서, 할로겐은 브로민이다. 일부 구체예에서, 할로겐은 아이오딘이다. 본원에 사용된 용어 "할로알킬"은 본원에 정의된 바와 같은 하나 이상의 할로 기로 치환된 본원에 정의된 바와 같은 알킬을 지칭한다. 할로알킬은 모노할로알킬, 디할로알킬 또는 폴리할로알킬일 수 있다. 모노할로알킬은 하나의 플루오로, 클로로, 브로모 또는 아이오도 치환기를 가질 수 있다. 디할로알킬 또는 폴리할로알킬은 두 개 이상의 동일한 할로 원자 또는 상이한 할로 기의 조합으로 치환될 수 있다. 할로알킬의 예는 플루오로메틸, 디플루오로메틸, 트리플루오로메틸, 클로로아메틸, 디클로로메틸, 트리클로로메틸, 펜타플루오로에틸, 헵타플루오로프로필, 디플루오로클로로메틸, 디클로로플루오로메틸, 디플루오로에틸, 디플루오로프로필, 디클로로에틸 및 디클로로프로필을 포함하지만 이에 제한되지 않는다.

[0084] 본원에 사용된 용어 "알콕시"는 알킬-O-를 지칭하고, 여기서 알킬은 본원에서 위에 정의된 바와 같다. 알콕시의 예는 메톡시, 에톡시, 프로폭시, 2-프로폭시, 부톡시, tert-부톡시, 펜틸옥시, 헥실옥시 등을 포함하지만 이에 제한되지 않는다.

[0085] 상기 기재된 알킬, 할로알킬, 알콕시, 알케닐, 알키닐, 사이클릭 알킬, 사이클릭 알케닐, 사이클릭 알키닐, 카보사이클릴, 아릴, 헤테로사이클릴 및 헤테로아릴은 하나 이상의 (*예를 들어*, 2, 3, 4, 5, 6 또는 그 이상의) 치환기로 임의로 치환될 수 있다.

[0086] "비치환"으로 구체적으로 언급되지 않는 한, 본원의 화학적 모이어티에 대한 언급은 또한 치환된 변형을 포함하는 것으로 이해된다. 예를 들어, "알킬" 기 또는 모이어티에 대한 언급은 치환 및 비치환 변형 모두를 암묵적으로 포함한다. 화학적 모이어티상의 치환기의 예는 할로겐, 하이드록실, 카르보닐 (예컨대 카르복실, 알콕시카르보닐, 포르밀, 또는 아실), 티오카르보닐 (예컨대 티오에스테르, 티오아세테이트, 또는 티오포르메이트), 알콕실, 알킬티오, 아실옥시, 포스포릴, 포스페이트, 포스포네이트, 아미노, 아미도, 아미딘, 이민, 시아노, 니트로, 아지도, 설프하이드릴, 알킬티오, 설페이트, 설포네이트, 설파모일, 설폰아미도, 설포닐, 헤테로사이클릴, 아랄킬, 또는 아릴 또는 헤테로아릴 모이어티를 포함하지만 이에 제한되지 않는다.

[0087] "임의의" 또는 "임의로"는 이후에 설명되는 상황이 발생하거나 발생하지 않을 수 있음을 의미하며, 따라서 본 출원은 상황이 발생하는 경우와 발생하지 않는 경우를 포함한다. 예를 들어, 어구 "임의로 치환된"은 주어진 원자에 비수소 치환기가 존재하거나 존재하지 않을 수 있음을 의미하고, 따라서 본 출원은 비수소 치환기가 존재하는 구조 및 비수소 치환기가 존재하지 않는 구조를 포함한다.

[0088] 용어 "치환된"은 하나 이상의 탄소, 질소, 산소 또는 황 원자에서 수소를 대체하는 치환기를 갖는 모이어티를 지칭한다. "치환" 또는 "~로 치환된"은 그러한 치환이 치환된 원자 및 치환기의 허용된 원자가에 따르고, 치환

이 안정한 화합물을 생성한다는, 예를 들어, 재배열, 고리화, 제거 등과 같은 변형을 자발적으로 겪지 않는다는 묵시적 단서를 포함하는 것으로 이해될 것이다. 본원에 사용된 용어 "치환된"은 유기 화합물의 모든 허용 가능한 치환기를 포함하는 것으로 고려된다. 광범위한 측면에서, 허용 가능한 치환기는 유기 화합물의 비환형 및 환형, 분지형 및 비분지형, 카르보사이클릭 및 헤테로사이클릭, 방향족 및 비방향족 치환기를 포함한다. 허용 가능한 치환기는 적절한 유기 화합물에 대해 하나 이상이고 동일하거나 상이할 수 있다. 본 발명의 목적을 위해, 질소와 같은 헤테로원자는 수소 치환기 및/또는 헤테로원자의 원자가를 만족시키는 본원에 기재된 유기 화합물의 임의의 허용 가능한 치환기를 가질 수 있다. 치환기는 본원에 기재된 임의의 치환기, 예를 들어, 할로겐, 하이드록실, 카르보닐 (예컨대 카르복실, 알콕시카르보닐, 포르밀, 또는 아실), 티오카르보닐 (예컨대 티오에스테르, 티오아세테이트, 또는 티오포르메이트), 알콕시, 알킬티오, 아실옥시, 포스포릴, 포스페이트, 포스포네이트, 아미노, 아미도, 아미딘, 이민, 시아노, 니트로, 아지도, 설프하이드릴, 알킬티오, 설페이트, 설포네이트, 설파모일, 설폰아미도, 설포닐, 헤테로사이클릴, 아랄킬, 또는 방향족 또는 헤테로방향족 모이어티를 포함할 수 있다. 예시를 위해, 모노플루오로알킬은 플루오로 치환기로 치환된 알킬이고, 디플루오로알킬은 두 개의 플루오로 치환기로 치환된 알킬이다. 치환기에 하나 이상의 치환이 있는 경우, 각각의 비수소 치환기는 (달리 언급되지 않는 한) 동일하거나 상이할 수 있음을 인식해야 한다.

[0089] 치환기의 탄소가 치환기의 목록 중 하나 이상으로 임의로 치환된 것으로 기재된 경우, 탄소상의 수소 중 하나 이상이 (존재하는 정도까지) 개별적으로 및/또는 함께 독립적으로 선택된 임의의 치환기로 대체될 수 있다. 치환기의 질소가 치환기의 목록 중 하나 이상으로 임의로 치환된 것으로 기재되는 경우, 질소상의 수소 중 하나 이상이 (존재하는 정도까지) 독립적으로 선택된 임의의 치환기로 대체될 수 있다. 하나의 예시적인 치환기는 -NR'R''로 묘사될 수 있고, 여기서 R' 및 R''는 이들의 부착된 질소 원자와 함께 헤테로사이클릭 고리를 형성할 수 있다. R' 및 R''로부터 형성된 헤테로사이클릭 고리는 이들이 부착된 질소 원자와 함께 부분적으로 또는 완전히 포화될 수 있다. 일부 구체예에서, 헤테로시클릭 고리는 3 내지 7개의 원자로 이루어진다. 다른 구체예에서, 헤테로사이클릭 고리는 피롤릴, 이미다졸릴, 피라졸릴, 트리아졸릴, 테트라졸릴, 이속사졸릴, 피리딜 및 티아졸릴로부터 선택된다.

[0090] 이 명세서는 용어 "치환기", "라디칼" 및 "기"를 상호 교환적으로 사용한다.

[0091] 치환기의 기가 치환기의 목록 중 하나 이상에 의해 임의로 치환되는 것으로 집합적으로 기재되는 경우, 기는: (1) 치환 불가능 치환기, (2) 임의의 치환기에 의해 치환되지 않은 치환 가능 치환기, 및/또는 (3) 하나 이상의 임의의 치환기에 의해 치환된 치환 가능 치환기를 포함할 수 있다.

[0092] 치환기가 특정 수 이하의 비수소 치환기로 임의로 치환되는 것으로 기재되는 경우, 치환기는 (1) 치환되지 않거나; (2) 비수소 치환기의 해당 특정 수 이하 또는 치환기상의 치환 가능 위치의 최대 수 이하 중 더 적은 것으로 치환될 수 있다. 따라서, 예를 들어, 치환기가 3 개 이하의 비수소 치환기로 임의로 치환된 헤테로아릴로 기재되는 경우, 3 개 미만의 치환 가능 위치를 갖는 임의의 헤테로아릴이 치환 가능 위치를 갖는 만큼만 비수소 치환기로 임의로 치환될 것이다. 그러한 치환기는, 비제한적 예에서, 1 내지 10 개의 탄소 원자를 갖는 선형, 분지형 또는 환형 알킬, 알케닐 또는 알키닐, 아릴, 헤테로아릴, 헤테로사이클릴, 할로겐, 구아니디늄 [$-NH(C=NH)NH_2$], $-OR^{100}$, $NR^{101}R^{102}$, $-NO_2$, $-NR^{101}COR^{102}$, $-SR^{100}$, $-SOR^{101}$에 의해 표시되는 설폭사이드, $-SO_2R^{101}$에 의해 표시되는 설폰, 설포네이트 $-SO_3M$, 설페이트 $-OSO_3M$, $-SO_2NR^{101}R^{102}$에 의해 표시되는 설폰아미드, 시아노, 아지도, $-COR^{101}$, $-OCOR^{101}$, $-OCONR^{101}R^{102}$ 및 폴리에틸렌 글리콜 단위 $(-OCH_2CH_2)_nR^{101}$, (여기서 M은 H 또는 양이온 (예컨대 Na^+ 또는 K^+); R^{101}, R^{102} 및 R^{103}은 H, 1 내지 10 개의 탄소 원자를 갖는 선형, 분지형, 환형 알킬, 알케닐 또는 알키닐로부터 각각 독립적으로 선택됨), 폴리에틸렌 글리콜 단위 $(-OCH_2CH_2)_n-R^{104}$, (여기서 n은 1 내지 24의 정수, 6 내지 10 개의 탄소 원자를 갖는 아릴, 3 내지 10 개의 탄소 원자를 갖는 헤테로사이클릭 고리 및 5 내지 10 개의 탄소 원자를 갖는 헤테로아릴이고; R^{104}는 H 또는 1 내지 4 개의 탄소 원자를 갖는 선형 또는 분지형 알킬임)로부터 선택될 수 있고, 여기서 기에서 R^{100}, R^{101}, R^{102}, R^{103} 및 R^{104}에 의해 표시되는 알킬, 알케닐, 알키닐, 아릴, 헤테로아릴 및 헤테로사이클릴은 할로겐, -OH, -CN, $-NO_2$ 및 1 내지 4 개의 탄소 원자를 갖는 비치환 선형 또는 분지형 알킬로부터 독립적으로 선택된 하나 이상의 (*예를 들어*, 2, 3, 4, 5, 6 또는 그 이상의) 치환기로 임의로 치환된다. 바람직하게는, 위에 기재된 임의로 치환된 알킬, 알케닐, 알키닐, 사이클릭 알킬, 사이클릭 알케닐, 사이클릭 알키닐, 카르보사이클릴, 아릴, 헤테로사이클릴 및 헤테로아릴에 대한 치환기는 할

로겐, -CN, $-NR^{102}R^{103}$, $-CF_3$, $-OR^{101}$, 아릴, 헤테로아릴, 헤테로사이클릴, $-SR^{101}$, $-SOR^{101}$, $-SO_2R^{101}$ 및 $-SO_3M$을 포함한다.

[0093] 기의 탄소 원자의 수는 접두어 "C_{x-xx}" 또는 "C_x-C_{xx}"에 의해 본원에서 명시될 수 있고, 여기서 x 및 xx는 정수이다. 예를 들어, "C_{1-4}알킬" 또는 "C1-C4 알킬"은 1 내지 4 개의 탄소 원자를 갖는 알킬 기이다.

[0094] 용어 "화합물" 또는 "세포독성 화합물", "세포독성 이량체" 및 "세포독성 이량체 화합물"은 상호 교환적으로 사용된다. 이들은 구조 또는 화학식 또는 이의 임의의 유도체가 본 발명에 개시된 화합물 또는 참조에 의해 포함된 구조 또는 화학식 또는 이의 임의의 유도체를 포함하는 것으로 의도된다. 이 용어는 또한 본 발명에 개시된 모든 화학식의 화합물의 입체이성질체, 기하 이성질체, 호변이성질체, 용매화물, 대사물, 염(예를 들어, 약제학적으로 허용되는 염) 및 전구약물, 및 전구약물 염을 포함한다. 이 용어는 또한 전술한 것 중 임의의 것의 임의의 용매화물, 수화물 및 다형체를 포함한다. 본 출원에서 설명된 본 발명의 특정 양태에서 "입체이성질체", "기하 이성질체", "호변이성질체", "용매화물", "대사물", "염", "전구약물", "전구약물 염", "접합체", "접합체 염", "용매화물", "수화물" 또는 "다형체"의 구체적인 언급은, 용어 "화합물"이 이러한 다른 형태의 언급 없이 사용되는 경우 본 발명의 다른 양태에서 이들 형태의 의도된 생략으로 해석되지 않아야 한다.

[0095] 본원에 사용된 용어 "접합체"는 세포결합제에 연결된 본원에 기재된 화합물 또는 이의 유도체를 지칭한다.

[0096] 용어 "카이랄"은 거울상 파트너의 비중첩성 특성을 갖는 분자를 지칭하는 한편, 용어 "아카이랄"은 거울상 파트너에 중첩 가능한 분자를 지칭한다.

[0097] 용어 "입체이성질체"는 동일한 화학적 구성 및 연결성을 갖지만, 단일 결합에 대한 회전에 의해 상호전환될 수 없는 공간에서의 원자의 상이한 배향을 갖는 화합물을 지칭한다.

[0098] 용어 "부분입체이성질체"는 둘 이상의 카이랄성 중심을 갖고 분자가 서로 거울상이 아닌 입체이성질체를 지칭한다. 부분입체이성질체는 상이한 물리적 특성, 예를 들어 녹는점, 끓는점, 스펙트럼 특성 및 반응성을 갖는다. 부분입체이성질체의 혼합물은 결정화, 전기영동 및 크로마토그래피와 같은 고해상도 분석 절차에서 분리될 수 있다.

[0099] 용어 "거울상이성질체"는 서로 중첩 불가능한 거울상인 화합물의 두 입체이성질체를 지칭한다.

[0100] 본원에 사용된 입체화학적 정의 및 관례는 일반적으로 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," John Wiley & Sons, Inc., New York, 1994를 따른다. 본 발명의 화합물은 비대칭 또는 카이랄 중심을 포함할 수 있으므로, 여러 상이한 입체이성질체 형태로 존재한다. 부분입체이성질체, 거울상이성질체 및 회전장애이성질체를 포함하지만 이에 제한되지 않는 본 발명의 화합물의 모든 입체이성질체 형태, 및 라세미 혼합물과 같은 이들의 혼합이 본 발명의 일부를 형성하는 것으로 의도된다. 많은 유기 화합물이 광학 활성 형태로 존재하고, 즉 평면 편광의 평면을 회전시키는 능력을 갖는다. 광학 활성 화합물 기재에서, 접두사 D 및 L, 또는 R 및 S는 카이랄 중심(들)에 대한 분자의 절대 배열을 나타내기 위해 사용된다. 접두사 d 및 l 또는 (+) 및 (-)는 화합물에 의한 평면-편광의 회전 기호를 지정하기 위해 사용되며, (-) 또는 l은 화합물이 좌선성임을 의미한다. (+) 또는 d가 앞에 오는 화합물은 우선성이다. 주어진 화학 구조에 대해, 이들 입체이성질체는 서로 거울상임을 제외하고 동일하다. 특정 입체이성질체는 거울상이성질체로도 지칭될 수 있으며, 그러한 이성질체의 혼합물은 흔히 거울상이성질체 혼합물로 불린다. 거울상이성질체의 50:50 혼합물은 라세미 혼합물 또는 라세미체로 지칭되고, 이는 화학 반응 또는 과정에서 입체선택 또는 입체특이성이 없는 경우에 발생할 수 있다. 용어 "라세미 혼합물" 및 "라세미체"는 광학 활성이 없는, 두 거울상이성질체 종의 등몰 혼합물을 지칭한다.

[0101] 용어 "호변이성질체" 또는 "호변이성질체 형태"는 낮은 에너지 장벽을 통해 상호 변환 가능한 여러 상이한 에너지의 구조 이성질체를 지칭한다. 예를 들어, 양성자 호변이성질체(양성자성 호변이성질체로도 알려짐)는 케토-엔올 및 이민-엔아민 이성질화와 같은 양성자의 이동을 통한 상호 전환을 포함한다. 원자가 호변이성질체는 결합 전자의 일부의 재구성에 의한 상호 전환을 포함한다.

[0102] 본원에 사용된 용어 "약제학적으로 허용되는 염"은 본 발명의 화합물의 약제학적으로 허용되는 유기 또는 무기 염을 지칭한다. 예시적인 염은 설페이트, 시트레이트, 아세테이트, 옥살레이트, 클로라이드, 브로마이드, 아이오다이드, 니트레이트, 비설페이트, 포스페이트, 산 포스페이트, 이소니코티네이트, 락테이트, 살리실레이트, 산 시트레이트, 타르트레이트, 올레에이트, 탄네이트, 판토테네이트, 비타르트레이트, 아스코르베이트, 석시네

이트, 말레에이트, 젠티시네이트, 푸마레이트, 글루코네이트, 글루쿠로네이트, 사카레이트, 포르메이트, 벤조에이트, 글루타메이트, 메탄설포네이트 "메실레이트", 에탄설포네이트, 벤젠설포네이트, p-톨루엔설포네이트, 파모에이트 (즉, 1,1'-메틸렌-비스-(2-하이드록시-3-나프토에이트)) 염, 알칼리 금속 (예를 들어, 소듐 및 포타슘) 염, 알칼리 토금속 (예를 들어, 마그네슘) 염, 및 암모늄 염을 포함하지만 이에 제한되지 않는다. 약제학적으로 허용되는 염은 아세테이트 이온, 석시네이트 이온 또는 기타 반대 이온과 같은 또 다른 분자의 포함을 포함할 수 있다. 반대 이온은 모 화합물의 전하를 안정화시키는 임의의 유기 또는 무기 모이어티일 수 있다. 또한, 약제학적으로 허용되는 염은 구조에 하나 초과의 하전된 원자를 가질 수 있다. 다수의 하전된 원자가 약제학적으로 허용되는 염의 일부인 경우는 다수의 반대 이온을 가질 수 있다. 따라서, 약제학적으로 허용되는 염은 하나 이상의 하전된 원자 및/또는 하나 이상의 반대 이온을 가질 수 있다.

[0103] 본 발명의 화합물이 염기인 경우, 원하는 약제학적으로 허용되는 염은 당해 분야에서 이용 가능한 임의의 적합한 방법, 예를 들어, 무기산, 예컨대 염산, 브롬화수소산, 황산, 질산, 메탄설폰산, 인산 등을 사용하거나, 유기산, 예컨대 아세트산, 말레산, 석신산, 만델산, 푸마르산, 말론산, 피루브산, 옥살산, 글리콜산, 살리실산, 피라노시딜 산 , 예컨대 글루쿠론산 또는 갈락투론산, 알파 하이드록시 산, 예컨대 시트르산 또는 타르타르산, 아미노산, 예컨대 아스파르트산 또는 글루탐산, 방향족 산, 예컨대 벤조산 또는 신남산, 설폰산, 예컨대 p-톨루엔설폰산 또는 에탄설폰산 등을 사용하는 유리 염기의 처리에 의해 제조될 수 있다.

[0104] 본 발명의 화합물이 산인 경우, 원하는 약제학적으로 허용되는 염은 임의의 적합한 방법에 의해, 예를 들어, 유리 산을 무기 또는 유기 염기, 예컨대 아민 (일차, 이차 또는 삼차), 알칼리 금속 수산화물 또는 알칼리 토금속 수산화물 등으로 처리하여 제조될 수 있다. 적합한 염의 예시적인 예는 아미노산, 예컨대 글라이신 및 아르기닌, 암모니아, 일차, 이차, 및 삼차 아민, 및 환형 아민, 예컨대 피페리딘, 모르폴린 및 피페라진으로부터 유도된 유기 염, 및 소듐, 칼슘, 포타슘, 마그네슘, 망간, 철, 구리, 아연, 알루미늄 및 리튬으로부터 유도된 무기 염을 포함하지만 이에 제한되지 않는다.

[0105] 본원에서 사용된 용어 "용매화물"은 비공유 분자간 힘에 의해 결합된 물, 이소프로판올, 아세톤, 에탄올, 메탄올, DMSO, 에틸 아세테이트, 아세트산, 및 에탄올아민 디클로로메탄, 2-프로판올 등과 같은 화학량론적 또는 비화학량론적 양의 용매를 추가로 포함하는 화합물을 의미한다. 화합물의 용매화물 또는 수화물은 적어도 1 몰당량의 메탄올, 에탄올, 1-프로판올, 2-프로판올 또는 물과 같은 하이드록실 용매를 화합물에 첨가하여 이민 모이어티의 용매화 또는 수화를 야기하여 쉽게 제조된다.

[0106] 어구 "약제학적으로 허용되는"은 물질 또는 조성물이 제제에 포함되는 다른 성분, 및/또는 그로써 치료되는 포유동물과 화학적으로 및/또는 독성학적으로 양립 가능해야 함을 나타낸다.

[0107] 용어 "이탈기"는 치환 또는 전위 동안 떠나는 하전 또는 비하전 모이어티의 기를 지칭한다. 그러한 이탈기는 당업계에서 공지이며 할로겐, 에스테르, 알콕시, 하이드록실, 토실레이트, 트리플레이트, 메실레이트, 니트릴, 아지드, 카르바메이트, 디설파이드, 티오에스테르, 티오에테르 및 디아조늄 화합물을 포함하지만 이에 제한되지 않는다.

[0108] 용어 "반응성 에스테르"는 아민 기와 쉽게 반응하여 아미드 결합을 형성할 수 있는 용이하게 치환 가능한 이탈기를 갖는 에스테르를 지칭한다. 반응성 에스테르의 예는 N-하이드록시석신이미드 에스테르, N-하이드록시 설포석신이미드 에스테르, 니트로페닐 (예를 들어, 2 또는 4-니트로페닐) 에스테르, 디니트로페닐 (예를 들어, 2,4-디니트로페닐) 에스테르, 설포-테트라플루오로페닐 (예를 들어, 4 설포-2,3,5,6-테트라플루오로페닐) 에스테르, 또는 펜타플루오로페닐 에스테르를 포함하지만 이에 제한되지 않는다.

[0109] 용어 "반응성 기"는 세포결합제 또는 세포독성 화합물과 같은 다른 분자에 위치한 모이어티와 반응하여 공유 결합을 형성할 수 있는 기를 지칭한다. 반응성 기는 아민 반응성 기 및 티올 반응성 기를 포함하지만 이에 제한되지 않는다.

[0110] 용어 "아민 반응성 기"는 아민 기와 반응하여 공유 결합을 형성할 수 있는 기를 지칭한다. 예시적인 아민 반응성 기는 반응성 에스테르 기, 아실 할라이드, 설포닐 할라이드, 이미도에스테르, 또는 반응성 티오에스테르 기를 포함하지만 이에 제한되지 않는다. 특정 구체예에서, 아민 반응성 기는 반응성 에스테르 기이다. 한 구체예에서, 아민 반응성 기는 N-하이드록시석신이미드 에스테르 또는 N-하이드록시 설포-석신이미드 에스테르이다.

[0111] 용어 "티올-반응성 기"는 티올 (-SH) 기와 반응하여 공유 결합을 형성할 수 있는 기를 지칭한다. 예시적인 티올-반응성 기는 말레이미드, 할로아세틸, 알로아세트아미드, 비닐 설폰, 비닐 설폰아미드 또는 비닐 피리딘을 포함하지만 이에 제한되지 않는다. 한 구체예에서, 티올-반응성 기는 말레이미드이다.

[0112] 용어 "이작용성 가교제", "이작용성 링커" 또는 "가교제"는 두 개의 반응성 기를 보유하는 변형제를 지칭하고; 그 중 하나는 세포결합제와 반응할 수 있는 한편 다른 하나는 세포독성 화합물과 반응하여 두 모이어티를 함께 연결한다. 그러한 이작용성 가교제는 당업계에서 공지이다 (예를 들어 Isalm and Dent in *Bioconjugation* chapter 5, p218-363, Groves Dictionaries Inc. New York, 1999를 참조하라). 예를 들어, 티오에테르 결합을 통한 연결을 가능하게 하는 이작용성 가교제는 말레이미도 기를 도입하기 위한 *N*-석신이미딜-4-(N-말레이미도메틸)-사이클로헥산-1-카르복실레이트 (SMCC), 또는 아이오도아세틸 기를 도입하기 위한 *N*-석신이미딜-4-(아이오도아세틸)-아미노벤조에이트 (SIAB)를 포함한다. 말레이미도 기 또는 할로아세틸 기를 세포결합제에 도입하는 다른 이작용성 가교제는 당업계에서 공지이고 (Pierce Biotechnology Inc. P.O. Box 117, Rockland, IL 61105, USA로부터 입수 가능한미국 출원 2008/0050310, 20050169933 참조) 비스-말레이미도폴리에틸렌글리콜 (BMPEO), $BM(PEO)_2$, $BM(PEO)_3$, N-(β-말레이미도프로필옥시)석신이미드 에스테르 (BMPS), γ-말레이미도부티르산 N-석신이미딜 에스테르 (GMBS), ε-말레이미도카프로산 N-하이드록시석신이미드 에스테르 (EMCS), 5-말레이미도발레르산 NHS, HBVS, N-석신이미딜-4-(N-말레이미도메틸)-사이클로헥산-1-카르복시-(6-아미도카프로에이트), 이는 SMCC의 "장쇄" 유사체(LC-SMCC)임, m-말레이미도벤조일-N-하이드록시석신이미드 에스테르 (MBS), 4-(4-N-말레이미도페닐)-부티르산 하이드라자이드 또는 HCl 염 (MPBH), N-석신이미딜 3-(브로모아세트아미도)프로피오네이트 (SBAP), N-석신이미딜 아이오도아세테이트 (SIA), κ-말레이미도운데칸산 N-석신이미딜 에스테르 (KMUA), N-석신이미딜 4-(p-말레이미도페닐)-부티레이트 (SMPB), 석신이미딜-6-(β-말레이미도프로피온아미도)헥사노에이트 (SMPH), 석신이미딜-(4-비닐설포닐)벤조에이트 (SVSB), 디티오비스-말레이미도에탄 (DTME), 1,4-비스-말레이미도부탄 (BMB), 1,4 비스말레이미딜-2,3-디하이드록시부탄 (BMDB), 비스-말레이미도헥산 (BMH), 비스-말레이미도에탄 (BMOE), 설포석신이미딜 4-(N-말레이미도-메틸)사이클로헥산-1-카르복실레이트 (설포-SMCC), 설포석신이미딜(4-아이오도-아세틸)아미노벤조에이트 (설포-SIAB), m-말레이미도벤조일-N-하이드록시설포석신이미드 에스테르 (설포-MBS), N-(γ-말레이미도부트릴옥시)설포석신이미드 에스테르 (설포-GMBS), N-(ε-말레이미도카프로일옥시)설포석신이미드 에스테르 (설포-EMCS), N-(κ-말레이미도운데카노일옥시)설포석신이미드 에스테르 (설포-KMUS), 및 설포석신이미딜 4-(p-말레이미도페닐)부티레이트 (설포-SMPB)를 포함하지만 이에 제한되지 않는다.

[0113] 이종이작용성 가교제는 두 개의 상이한 반응성 기를 갖는 이작용성 가교제이다. 아민-반응성 *N*-하이드록시석신이미드 기 (NHS 기) 및 카르보닐-반응성 하이드라진 기 두 가지 모두를 포함하는 이종이작용성 가교제는 또한 본원에 기재된 세포독성 화합물을 세포결합제(*예를 들어*, 항체)와 연결하기 위해 사용될 수 있다. 그러한 상업적으로 입수 가능한 헤테로이작용성 가교제의 예는 석신이미딜 6-하이드라지노니코틴아미드 아세톤 하이드라존 (SANH), 석신이미딜 4-하이드라지도테레프탈레이트 하이드로클로라이드 (SHTH) 및 석신이미딜 하이드라지늄 니코티네이트 하이드로클로라이드 (SHNH)를 포함한다. 산-불안정 연결을 보유하는 접합체는 또한 본 발명의 하이드라진 보유 벤조디아제핀 유도체를 사용하여 제조될 수 있다. 사용될 수 있는 이작용성 가교제의 예는 석신이미딜-p-포르밀 벤조에이트 (SFB) 및 석신이미딜-p-포르밀페녹시아세테이트 (SFPA)를 포함한다.

[0114] 디설파이드 결합을 통해 세포결합제와 세포독성 화합물의 연결을 가능하게 하는 이작용성 가교제는 당업계에 공지되어 있고 디티오피리딜 기를 도입하기 위한 *N*-석신이미딜-3-(2-피리딜디티오)프로피오네이트 (SPDP), *N*-석신이미딜-4-(2-피리딜디티오)펜타노에이트 (SPP), *N*-석신이미딜-4-(2-피리딜디티오)부타노에이트 (SPDB), *N*-석신이미딜-4-(2-피리딜디티오)2-설포 부타노에이트 (설포-SPDB)를 포함한다. 디설파이드 기를 도입하기 위해 사용될 수 있는 다른 이작용성 가교제는 당업계에 공지되어 있고 미국 특허 6,913,748, 6,716,821 및 미국 특허 공개 20090274713 및 20100129314에 개시되며, 이들 모두는 본원에 참고로 포함된다. 대안적으로, 티올 기를 도입하는 2-이미노티올란, 호모시스테인 티오락톤 또는 S-아세틸석신산 무수물과 같은 가교제가 또한 사용될 수 있다.

[0115] 본원에 정의된 용어 "링커," "링커 모이어티," 또는 "연결 기"는 세포결합제 및 세포독성 화합물과 같은 두 기를 함께 연결하는 모이어티를 지칭한다. 일반적으로, 링커는 이것이 연결하는 두 기가 연결되는 조건에서 실질적으로 불활성이다. 이작용성 가교제는 하나의 반응성 기가 먼저 세포독성 화합물과 반응하여 링커 모이어티 및 제2 반응성 기를 보유하는 화합물을 제공할 수 있고, 이는 이후 세포결합제와 반응할 수 있도록, 링커 모이어티의 각 말단에 하나씩 두 개의 반응성 기를 포함할 수 있다. 대안적으로, 이작용성 가교제의 한 말단이 먼저 세포결합제와 반응하여 링커 모이어티 및 제2 반응성 기를 보유하는 세포결합제를 제공할 수 있고, 이는 이후 세포독성 화합물과 반응할 수 있다. 연결 모이어티는 특정 부위에서 세포독성 모이어티의 방출을 허용하는 화학 결합을 포함할 수 있다. 적합한 화학 결합은 당업계에 공지이고 디설파이드 결합, 티오에테르 결합, 산 불안정 결합, 광불안정 결합, 펩티데이스 불안정 결합 및 에스테레이스 불안정 결합을 포함한다 (예를 들어 미국 특허 5,208,020; 5,475,092; 6,441,163; 6,716,821; 6,913,748; 7,276,497; 7,276,499; 7,368,565; 7,388,026 및

7,414,073 참조). 디설파이드 결합, 티오에테르 및 펩티데이스 불안정 결합이 바람직하다. 본 발명에서 사용될 수 있는 다른 링커는 절단 불가능 링커, 예컨대 미국 공개 번호 20050169933에 상세히 설명된 것, 또는 하전된 링커 또는 친수성 링커를 포함하고 US 2009/0274713, US 2010/01293140 및 WO 2009/134976에 기재되며, 이들 각각은 본원에 참고로 명백하게 포함된다.

[0116] 용어 "자가 희생 링커"는 원거리 부위가 활성화될 때 세포독성 화합물의 방출을 허용할 링커를 지칭한다. 특정 구체예에서, 링커는 p-아미노벤질 단위를 포함한다. 그러한 일부 구체예에서, p-아미노벤질 알코올은 아미드 결합을 통해 아미노산 단위에 부착되고, 벤질 알코올과 약물 사이에 카르바메이트, 메틸카르바메이트, 또는 카르보네이트가 생성된다 (Hamann et al. (2005) Expert Opin. Ther. Patents (2005) 15:1087-1103). 일부 구체예에서, 링커는 p-아미노벤질옥시카르보닐(PAB)을 포함한다. 자가 희생 링커의 다른 예는 PAB 기와 전자적으로 유사한 방향족 화합물, 예컨대 2-아미노이미다졸-5-메탄올 유도체 (미국 특허 번호 7,375,078; Hay et al. (1999) Bioorg. Med. Chem. Lett. 9:2237) 및 오르토- 또는 파라-아미노벤질아세탈을 포함하지만 이에 제한되지 않는다. 일부 구체예에서, 아미드 결합 가수분해시 고리화를 겪는 스페이서, 예컨대 치환 및 비치환 4-아미노부티르산 아미드 (Rodrigues et al (1995) Chemistry Biology 2:223), 적절하게 치환된 바이사이클로[2.2.1] 및 바이사이클로[2.2.2] 고리 시스템 (Storm et al (1972) J. Amer. Chem. Soc. 94:5815) 및 2-아미노페닐프로피온산 아미드 (Amsberry, et al (1990) J. Org. Chem. 55:5867)가 사용될 수 있다. 글라이신 잔기의 α-탄소에 대한 약물의 연결은 ADC에서 유용할 수 있는 자가 희생 링커의 또 다른 예이다 (Kingsbury et al (1984) J. Med. Chem. 27:1447).

[0117] 용어 "아미노산"은 천연 발생 아미노산 또는 비천연 발생 아미노산을 지칭한다. 일부 구체예에서, 아미노산은 NH_2-C($R^{aa'}R^{aa}$)-C(=O)OH에 의해 표시되고, 여기서 R^{aa} 및 $R^{aa'}$은 각각 독립적으로 H, 1 내지 10 개의 탄소 원자를 갖는 임의로 치환된 선형, 분지형 또는 환형 알킬, 알케닐 또는 알키닐, 아릴, 헤테로아릴 또는 헤테로사이클릴이고 또는 R^{aa} 및 N-말단 질소 원자는 함께 헤테로사이클릭 고리를 형성할 수 있다 (*예를 들어*, 프롤린에서와 같이). 용어 "아미노산 잔기"는 -NH-C($R^{aa'}R^{aa}$)-C(=O)-와 같이 하나의 수소 원자가 아미노산의 아민 및/또는 카르복시 말단으로부터 제거될 때 상응하는 잔기를 지칭한다.

[0118] 용어 "펩타이드"는 펩타이드 (아미드) 결합에 의해 연결된 아미노산 단량체의 짧은 사슬을 지칭한다. 일부 구체예에서, 펩타이드는 2 내지 20 개의 아미노산 잔기를 포함한다. 다른 구체예에서, 펩타이드는 2 내지 10 또는 2 내지 8 개의 아미노산 잔기를 포함한다. 또 다른 구체예에서, 펩타이드는 2 내지 5 개의 아미노산 잔기를 포함한다. 본원에서 사용된 바와 같이, 펩타이드가 아미노산의 특정 서열에 의해 표시되는 본원에 기재된 세포독성제 또는 링커의 일부인 경우, 펩타이드는 세포독성제 또는 링커의 나머지에 양방향으로 연결될 수 있다.

[0119] 용어 "양이온"은 양전하를 띠는 이온을 지칭한다. 양이온은 일가(*예를 들어*, Na^+, K^+, *등*), 이가(*예를 들어*, Ca^{2+}, Mg^{2+}, *등*) 또는 다가(*예를 들어*, Al^{3+} *등*)일 수 있다. 바람직하게는, 양이온은 일가이다.

[0120] 본원에서 상호 교환적으로 사용되는 용어 "(인간) IL-3Rα," "인터루킨-3 수용체 알파" 또는 "CD123"은 달리 지시되지 않는 한 임의의 천연 (인간) IL-3Rα 또는 CD123을 지칭한다. CD123 단백질은 이종이량체 사이토카인 수용체(IL-3 수용체, 또는 IL-3R)의 인터루킨 3-특이적 서브유닛이다. IL-3R은 리간드 특이적 알파 서브유닛, 그리고 인터루킨 3 (IL3), 집락 자극 인자 2 (CSF2 / GM-CSF) 및 인터루킨 5 (IL5)에 대한 수용체에 의해 공유되는 신호 전달 공통 베타 서브유닛(CD131로도 알려짐)으로 구성된다. IL3에 대한 CD123/IL-3Rα의 결합은 베타 서브유닛에 따라 다르다. 베타 서브유닛은 리간드 결합에 의해 활성화되고, IL3의 생물학적 활성에 필요하다.

[0121] CD123에 대한 이러한 상기 모든 용어는 본원에 나타난 단백질 또는 핵산 서열을 지칭할 수 있다. 용어 "CD123/IL-3Rα"는 "전장", 미처리 CD123/IL-3Rα, 그뿐만 아니라 세포 내의 처리로부터 기인한 CD123/IL-3Rα의 임의의 형태를 포함한다. 상기 용어는 또한 CD123/IL-3Rα 단백질 또는 핵산 천연 발생 변이체, *예를 들어*, 스플라이스 변이체, 대립유전자 변이체 및 동형을 포함한다. 본원에 기재된 CD123/IL-3Rα 폴리펩타이드 및 폴리뉴클레오타이드는 다양한 공급원, 예컨대 인간 조직 유형 또는 또 다른 공급원으로부터 단리되거나, 재조합 또는 합성 방법에 의해 제조될 수 있다. CD123/IL-3Rα 서열의 예는 NCBI 참조 번호 NP_002174 & NM_002183 (인간 CD123 변이체 1에 대한 단백질 및 핵산 서열), 및 NP_001254642 & NM_001267713 (인간 CD123 변이체 2에 대한 단백질 및 핵산 서열)을 포함하지만 이에 제한되지 않는다.

[0122] 용어 "ADAM9"는 분자의 ADAM 패밀리의 구성원인 디스인테그린 및 메탈로프로테네이스 도메인-포함 단백질 9를 지칭한다. 그것은 활성 효소를 생성하기 위해 단백질 분해로 절단되는 비활성 형태로 합성된다. 상류 부위에서

의 처리는 전구효소의 활성화에 특히 중요하다. ADAM9는 섬유아세포(Zigrino, P. *et al.* (2011) "*The Disintegrin-Like And Cysteine-Rich Domains Of ADAM-9 Mediate Interactions Between Melanoma Cells And Fibroblasts*," J. Biol. Chem. 286:6801-6807), 활성화된 혈관 평활근 세포(Sun, C. *et al.* (2010) "*ADAM15 Regulates Endothelial Permeability And Neutrophil Migration Via Src/ERK1/2 Signalling*," Cardiovasc. Res. 87:348-355), 단핵구(Namba, K. *et al.* (2001) "*Involvement Of ADAM9 In Multinucleated Giant Cell Formation Of Blood Monocytes*," Cell. Immunol. 213:104-113) 및 활성화된 대식세포(Oksala, N. *et al.* (2009) "*ADAM-9, ADAM-15, And ADAM-17 Are Upregulated In Macrophages In Advanced Human Atherosclerotic Plaques In Aorta And Carotid And Femoral Arteries - Tampere Vascular Study*," Ann. Med. 41:279-290)에서 발현된다. 대표적인 인간 ADAM9 폴리펩타이드는 NCBI 서열 NP_003807이다. ADAM9 폴리펩타이드의 819 개의 아미노산 잔기 중, 잔기 1-28은 신호 서열이고, 잔기 29-697은 세포외 도메인이고, 잔기 698-718은 막관통 도메인이고, 잔기 719-819는 세포내 도메인이다. 세 개의 구조 도메인이 세포외 도메인 내에 위치한다: 레프롤리신 (M12B) 패밀리 아연 메탈로프로테이스 도메인 (대략 잔기 212-406에서); 디스인테그린 도메인 (대략 잔기 423-497에서); 및 EGF-유사 도메인 (대략 잔기 644-697에서). 다수의 번역 후 변형 및 동형이 확인되었고 단백질은 성숙한 단백질을 생성하기 위해 원형질막에 도달하기 전에 트랜스-골지 네트워크에서 단백질 분해적으로 절단된다. 프로-도메인의 제거는 둘의 상이한 부위에서 절단을 통해 일어난다. 처리는 프로-도메인과 촉매 도메인 사이의 경계에서 (Arg-205/Ala-206) 푸린과 같은 프로-단백질 전환효소에 의한 것이 가장 가능성이 높다. 추가적인 상류 절단 프로-단백질 전환효소 부위 (Arg-56/Glu-57)는 ADAM9의 활성화에 중요한 역할을 한다. 대표적인 시노몰구스 원숭이 ADAM9 폴리펩타이드는 가능한 28 개의 아미노산 잔기 신호 서열을 포함하는 NCBI 서열 XM_005563126.2이다. 단백질의 레프롤리신 (M12B) 패밀리 아연 메탈로프로테이스 도메인은 대략 잔기 212-406에 있고; 단백질의 디스인테그린 도메인은 대략 잔기 423-497에 있다.

[0123] 용어 "항체"는 면역글로불린 분자의 가변 영역 내의 적어도 하나의 항원 인식 부위를 통하여 표적, 예컨대 단백질, 폴리펩타이드, 펩타이드, 탄수화물, 폴리뉴클레오타이드, 지질, 또는 이들의 조합을 인식하고 특이적으로 결합하는 면역글로불린 분자를 의미한다. 본원에서 사용된 용어 "항체"는 온전한 다중클론 항체, 온전한 단일클론 항체, 항체 단편 (예컨대 Fab, Fab', $F(ab')_2$, 및 Fv 단편), 단일 사슬 Fv (scFv) 돌연변이체, 이중특이적 항체와 같은 다중특이적 항체, 키메라 항체, 인간화 항체, 인간 항체, 항체의 항원 결정 부분을 포함하는 융합 단백질, 및 항체가 원하는 생물학적 활성을 나타내는 한 항원 인식 부위를 포함하는 임의의 다른 변형된 면역글로불린 분자를 포함한다. 항체는 각각 알파, 델타, 엡실론, 감마 및 뮤로 지칭되는 이들의 중쇄 불변 도메인의 정체성이 기초하여 면역글로불린의 임의의 다섯 가지의 주요 클래스: IgA, IgD, IgE, IgG, 및 IgM, 또는 이의 서브클래스(아이소타입)(예를 들어 IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1 및 IgA2)에 속할 수 있다. 상이한 클래스의 면역글로불린은 상이하고 잘 알려진 서브유닛 구조 및 3-차원 배열을 갖는다. 항체는 노출되거나 독소, 방사성 동위원소 등과 같은 다른 분자와 접합될 수 있다.

[0124] 일부 구체예에서, 항체는 비천연 발생 항체이다. 일부 구체예에서, 항체는 천연 성분으로부터 정제된다. 일부 구체예에서, 항체는 재조합으로 생성된다. 일부 구체예에서, 항체는 하이브리도마에 의해 생성된다.

[0125] 용어 CD123/IL-3Rα"에 (특이적으로) 결합하는 "항-CD123 항체", "항-IL-3Rα 항체" 또는 "항체는 항체가 CD123/IL-3Rα 표적화에서 진단제 및/또는 치료제로서 유용하도록 충분한 친화도로 CD123 / IL-3Rα에 결합할 수 있는 항체를 지칭한다. 달리 명시되지 않는 한, 관련되지 않은, 비-CD123/IL-3Rα 단백질에 대한 항-CD123/IL-3Rα 항체의 결합 정도는 *예를 들어*, 방사면역검정(RIA)에 의해 측정하여 CD123/IL-3Rα에 대한 항체의 결합의 약 10% 미만이다. 특정 구체예에서, CD123/IL-3Rα에 결합하는 항체는 ≤0.5 nM, ≤0.3 nM, ≤0.1 nM, ≤0.05 nM, 또는 ≤0.01 nM의 해리 상수(K_d)를 갖는다. 한 구체예에서, 항-CD123/IL-3Rα 항체는 공통 베타 사슬 CD131에 결합하지 않는다. 한 구체예에서, 항-CD123/IL-3Rα 항체는 7G3 (마우스 IgG_{2a}), 6H6 (마우스 IgG_1), 및 9F5 (마우스 IgG_1)와 같은 공지되고 상업적으로 입수 가능한 CD123 항체에 의해 결합된 CD123의 동일한 에피토프에 결합하지 않는다 (Sun *et al.*, *Blood* 87(1): 83-92, 1996).

[0126] 본 발명의 항-CD123/IL-3Rα 항체 및 이의 항원 결합 단편의 서열은 본원에 제공된다.

[0127] 용어 "항체 단편"은 온전한 항체의 일부를 지칭하고 온전한 항체의 항원 결정 가변 영역을 지칭한다. 항체 단편의 예는 Fab, Fab', $F(ab')_2$, 및 F_v 단편, 선형 항체, 단일 사슬 항체, 및 항체 단편으로부터 형성된 다중특이적 항체를 포함하지만 이에 제한되지 않는다. 용어 항체의 "항원-결합 단편"은 항원에 특이적으로 결합하는 능력을 보유하는 항체의 하나 이상의 단편을 포함한다. 항체의 항원 결합 기능은 전장 항체의 특정 단편에 의해

수행될 수 있는 것으로 나타났다. 항체의 "항원-결합 단편"이라는 용어 내에 포함된 결합 단편의 예는 (제한 없이): (i) V_L, V_H, C_L, 및 C_{H1} 도메인으로 구성된 일가 단편인 Fab 단편 (*예를 들어*, 파파인에 의해 소화된 항체는 세 개의 단편: 두 개의 항원-결합 Fab 단편, 및 항원에 결합하지 않는 한 개의 Fc 단편을 생성함); (ii) 힌지 영역에서 디설파이드 가교에 의해 연결된 두 개의 Fab 단편을 포함하는 이가 단편인 $F(ab')_2$ 단편 (*예를 들어*, 펩신에 의해 소화된 항체는 두 개의 단편: 이가 항원-결합 $F(ab')_2$ 단편, 및 항원에 결합하지 않는 pFc' 단편을 생성함) 및 이의 관련 F(ab') 일가 단위; (iii) V_H 및 C_{H1} 도메인으로 구성된 F_d 단편 (즉, Fab에 포함된 중쇄 부분); (iv) 항체의 단일 암의 V_L 및 V_H 도메인으로 구성된 F_v 단편, 및 관련된 디설파이드 연결된 F_v; (v) V_H 도메인으로 구성된, dAb (도메인 항체) 또는 sdAb (단일 도메인 항체) 단편 (Ward *et al.*, *Nature* 341:544-546, 1989); 및 (vi) 분리된 상보성 결정 영역(CDR)을 포함한다.

[0128] 용어 "단일클론 항체"는 단일 항원 결정인자 또는 에피토프의 고도로 특이적인 인식 및 결합에 관여하는 균질 항체를 집단을 지칭한다. 이는 여러 상이한 항원 결정인자에 대해 지시된 여러 상이한 항체를 전형적으로 포함하는 다중클론 항체와 대조적이다. 용어 "단일클론 항체"는 온전하면서 전장(full-length)인 단일클론 항체뿐만 아니라 항체 단편 (예컨대 Fab, Fab', F(ab')2, Fv), 단일 사슬 (scFv) 돌연변이체, 항체 부분을 포함하는 융합 단백질, 및 항원 인식 부위를 포함하는 임의의 다른 변형된 면역글로불린 분자를 포함한다. 더욱이, "단일클론 항체"는 하이브리도마, 파지 선택, 재조합 발현 및 형질전환 동물을 포함하지만 이에 제한되지 않는 임의의 수의 방식으로 제조된 그러한 항체 및 이의 항원-결합 단편을 지칭한다.

[0129] 용어 "인간화 항체"는 특이적 면역글로불린 사슬, 키메라 면역글로불린 또는 최소한의 비인간(예를 들어, 뮤린) 서열을 포함하는 이의 단편인 비인간(예를 들어 뮤린) 항체 또는 항원-결합 단편의 형태를 지칭한다. 전형적으로, 인간화 항체는 상보성 결정 영역(CDR)으로부터의 잔기가 원하는 특이성, 친화도 및 능력을 갖는 비인간 종 (예를 들어 마우스, 래트, 토끼, 햄스터)의 CDR로부터의 잔기로 대체되는 인간 면역글로불린이다 (Jones et al., Nature 321:522-525, 1986; Riechmann et al., Nature 332:323-327, 1988; Verhoeyen et al., Science 239:1534-1536, 1988).

[0130] 일부 예에서, 인간 면역글로불린의 Fv 프레임워크 영역(FR) 잔기는 원하는 특이성, 친화도 및 능력을 갖는 비인간 종으로부터의 항체 중의 상응하는 잔기로 대체된다. 틀, 골격인간화 항체는 Fv 프레임워크 영역에서 및/또는 대체된 비인간 잔기 내에서 추가적인 잔기의 치환에 의해 추가로 변형되어 항체 특이성, 친화도 및/또는 능력을 개선하고 최적화할 수 있다. 일반적으로, 인간화 항체는 비인간 면역글로불린에 상응하는 모든 또는 실질적으로 모든 CDR 영역을 포함하는 적어도 하나, 전형적으로 둘 또는 셋의 가변 도메인을 실질적으로 모두 포함할 것이지만, 모든 또는 실질적으로 모든 FR 영역은 인간 면역글로불린 일치 서열의 영역이다. 인간화 항체는 전형적으로 인간 면역글로불린의 것인 면역글로불린 불변 영역 또는 도메인(Fc)의 적어도 일부를 또한 포함할 수 있다. 인간화 항체 생성에 사용된 방법의 예는 미국 특허 5,225,539 및 5,639,641, Roguska *et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91(3):969-973, 1994; 및 Roguska *et al., Protein Eng.* 9(10):895-904, 1996에 설명된다 (모두 본원에 참조로 포함됨). 일부 구체예에서, "인간화 항체"는 리서페이싱된(resurfaced) 항체이다. 일부 구체예에서, "인간화 항체"는 CDR-이식 항체이다.

[0131] 용어 항체의 "가변 영역"은 항체 경쇄의 가변 영역 또는 항체 중쇄의 가변 영역을 단독으로 또는 조합으로 지칭한다. 중쇄 및 경쇄 각각의 가변 영역은 초가변 영역으로도 알려진 세 개의 상보성 결정 영역(CDR)에 의해 연결된 네 개의 프레임워크 영역(FR)으로 구성된다. 각 쇄의 CDR은 FR에 의해 아주 근접하게 엮이고, 다른 쇄로부터의 CDR과 함께, 항체의 항원-결합 부위의 형성에 기여한다. CDR을 결정하기 위한 적어도 두 가지의 기술이 있다: (1) 종간 서열 가변성에 기초한 접근법 (즉, Kabat et al. Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th ed., 1991, National Institutes of Health, Bethesda Md.); 및 (2) 항원-항체 복합체의 결정학적 연구에 기초한 접근법 (Al-lazikani et al., J. Molec. Biol. 273:927-948, 1997). 또한, 이들 두 접근법의 조합은 당해 분야에서 CDR을 결정하기 위하여 때때로 사용된다.

[0132] Kabat 넘버링 시스템은 일반적으로 가변 도메인의 잔기(대략 경쇄의 잔기 1-107 및 중쇄의 잔기 1-113)를 언급할 때 사용된다 (*예를 들어*, Kabat *et al., Sequences of Immunological Interest*, 5th Ed., Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, Md. (1991)).

[0133] Kabat에서와 같은 아미노산 위치 넘버링은 Kabat *et al.*, *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 5th Ed., Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, Md. (1991) (본원에 참조로 포함됨)에서 항체의 편집의 중쇄 가변 도메인 또는 경쇄 가변 도메인에 사용되는 넘버링 시스템을 지칭한다. 이러

한 넘버링 시스템을 사용하여, 실제 선형 아미노산 서열은 가변 도메인의 FR 또는 CDR의 단축 또는 삽입에 상응하는 더 적거나 추가의 아미노산을 포함할 수 있다. 예를 들어, 중쇄 가변 도메인은 H2의 잔기 52 뒤에 단일 아미노산 삽입체 (Kabat에 따라 잔기 52a) 및 중쇄 FR 잔기 82 뒤에 삽입된 잔기 (*예를 들어*, Kabat에 따라 잔기 82a, 82b, 및 82c, *등*)를 포함할 수 있다. 잔기의 Kabat 넘버링은 "표준" Kabat 넘버링된 서열을 갖는 항체의 서열의 상동성 영역에서의 정렬에 의해 주어진 항체에 대해 결정될 수 있다. Chothia는 대신 구조 루프의 위치를 언급한다 (Chothia and Lesk, *J. Mol. Biol.* 196:901-917,1987). Kabat 넘버링 규칙을 사용하여 넘버링될 때 Chothia CDR-H1 루프의 말단은 루프의 길이에 따라 H32와 H34 사이에서 달라진다. 이는 Kabat 넘버링 체계가 H35A 및 H35B에 삽입을 배치하기 때문이다 - 35A와 35B가 모두 존재하지 않을 경우, 루프는 32에서 끝나고; 35A만 존재할 경우, 루프는 33에서 끝나며; 35A와 35B가 모두 존재할 경우, 루프는 34에서 끝난다. AbM 초가변 영역은 Kabat CDR과 Chothia 구조 루프 사이의 절충을 나타내며, Oxford Molecular의 AbM 항체 모델링 소프트웨어에 의해 사용된다.

[0134]

루프	Kabat	AbM	Chiothia
L1	L24-L34	L24-L34	L24-L34
L2	L50-L56	L50-L56	L50-L56
L3	L89-L97	L89-L97	L89-L97
H1	H31-H35B	H26-H35B	H26-H32..34
		(Kabat 넘버링)	
H1	H31-H35	H26-H35	H26-H32
		(Chothia 넘버링)	
H2	H50-H65	H50-H58	H52-H56
H3	H9S-H102	H95-H102	H95-H102

[0135] Kabat 또는 EU 넘버링 방식에서와 같은 EU 인덱스 또는 EU 인덱스는 본원에 참조로 포함되는 Edelman et al., 1969, Proc Natl Acad Sci USA 63:78-85의 인간 IgG1 Eu 항체를 기반으로 하는 넘버링 시스템을 지칭한다.

[0136] 용어 "인간 항체"는 인간에 의해 생성된 항체 또는 당업계에 공지된 임의의 기술을 사용하여 제조된 인간에 의해 생성된 항체에 상응하는 아미노산 서열을 갖는 항체를 의미한다. 특정 구체예에서, 인간 항체는 비인간 서열을 갖지 않는다. 인간 항체의 이러한 정의는 온전한 또는 전장 항체, 또는 이의 항원 결합 단편을 포함한다.

[0137] 용어 "키메라 항체"는 면역글로불린 분자의 아미노산 서열이 두 가지 이상의 종으로부터 유래하는 항체를 지칭한다. 전형적으로, 경쇄 및 중쇄의 가변 영역은 원하는 특이성, 친화도 및 능력을 갖는 포유동물의 한 종(*예를 들어*, 마우스, 래트, 토끼 *등*)으로부터 유래한 항체의 가변 영역에 상응하는 반면 불변 영역은 다른 종(*예를 들어*, 인간)에서 면역 반응을 유발할 기회를 피하거나 줄이기 위해 다른 종(보통 인간)으로부터 유래한 항체의 서열과 상동성이다. 특정 구체예에서, 키메라 항체는 예를 들어, 뮤린 경쇄 및 인간 중쇄 폴리펩타이드를 포함하는 항체와 같이 적어도 하나의 인간 중쇄 및/또는 경쇄 폴리펩타이드를 포함하는 항체 또는 이의 항원 결합 단편을 포함할 수 있다.

[0138] 용어 "에피토프" 또는 "항원 결정인자"는 본원에서 상호 교환적으로 사용되고 특정 항체에 의해 인식되고 특이적으로 결합될 수 있는 항원의 부분을 지칭한다. 항원이 폴리펩타이드인 경우, 에피토프는 단백질의 삼차 폴딩에 의해 병치된 인접 아미노산 및 비인접 아미노산 모두로부터 형성될 수 있다. 인접 아미노산으로부터 형성된 에피토프는 일반적으로 단백질 변성시 유지되는 반면, 3차 폴딩에 의해 형성된 에피토프는 일반적으로 단백질 변성시 손실된다. 에피토프는 전형적으로 독특한 공간적 형태로 적어도 3 개, 보다 일반적으로, 적어도 5 또는 8-10 개의 아미노산을 포함한다.

[0139] "결합 친화도"는 일반적으로 분자(*예를 들어*, 항체)의 결합 단일 결합 부위와 이의 결합 상대(*예를 들어*, 항원) 사이의 비공유 상호작용의 합계의 강도를 지칭한다. 달리 지시되지 않는 한, 본원에서 사용된 "결합 친화도"는 결합 쌍의 구성원 (*예를 들어*, 항체 및 항원) 사이의 1:1 상호작용을 반영하는 고유한 결합 친화도를 지칭한다. 상대 Y에 대한 분자 X의 친화도는 일반적으로 해리 상수(K_d) 또는 최대 유효 농도 절반(EC_{50})에 의해 나타날 수 있다. 친화도는 본 명세서에 기재된 것을 포함하여 당업계에 공지된 통상적인 방법에 의해 측정될 수 있다. 저친화도 항체는 일반적으로 항원에 천천히 결합하고 쉽게 해리되는 경향이 잇는 반면, 고친화도 항체는 일반적으로 항원에 더 빨리 결합하고 더 오래 결합된 상태로 유지되는 경향이 있다. 결합 친화도를 측정하는 다양한 방법이 당업계에 공지되어 있고, 이들 중 임의의 것이 본 발명의 목적을 위해 사용될 수 있다. 특정한 예시적인 구체예가 본원에 설명된다.

[0140] "특이적으로 결합한다"는 항체가 항원-결합 도메인을 통해 에피토프에 결합하고, 항원-결합 도메인과 에피토프 사이에 약간의 상보성을 수반함을 일반적으로 의미한다. 이 정의에 따르면, 항체는 무작위의 관련 없는 에피토프에 결합하는 것보다 항원-결합 도메인을 통해 에피토프에 결합할 때 에피토프에 "특이적으로 결합한다"고 언급된다. 용어 "특이성"은 특정 항체가 특정 에피토프에 결합하는 상대 친화도를 한정하기 위해 본원에서 사용된다. 예를 들어, 항체 "A"는 항체 "B"보다 주어진 에피토프에 대해 더 높은 특이성을 갖는 것으로 간주될 수 있거나 항체 "A"는 관련 에피토프 "D"에 대해 갖는 것보다 더 높은 특이성으로 에피토프 "C"에 결합한다고 언급될 수 있다.

[0141] 본원에서 사용된 용어 "면역접합체", "접합체" 또는 "ADC"는 세포결합제(*예를 들어*, 항체 또는 이의 항원 결합 단편)에 연결된 화합물 또는 이의 유도체를 지칭한다.

[0142] 용어 "시스테인-조작된 항체"는 항체 경쇄 또는 중쇄의 주어진 잔기에 정상적으로 존재하지 않는 적어도 하나의 Cys를 갖는 항체를 포함한다. "조작된 Cys"로도 지칭될 수 있는 그러한 Cys는 임의의 통상적인 분자 생물학 또는 재조합 DNA 기술을 사용하여 (*예를 들어*, 표적 잔기에서 비-Cys 잔기에 대한 코딩 서열을 Cys에 대한 코딩 서열로 대체함으로써) 조작될 수 있다. 예를 들어, 원래 잔기가 5'-UCU-3'의 코딩 서열을 갖는 Ser인 경우, 코딩 서열은 (*예를 들어*, 부위-지정 돌연변이유발에 의해) 5'-UGU-3'로 돌연변이될 수 있고, 이는 Cys를 인코딩한다. 특정 구체예에서, 본 발명의 Cys 조작된 항체는 중쇄에서 조작된 Cys를 갖는다. 특정 구체예에서, 조작된 Cys는 중쇄의 CH3 도메인에 또는 그 근처에 있다. 특정 구체예에서, 조작된 Cys는 중쇄의 잔기 442에 있다 (EU/OU 넘버링). C442 잔기는 C442 잔기의 유리 티올 기를 통해, 예컨대 세포독성 약물의 티올-반응성 제제(*예를 들어*, 말레이미도 기)와의 반응을 통해 세포독성 약물 / 제제와 접합될 수 있다.

[0143] 용어 "암" 및 "암성"은 세포 집단이 조절되지 않은 세포 성장을 특징으로 하는 포유동물의 생리학적 상태를 지칭하거나 설명한다. "종양" 및 "신생물"은 양성(비암성) 또는 전암성 병변을 포함하는 악성(암성)인, 과도한 세포 성장 또는 증식으로 인해 발생한 하나 이상의 세포를 지칭한다.

[0144] 암의 예는 자궁내막암, 폐암 (예를 들어, 비소세포 폐암), 결장직장암, 방광암, 위암, 췌장암, 신장 세포 암종, 전립선암, 식도암, 유방암, 두경부암, 자궁암, 난소암, 간암, 자궁경부암, 갑상선암, 고환암, 골수암, 흑색종, 및 림프구암을 포함한다. 특정 구체예에서, 암은 비소세포 폐암, 결장직장암, 위암 또는 췌장암이다. 특정 구체예에서, 암은 비소세포 폐암 (편평 세포, 비편평 세포, 선암종, 또는 대세포 미분화 암종), 결장직장암 (선암종, 위장관 카르시노이드 종양, 위장관 기질 종양, 원발성 결장직장 림프종, 평활근육종, 또는 편평 세포 암종) 또는 유방암 (*예를 들어*, 삼중 음성 유방암 (TNBC))이다. 특정 구체예에서, 암은 림프종 및 백혈병이다. 특정 구체예에서, 암의 예는 AML, CML, ALL (*예를 들어*, B-ALL), CLL, 골수이형성 증후군, 모구 성질세포양 DC 신생물 (BPDCN) 백혈병, 비호지킨 림프종 (NHL)을 포함하는 B-세포 림프종, 전구체 B-세포 림프모구성 백혈병 / 림프종 및 성숙 B-세포 신생물, 예컨대 B-세포 만성 림프구성 백혈병 (B-CLL) / 소림프구성 림프종 (SLL), B-세포 전림프구성 백혈병, 림프형질세포 림프종, 맨틀 세포 림프종 (MCL), 저급, 중급 및 고급 FL을 포함하는 소포 림프종 (FL), 피부 소포 중심 림프종, 변연부 B-세포 림프종 (MALT 유형, 결절 및 비장 유형), 모세포 백혈병 (HCL), 미만성 거대 B-세포 림프종 (DLBCL), 버킷 림프종, 형질세포종, 형질 세포 골수종, 이식 후 림프증식성 장애, 발덴스트롬 거대글로불린혈증, 역형성 대세포 림프종 (ALCL), 및 호지킨 백혈병 (HL)을 포함한다. 특정 구체예에서, 암은 BPDCN 백혈병이다. 특정 구체예에서, 암은 ALL이다. 다른 구체예에서, 암은 AML이다.

[0145] 용어 "대상"은 특정 치료의 수용자가 될 인간, 비인간 영장류, 설치류 등을 포함하지만 이에 제한되지 않는 임의의 동물(*예를 들어*, 포유동물)을 지칭한다. 전형적으로, 용어 "대상" 및 "환자"는 인간 대상과 관련하여 본원에서 상호 교환적으로 사용된다.

[0146] 용어 "약제학적 조성물"은 활성 성분의 생물학적 활성이 유효하도록 허용하는 형태이고, 조성물이 투여될 대상에게 허용 불가능하게 독성인 추가 성분을 포함하지 않는 제제를 지칭한다. 그러한 조성물은 무균일 수 있다.

[0147] 본원에 개시된 면역접합체의 "치료학 유효량"은 구체적으로 명시된 목적을 수행하기에 충분한 양이다. "치료적 유효량"은 명시된 목적과 관련하여 경험적으로 그리고 일상적인 방식으로 결정될 수 있다.

[0148] 용어 "이민 반응성 시약"은 이민 기와 반응할 수 있는 시약을 지칭한다. 바람직하게는, 이민 반응성 시약은 설파이트, 하이드록실 아민, 우레아 및 하이드라진으로부터 선택된다. 더욱 바람직하게는, 이민 반응성 시약은 $NaHSO_3$ 또는 $KHSO_3$이다.

[0149] 본 발명의 화합물

[0150] 제1 양태에서, 본 발명은 본원에 기재된 세포독성 화합물에 관한 것이다. 특정 구체예에서, 본 발명의 세포독성 화합물은 환원된 벤조디아제핀 단량체의 N-10 아민에서 세포결합제(CBA)에 연결될 수 있는 자가 희생 링커를 갖는 벤조디아제핀 이량체 화합물이다.

[0151] 제1 구체예에서, 본 발명의 화합물은 화학식 (I), (II), (TI), (T2), (I^m), (II^m), (TI^m) 또는 ($T2^m$), 또는 이의 약제학적으로 허용되는 염에 의해 표시되고, 여기서:

[0152] N과 C 사이의 이중선 ⎓은 단일 결합 또는 이중 결합을 나타내고, 이중 결합인 경우 X는 부재하고 Y는 H, 또는 C_{1-4}알킬이고, 단일 결합인 경우, X는 H이고 Y는 -OH 또는 $-SO_3H$이고;

[0153] W는 -C(=O)- 또는 -C(Y')-이고;

[0154] Y'은 H 또는 C_{1-4}알킬이고;

[0155] R^{1a}, R^{2a}, R^{3a}, R^{4a}, R^{1b}, R^{2b}, R^{3b} 및 R^{4b}는 H, C_{1-10}알킬, $-(OCH_2CH_2)_nOR^c$, 할로겐, $-NH(C=NH)NH_2$, -OR, -NR'R'', $-NO_2$, -NR'COR'', -SR, -SOR', $-SO_2R'$, $-SO_3H$, $-OSO_3H$, $-SO_2NR'R''$, -CN, $-N_3$, -COR', -OCOR', 및 -OCONR'R''로 이루어진 군으로부터 각각 독립적으로 선택되고;

[0156] R^c는 H 또는 C_{1-4}알킬이고;

[0157] n은 1 내지 24의 정수이고;

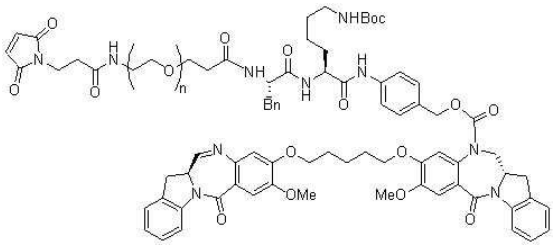
[0158] R은, 각각의 경우에, H, $-(CH_2CH_2O)_n-R^c$, C_{1-10}알킬, C_{3-8}사이클로알킬, 6- 내지 18-원 아릴, N, O 및 S로부터 독립적으로 선택된 하나 이상의 헤테로원자를 포함하는 5- 내지 18-원 헤테로아릴 고리, 또는 O, S, N 및 P로부터 독립적으로 선택된 1 내지 6 헤테로원자를 포함하는 3- 내지 18-원 헤테로사이클릭 고리로 이루어진 군으로부터 독립적으로 선택되고;

[0159] R' 및 R''은 -H, -OH, -OR, -NHR, $-NR_2$, -COR, C_{1-10}알킬, $-(CH_2CH_2O)_n-R^c$, 및 O, S, N 및 P로부터 독립적으로 선택된 1 내지 6 헤테로원자를 갖는 3- 내지 18-원 헤테로사이클릭 고리로부터 각각 독립적으로 선택되고;

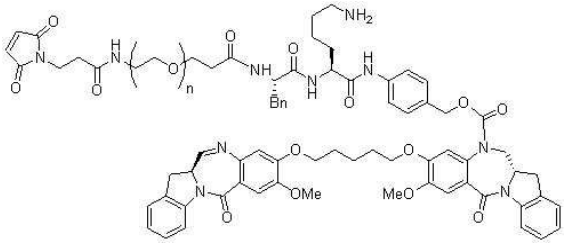
[0160] R^5는 C_{3-12}알킬렌이고, 이 사슬은 -O-, -S-, -NH-, -NMe-, 벤젠 고리, 4 내지 7-원 헤테로아릴 고리 및 4 내지 7-원 헤테로사이클릭 고리로부터 선택된 하나 이상의 기에 의해 단절될 수 있고, 여기서 벤젠, 4 내지 7-원 헤테로아릴 고리 및 4 내지 7-원 헤테로사이클릭 고리는 1 내지 4 R^6으로 치환되고;

[0161] R^6은 각각의 경우에 H, C_{1-10}알킬, $-(CH_2CH_2O)_n-R^c$, 할로겐, $-NH(C=NH)NH_2$, -OR, -NR'R'', $-NO_2$, -NCO, -NR'COR'', -SR, -SOR', $-SO_2R'$, $-SO_3H$, $-OSO_3H$, $-SO_2NR'R''$, -CN, $-N_3$, -COR', -OCOR', 및 -OCONR'R''로부터 독립적으로 선택되고;

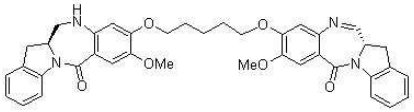
[0162] R^L은 세포결합제와 공유 결합을 형성할 수 있는 반응성 기를 포함하는 자가 희생 링커이고, 단 화학식 (I)의 화합물은:

[0163] 

; 또는

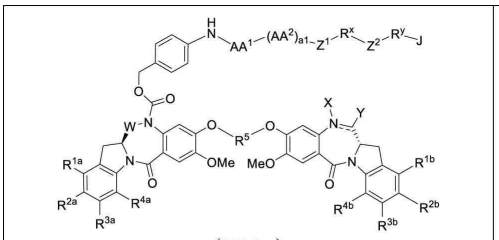
[0164]  이 아니고;

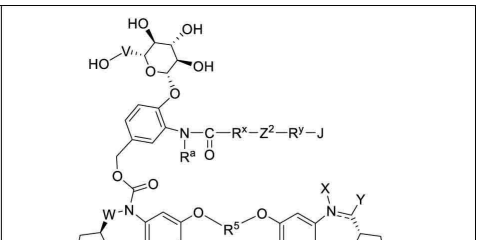
[0165] 단 화학식 (I^m)의 화합물은:

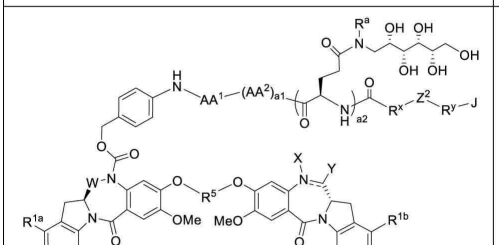
[0166]  이 아니다.

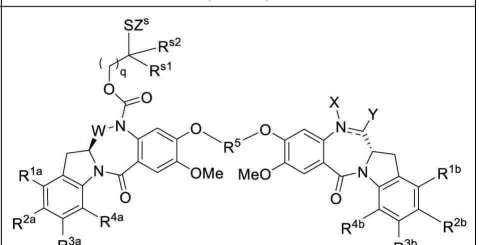
[0167] 제2 구체예에서, 본 발명의 화합물은 표 A에서 다음 화학식 중 하나에 의해 표시되고:

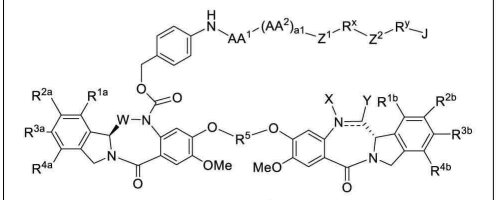
[0168]

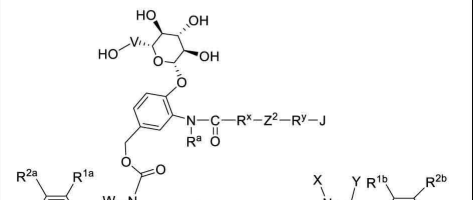

(IIIa)

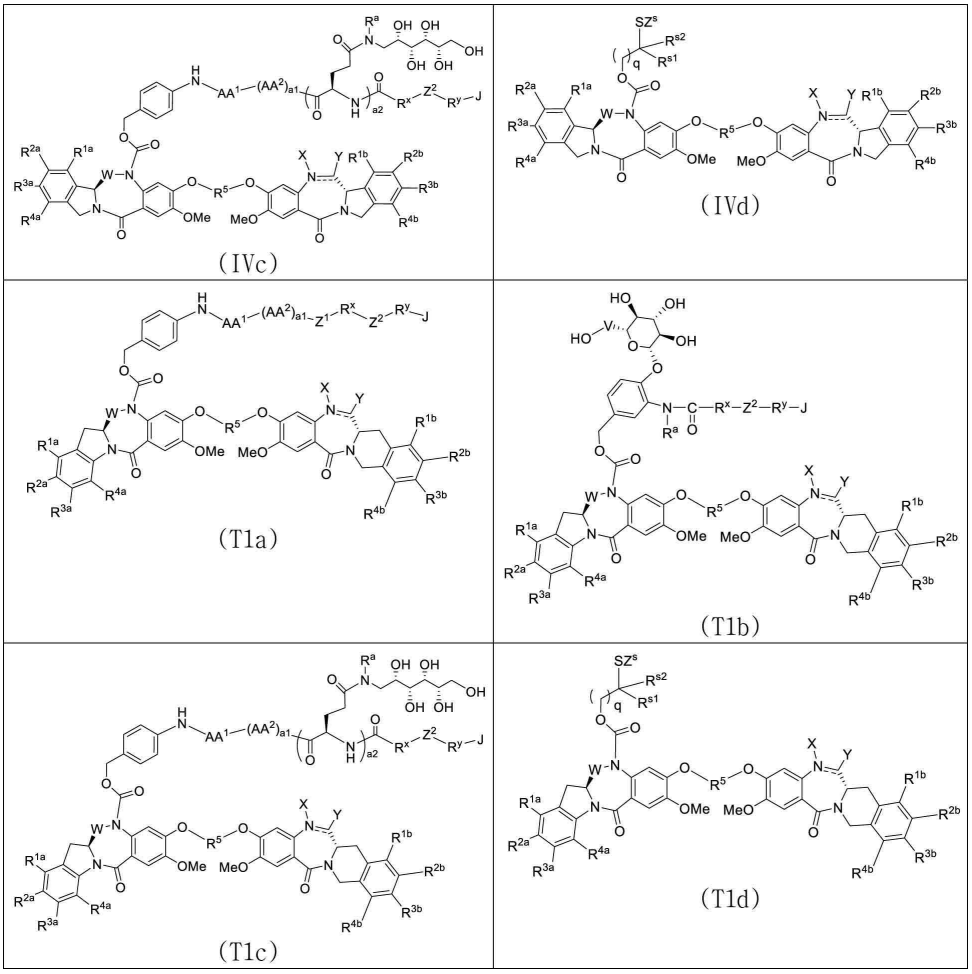

(IIIb)


(IIIc)

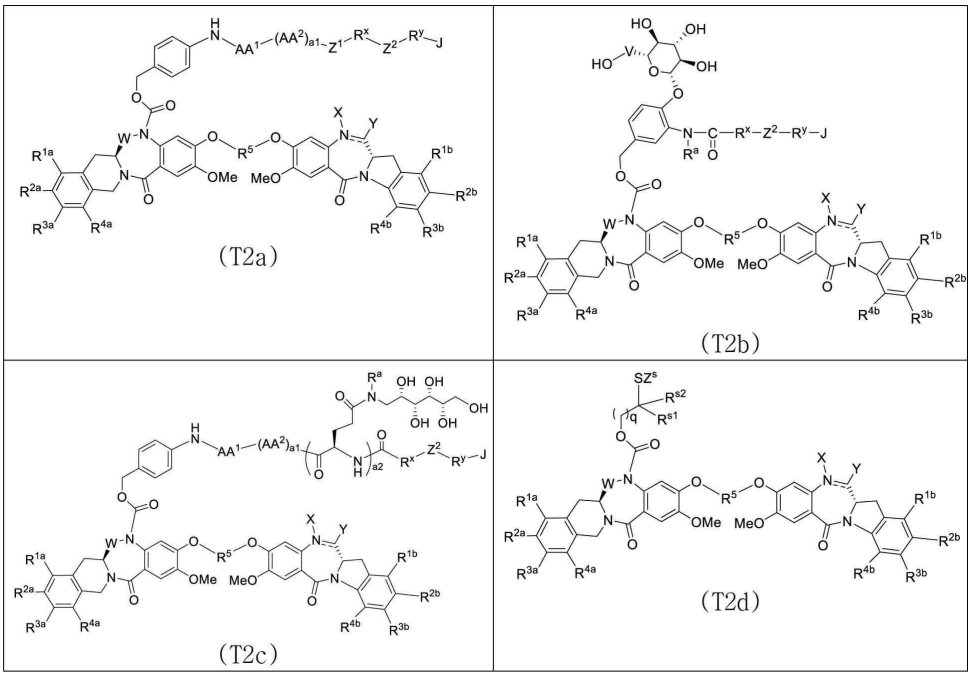

(IIId)


(IVa)

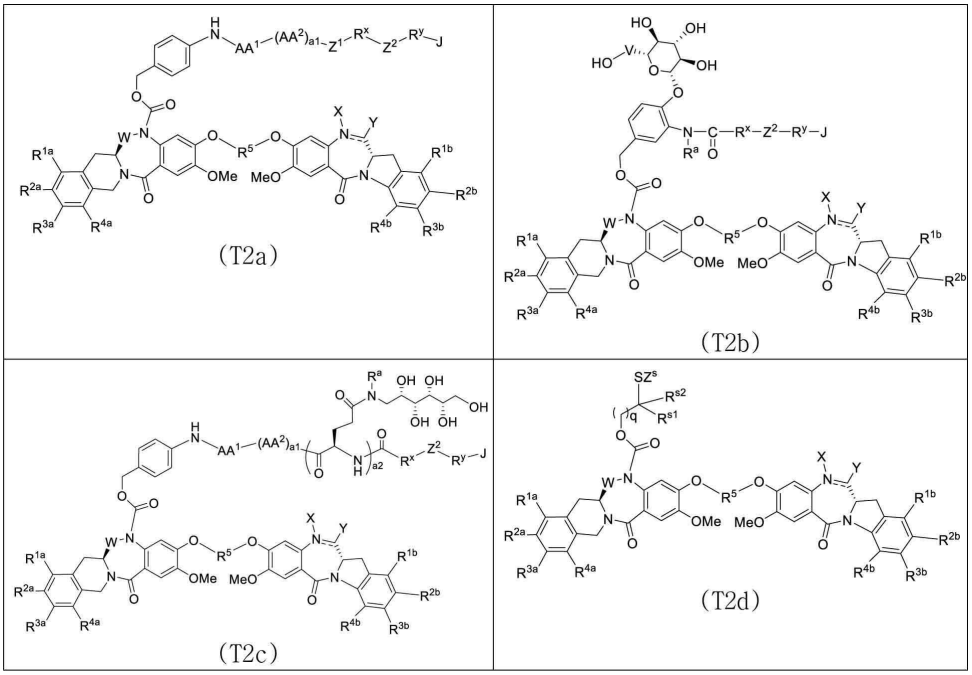

(IVb)



[0169]



[0170]



[0171] 또는 이의 약제학적으로 허용되는 염, 여기서:

[0172] AA^1 및 AA^2는 각각 독립적으로 아미노산 잔기이고;

[0173] a1은 1 내지 19의 정수이고;

[0174] a2는 1 내지 5의 정수이고;

[0175] R^a는 H 또는 C_{1-4}알킬이고;

[0176] q는 1, 2 또는 3이고;

[0177] R^{s1} 및 R^{s2}는 각각 독립적으로 H 또는 C_{1-4}알킬이고, 또는 R^{s1} 및 R^{s2}는 이들이 부착된 탄소 원자와 함께 3 내지 5-원 사이클로알킬 고리를 형성하고, 단 q가 1일 때, R^{s1} 및 R^{s2}는 이들이 부착된 탄소 원자와 함께 3-원 사이클로알킬 고리를 형성할 수 없고;

[0178] V는 C(=O) 또는 CH_2

[0179] Z^1은 -C(=O)- 또는 $-SO_2$-NH-C(=O)-이고, 여기서 $-SO_2$-NH-C(=O)-에서 $-SO_2$- 기는 P^1에 연결되고;

[0180] R^x는 C_{1-10}알킬렌, C_{3-8}사이클로알킬, $-(CH_2CH_2O)_{m1}$-C_{1-10}알킬렌- 또는 C_{1-10}알킬렌-$(OCH_2CH_2)_{m2}$-이고;

[0181] m1 및 m2는 각각 독립적으로 1 내지 24의 정수이고;

[0182] Z^2는 부재, -C(=O)NH- 또는 -NH-C(=O)-이고;

[0183] R^y는 부재, C_{1-10}알킬렌, $-(CH_2CH_2O)_{m3}$-C_{1-10}알킬렌- 또는 C_{1-10}알킬렌-$(OCH_2CH_2)_{m4}$-이고;

[0184] m3 및 m4는 각각 독립적으로 1 내지 24의 정수이고;

[0185] Z^s는 디설파이드 결합 또는 티오에테르 결합을 통해 세포독성 화합물에 공유적으로 연결된 반응성 기를 보유하는 이작용성 가교제이고;

[0186] J는 세포결합제와 공유 결합을 형성할 수 있는 반응성 기(바람직하게는, 아민 반응성 기 또는 티올 반응성 기)를 포함하는 모이어티이고; 나머지 변수는 제1 구체예에 정의된 바와 같다.

[0187] 특정 구체예에서, 화학식 (IIId), (IVd), (T1d) 또는 (T2d)에 대해, q는 1이다. 보다 특정한 구체예에서, 화학

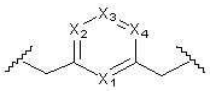
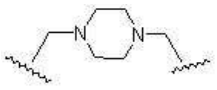
식 (IIId), (IVd), (T1d) 또는 (T2d)에 대해, q는 1이고; R^{s1} 및 R^{s2}는 모두 메틸이다.

[0188] 특정 구체예에서, 화학식 (IIIb), (IIIc), (IVb), (IVc), (T1b), (T1c), (T2b) 또는 (T2c)에 대해, R^a는 H, 메틸 또는 에틸이다. 보다 특정한 구체예에서, R^a는 H이다. 보다 특정한 구체예에서, R^a는 메틸이다.

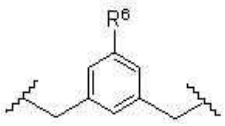
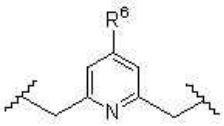
[0189] 제3 구체예에서, 본 발명의 화합물은 제1 또는 제2 구체예에 기재된 화학식에 의해 표시되거나, 이의 약제학적으로 허용되는 염이고, 여기서 R^{1a}, R^{2a}, R^{3a}, R^{4a}, R^{1b}, R^{2b}, R^{3b} 및 R^{4b}는 모두 H이고; 나머지 변수는 제1 또는 제2 구체예 또는 본원에 기재된 임의의 특정 구체예에 정의된 바와 같다.

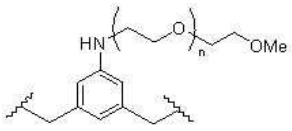
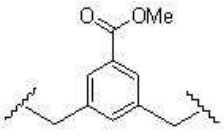
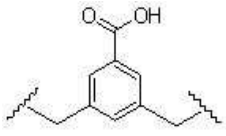
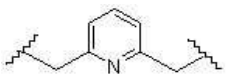
[0190] 제4 구체예에서, 본 발명의 화합물은 제1 또는 제2 구체예에 기재된 화학식에 의해 표시되거나, 이의 약제학적으로 허용되는 염이고, 여기서 R^5는 C_{3-7}알킬렌이고; 나머지 변수는 제1, 제2, 또는 제3 구체예 또는 본원에 기재된 임의의 특정 구체예에 정의된 바와 같다. 특정 구체예에서, R^5는 $-(CH_2)_3-$, $-(CH_2)_5-$ 또는 $-(CH_2)_7-$이다. 보다 특정한 구체예에서, R^5는 $-(CH_2)_7-$이다. 보다 특정한 구체예에서, R^5는 $-(CH_2)_5-$이다. 보다 특정한 구체예에서, R^5는 $-(CH_2)_3-$이다.

[0191] 제5 구체예에서, 본 발명의 화합물은 제1 또는 제2 구체예에 기재된 화학식에 의해 표시되거나, 이의 약제학적으로 허용되는 염이고, 여기서 R^5는 다음 화학식에 의해 표시되고:

[0192]  또는  ,

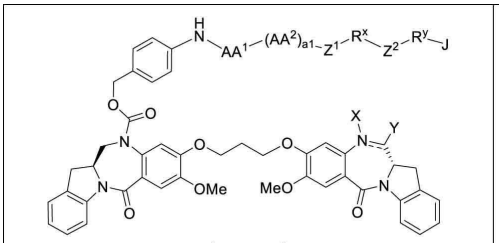
[0193] 여기서 X_1, X_2, X_3 및 X_4는 각각 독립적으로 N 또는 CR^6이고, 단 X_1, X_2, X_3 및 X_4 중 적어도 하나는 CR^6이고; 나머지 변수는 제1, 제2, 또는 제3 구체예 또는 본원에 기재된 임의의 특정 구체예에 정의된 바와 같다.

[0194] 특정 구체예에서, R^5는  또는  이다.

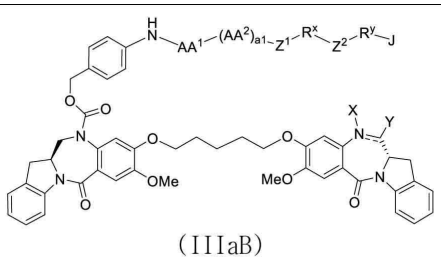
[0195] 보다 특정한 구체예에서, R^5는  이고, 여기서 n은 1 내지 8의 정수이다. 추가로 명시된 구체예에서, n은 1, 2, 3, 또는 4이다. 보다 특정한 구체예에서, n은 1이다. 보다 특정한 구체예에서, n은 2이다. 보다 특정한 구체예에서, n은 3이다. 보다 특정한 구체예에서, n은 4이다. 보다 특정한 구체예에서, R^5는  이다. 보다 특정한 구체예에서, R^5는  이다. 또 다른 특정 구체예에서, R^5는  이다.

[0196] 제6 구체예에서, 본 발명의 화합물은 표 B에서 다음 화학식 중 하나에 의해 표시되고:

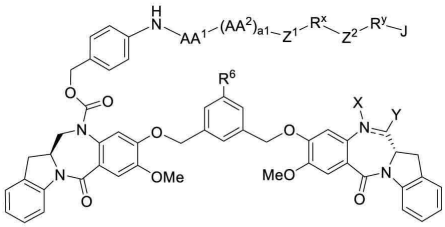
[0197]



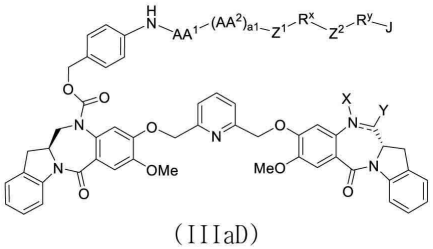
(IIIaA)



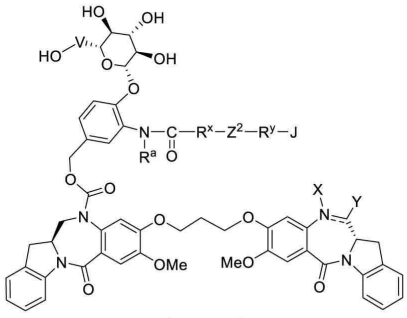
(IIIaB)



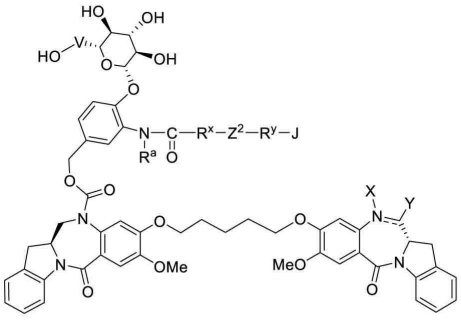
(IIIaC)



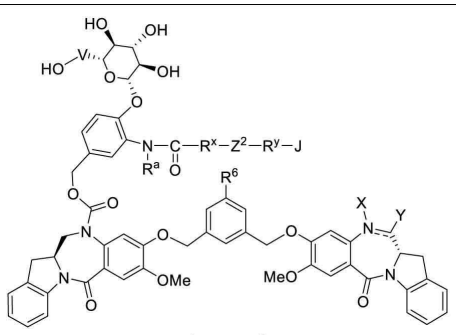
(IIIaD)



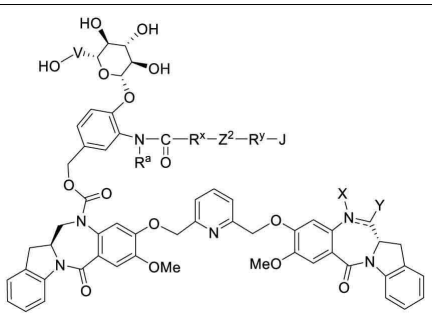
(IIIbA)



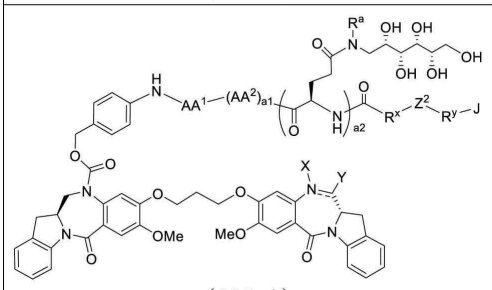
(IIIbB)



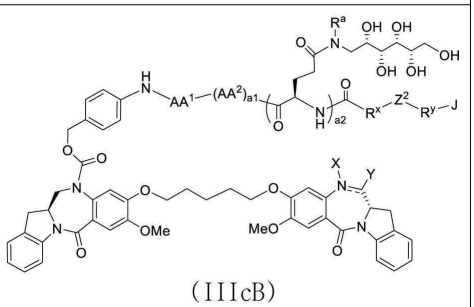
(IIIbC)



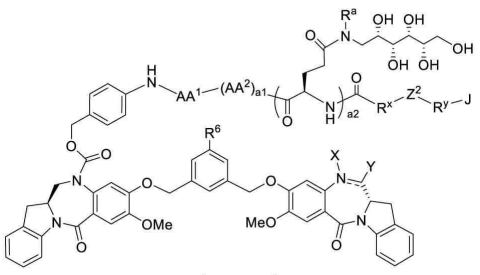
(IIIbD)



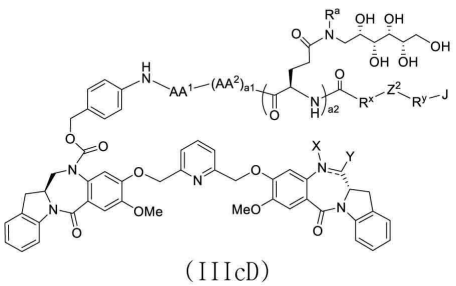
(IIIcA)



(IIIcB)



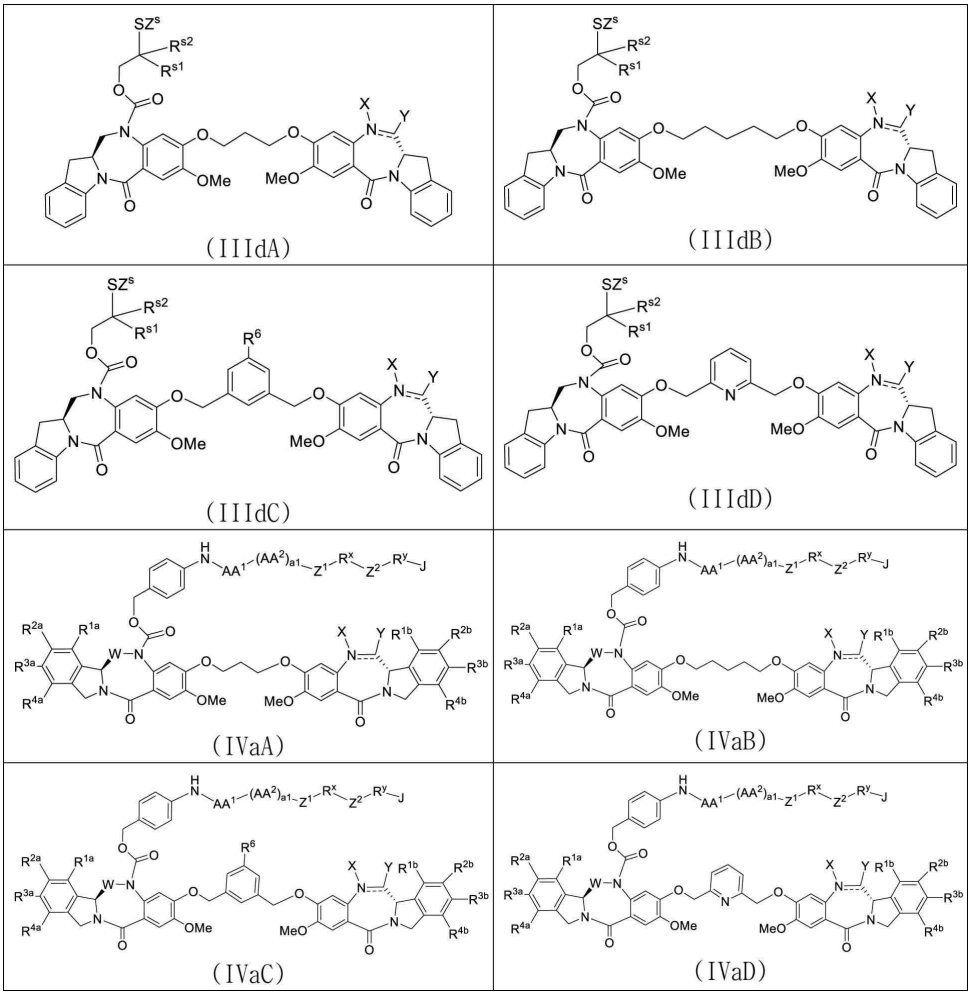
(IIIcC)



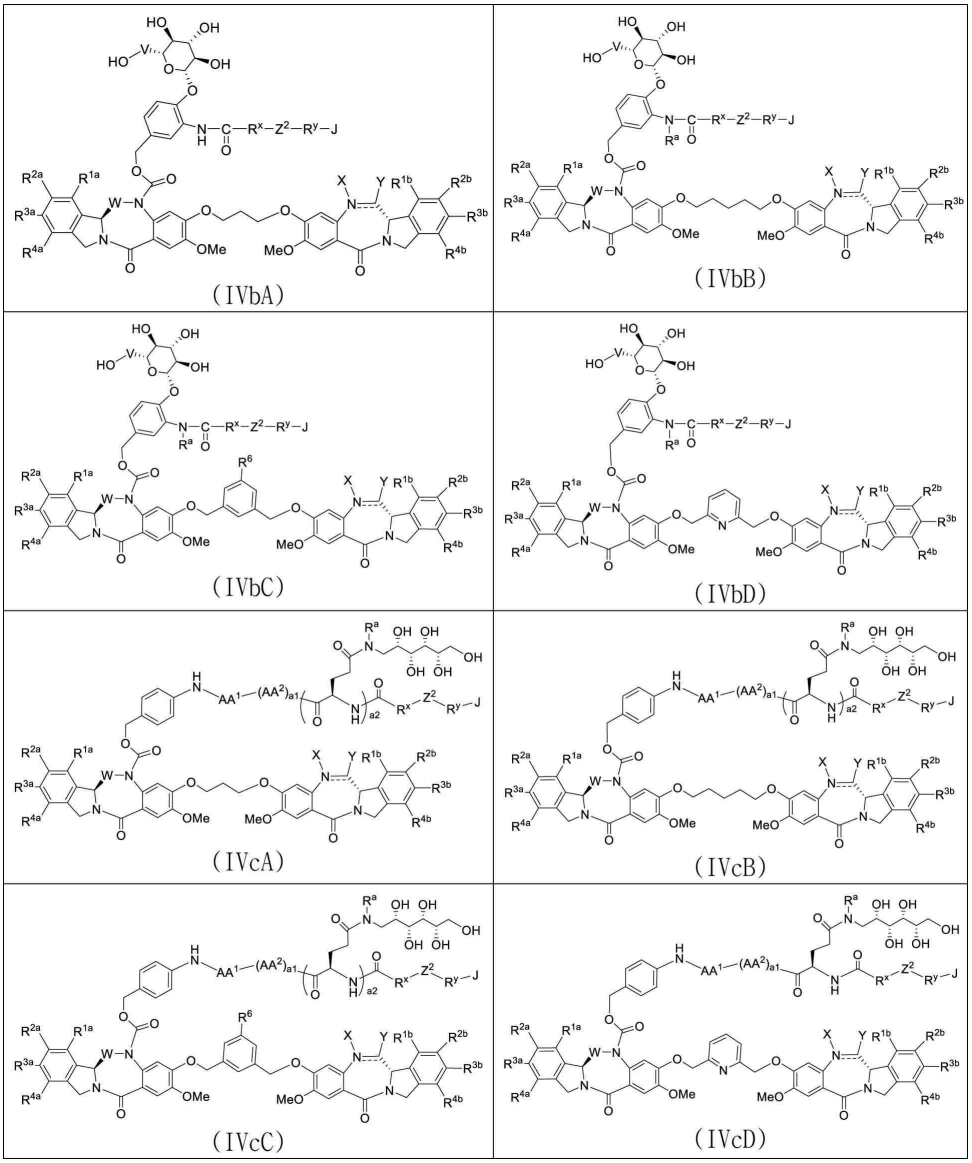
(IIIcD)

[0198]

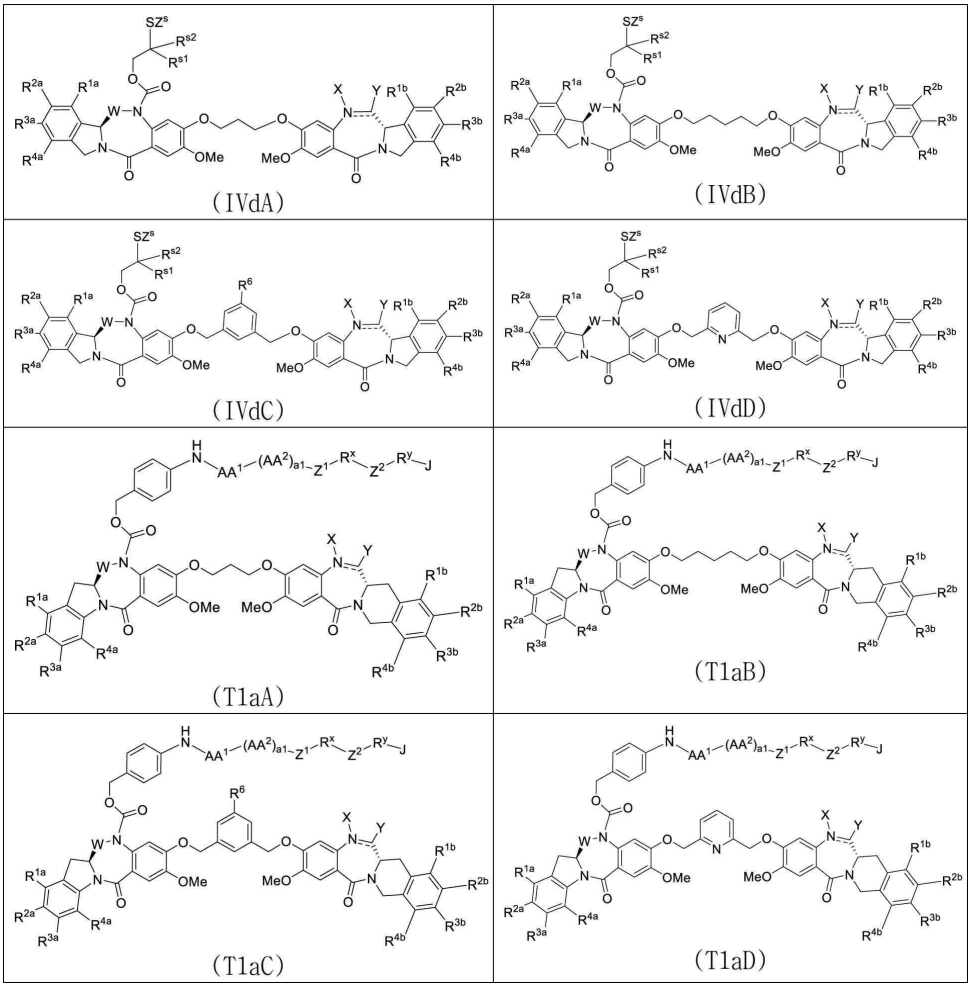
[0199]



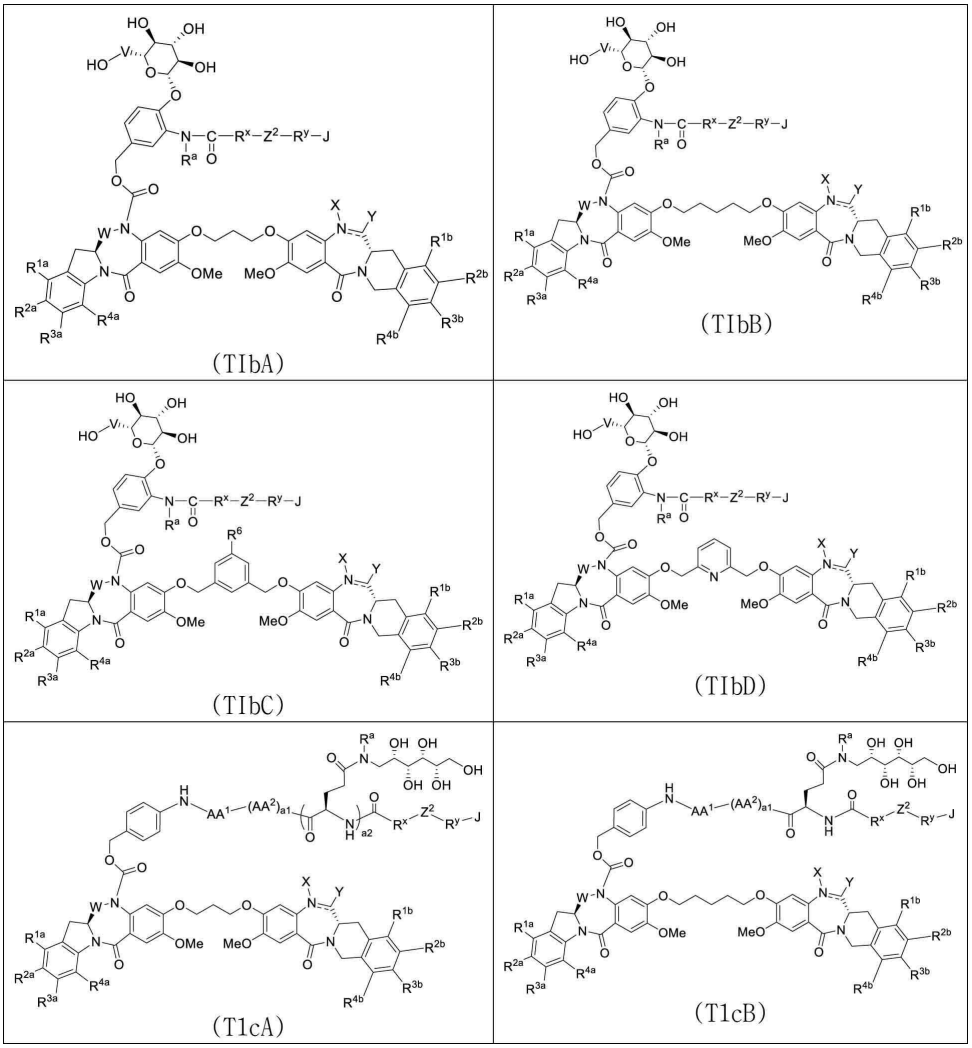
[0200]



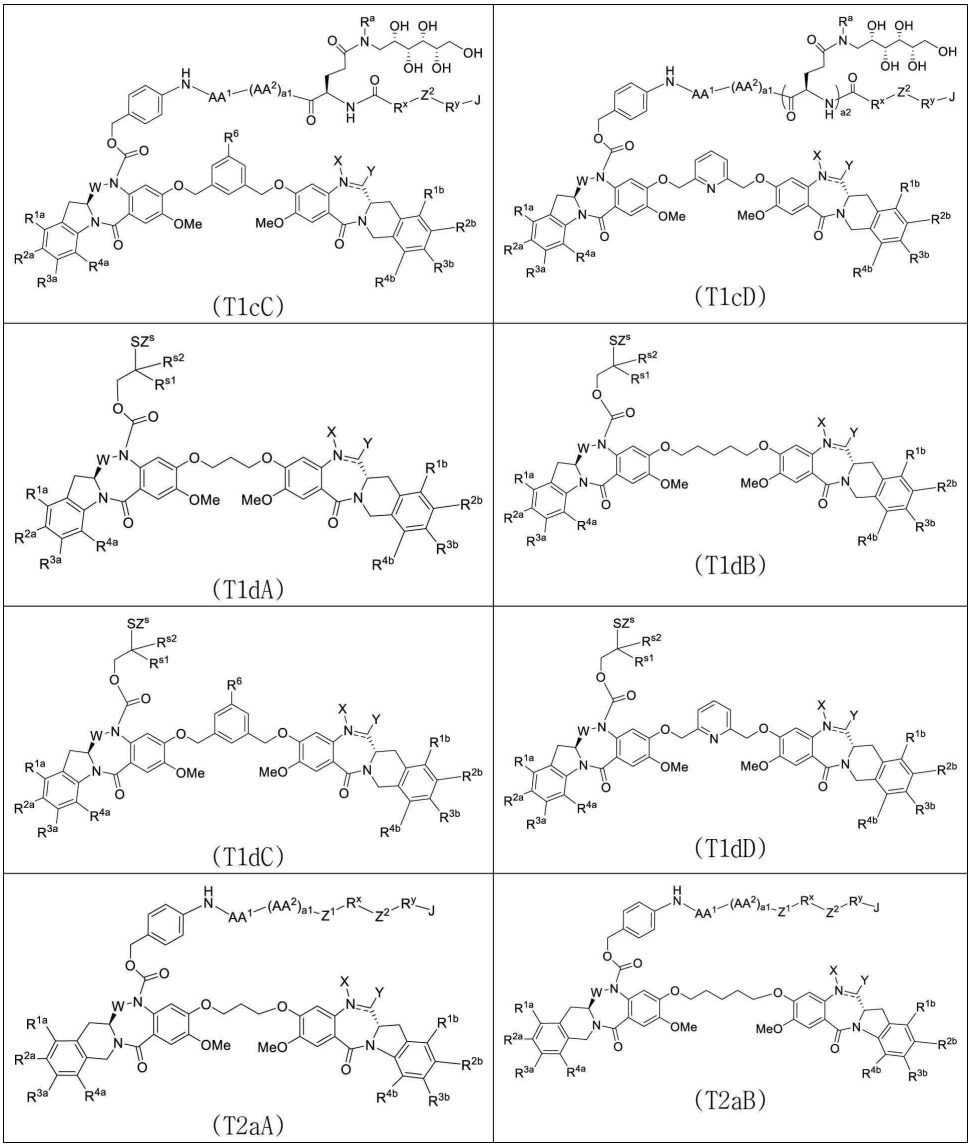
[0201]



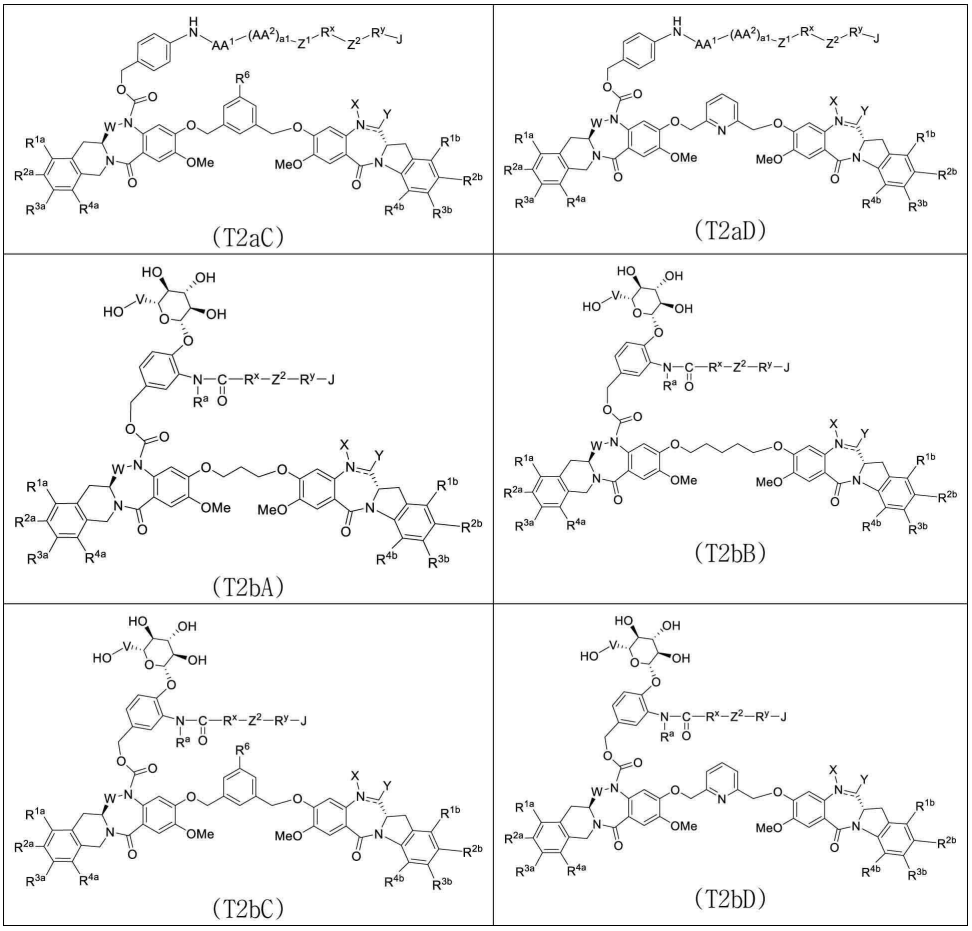
[0202]

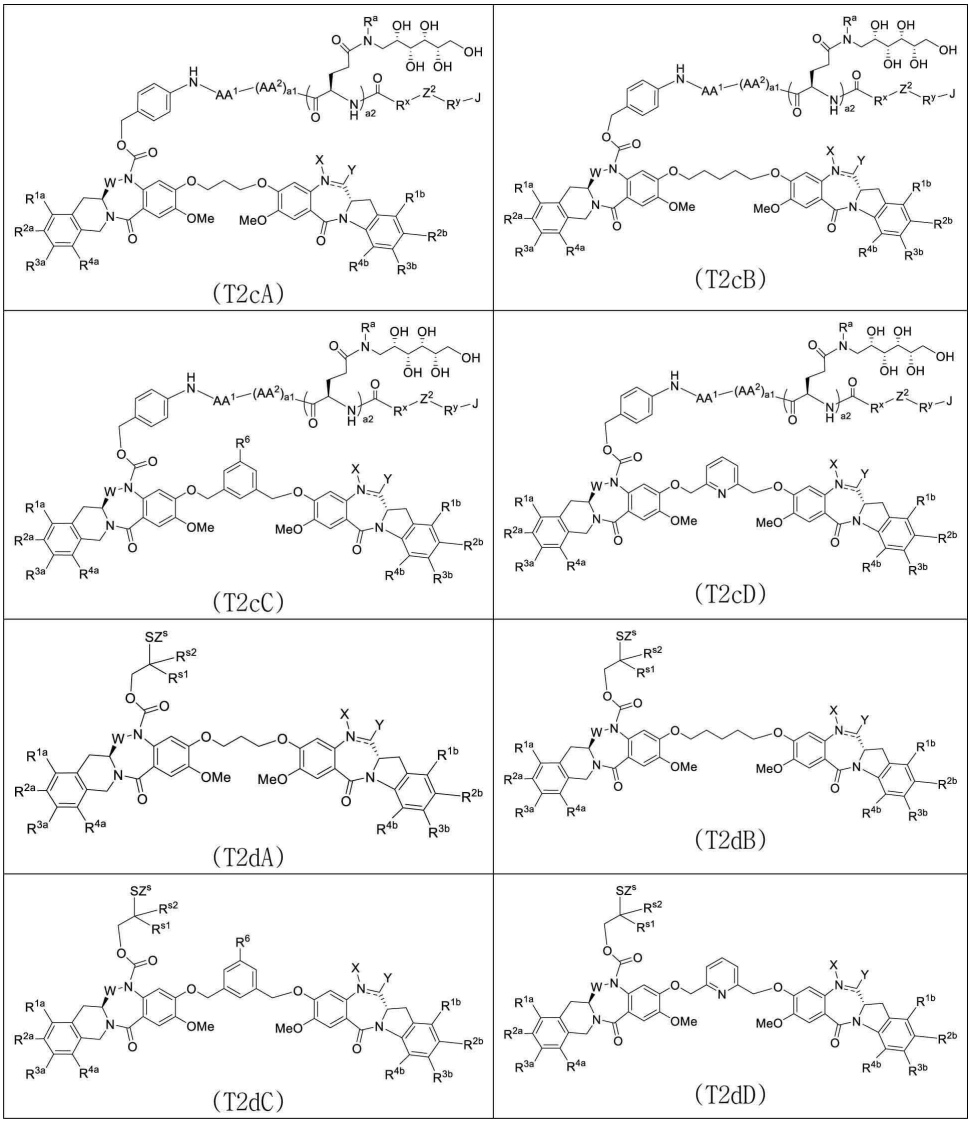


[0203]



[0204]





[0205]

[0206] 또는 이의 약제학적으로 허용되는 염, 여기서 나머지 변수는 제2 구체예 또는 본원에 기재된 임의의 특정 구체예에 정의된 바와 같다.

[0207] 제7 구체예에서, 본 발명의 화합물은 제2 또는 제6 구체예에 기재된 화학식에 의해 표시되거나, 이의 약제학적으로 허용되는 염이고, 여기서 Z^1은 -C(=O)-이고; 나머지 변수는 제2, 제3, 제4, 제5 또는 제6 구체예 또는 본원에 기재된 임의의 특정 구체예에 정의된 바와 같다.

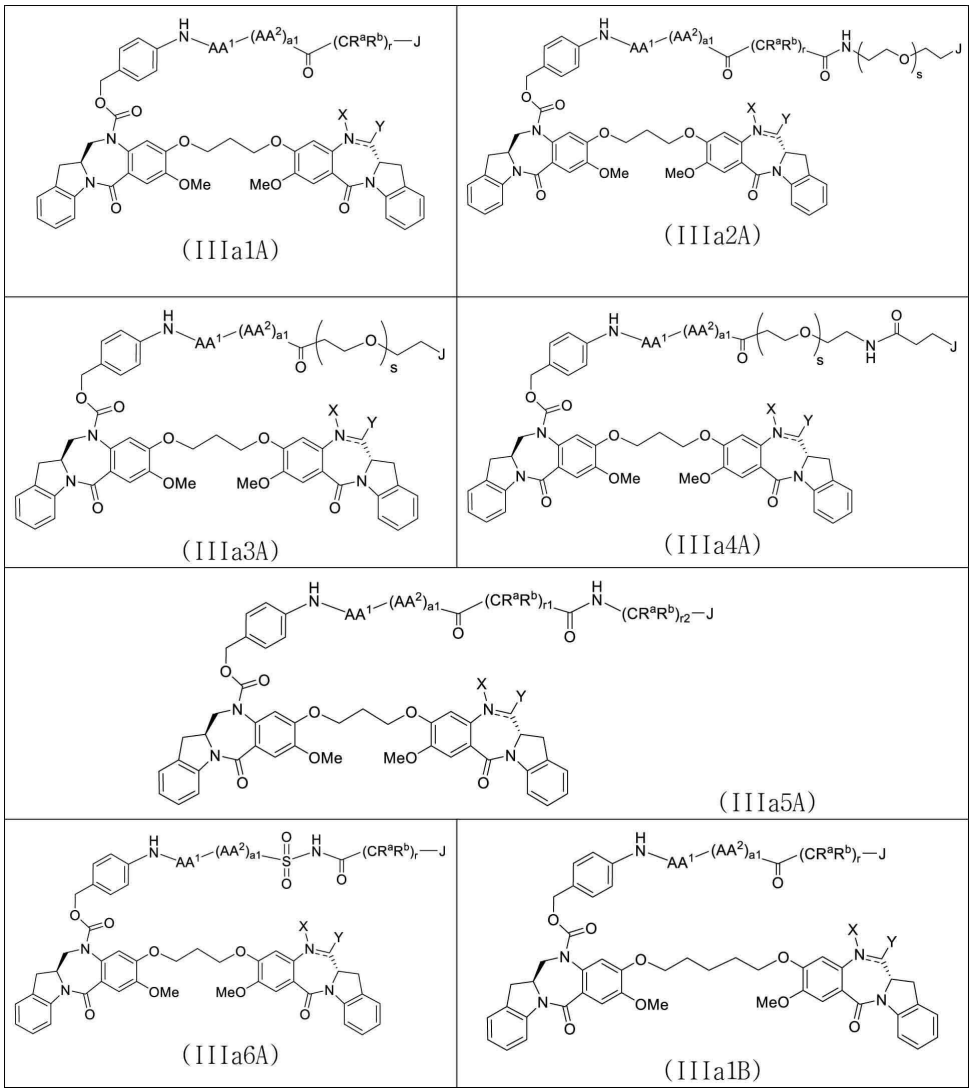
[0208] 제8 구체예에서, 본 발명의 화합물은 제2 또는 제6 구체예에 언급된 화학식에 의해 표시되거나, 이의 약제학적으로 허용되는 염이고, 여기서 R^x는 C_{1-6}알킬렌이고; Z^2 및 R^y는 모두 부재하고; 나머지 변수는 제2, 제3, 제4, 제5, 제6 또는 제7 구체예 또는 본원에 기재된 임의의 특정 구체예에 정의된 바와 같다. 또 다른 구체예에서, R^x, Z^2 및 R^y는 부재하고; 나머지 변수는 제2, 제3, 제4, 제5, 제6 또는 제7 구체예 또는 본원에 기재된 임의의 특정 구체예에 정의된 바와 같다.

[0209] 제9 구체예에서, 본 발명의 화합물은 제2 또는 제6 구체예에 기재된 화학식에 의해 표시되거나, 이의 약제학적으로 허용되는 염이고, 여기서 R^x는 $-(CH_2CH_2O)_{m1}-C_{1-6}$알킬렌-이고; Z^2는 -NH-C(=O)- 또는 -C(=O)-NH-이고; R^y는 C_{1-6}알킬렌이고; 나머지 변수는 제2, 제3, 제4, 제5, 제6, 또는 제7 구체예 또는 본원에 기재된 임의의 특정 구체예에 정의된 바와 같다.

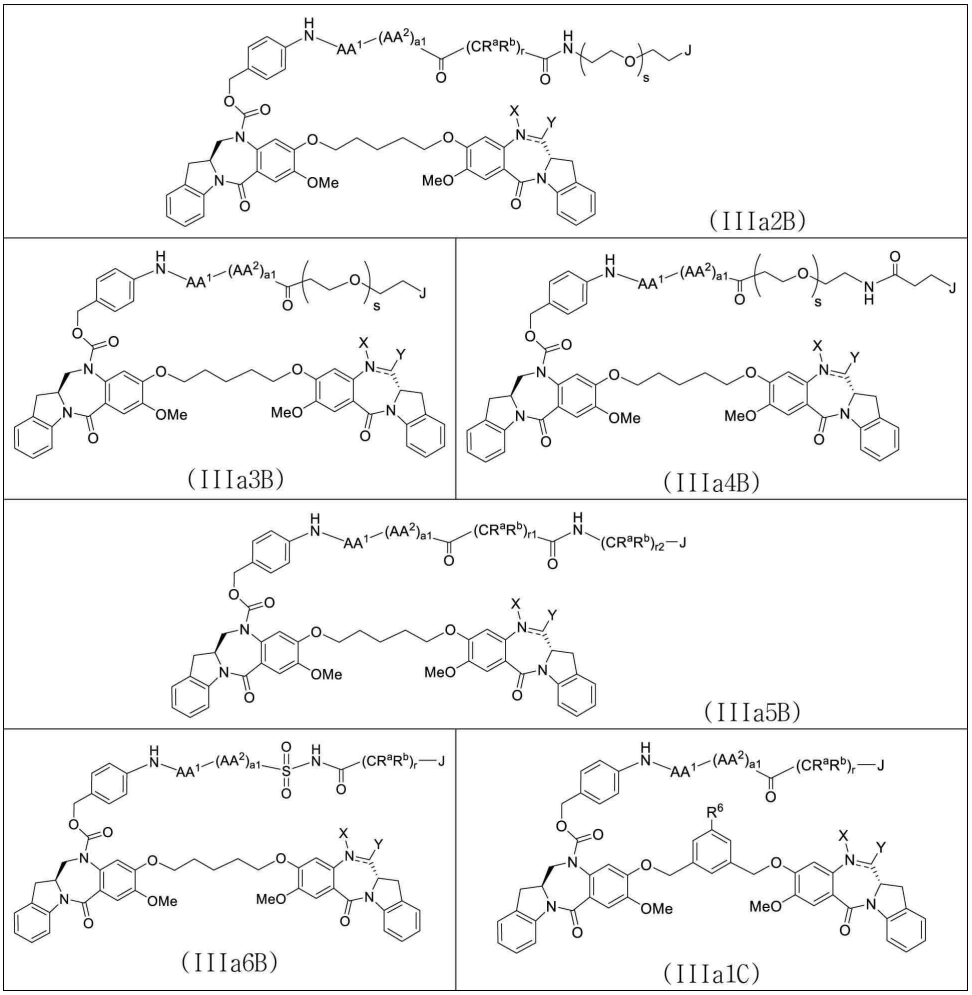
[0210] 제10 구체예에서, 본 발명의 화합물은 제2 또는 제6 구체예에 언급된 화학식에 의해 표시되거나, 이의 약제학적으로 허용되는 염이고, 여기서 R^x는 C_{1-6}알킬렌이고; Z^2는 -NH-C(=O)- 또는 -C(=O)-NH-이고; R^y는 $-(CH_2CH_2O)_{m2}-C_{1-}$

$_6$알킬렌-이고; 나머지 변수는 제2, 제3, 제4, 제5, 제6, 또는 제7 구체예 또는 본원에 기재된 임의의 특정 구체예에 정의된 바와 같다.

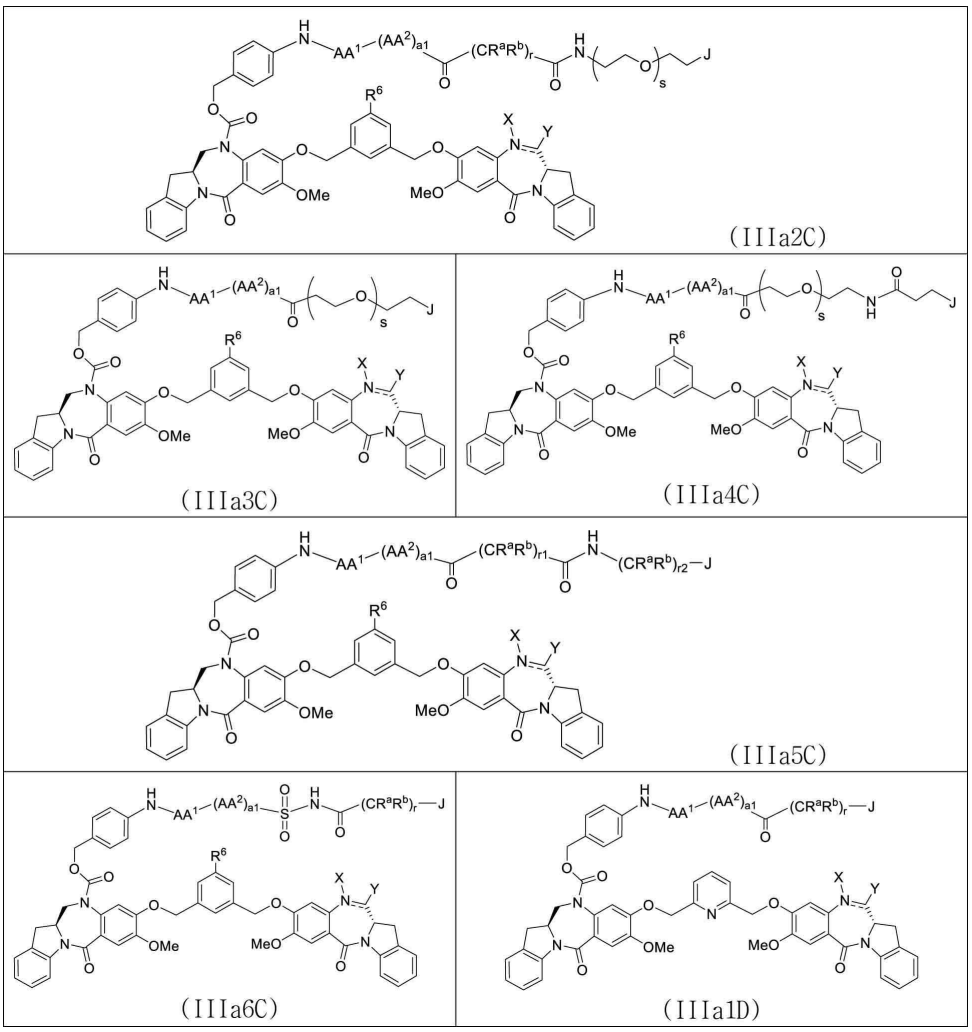
[0211] 제11 구체예에서, 본 발명의 화합물은 표 C에서 다음 화학식 중 하나에 의해 표시되고:

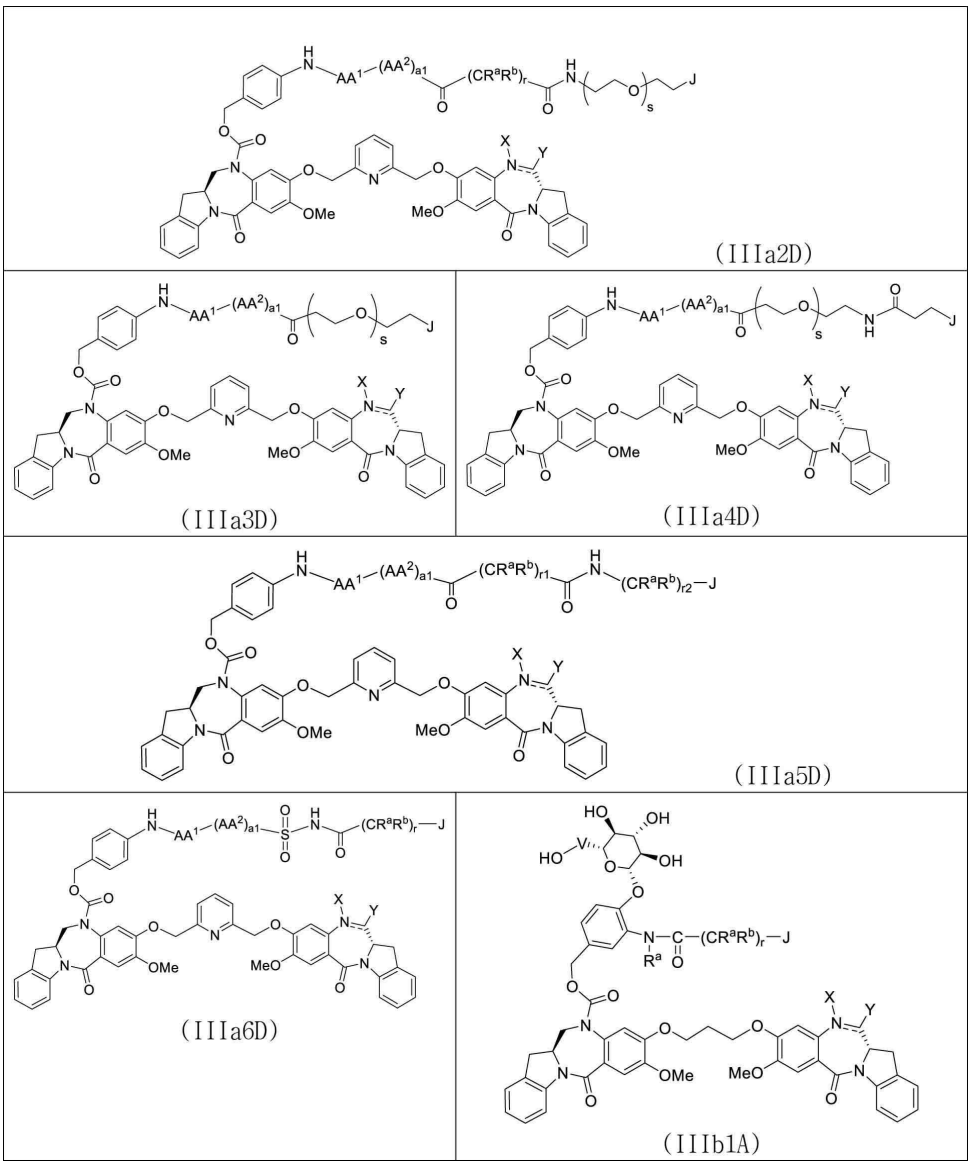


[0212]



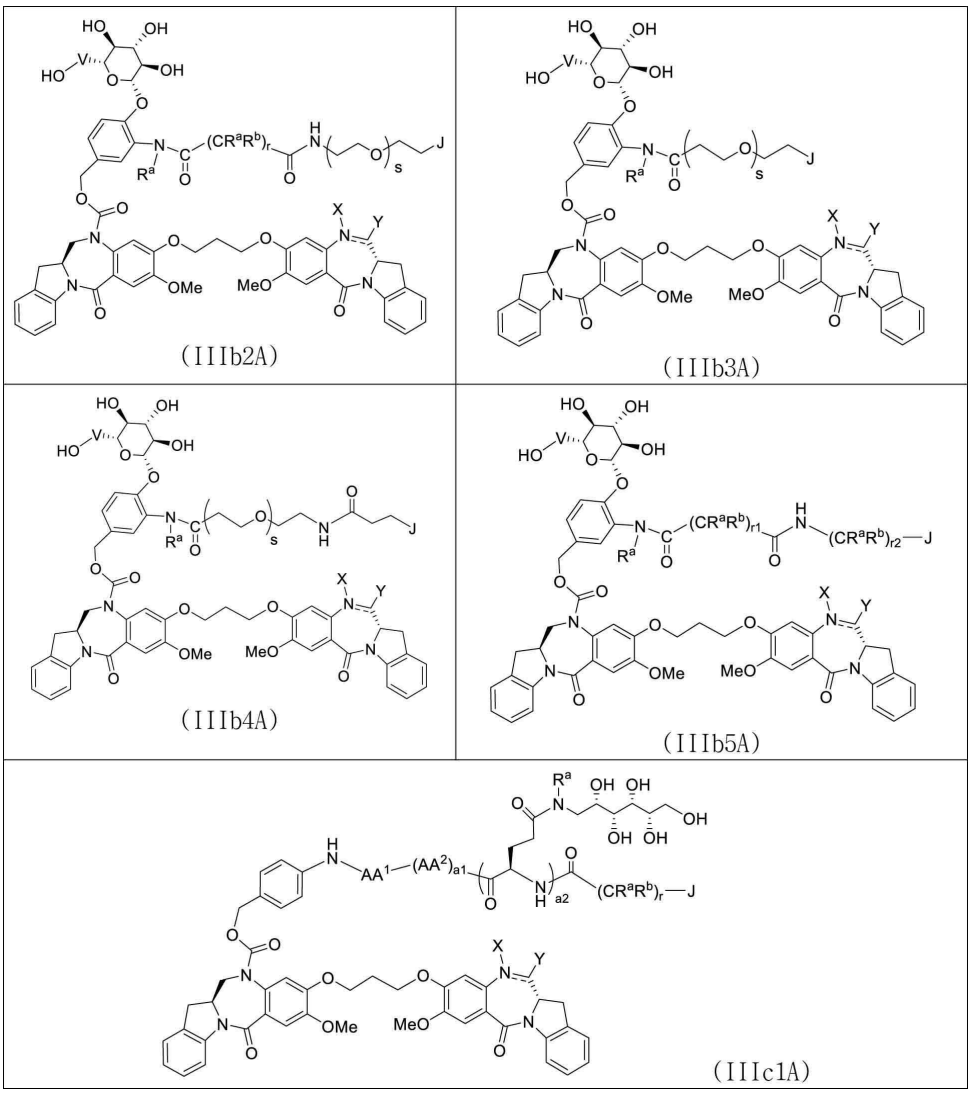
[0213]



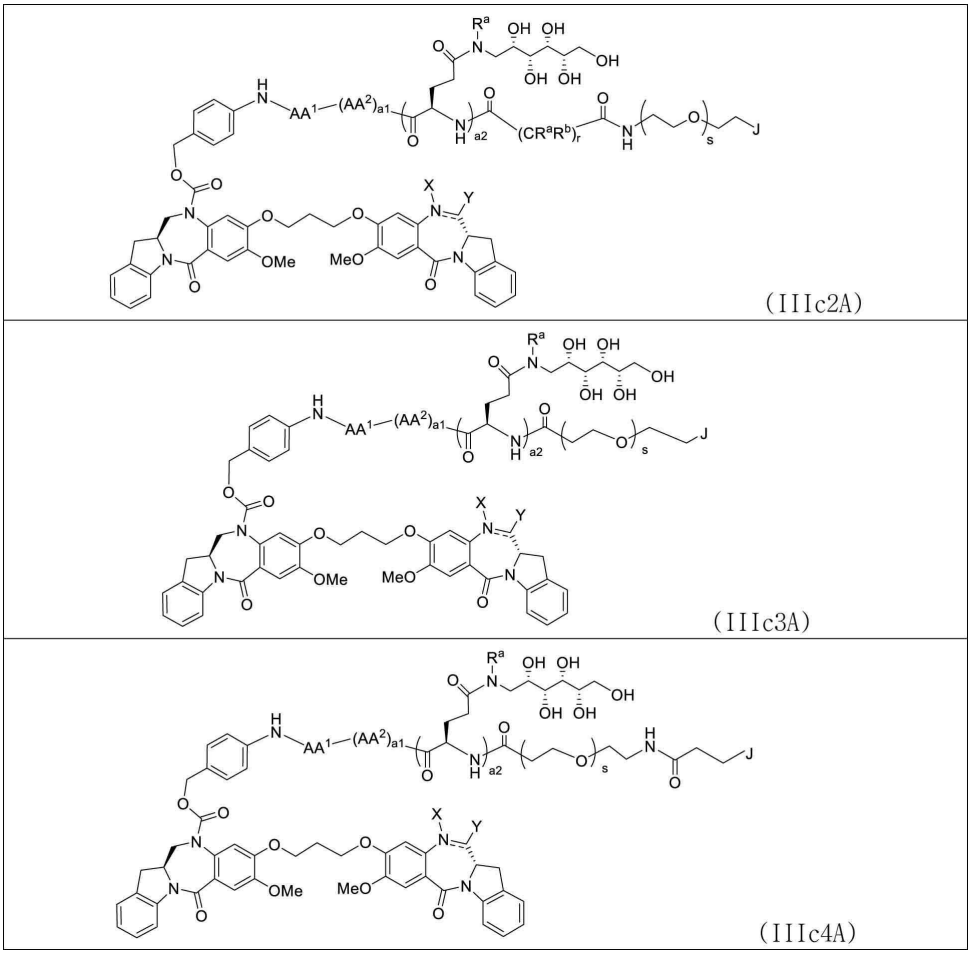


[0214]

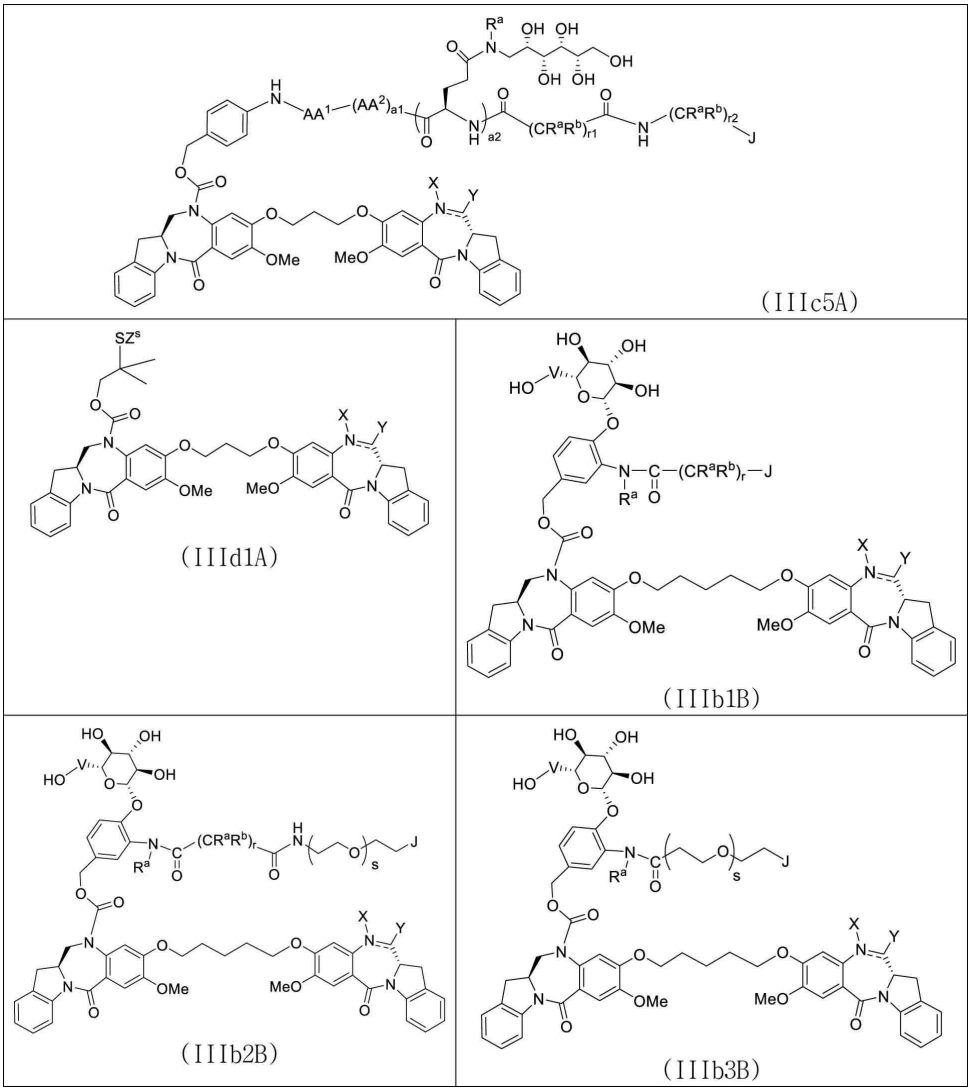
[0215]



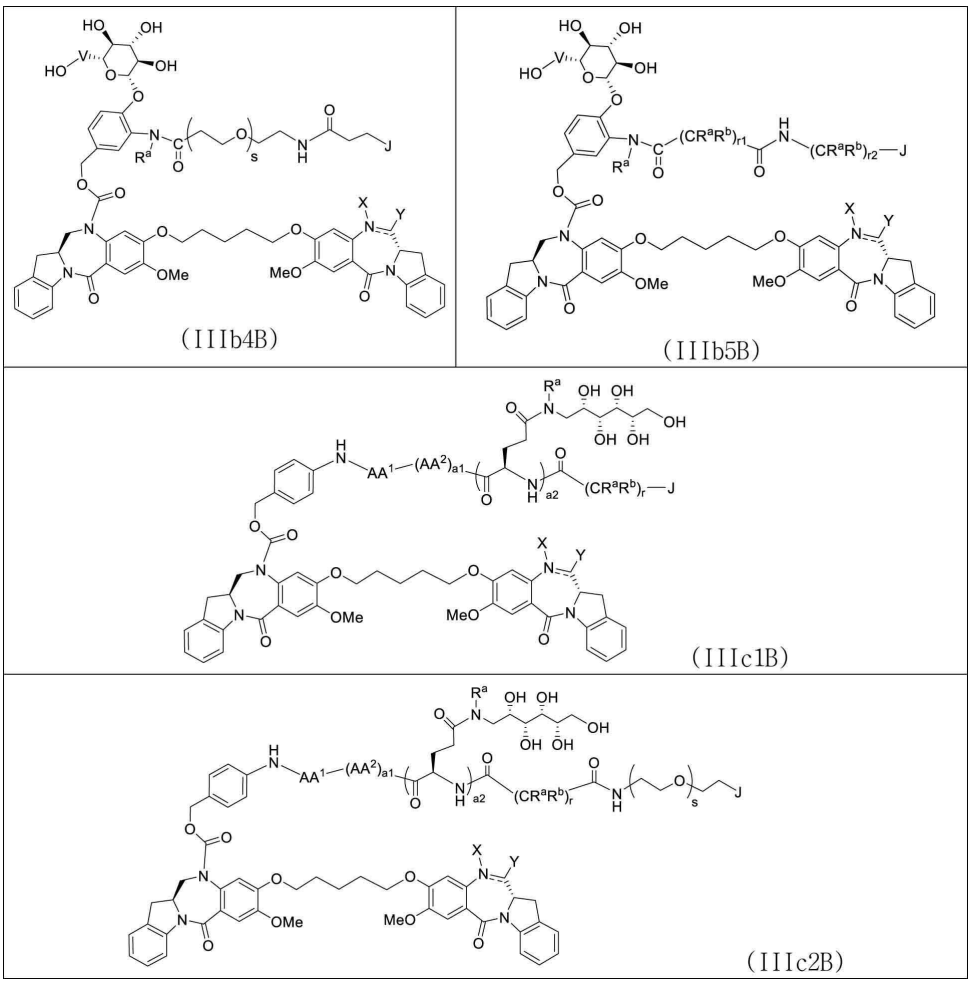
[0216]



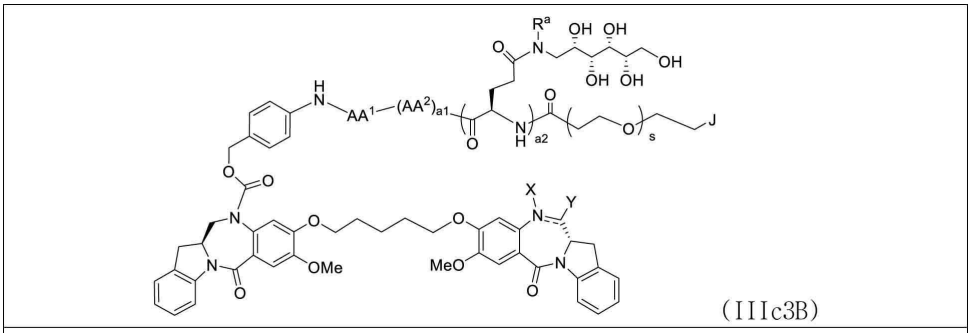
[0217]



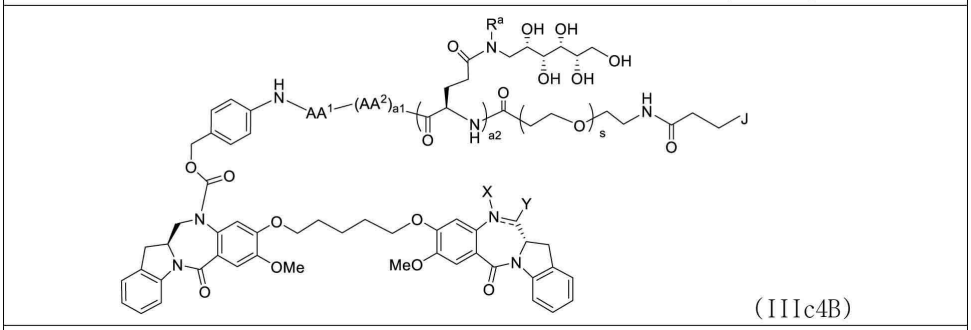
[0218]



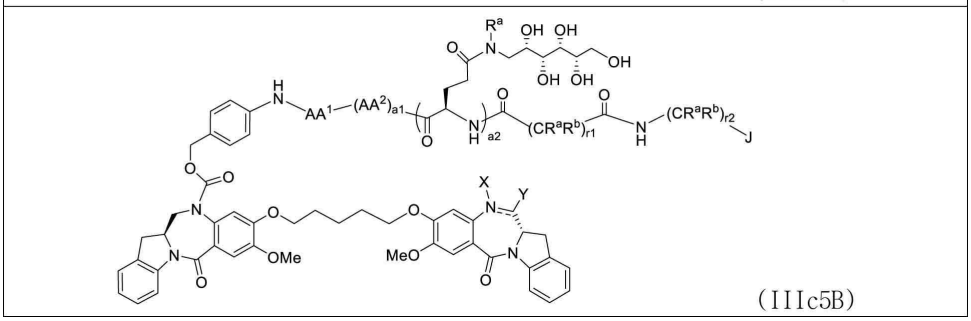
[0219]



(IIIc3B)

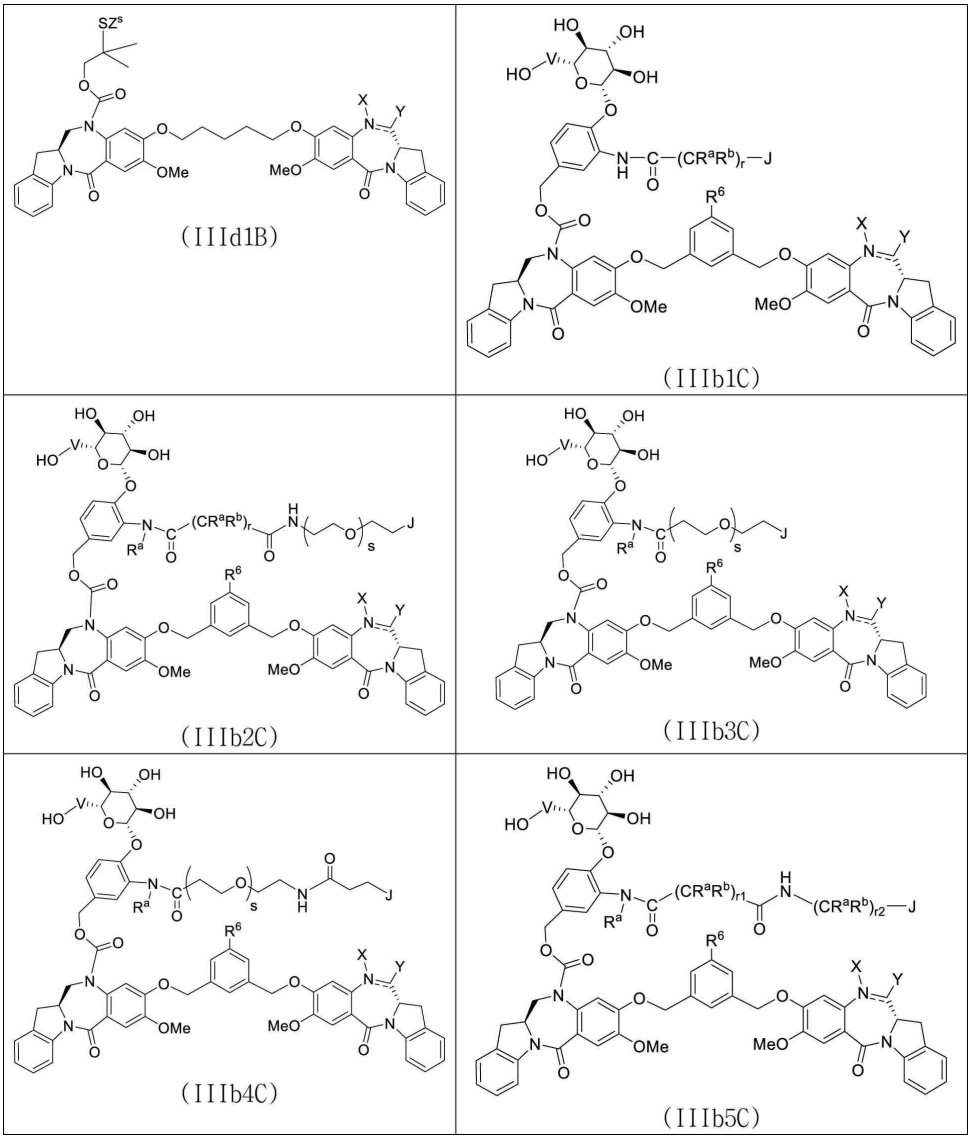


(IIIc4B)

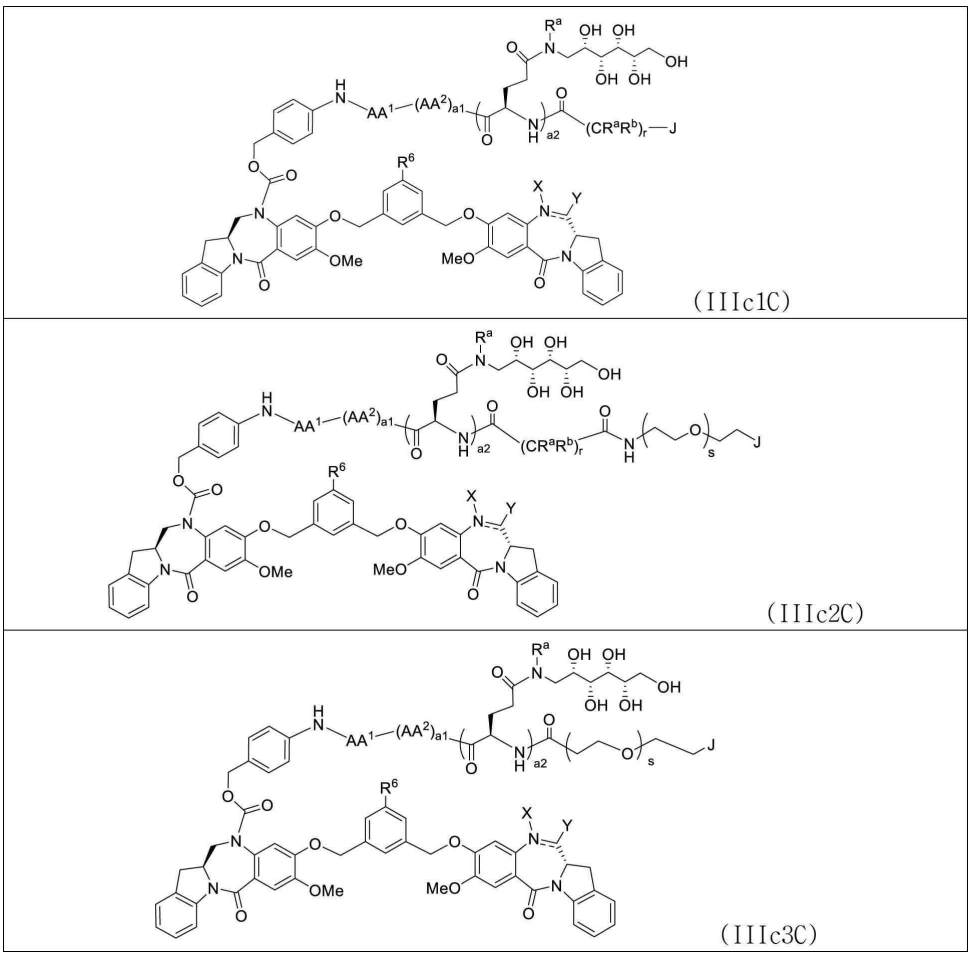


(IIIc5B)

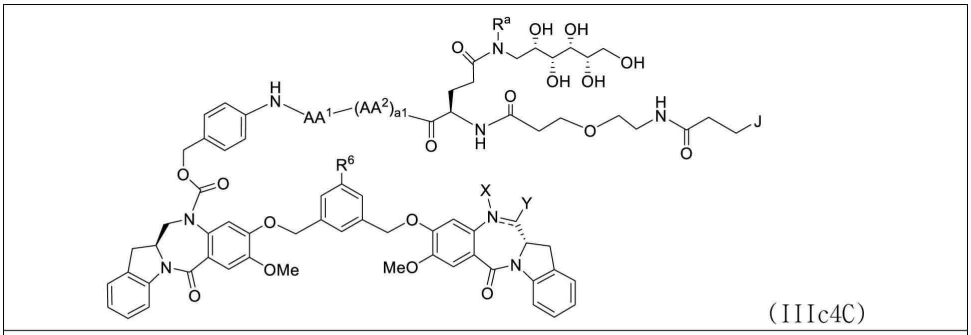
[0220]



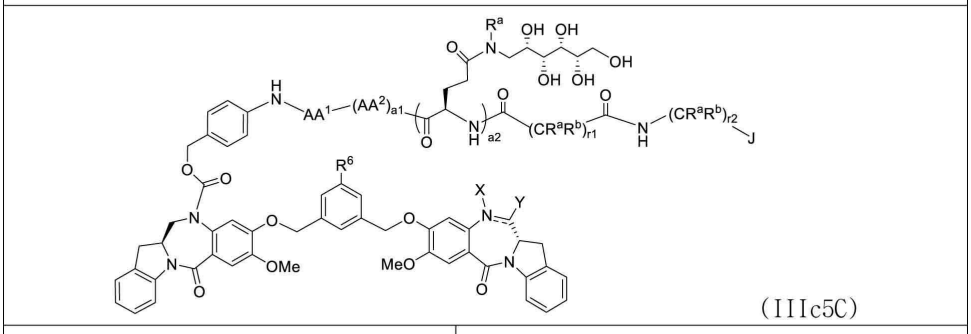
[0221]



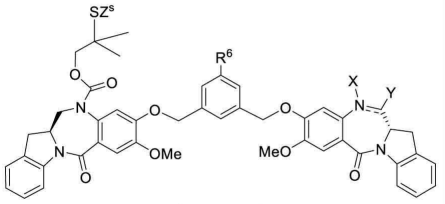
[0222]



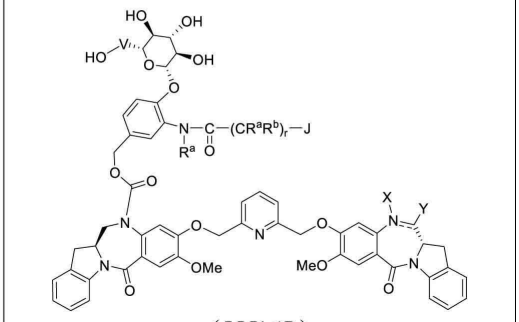
(IIIc4C)



(IIIc5C)

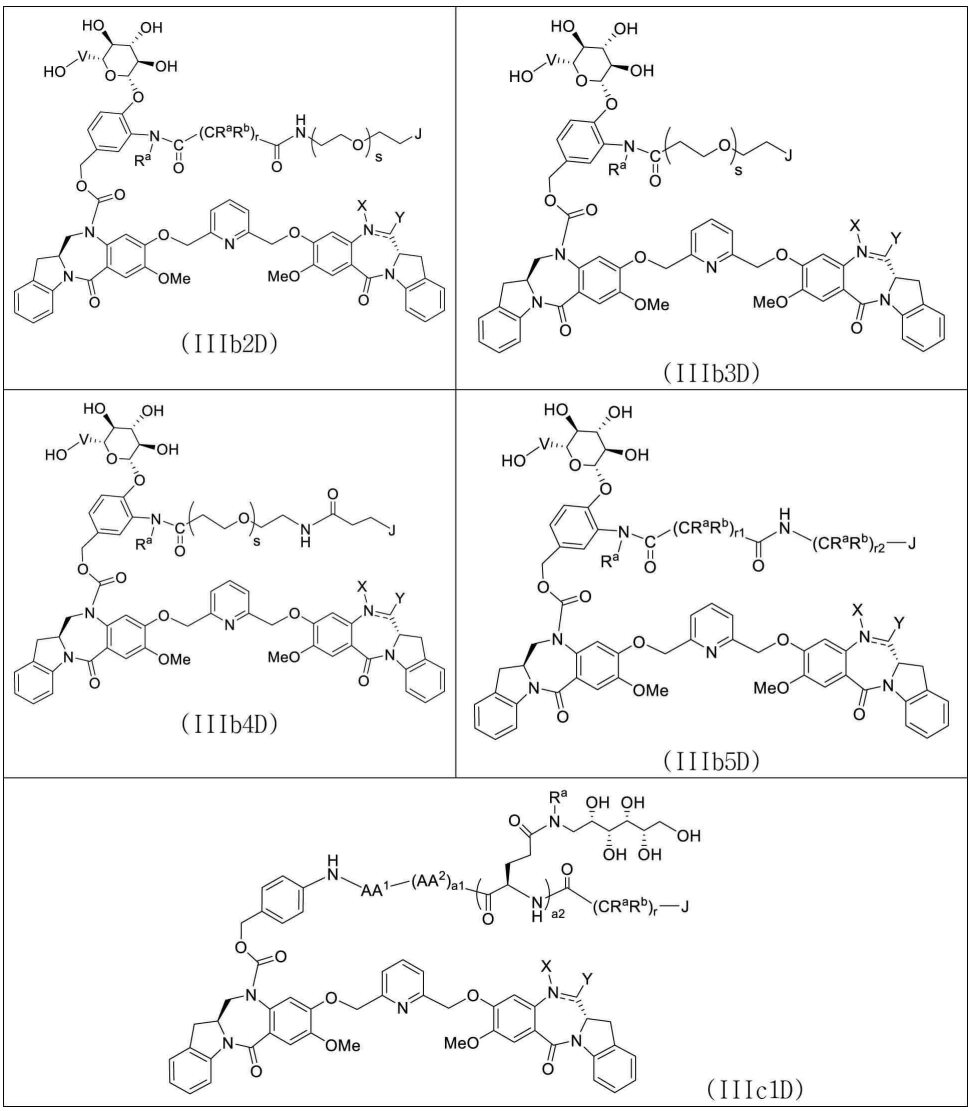


(IIId1C)

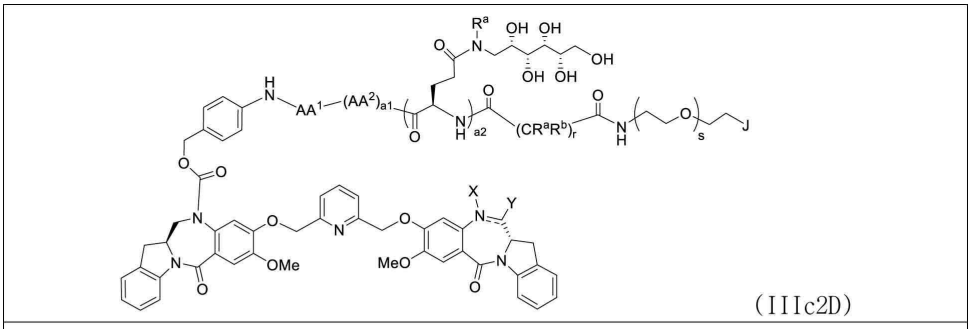


(IIIb1D)

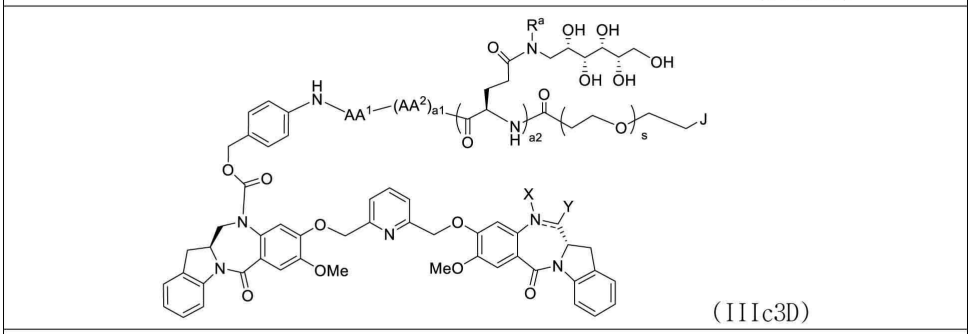
[0223]



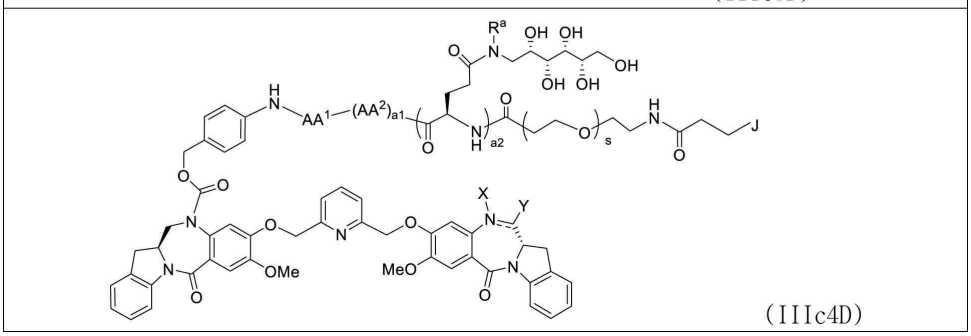
[0224]



(IIIc2D)

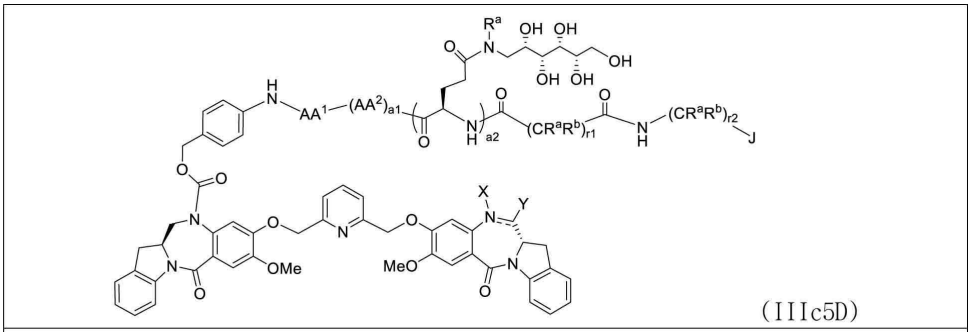


(IIIc3D)

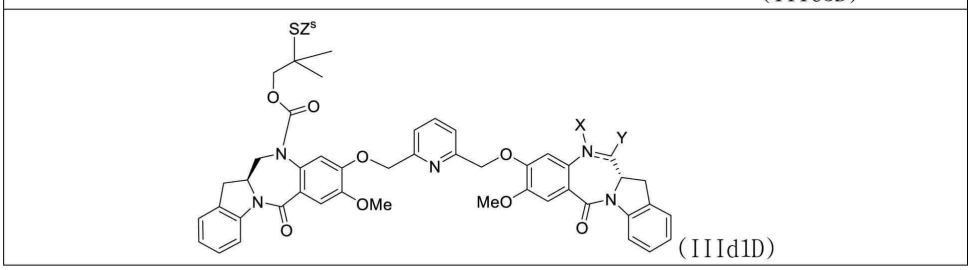


(IIIc4D)

[0225]



(IIIc5D)



(IIId1D)

[0226] 또는 이의 약제학적으로 허용되는 염, 여기서:

[0227] R^6은 $-C(=O)OR^{6a}$ 또는 $NR^{6b}(CH_2CH_2O)_nCH_2CH_2OR^{6c}$이고;

[0228] R^{6a}, R^{6b} 및 R^{6c}는 각각 독립적으로 H 또는 C_{1-4}알킬이고;

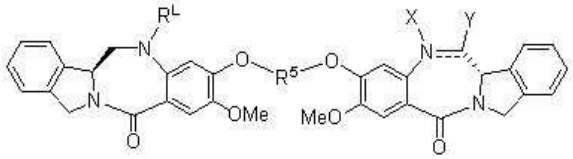
[0229] n은 1 내지 8의 정수이고;

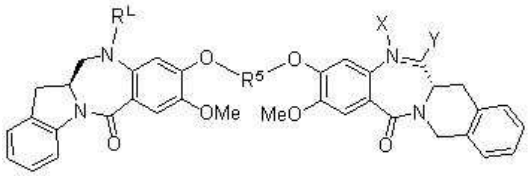
[0230] R^a 및 R^b는, 각각의 경우에, 독립적으로 H 또는 C_{1-4}알킬이고;

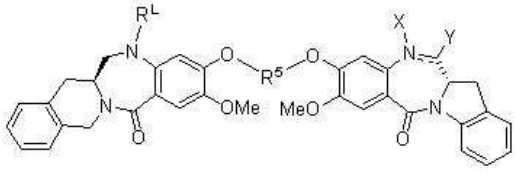
[0231] r, r1 및 r2는 각각 독립적으로 2 내지 6의 정수이고;

[0232] s는 2 내지 12의 정수이고; 나머지 변수는 제6 구체예에 정의된 바와 같다.

[0233] 또한 제11 구체예에 다음 화학식에 의해 표시되는 화합물이 포함된다:

[0234]  (III);

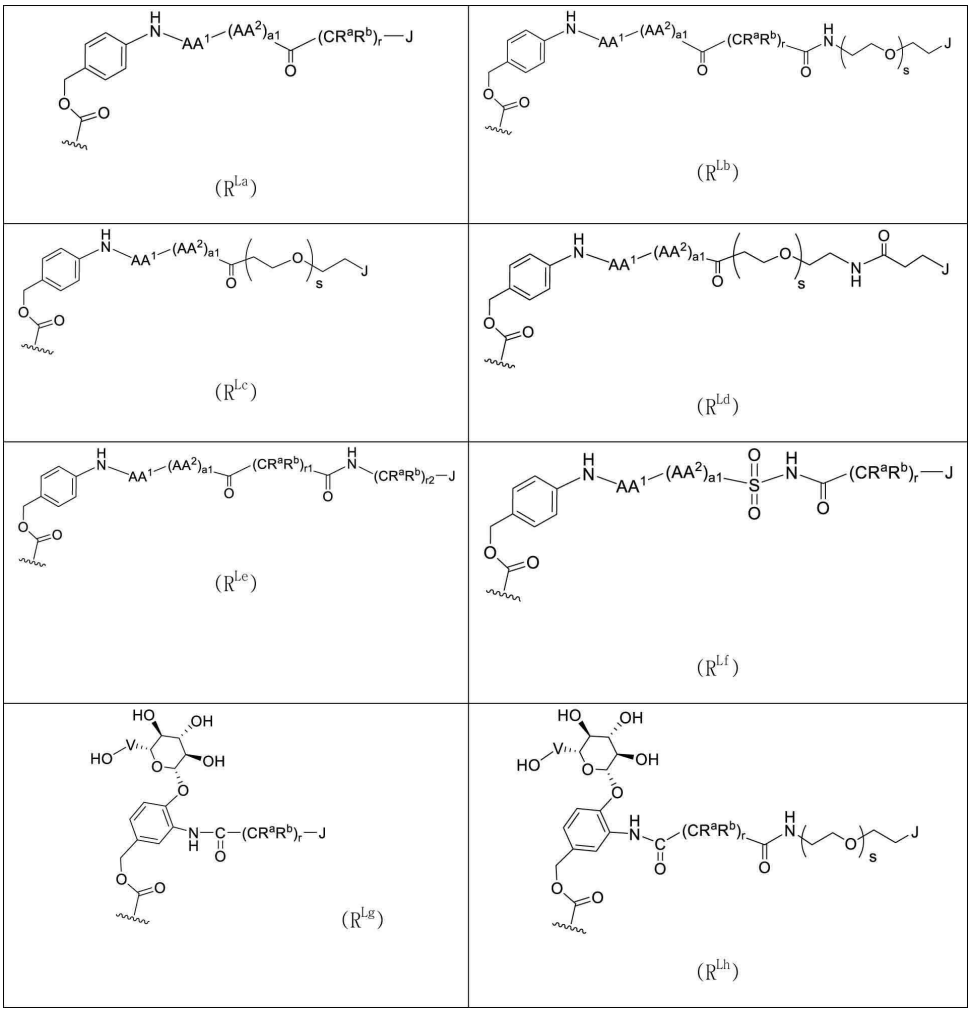
[0235]  (TI'); 또는

[0236]  (T2');

[0237] 또는 이의 약제학적으로 허용되는 염, 여기서:

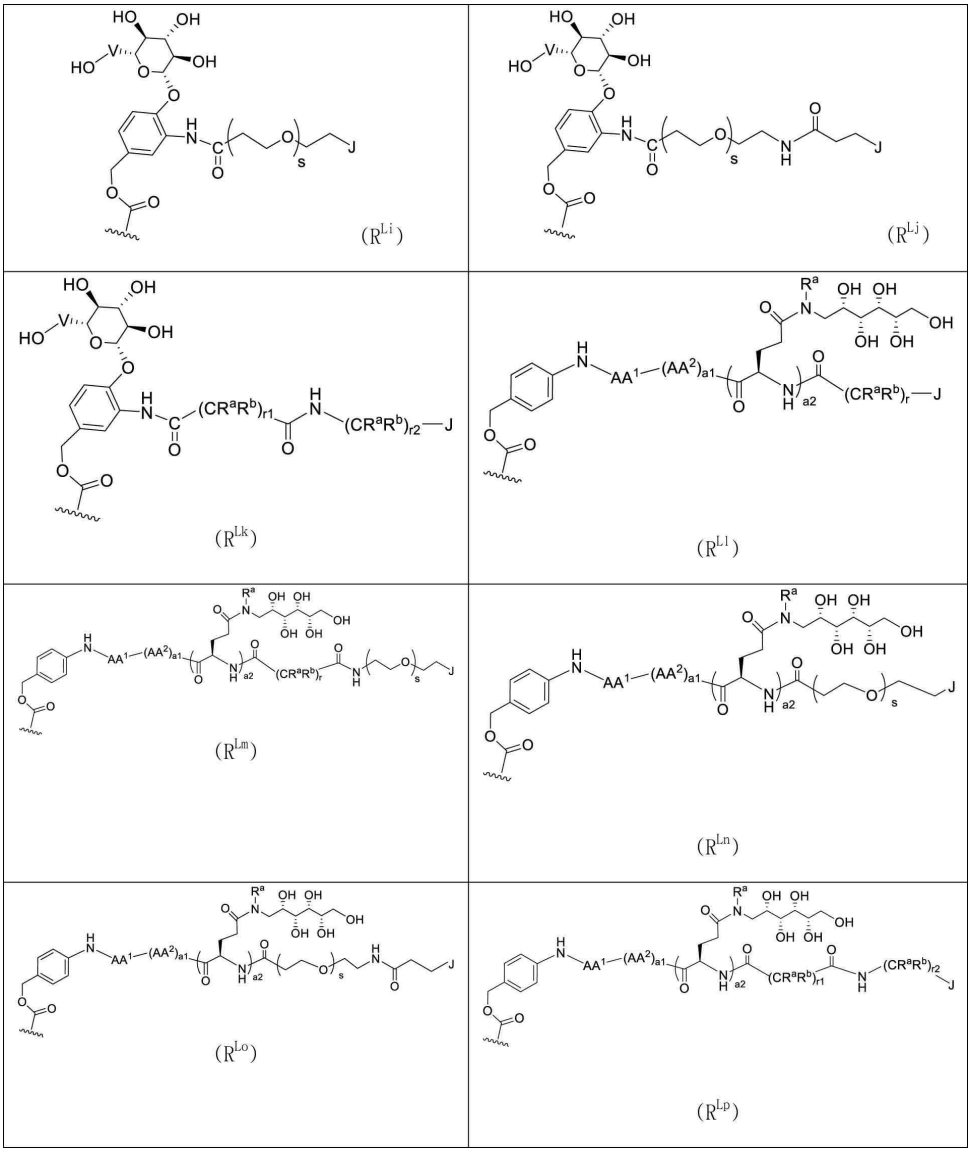
[0238] N과 C 사이의 이중선 ┅ 은 단일 결합 또는 이중 결합을 나타내고, 이중 결합인 경우 X는 부재하고 Y는 H, 또는 C_{1-4}알킬이고, 단일 결합인 경우, X는 H이고 Y는 $-SO_3H$이고;

[0239] R^L은 다음 화학식 중 어느 하나에 의해 표시된다:

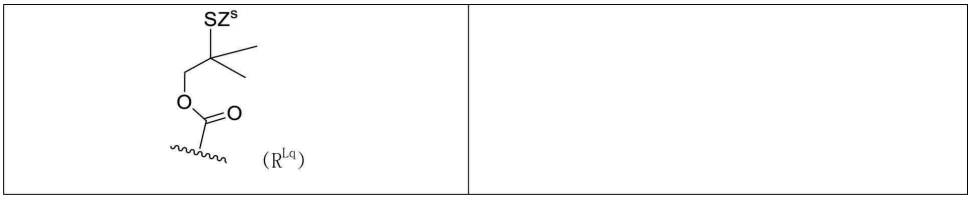


[0240]

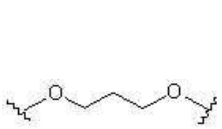
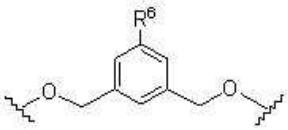
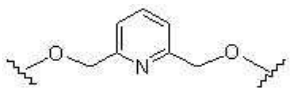
[0241]



[0242]



[0243] R^5는 다음 화학식 중 하나에 의해 표시된다:

[0244]  (R^{5a}); ;  (R^{5c}); 또는  (R^{5d}).

[0245] R^L 및 R^5의 임의의 조합이 본 발명에 포함된다.

[0246] 제12 구체예에서, 제11 구체예에 기재된 화합물, 또는 이의 약제학적으로 허용되는 염에 대해, 변수는 다음과 같이 정의된다:

[0247] R^{6a} 및 R^{6c}은 모두 Me이고;

[0248] R^{6b}는 H이고;

[0249] n은 1, 2, 3 또는 4이고;

[0250] R^{a} 및 R^{b}는, 각각의 경우에, 독립적으로 H 또는 Me이고;

[0251] r은 4이고;

[0252] r1은 4이고;

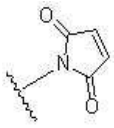
[0253] r2는 2이고;

[0254] s는 1, 2, 3 또는 4이고; 나머지 변수는 제11 구체예에 정의된 바와 같다.

[0255] 제13 구체예에서, 제2 내지 제12 구체예에 기재된 화합물, 또는 이의 약제학적으로 허용되는 염에 대해, J는 $-COOR^{d}$ 또는 COE에 의해 표시되는 반응성 에스테르이고, 여기서 R^{d}는 H 또는 C_{1-4}알킬이고; 나머지 변수는 제2, 제3, 제4, 제5, 제6, 제7, 제8, 제9, 제10, 제11, 또는 제12 구체예 또는 본원에 기재된 임의의 특정 구체예에 정의된 바와 같다.

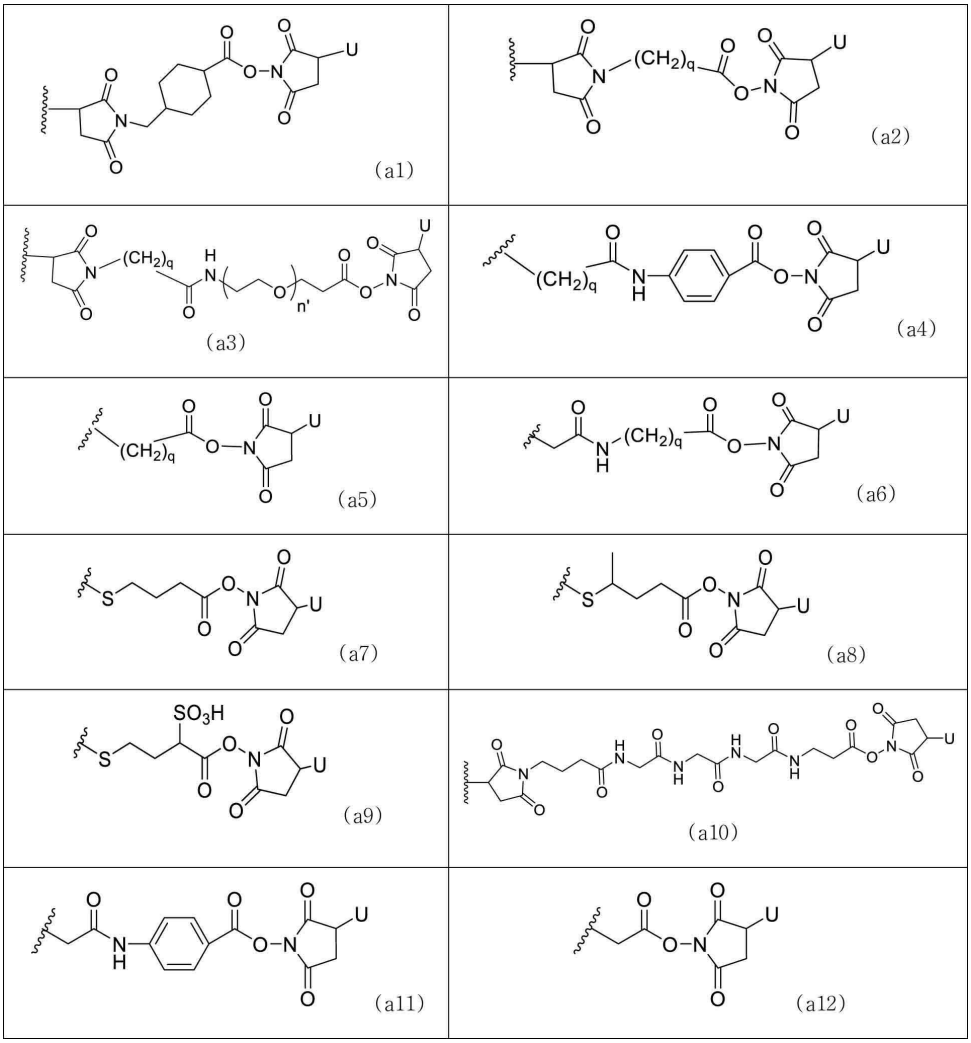
[0256] 특정 구체예에서, J는 N-하이드록시석신이미드 에스테르, N-하이드록시 설포석신이미드 에스테르, 니트로페닐 (*예를 들어*, 2 또는 4-니트로페닐) 에스테르, 디니트로페닐 (*예를 들어*, 2,4-디니트로페닐) 에스테르, 설포-테트라플루오로페닐 (*예를 들어*, 4-설포-2,3,5,6-테트라플루오로페닐) 에스테르, 및 펜타플루오로페닐 에스테르로부터 선택된 반응성 에스테르이다.

[0257] 보다 특정한 구체예에서, J는 N-하이드록시석신이미드 에스테르이다.

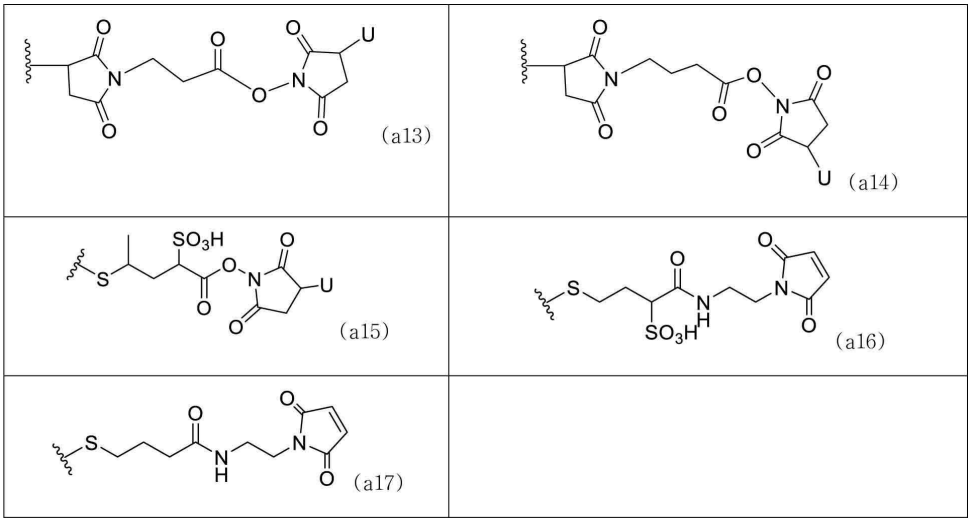
[0258] 제14 구체예에서, 제2 내지 제12 구체예 중 어느 하나에 기재된 화합물, 또는 이의 약제학적으로 허용되는 염에 대해, J는  이고; 나머지 변수는 제2, 제3, 제4, 제5, 제6, 제7, 제8, 제9, 제10, 제11, 또는 제12 구체예 또는 본원에 기재된 임의의 특정 구체예에 정의된 바와 같다.

[0259] 제15 구체예에서, 제2 내지 제12 구체예 중 어느 하나에 기재된 화합물, 또는 이의 약제학적으로 허용되는 염에 대해, J는 $-SZ^{s}$이고; Z^{s}는 H, SR^{e}이고, 또는 다음 화학식으로부터 선택된다:

[0260]



[0261]



[0262] 여기서:

[0263] q는 1 내지 5의 정수이고;

[0264] n'은 2 내지 6의 정수이고;

[0265] U는 -H 또는 SO_3H이고;

[0266] R^e는 1 내지 6 탄소 원자를 갖는 선형 또는 분지형 알킬이거나 페닐, 니트로페닐 (*예를 들어*, 2 또는 4-니트로페닐), 디니트로페닐 (*예를 들어*, 2,4-디니트로페닐), 카르복시니트로페닐 (*예를 들어*, 3-카르복시-4-니트로페

닐), 피리딜 또는 니트로피리딜 (*예를 들어*, 4-니트로피리딜)로부터 선택되고;

[0267] 나머지 변수는 제2, 제3, 제4, 제5, 제6, 제7, 제8, 제9, 제10, 제11, 또는 제12 구체예 또는 본원에 기재된 임의의 특정 구체예에 정의된 바와 같다.

[0268] 특정 구체예에서, Z^s는 H이다. 또 다른 특정 구체예에서, Z^s는 $-SR^e$이고, 여기서 R^e는 메틸이다. 또 다른 특정 구체예에서, Z^s는 화학식 (a7) 또는 (a9)에 의해 표시된다. 또 다른 특정 구체예에서, Z^s는 화학식 (a16) 또는 (a17)에 의해 표시된다.

[0269] 제16 구체예에서, 제1 내지 제15 구체예 중 어느 하나에 기재된 화합물, 또는 이의 약제학적으로 허용되는 염에 대해, N과 C 사이의 이중선 ⁻ 은 이중 결합을 나타내고, X는 부재하고 Y는 H이고; 나머지 변수는 제1, 제2, 제3, 제4, 제5, 제6, 제7, 제8, 제9, 제10, 제11, 제12, 제13, 제14, 또는 제15 구체예 또는 본원에 기재된 임의의 특정 구체예에 정의된 바와 같다.

[0270] 제17 구체예에서, 제1 내지 제15 구체예 중 어느 하나에 기재된 화합물, 또는 이의 약제학적으로 허용되는 염에 대해, N과 C 사이의 이중선 ⁻ 은 단일 결합을 나타내고, X는 H이고 Y는 $-SO_3H$이고; 나머지 변수는 제1, 제2, 제3, 제4, 제5, 제6, 제7, 제8, 제9, 제10, 제11, 제12, 제13, 제14, 또는 제15 구체예 또는 본원에 기재된 임의의 특정 구체예에 정의된 바와 같다. 특정 구체예에서, 약제학적으로 허용되는 염은 소듐 또는 포타슘 염이다. 또 다른 특정 구체예에서, 약제학적으로 허용되는 염은 소듐 염이다.

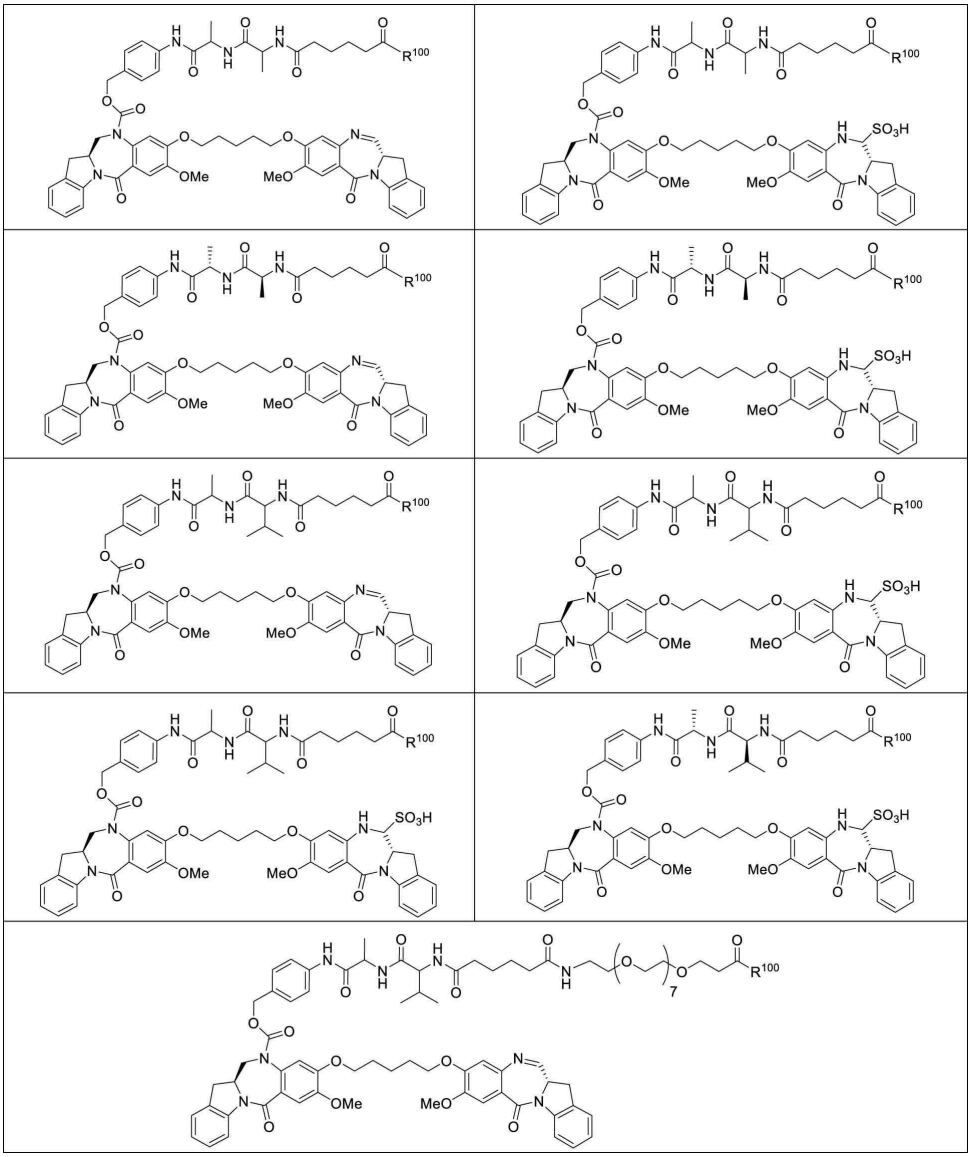
[0271] 제18 구체예에서, 제2 내지 제17 구체예 중 어느 하나에 기재된 화합물, 또는 이의 약제학적으로 허용되는 염에 대해, a1은 1 내지 7의 정수이고; 나머지 변수는 제2, 제3, 제4, 제5, 제6, 제7, 제8, 제9, 제10, 제11, 제12, 제13, 제14, 제15, 제16, 또는 제17 구체예 또는 본원에 기재된 임의의 특정 구체예에 정의된 바와 같다.

[0272] 특정 구체예에서, AA^1 및 AA^2는 각각 독립적으로 아르기(Arg), 히스티딘(His), 라이신(Lys), 아스파트산(Asp), 글루탐산(Glu), 세린(Ser), 트레오닌(Thr), 아스파라긴(Asn), 글루타민(Gln), 시스테인(Cys), 셀레노시스테인(Sec), 글라이신(Gly), 프롤린(Pro), 알라닌(Ala), 발린(Val), 이소류신(Ile), 류신(Leu), 메티오닌(Met), 페닐알라닌(Phe), 티로신(Tyr) 및 트립토판(Trp)으로부터 선택된다.

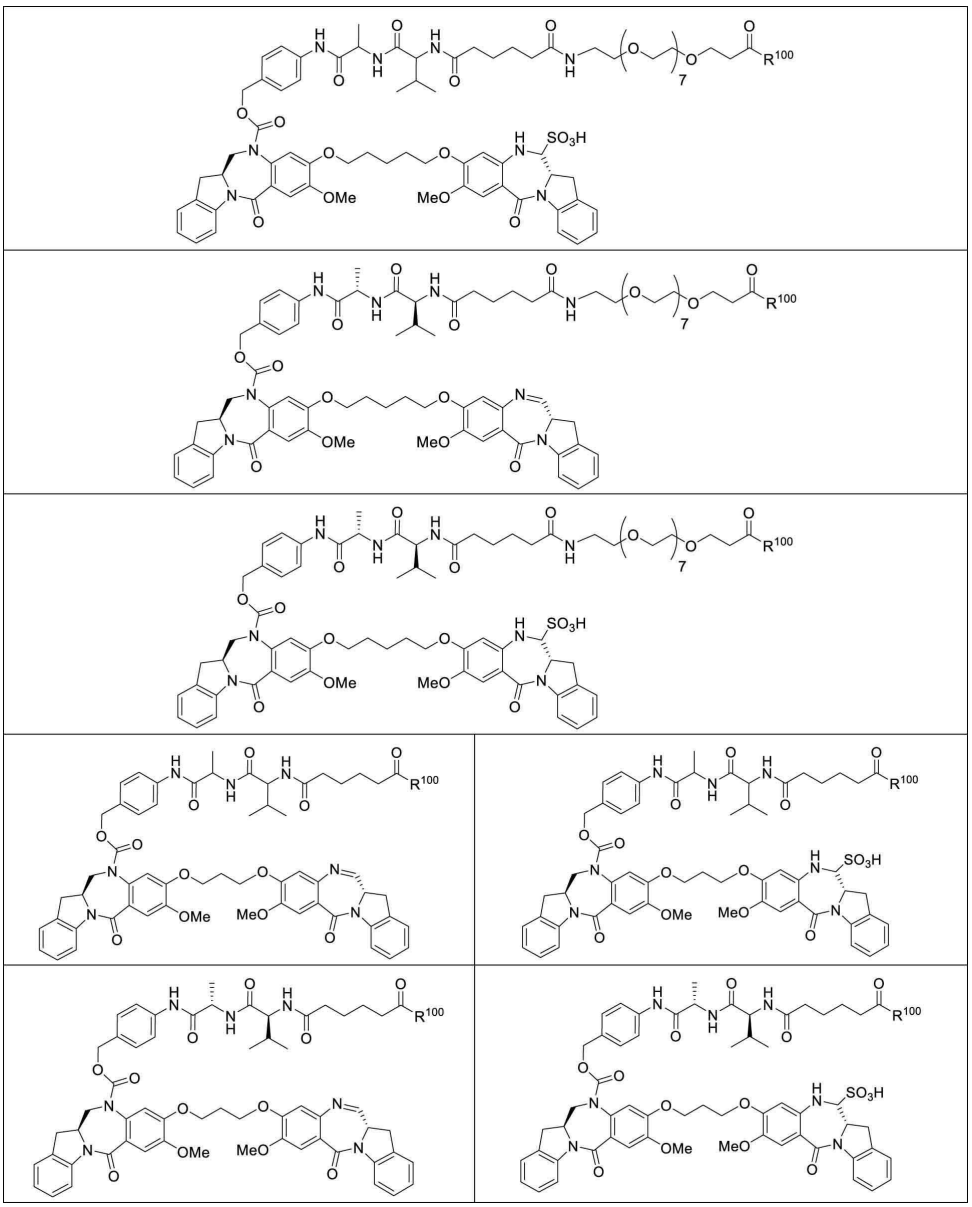
[0273] 제19 구체예에서, 제18 구체예에 기재된 화합물, 또는 이의 약제학적으로 허용되는 염에 대해, AA^1-$(AA^2)_{a1}$은 Gly-Gly-Gly, Ala-Val, Val-Ala, Val-Cit, Val-Lys, Phe-Lys, Lys-Lys, Ala-Lys, Phe-Cit, Leu-Cit, Lle-Cit, Phe-Ala, Phe-N^9-토실-Arg, Phe-N^9-니트로-Arg, Phe-Phe-Lys, D-Phe-Phe-Lys, Gly-Phe-Lys, Leu-Ala-Leu, Ile-Ala-Leu, Val-Ala-Val, Ala-Leu-Ala-Leu, β-Ala-Leu-Ala-Leu, Gly-Phe-Leu-Gly, Val-Arg, Arg-Val, Arg-Arg, Val-D-Cit, Val-D-Lys, Val-D-Arg, D-Val-Cit, D-Val-Lys, D-Val-Arg, D-Val-D-Cit, D-Val-D-Lys, D-Val-D-Arg, D-Arg-D-Arg, Ala-Ala, Ala-D-Ala, D-Ala-Ala, D-Ala-D-Ala, Ala-Met, Met-Ala, Thr-Thr, Thr-Met, Met-Thr, Leu-Ala, Cit-Val, Gln-Val, Ser-Val, Leu-Gln, Gln-Leu, Phe-Arg, Arg-Phe, Tyr-Arg, Arg-Tyr, Phe-Gln, Gln-Phe, Val-Thr, Thr-Val, Met-Tyr, 및 Tyr-Met로부터 선택되고; 나머지 변수는 제18 구체예에 정의된 바와 같다.

[0274] 특정 구체예에서, AA^1-$(AA^2)_{a1}$은 Ala-Ala, L-Ala-L-Ala, Ala-Val, L-Ala-L-Val, Gln-Val, L-Gln-L-Val, Gln-Leu, L-Gln-L-Leu, Ser-Val, 또는 L-Ser-L-Val이다.

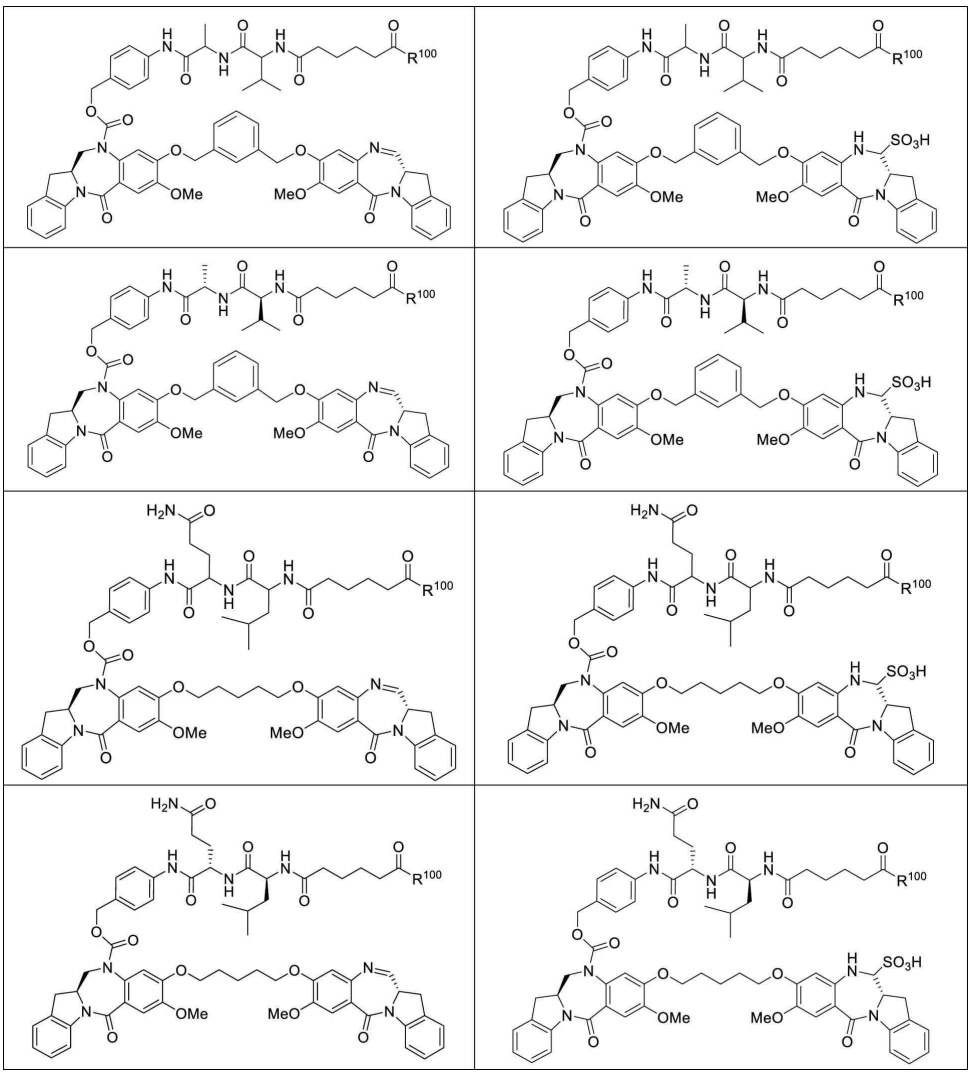
[0275] 제20 구체예에서, 본 발명의 화합물은 표 D에서 다음 화학식에 의해 표시되고:

[0276] 

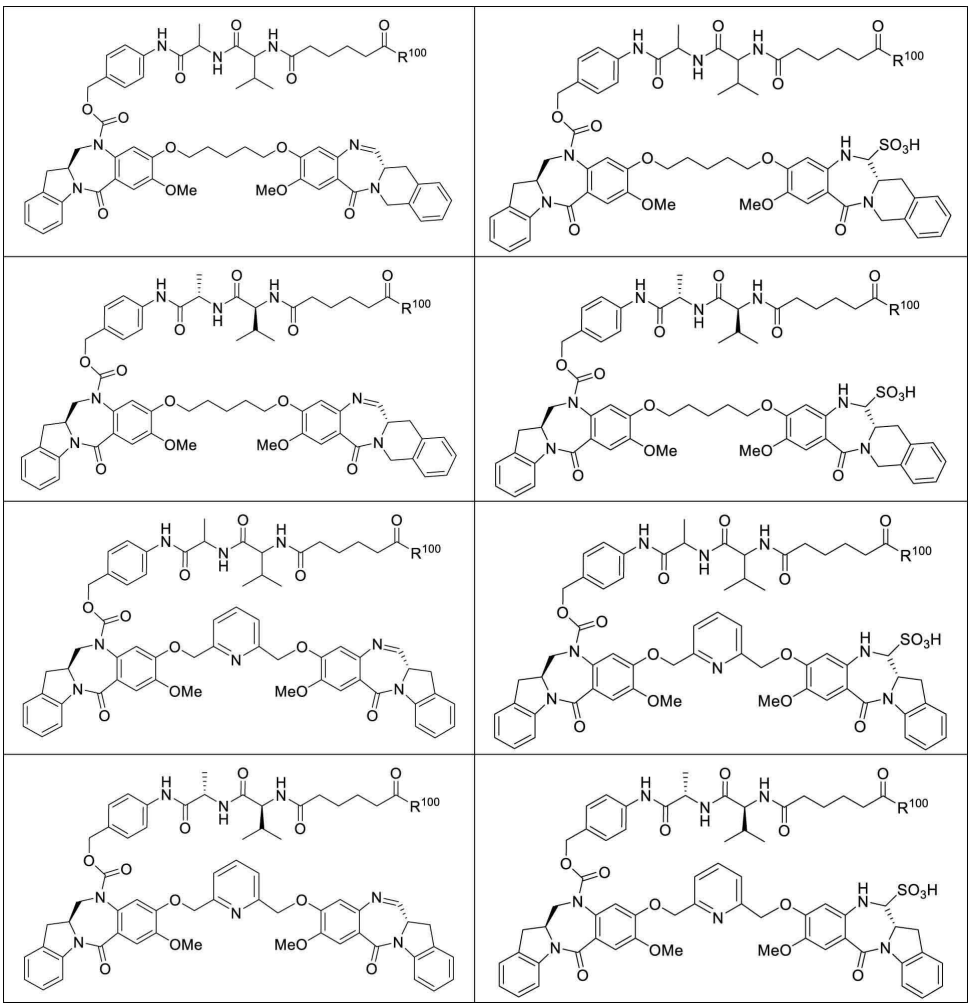
[0277]



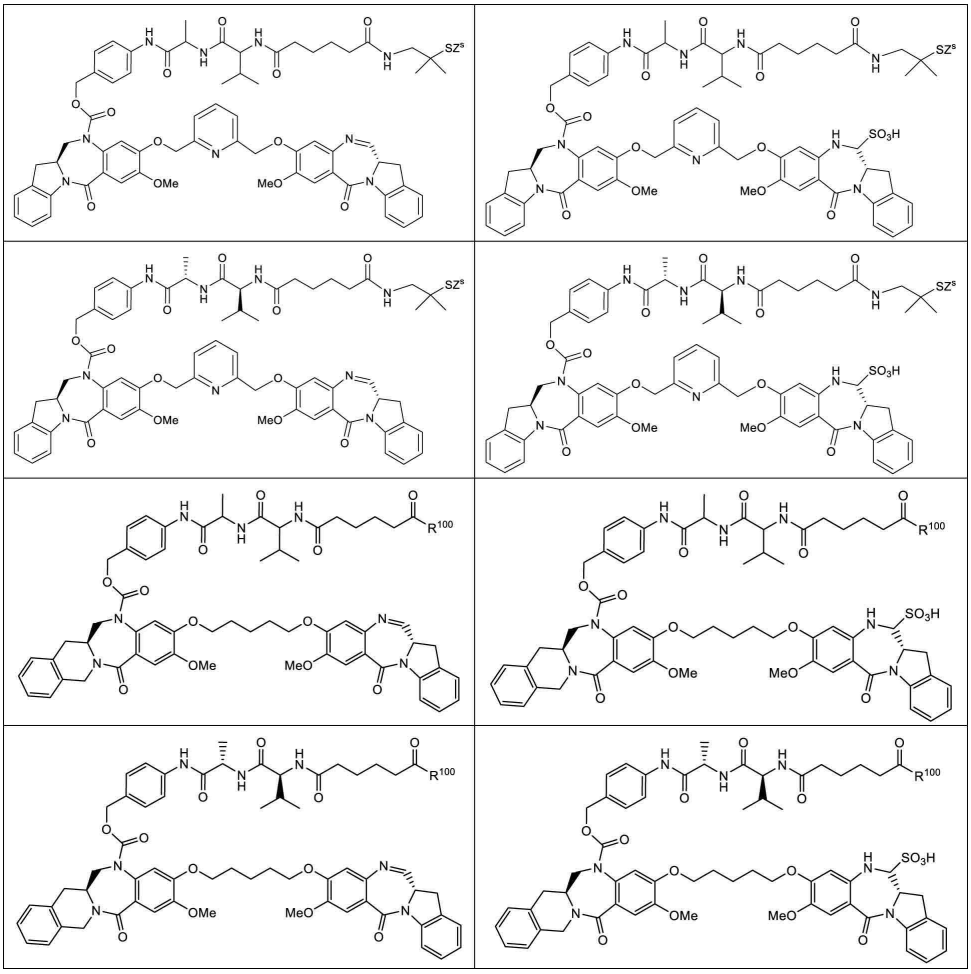
[0278]



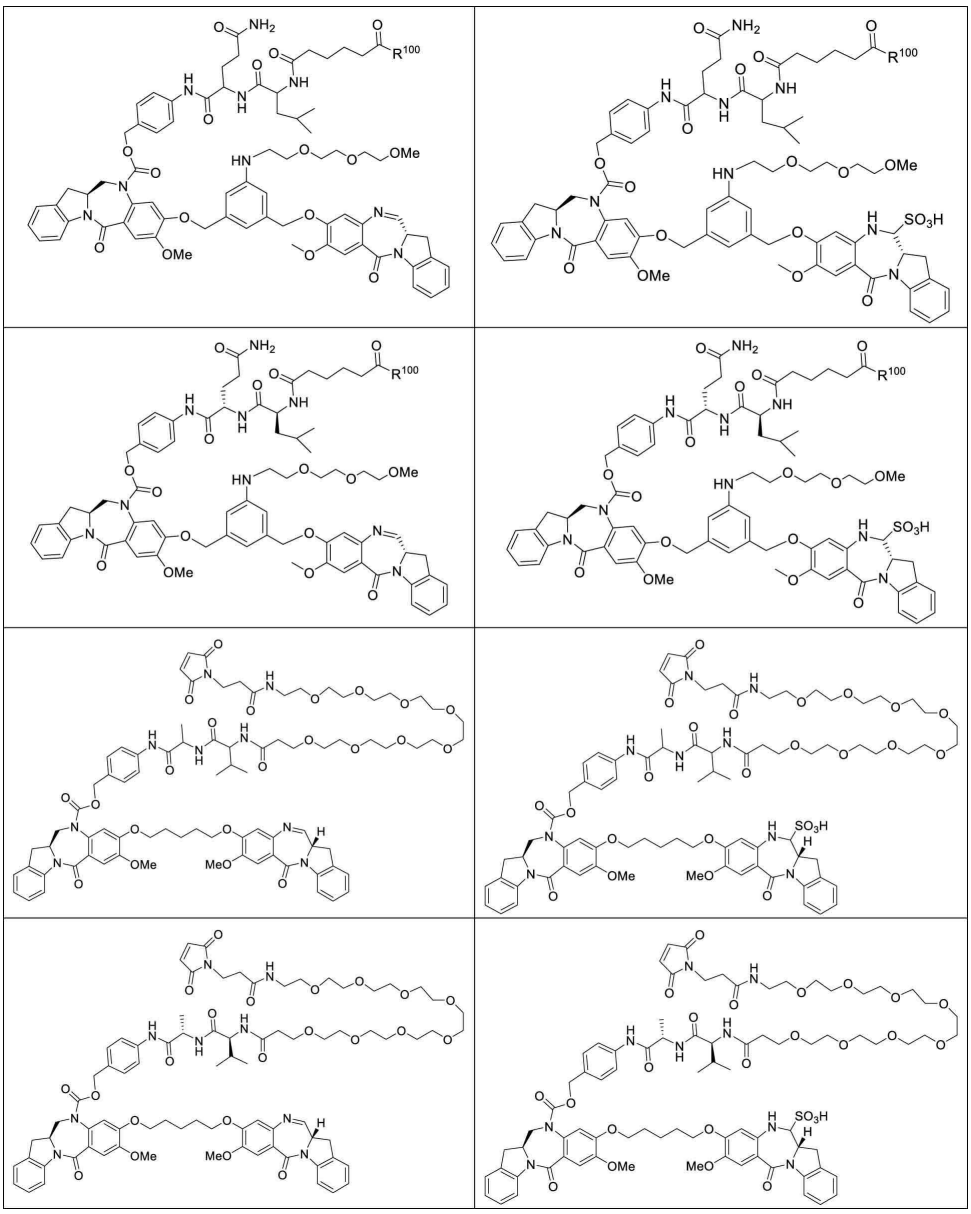
[0279]

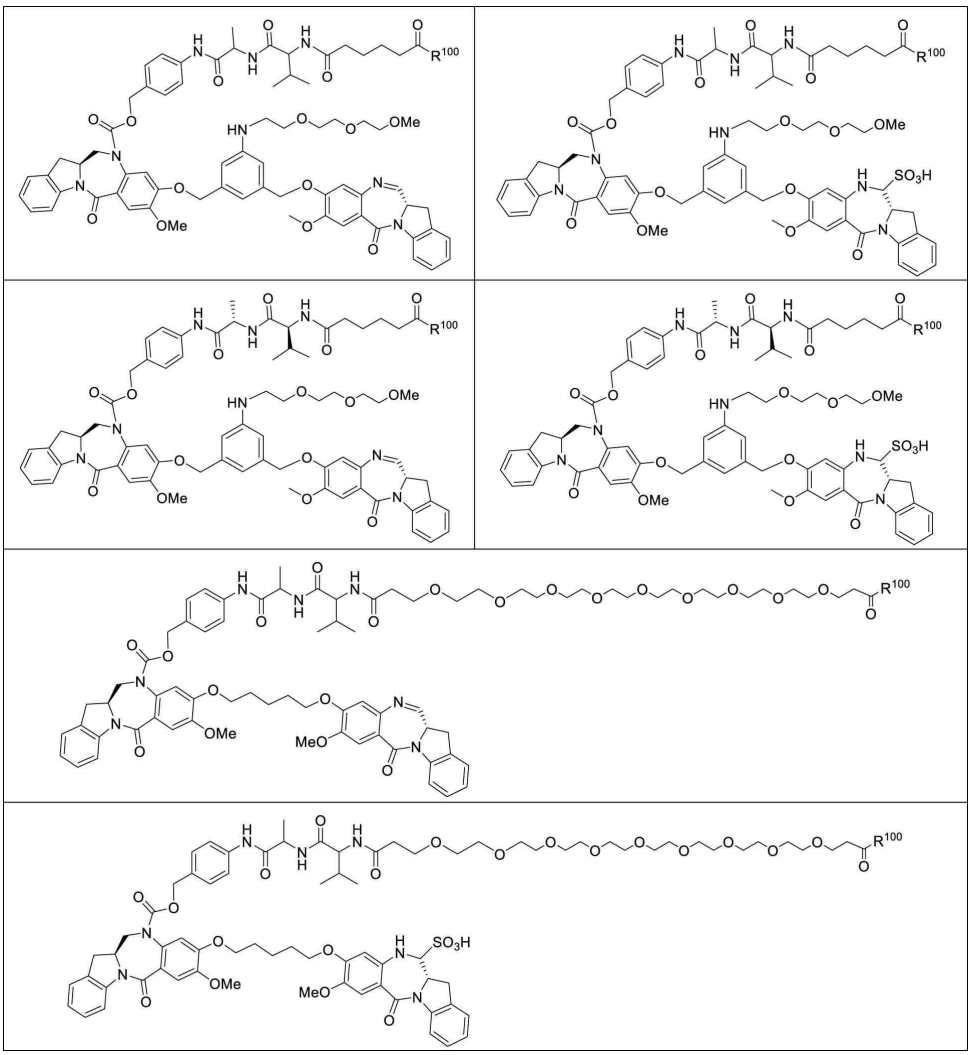


[0280]

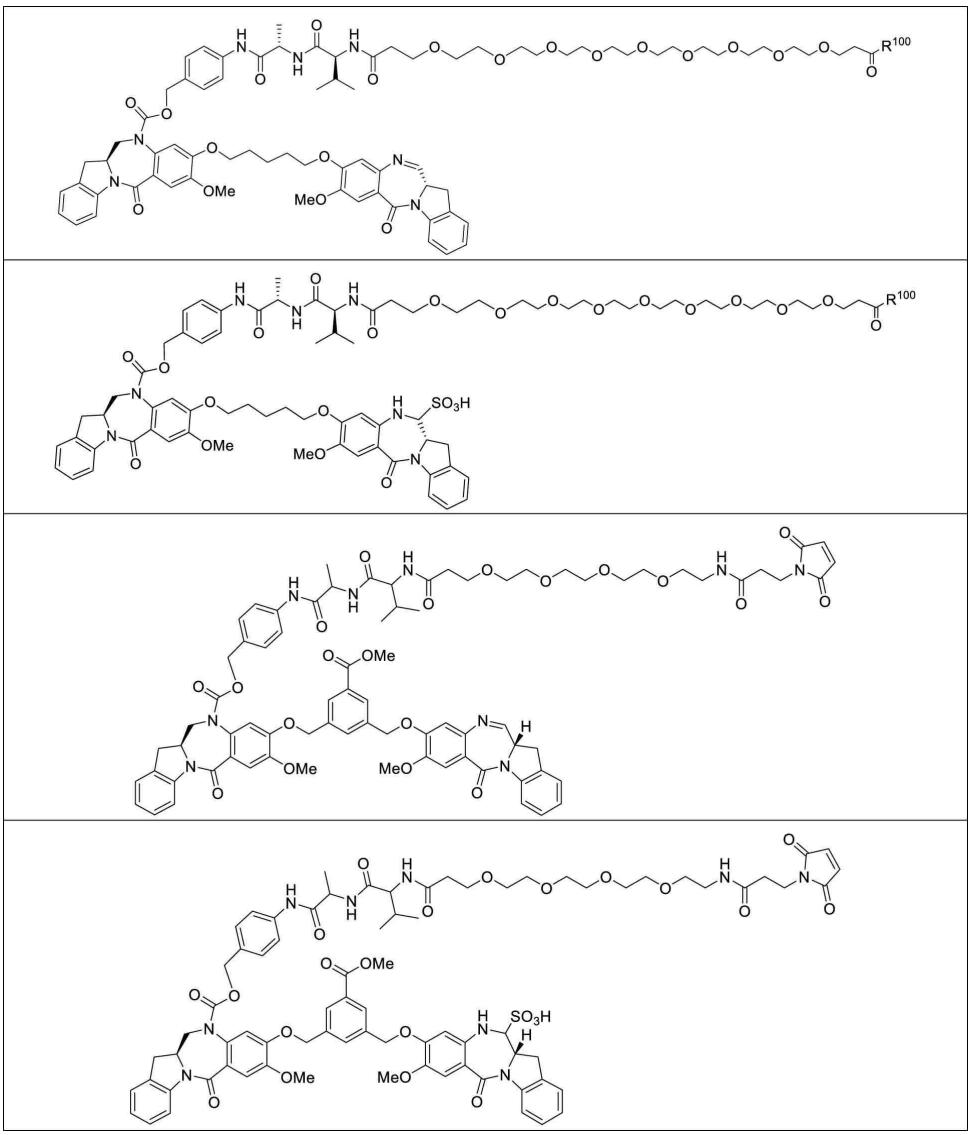


[0281]

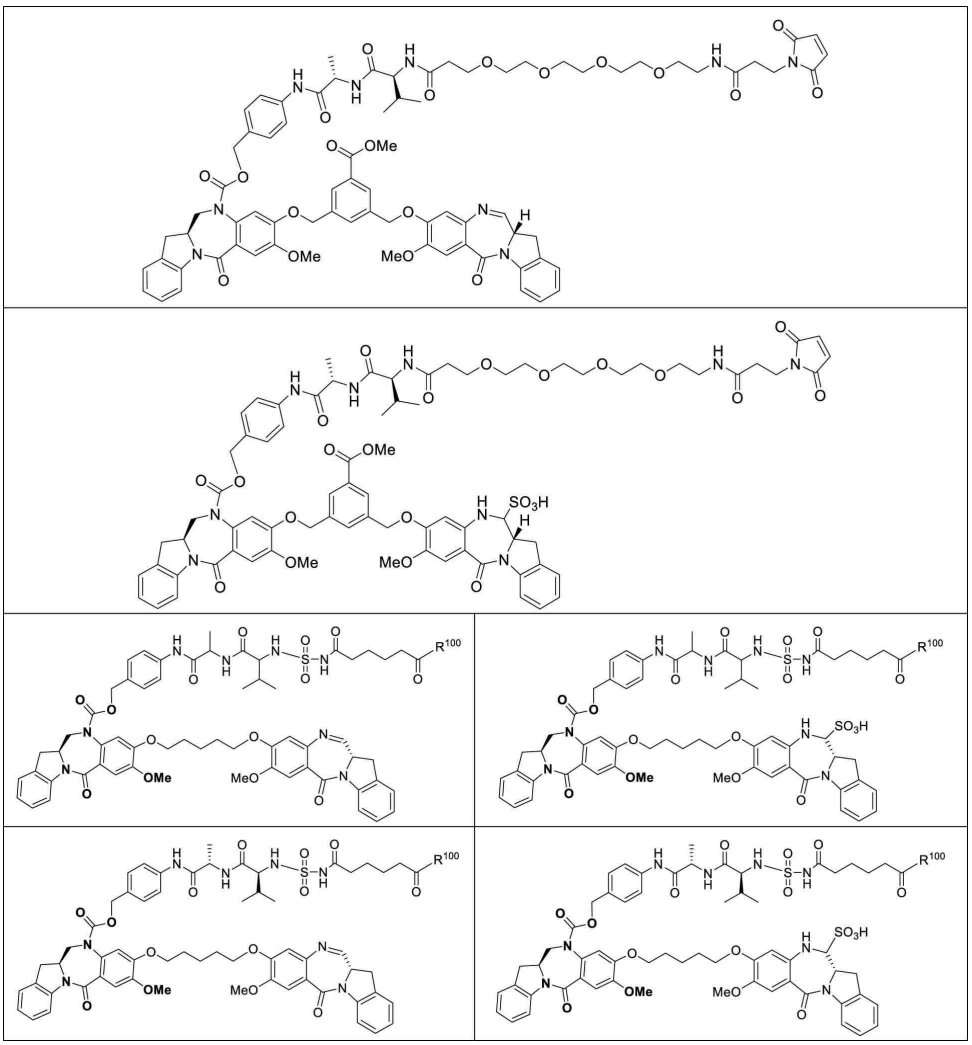


[0282] 

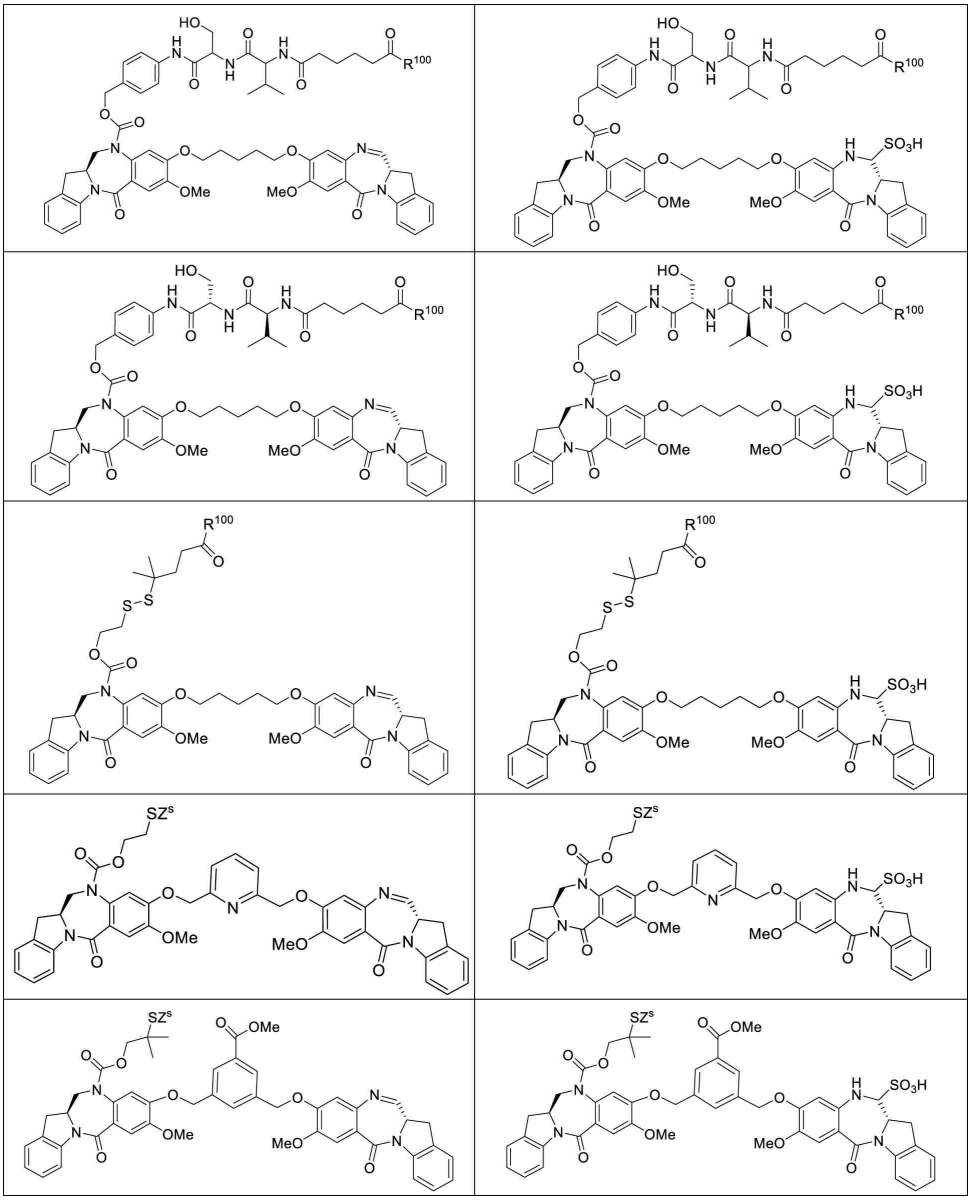
[0283]



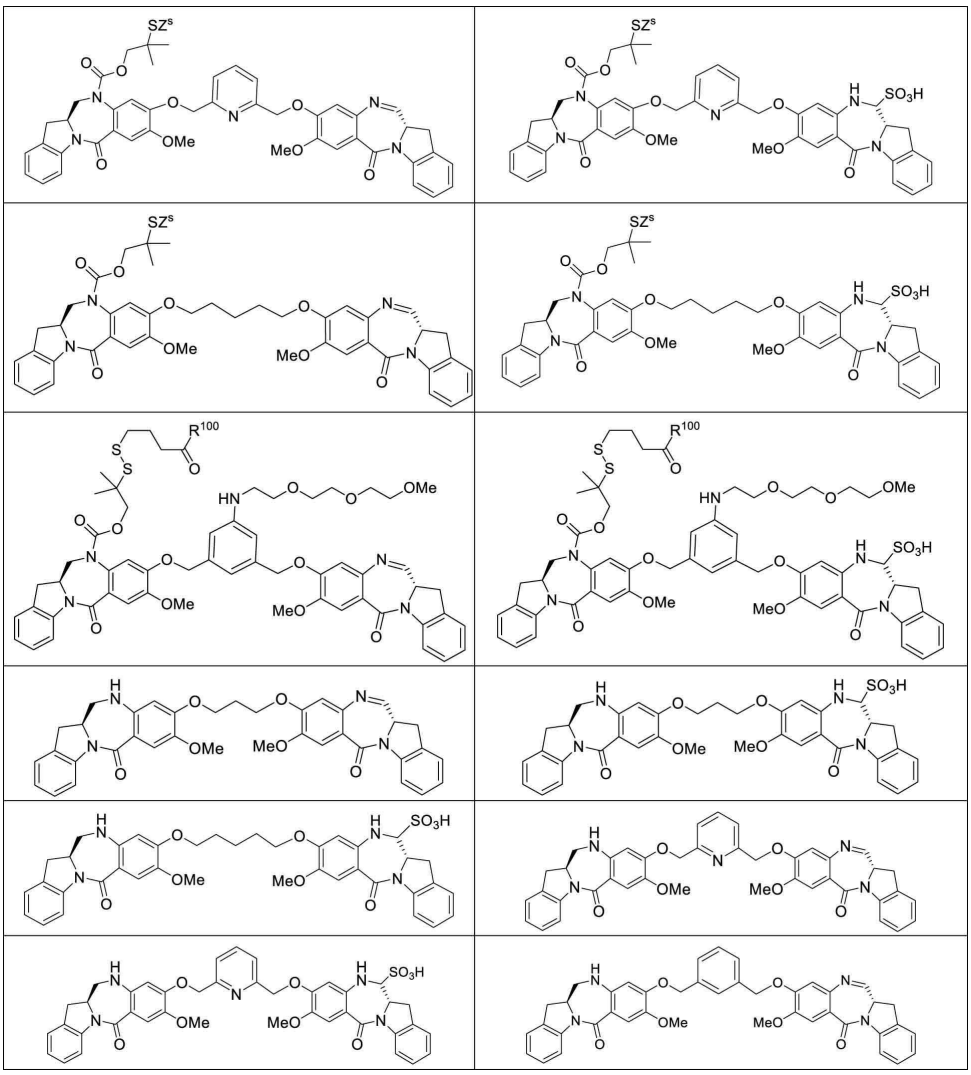
[0284]

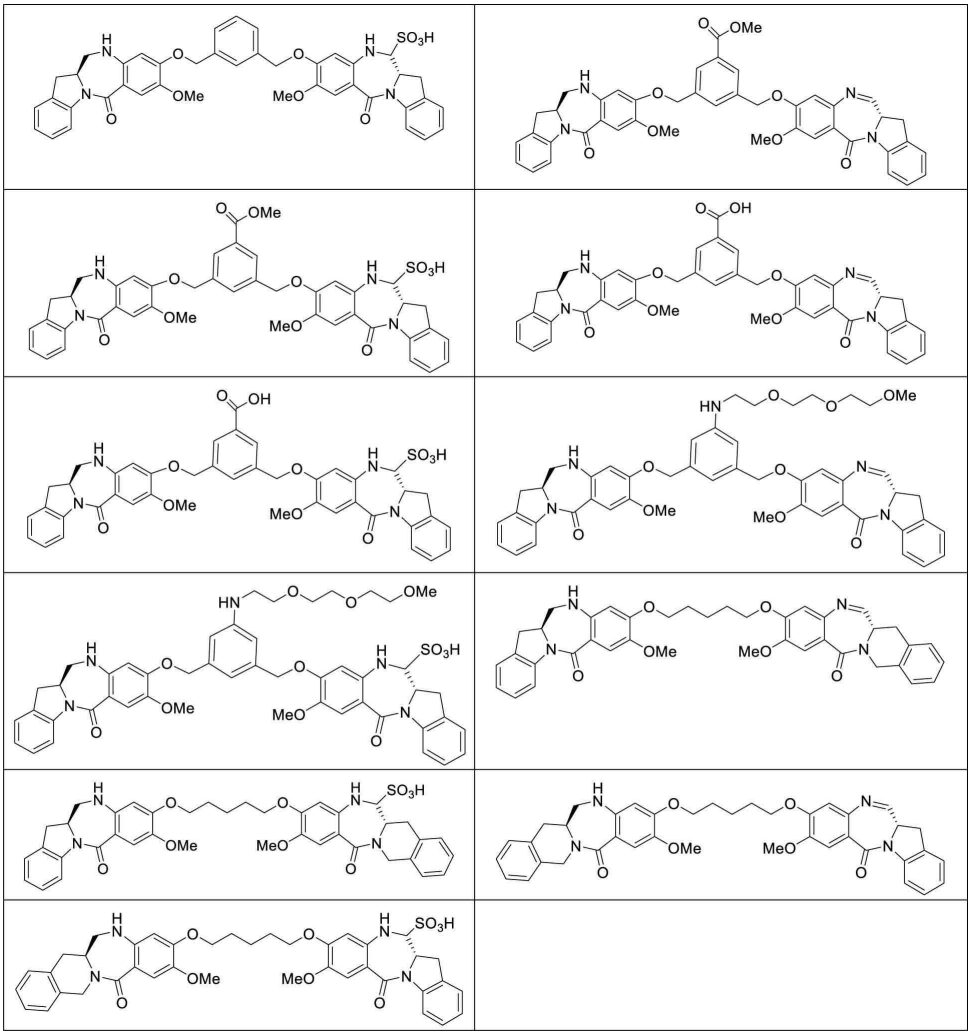


[0285]



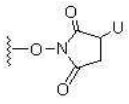
[0286]



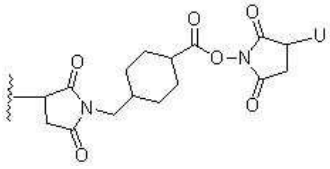
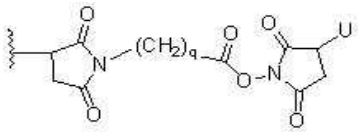


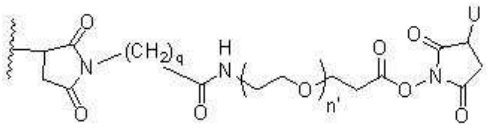
[0287]

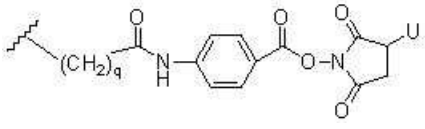
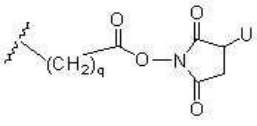
[0288] 또는 이의 약제학적으로 허용되는 염, 여기서:

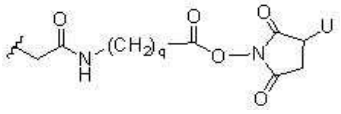
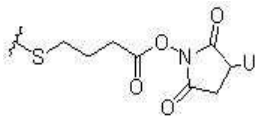
[0289] R^{100}은 -OH, -OMe 또는  이고;

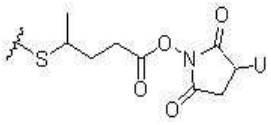
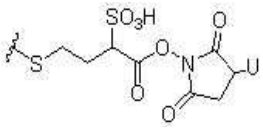
[0290] Z^s는 H, SR^e이고, 또는 다음 화학식으로부터 선택되고:

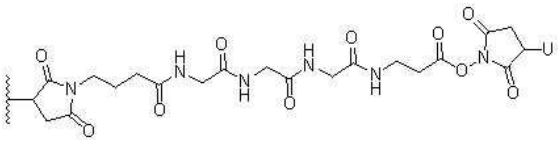
[0291]  (a1);  (a2);

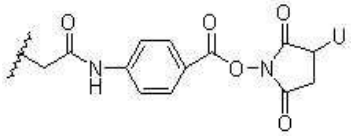
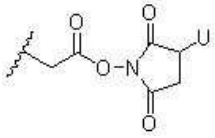
[0292]  (a3);

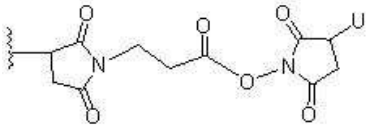
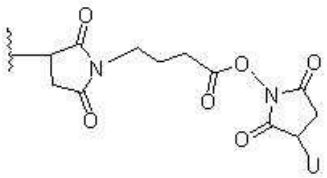
[0293]  (a4);  (a5);

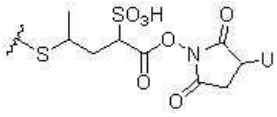
[0294]  (a6);  (a7);

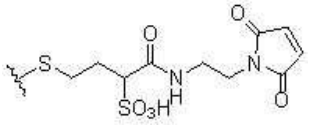
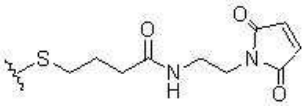
[0295]  (a8);  (a9);

[0296]  (a10);

[0297]  (a11);  (a12);

[0298]  (a13);  (a14);

[0299]  (a15),

[0300]  (a16), 또는  (a17)

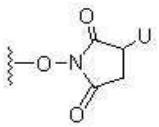
[0301] 여기서:

[0302] q는 1 내지 5의 정수이고;

[0303] n'은 2 내지 6의 정수이고;

[0304] U는 -H 또는 SO_3H이고;

[0305] R^e는 1 내지 6 탄소 원자를 갖는 선형 또는 분지형 알킬이거나 페닐, 니트로페닐 (*예를 들어*, 2 또는 4-니트로페닐), 디니트로페닐 (*예를 들어*, 2,4-디니트로페닐), 카르복시니트로페닐 (*예를 들어*, 3-카르복시-4-니트로페닐), 피리딜 또는 니트로피리딜 (*예를 들어*, 4-니트로피리딜)로부터 선택되고; 나머지 변수는 제1 구체예에 정의된 바와 같다.

[0306] 특정 구체예에서, R^{100}은  이다. 보다 특정한 구체예에서, U는 H이다.

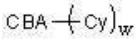
[0307] 제21 구체예에서, 위에 기재된 화합물(*예를 들어*, 제1 양태 또는 이에 기재된 임의의 구체예 또는 제1 내지 제20 구체예 또는 이에 기재된 임의의 구체예 또는 특정 구체예에 기재된 화합물)에 대해, 이의 약제학적으로 허용되는 염은 소듐 또는 포타슘 염이다. 한 구체예에서, 약제학적으로 허용되는 염은 소듐 염이다. 한 구체예에

서, 약제학적으로 허용되는 염은 포타슘 염이다.

[0308] 본 발명의 접합체

[0309] 제2 양태에서, 본 발명은 본원에 기재된 세포독성 화합물에 공유적으로 연결된 본원에 기재된 세포결합제를 포함하는 세포결합제-세포독성제 접합체를 제공한다.

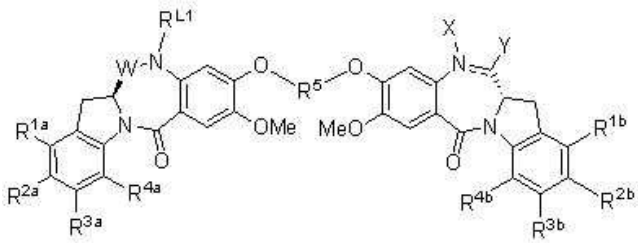
[0310] 제22 구체예에서, 본 발명의 접합체는 다음 화학식에 의해 표시된다:

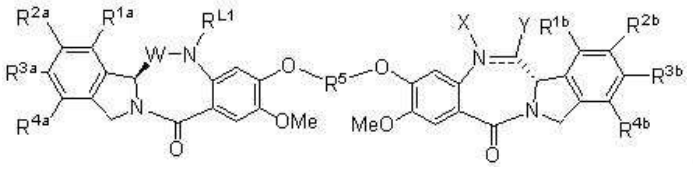
[0311] 
,

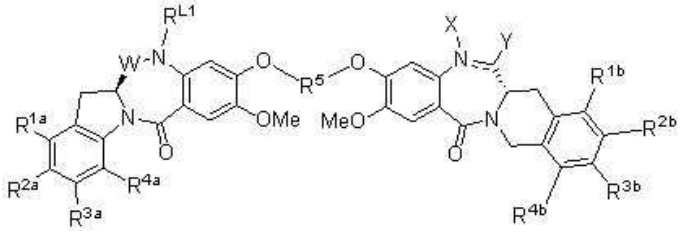
[0312] 또는 이의 약제학적으로 허용되는 염, 여기서:

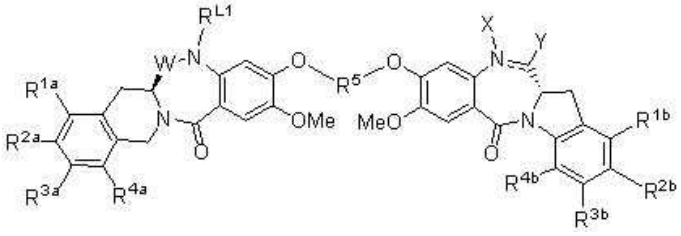
[0313] CBA는 세포결합제이고;

[0314] Cy는 다음 화학식에 의해 표시되는 세포독성제:

[0315] 
(V);

[0316] 
(VI);

[0317] 
(TC1); 또는

[0318] 
(TC2),

[0319] 또는 이의 약제학적으로 허용되는 염이고, 여기서:

[0320] N과 C 사이의 이중선 ┅ 은 단일 결합 또는 이중 결합을 나타내고, 이중 결합인 경우 X는 부재하고 Y는 H, 또는 C_{1-4}알킬이고, 단일 결합인 경우, X는 H이고 Y는 -OH 또는 $-SO_3H$이고;

[0321] W는 -C(=O)- 또는 -C(Y')-이고;

[0322] Y'은 H 또는 C_{1-4}알킬이고;

[0323] R^{1a}, R^{2a}, R^{3a}, R^{4a}, R^{1b}, R^{2b}, R^{3b} 및 R^{4b}는 H, C_{1-10}알킬, $-(OCH_2CH_2)_n-OR^c$, 할로겐, $-NH(C=NH)NH_2$, -OR, -NR'R'', $-NO_2$, -NR'COR'', -SR, -SOR', $-SO_2R'$, $-SO_3H$, $-OSO_3H$, $-SO_2NR'R''$, -CN, $-N_3$, -COR', -OCOR', 및 -OCONR'R''로

이루어진 군으로부터 각각 독립적으로 선택되고;

[0324] R^c는 H 또는 C_{1-4}알킬이고;

[0325] n은 1 내지 24의 정수이고;

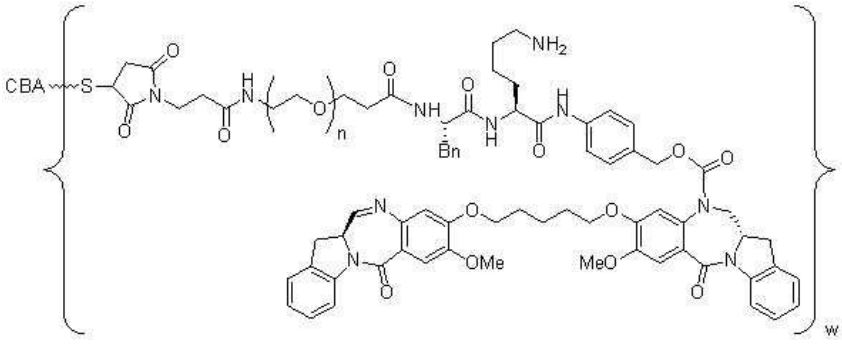
[0326] R은, 각각의 경우에, H, $-(CH_2CH_2O)_n-R^c$, C_{1-10}알킬, C_{3-8}사이클로알킬, 6- 내지 18-원 아릴, N, O 및 S로부터 독립적으로 선택된 하나 이상의 헤테로원자를 포함하는 5- 내지 18-원 헤테로아릴 고리, 또는 O, S, N 및 P로부터 독립적으로 선택된 1 내지 6 헤테로원자를 포함하는 3- 내지 18-원 헤테로사이클릭 고리로 이루어진 군으로부터 독립적으로 선택되고;

[0327] R' 및 R''은 -H, -OH, -OR, -NHR, $-NR_2$, -COR, C_{1-10}알킬, $-(CH_2CH_2O)_n-R^c$, 및 O, S, N 및 P로부터 독립적으로 선택된 1 내지 6 헤테로원자를 갖는 3- 내지 18-원 헤테로사이클릭 고리로부터 각각 독립적으로 선택되고;

[0328] R^5는 C_{3-12}알킬렌이고, 이 사슬은 -O-, -S-, -NH-, -NMe-, 벤젠 고리, 4 내지 7-원 헤테로아릴 고리 및 4 내지 7-원 헤테로사이클릭 고리로부터 선택된 하나 이상의 기에 의해 단절될 수 있고, 여기서 벤젠, 4 내지 7-원 헤테로아릴 고리 및 4 내지 7-원 헤테로사이클릭 고리는 1 내지 4 R^6으로 치환되고;

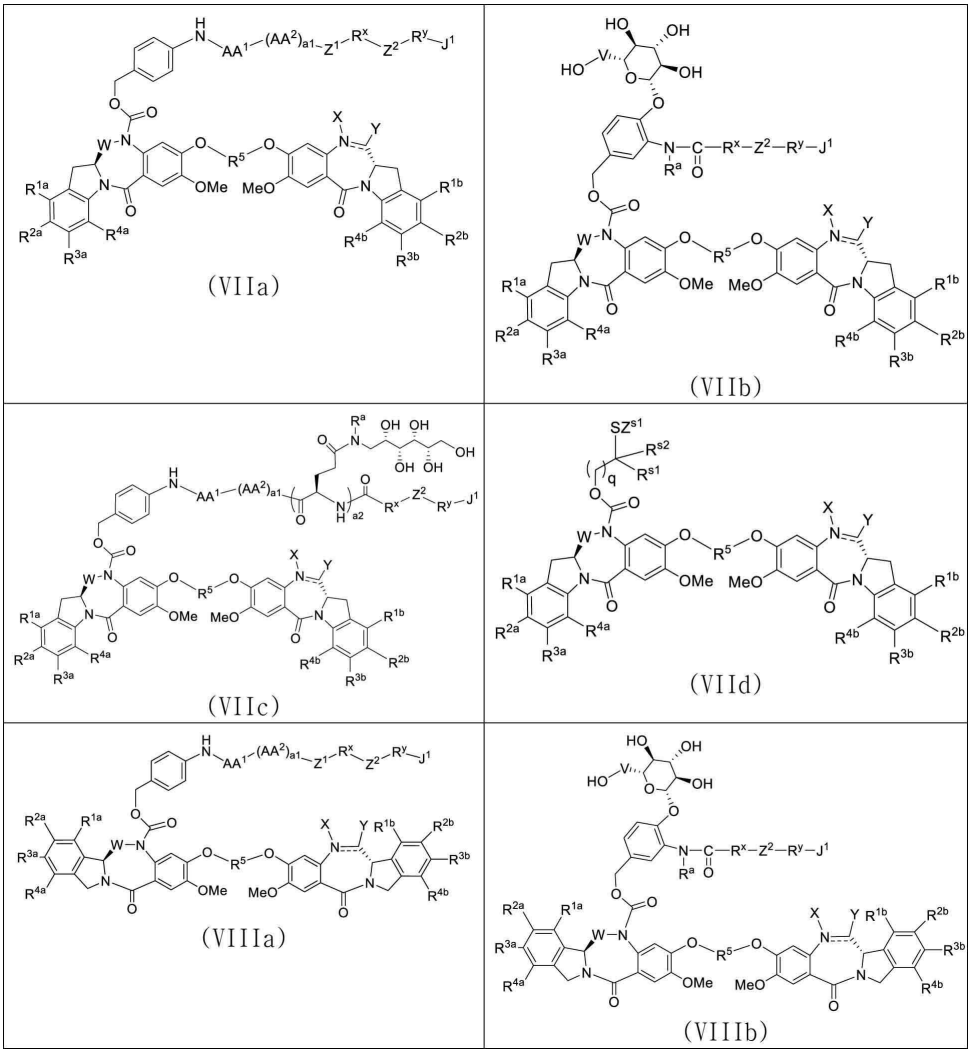
[0329] R^6은 각각의 경우에 H, C_{1-10}알킬, $-(CH_2CH_2O)_n-R^c$, 할로겐, $-NH(C=NH)NH_2$, -OR, -NR'R'', $-NO_2$, -NCO, -NR'COR'', -SR, -SOR', $-SO_2R'$, $-SO_3H$, $-OSO_3H$, $-SO_2NR'R''$, -CN, $-N_3$, -COR', -OCOR', 및 -OCONR'R''로부터 독립적으로 선택되고;

[0330] R^{L1}은 CBA에 공유적으로 연결된 자가 희생 링커이고, 단 화학식 (V)의 접합체는:

[0331] 

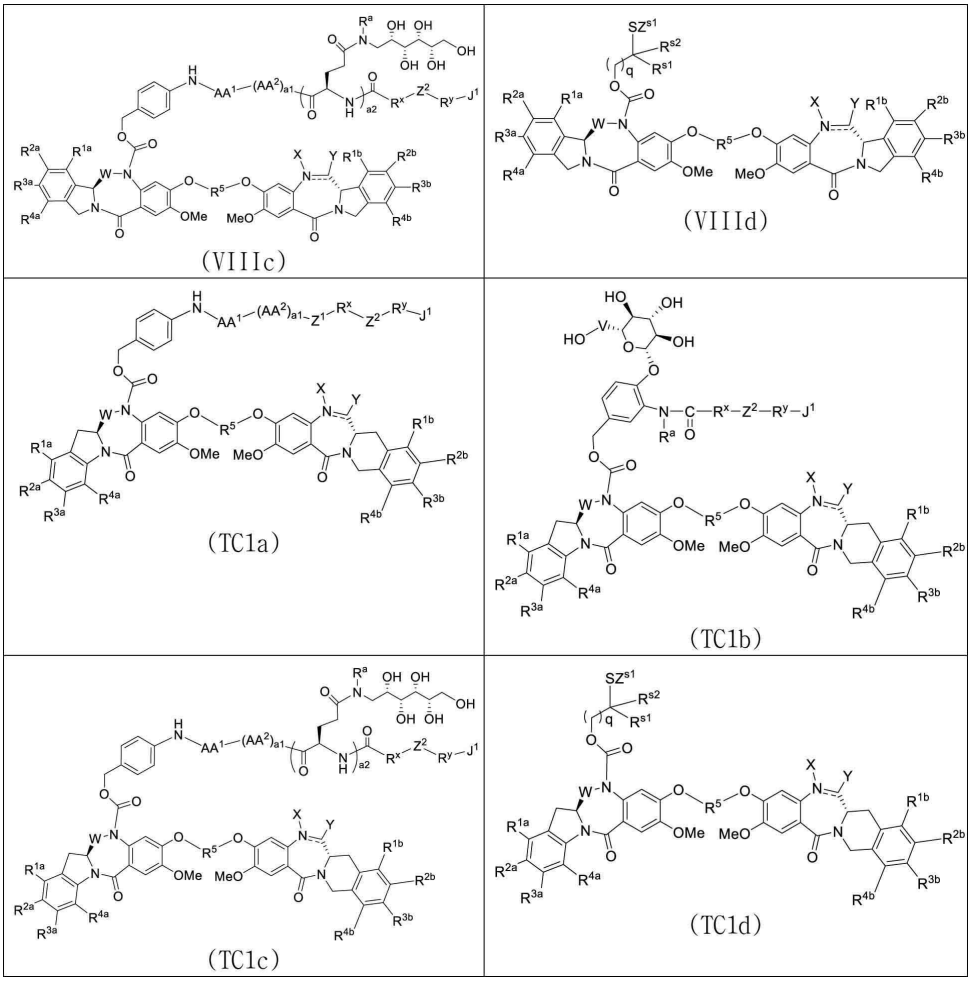
w 가 아니다.

[0332] 제23 구체예에서, 제22 구체예에 기재된 화학식 (V), (VI), (TC1) 또는 (TC2)의 접합체, 또는 이의 약제학적으로 허용되는 염에 대해, 여기서 Cy는 표 E의 다음 화학식 중 하나에 의해 표시된다:

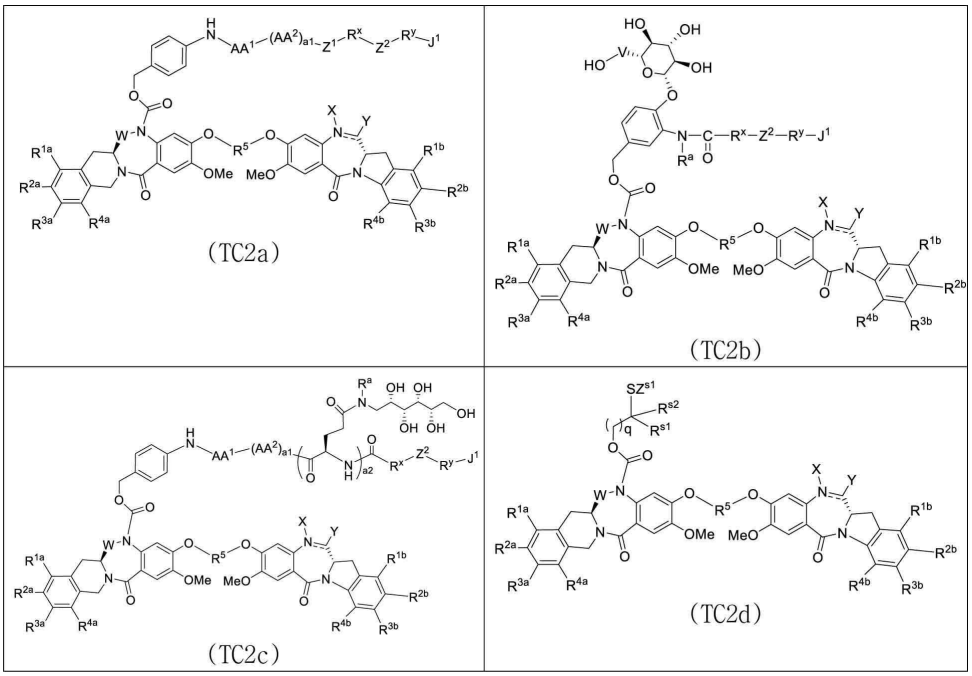


[0333]

[0334]



[0335]



[0336] 또는 이의 약제학적으로 허용되는 염, 여기서:

[0337] AA^1 및 AA^2는 각각 독립적으로 아미노산 잔기이고;

[0338] a1은 1 내지 19의 정수이고;

[0339] a2는 1 내지 5의 정수이고;

[0340] R^a는 H 또는 C_{1-4}알킬이고;

[0341] q는 1, 2, 3 또는 4이고;

[0342] R^{s1} 및 R^{s2}는 각각 독립적으로 H 또는 C_{1-4}알킬이고, 또는 R^{s1} 및 R^{s2}는 이들의 부착된 탄소 원자와 함께 3 내지 5-원 사이클로알킬 고리를 형성하고, 단 q가 1일 때, R^{s1} 및 R^{s2}는 이들이 부착된 탄소 원자와 함께 4 또는 5-원 사이클로알킬 고리를 형성하고;

[0343] V는 C(=O) 또는 CH_2;

[0344] Z^1은 -C(=O)- 또는 $-SO_2$-NH-C(=O)-이고, 여기서 $-SO_2$-NH-C(=O)-에서 $-SO_2$- 기는 P^1에 연결되고;

[0345] R^x는 부재, C_{1-10}알킬렌, C_{3-8}사이클로알킬, $-(CH_2CH_2O)_{m1}$-C_{1-10}알킬렌- 또는 C_{1-10}알킬렌-$(OCH_2CH_2)_{m2}$-이고;

[0346] m1 및 m2는 각각 독립적으로 1 내지 24의 정수이고;

[0347] Z^2는 부재, -C(=O)NH- 또는 -NH-C(=O)-이고;

[0348] R^y는 부재, C_{1-10}알킬렌, $-(CH_2CH_2O)_{m3}$-C_{1-10}알킬렌- 또는 C_{1-10}알킬렌-$(OCH_2CH_2)_{m4}$-이고;

[0349] m3 및 m4는 각각 독립적으로 1 내지 24의 정수이고;

[0350] Z^{s1}은 CBA 및 세포독성 화합물에 공유적으로 연결된 이작용성 가교제, 여기서 가교제는 디설파이드 결합 또는 티오에테르 결합을 통해 세포독성 화합물에 공유적으로 연결됨;

[0351] J^1은 세포독성제의 아민 반응성 기 또는 티올 반응성 기와 CBA에 위치하는 아민 기 또는 티올 기의 반응에 의해 형성된 모이어티이고;

[0352] 나머지 변수는 제2 양태 또는 제22 구체예에 정의된 바와 같다.

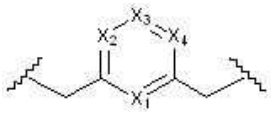
[0353] 특정 구체예에서, 화학식 (VIId), (VIIId), (TC1d) 또는 (TC2d)에 대해, q는 1이다. 보다 특정한 구체예에서, 화학식 (VIId), (VIIId), (TC1d) 또는 (TC2d)에 대해, q는 1이고; R^{s1} 및 R^{s2}는 모두 메틸이다.

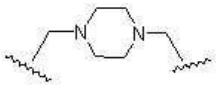
[0354] 또 다른 특정 구체예에서, 화학식 (VIIb), (VIIc), (VIIIb), (VIIIc), (TC1b), (TC1c), (TC2b) 또는 (TC2c)에 대해, R^a는 H, 메틸 또는 에틸이다. 보다 특정한 구체예에서, R^a는 H이다. 보다 특정한 구체예에서, R^a는 메틸이다.

[0355] 제24 구체예에서, 제22 구체예에 기재된 접합체, 또는 이의 약제학적으로 허용되는 염에 대해, R^{1a}, R^{2a}, R^{3a}, R^{4a}, R^{1b}, R^{2b}, R^{3b} 및 R^{4b}는 모두 H이고; 나머지 변수는 제2 양태 또는 제22 또는 제23 구체예 또는 본원에 기재된 임의의 특정 구체예에 정의된 바와 같다.

[0356] 제25 구체예에서, 제22 또는 제23 구체예의 접합체, 또는 이의 약제학적으로 허용되는 염에 대해, R^5는 C_{3-7}알킬렌이고; 나머지 변수는 제2 양태 또는 제22, 제23, 또는 제24 구체예 또는 본원에 기재된 임의의 특정 구체예에 정의된 바와 같다. 특정 구체예에서, R^5는 $-(CH_2)_3$-, $-(CH_2)_5$- 또는 $-(CH_2)_7$-이다. 보다 특정한 구체예에서, R^5는 $-(CH_2)_7$-이다. 보다 특정한 구체예에서, R^5는 $-(CH_2)_5$-이다. 보다 특정한 구체예에서, R^5는 $-(CH_2)_3$-이다.

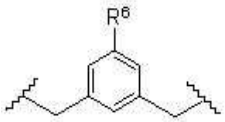
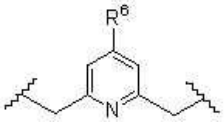
[0357] 제26 구체예에서, 제22 또는 제23 구체예의 접합체, 또는 이의 약제학적으로 허용되는 염에 대해, R^5는 다음 화학식에 의해 표시된다:

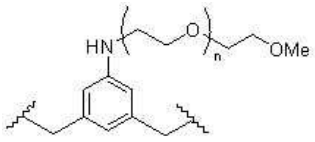
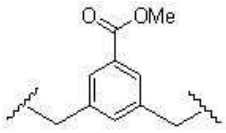
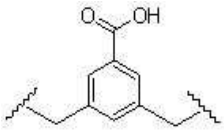
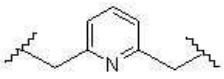
[0358] 

또는 

,

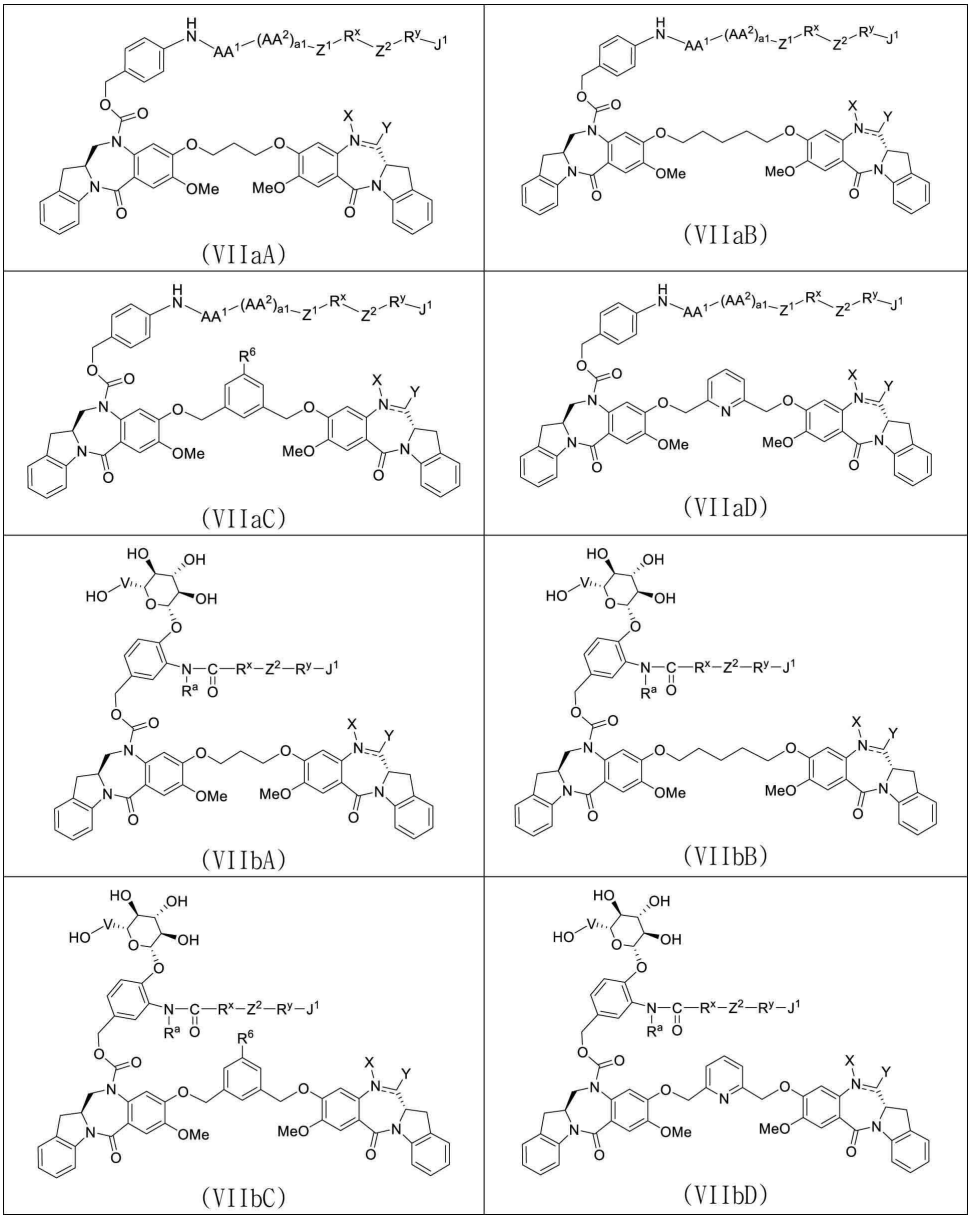
[0359] 여기서 X_1, X_2, X_3 및 X_4는 각각 독립적으로 N 또는 CR^6이고, 단 X_1, X_2, X_3 및 X_4 중 적어도 하나는 CR^6이고; 나머지 변수는 제2 양태 또는 제22, 제23, 또는 제24 구체예 또는 본원에 기재된 임의의 특정 구체예에 정의된 바와 같다.

[0360] 특정 구체예에서, R^5는  또는  이다.

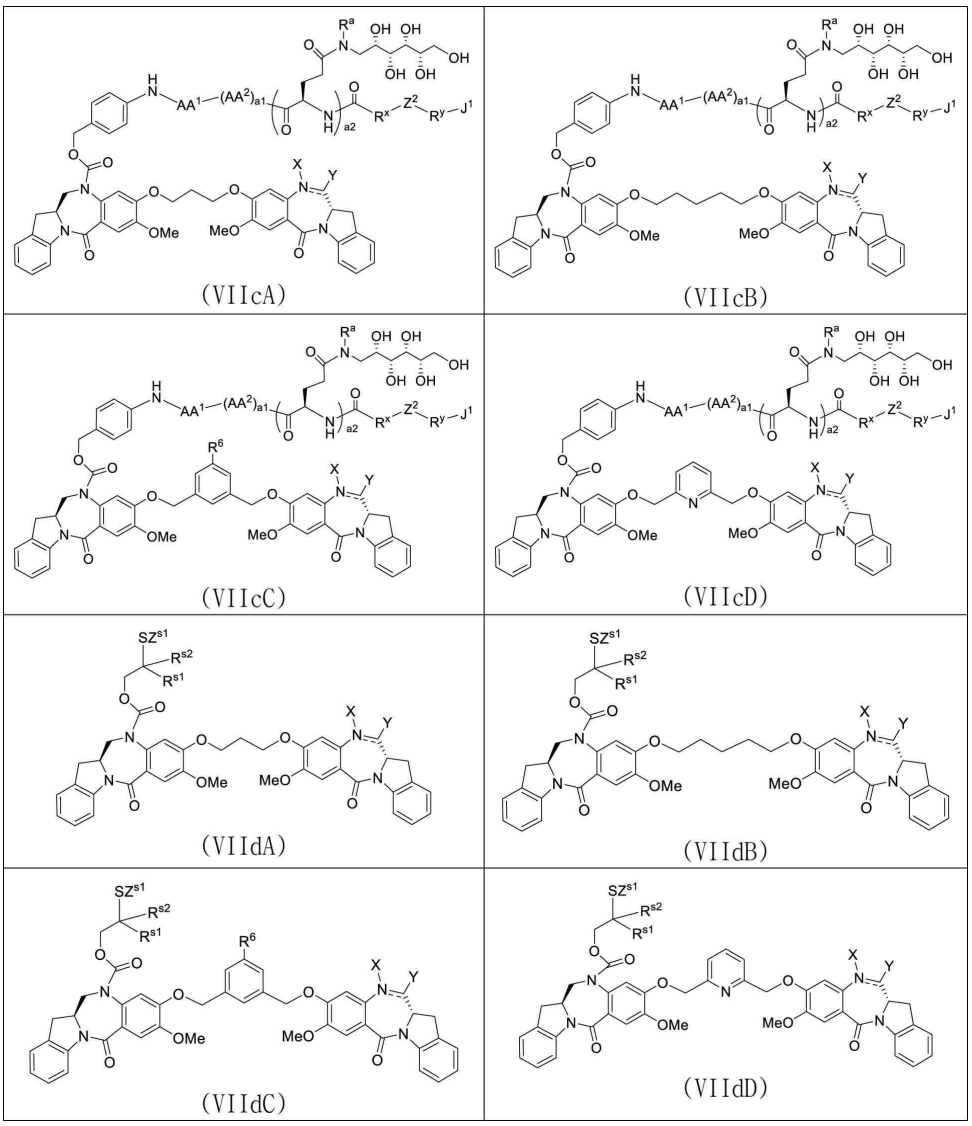
[0361] 보다 특정한 구체예에서, R^5는  이고, 여기서 n은 1 내지 8의 정수이다. 추가로 명시된 구체예에서, n은 1, 2, 3, 또는 4이다. 보다 특정한 구체예에서, n은 1이다. 보다 특정한 구체예에서, n은 2이다. 보다 특정한 구체예에서, n은 3이다. 보다 특정한 구체예에서, n은 4이다. 보다 특정한 구체예에서, R^5는  이다. 보다 특정한 구체예에서, R^5는  이다. 또 다른 보다 특정 구체예에서, R^5는  이다.

[0362] 제27 구체예에서, 제23 구체예의 접합체, 또는 이의 약제학적으로 허용되는 염에 대해, Cy는 표 F의 다음 화학식 중 하나에 의해 표시된다:

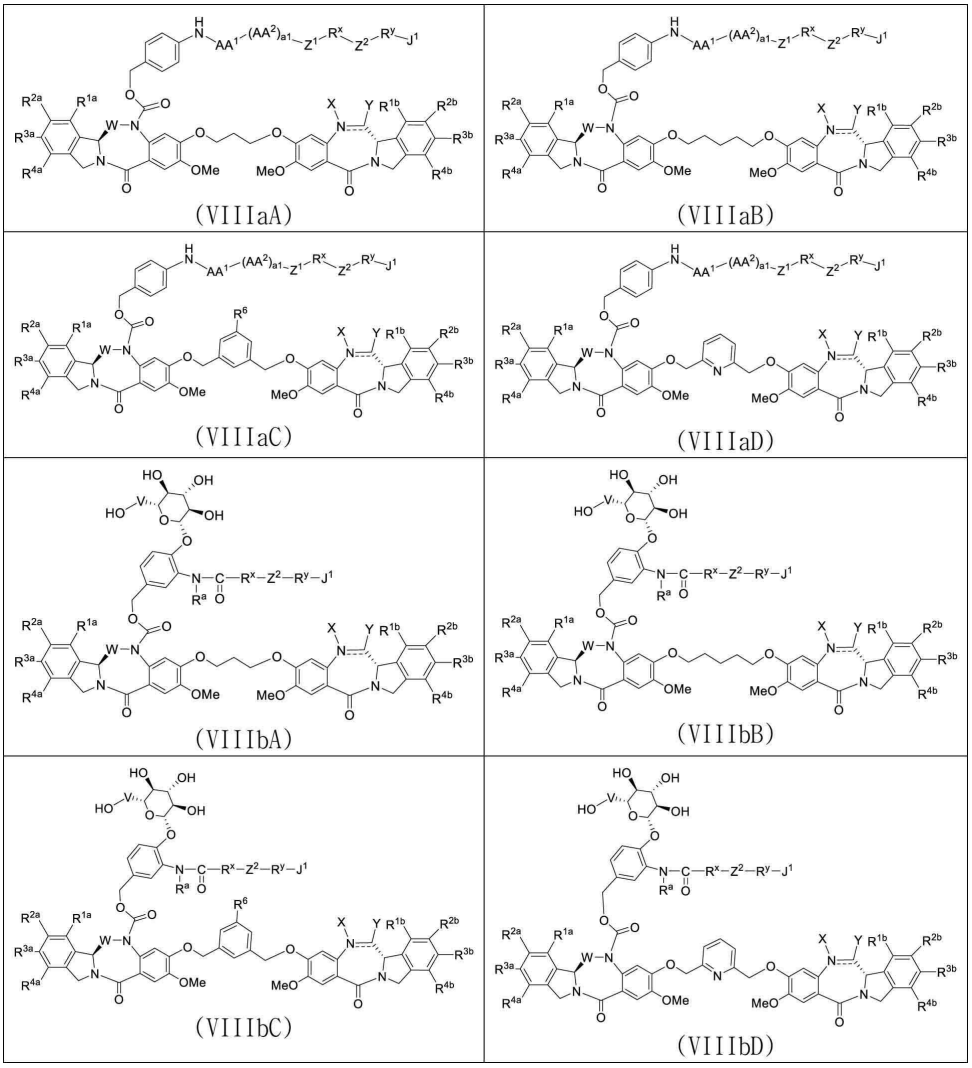
[0363]



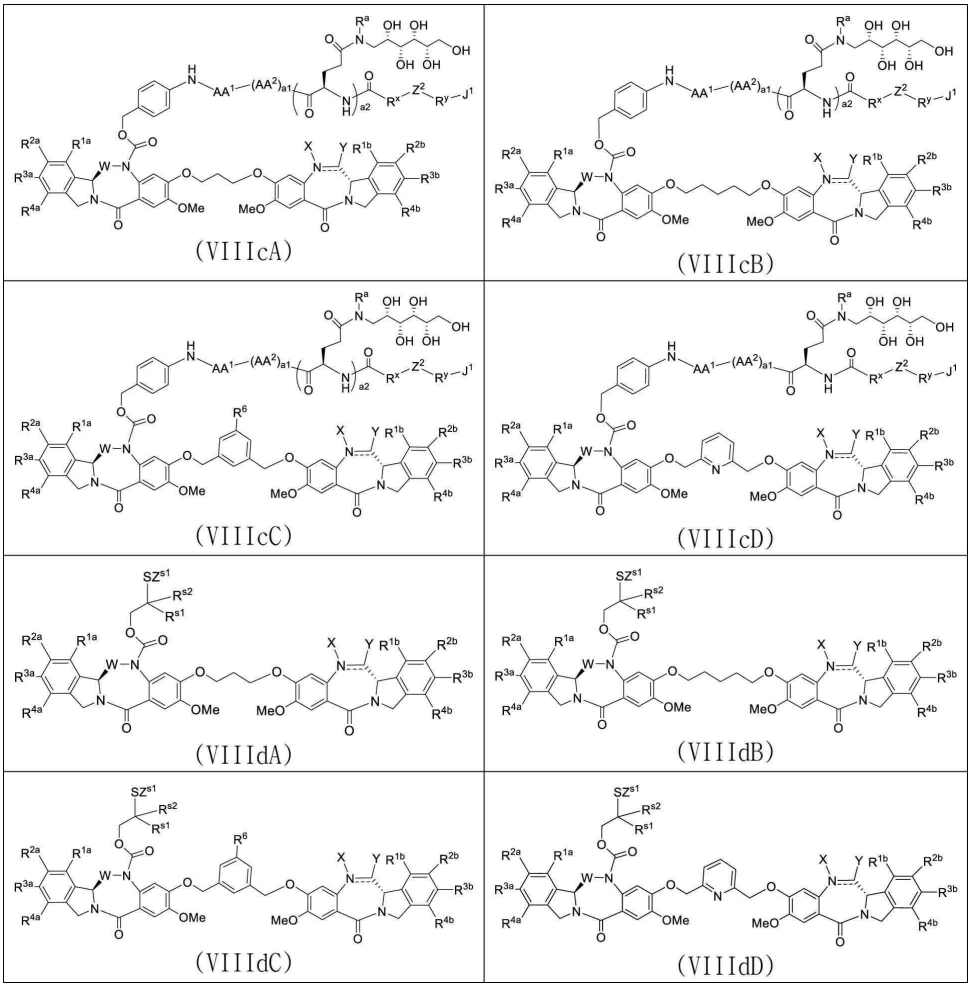
[0364]



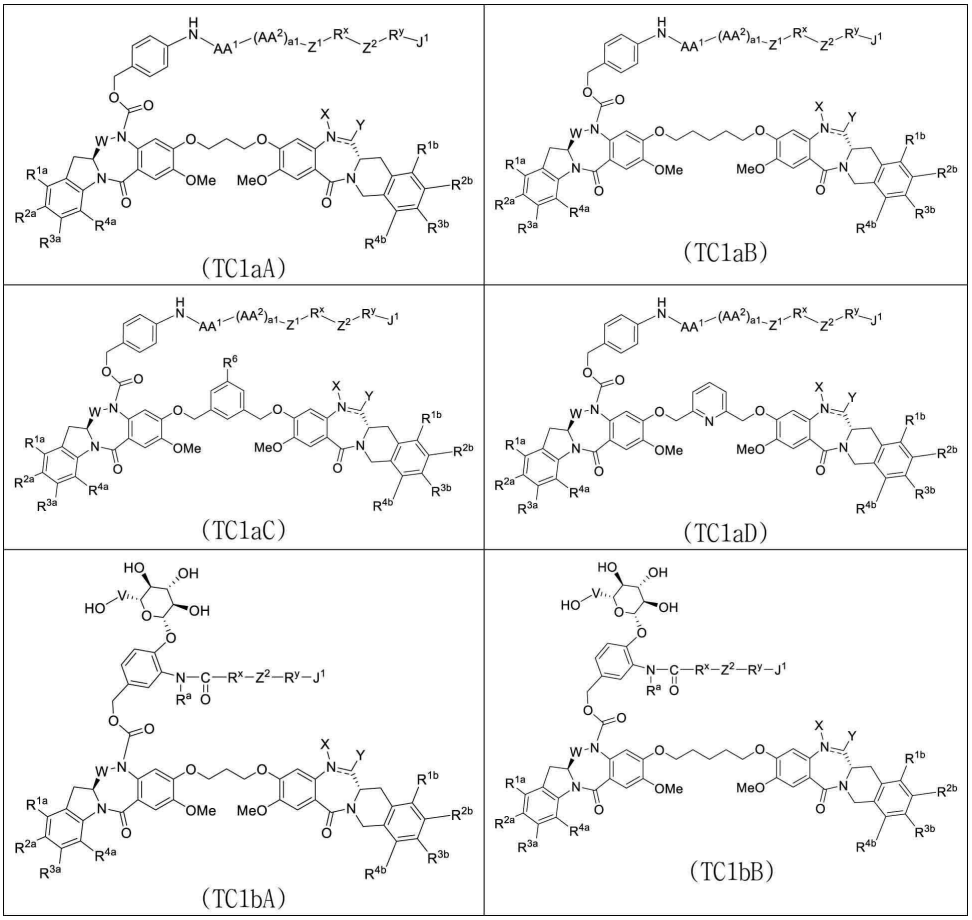
[0365]



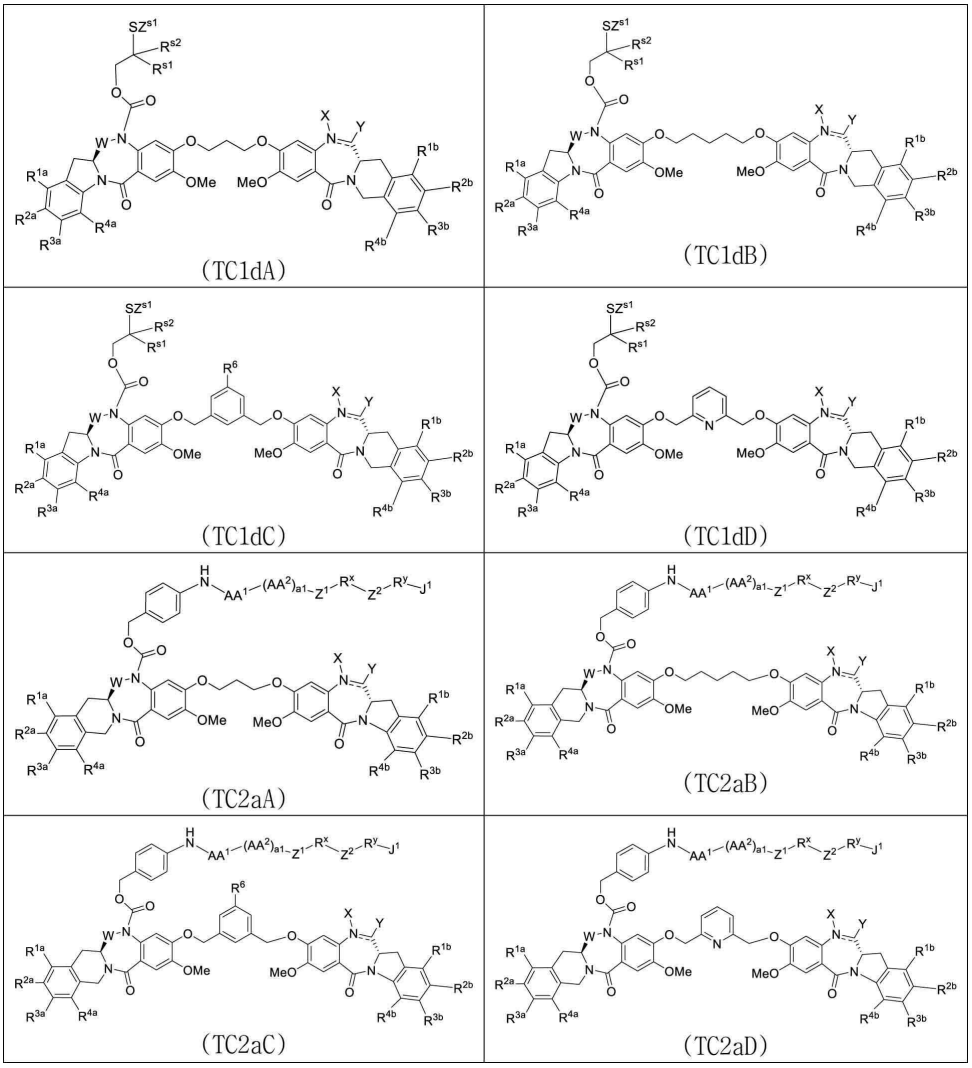
[0366]

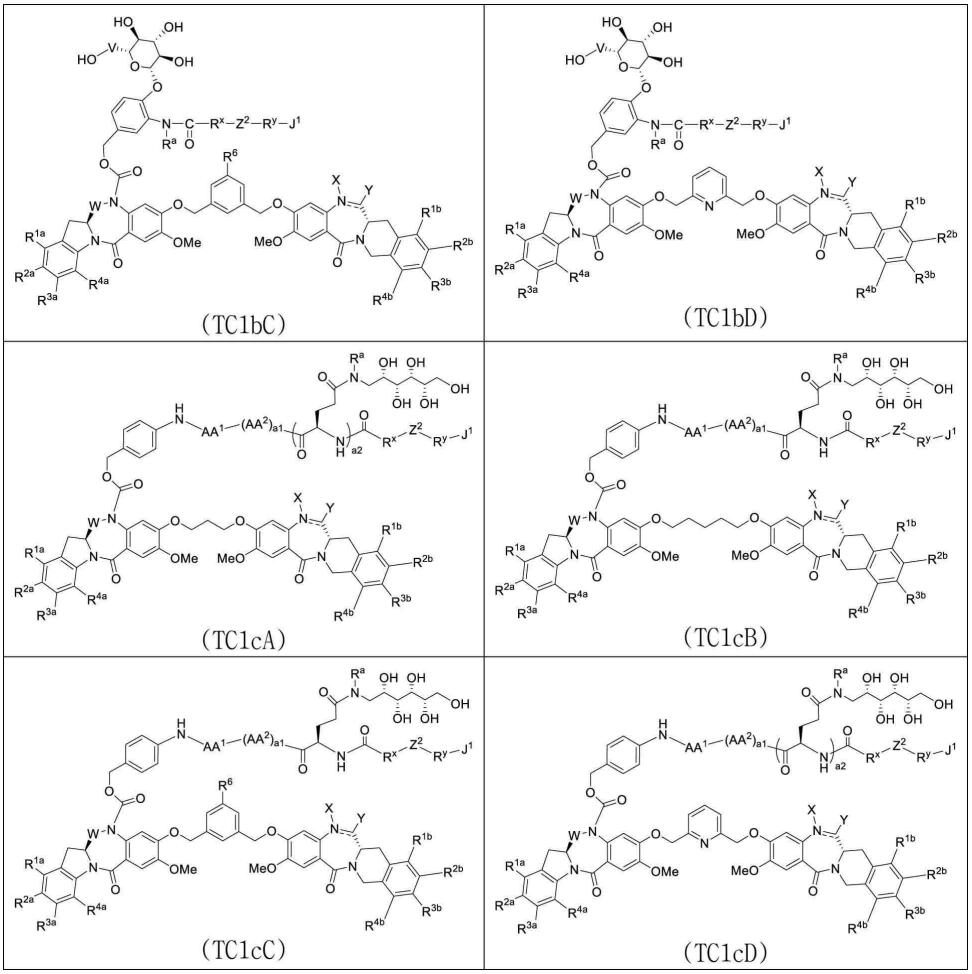


[0367]

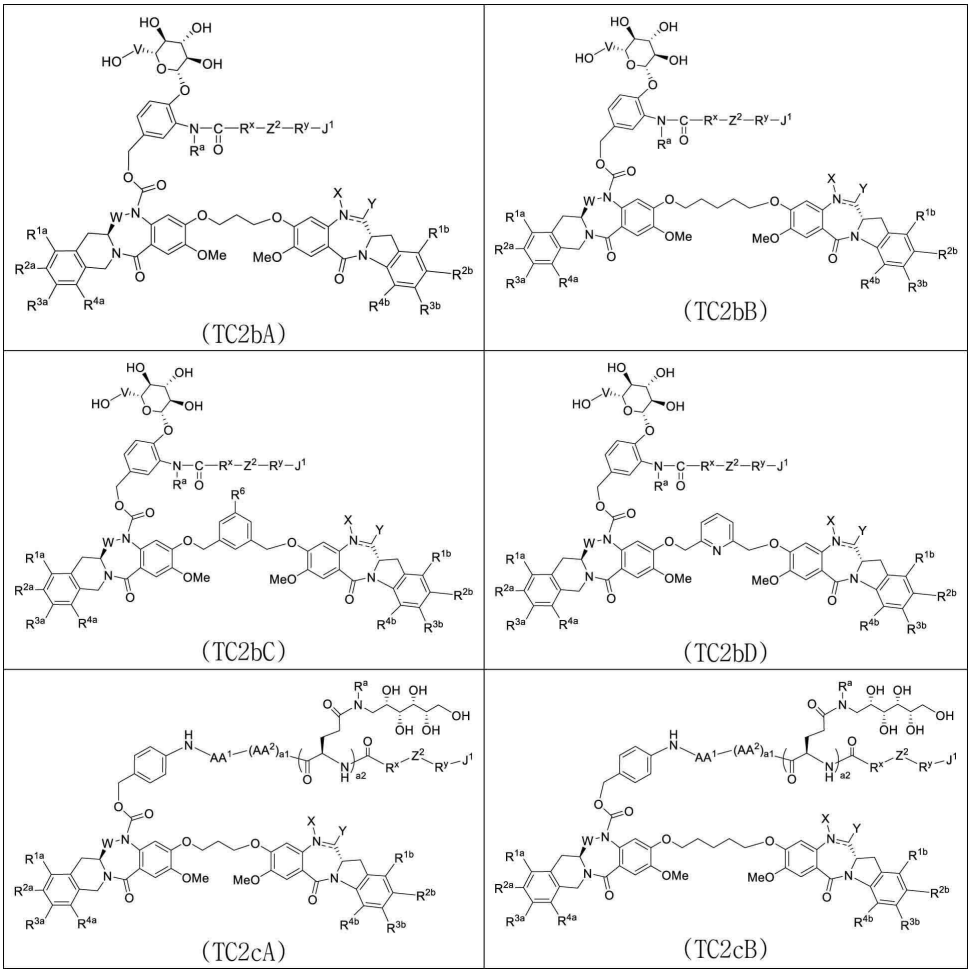


[0368]

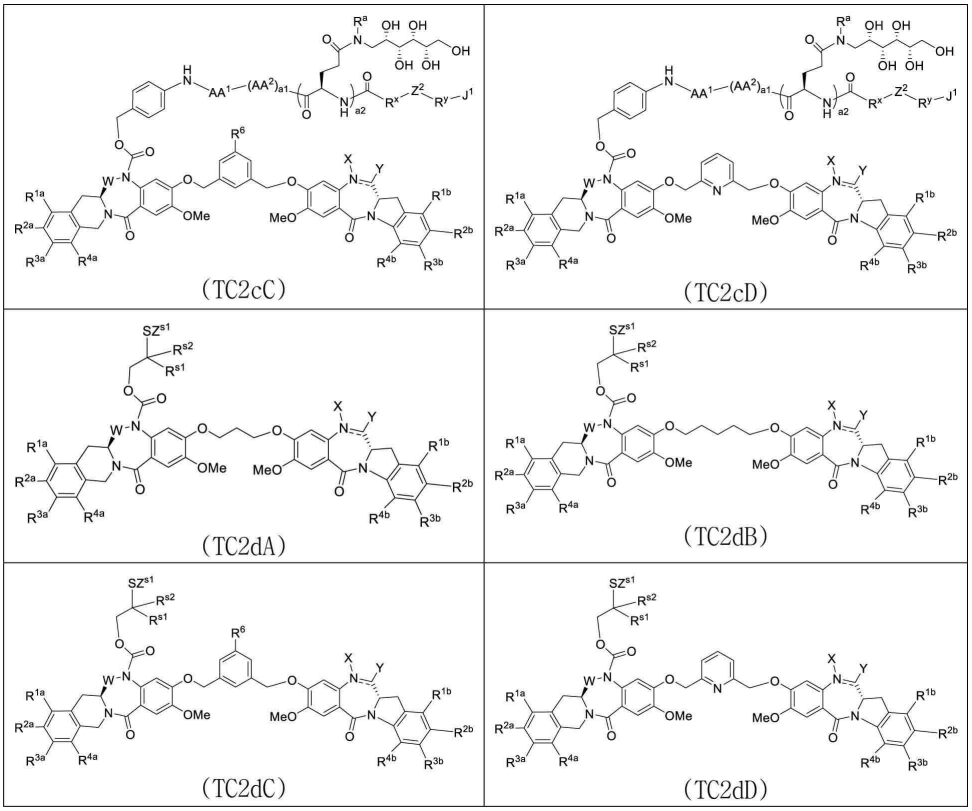



(TC1bC)
(TC1bD)
(TC1cA)
(TC1cB)
(TC1cC)
(TC1cD)

[0369]



[0370]



[0371] 또는 이의 약제학적으로 허용되는 염, 여기서 나머지 변수는 제2 양태 또는 제23 구체예 또는 본원에 기재된 임의의 특정 구체예에 정의된 바와 같다.

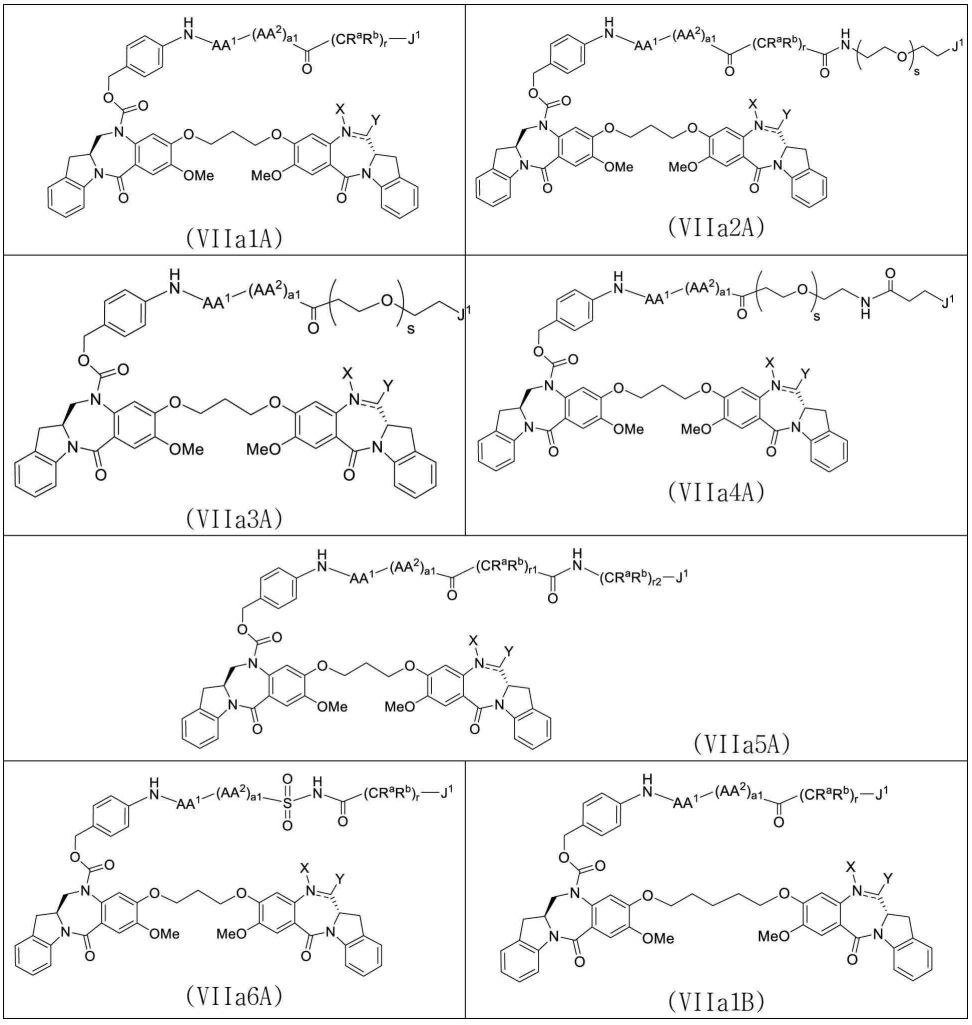
[0372] 제28 구체예에서, 제23 내지 제27 구체예에 기재된 접합체, 또는 이의 약제학적으로 허용되는 염에 대해, Z^1은 -C(=O)-이고; 나머지 변수는 제2 양태 또는 제23, 제24, 제25, 제26, 또는 제27 구체예 또는 본원에 기재된 임의의 특정 구체예에 정의된 바와 같다.

[0373] 제29 구체예에서, 제23 내지 제28 구체예에 기재된 접합체, 또는 이의 약제학적으로 허용되는 염에 대해, R^x는 C_{1-6}알킬렌이고; Z^2 및 R^y는 모두 부재하고; 나머지 변수는 제2 양태 또는 제23, 제24, 제25, 제26, 제27, 또는 제28 구체예 또는 본원에 기재된 임의의 특정 구체예에 정의된 바와 같다. 또 다른 구체예에서, R^x, Z^2 및 R^y는 부재하고; 나머지 변수는 제23, 제24, 제25, 제26, 제27, 또는 제28 구체예 또는 본원에 기재된 임의의 특정 구체예에 정의된 바와 같다.

[0374] 제30 구체예에서, 제23 내지 제28 구체예에 기재된 접합체, 또는 이의 약제학적으로 허용되는 염에 대해, R^x는 $-(CH_2CH_2O)_{m1}-C_{1-6}$알킬렌-이고; Z^2는 -NH-C(=O)- 또는 -C(=O)-NH-이고; R^y는 C_{1-6}알킬렌이고; 나머지 변수는 제2 양태 또는 제23, 제24, 제25, 제26, 제27, 또는 제28 구체예 또는 본원에 기재된 임의의 특정 구체예에 정의된 바와 같다.

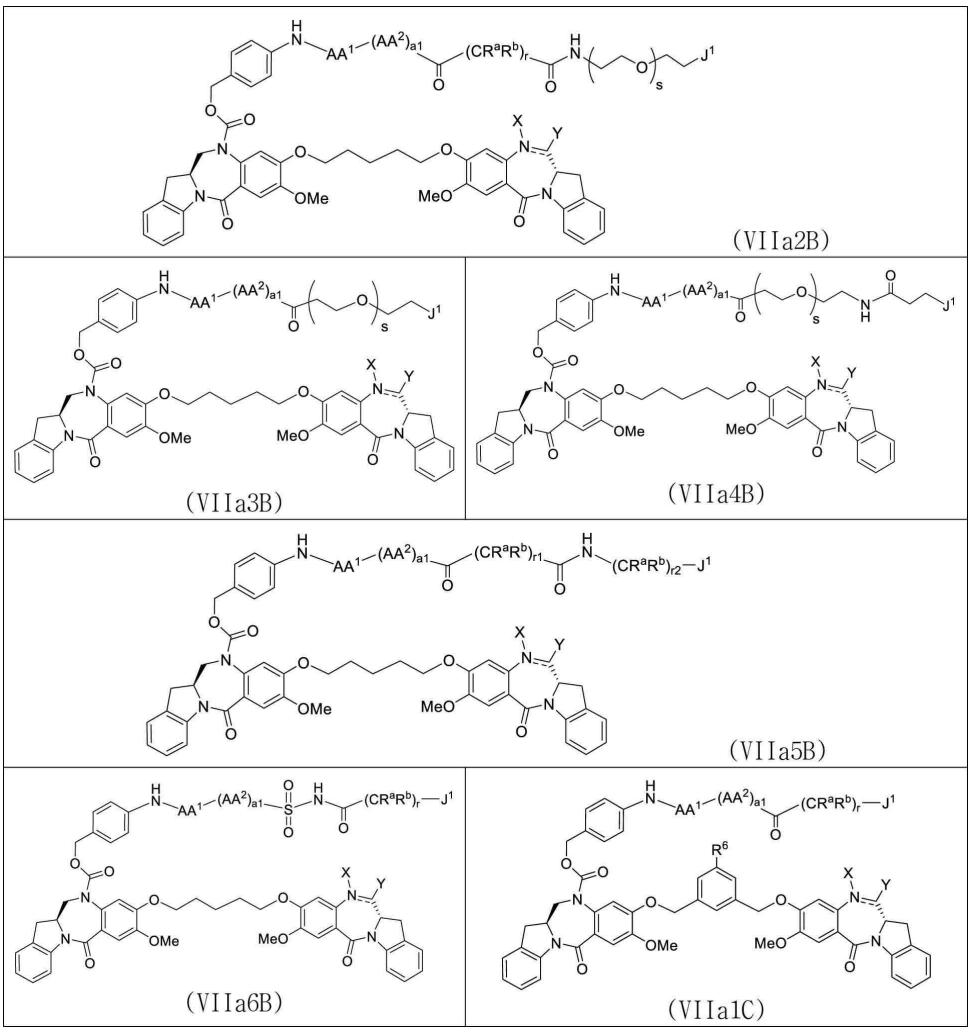
[0375] 제31 구체예에서, 제23 내지 제28 구체예에 기재된 접합체, 또는 이의 약제학적으로 허용되는 염에 대해, R^x는 C_{1-6}알킬렌이고; Z^2는 -NH-C(=O)- 또는 -C(=O)-NH-이고; R^y는 $-(CH_2CH_2O)_{m2}-C_{1-6}$알킬렌-이고; 나머지 변수는 제2 양태 또는 제23, 제24, 제25, 제26, 제27, 또는 제28 구체예 또는 본원에 기재된 임의의 특정 구체예에 정의된 바와 같다.

[0376] 제32 구체예에서, 제27 구체예의 접합체, 또는 이의 약제학적으로 허용되는 염에 대해, Cy는 표 G의 다음 화학식 중 하나에 의해 표시된다:

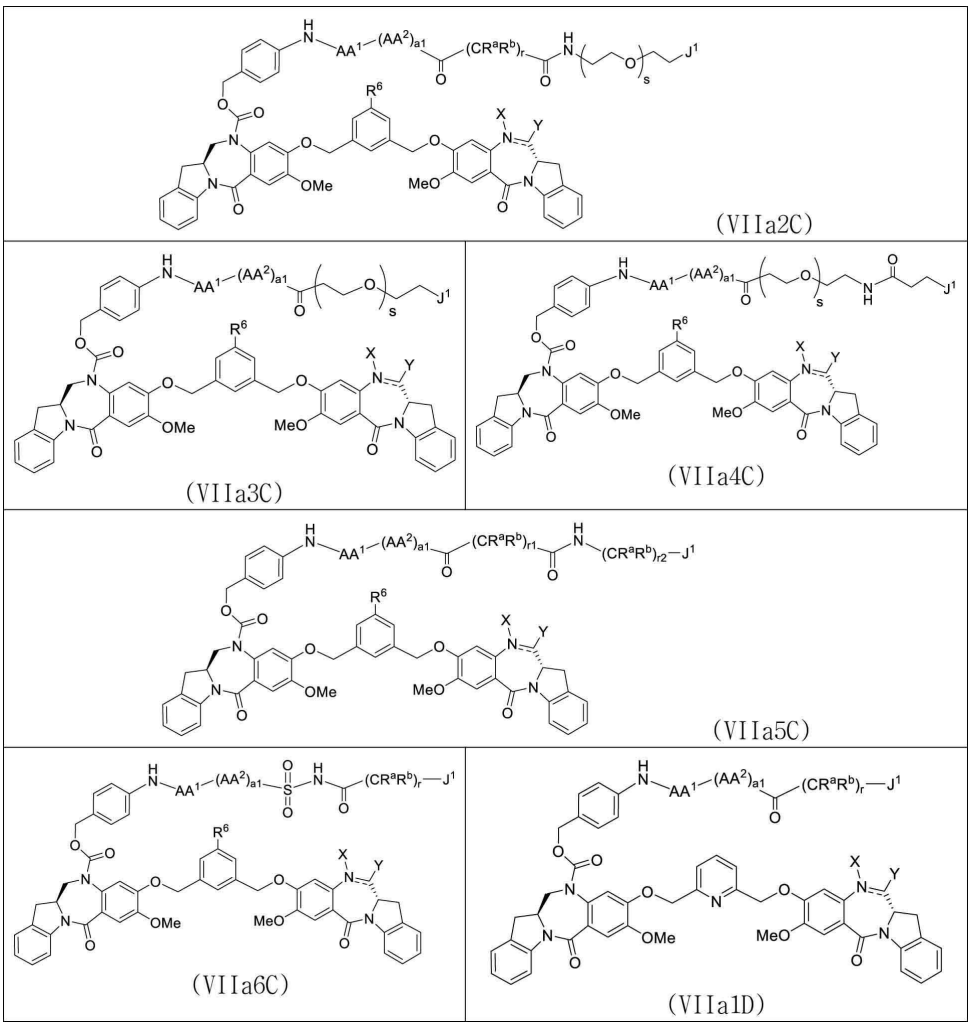


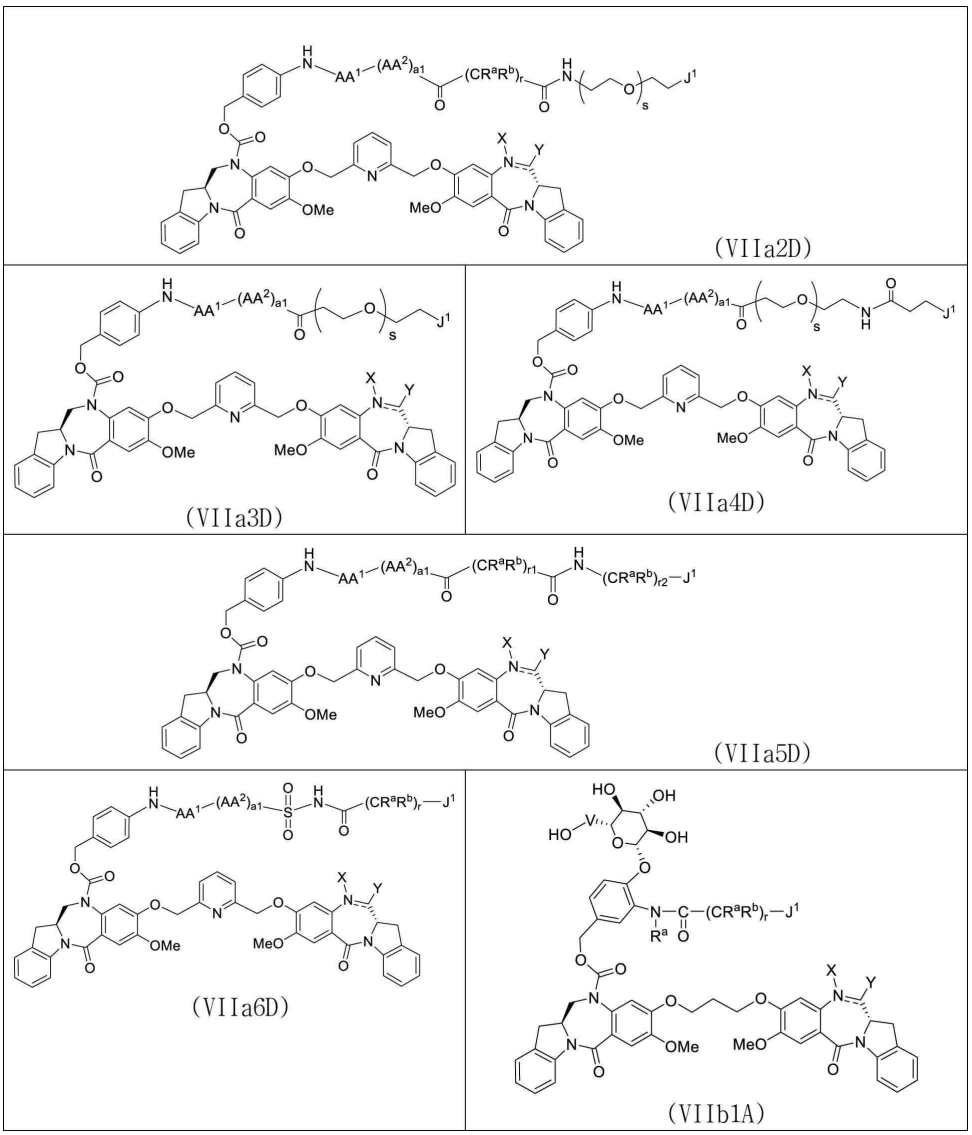
[0377]

[0378]



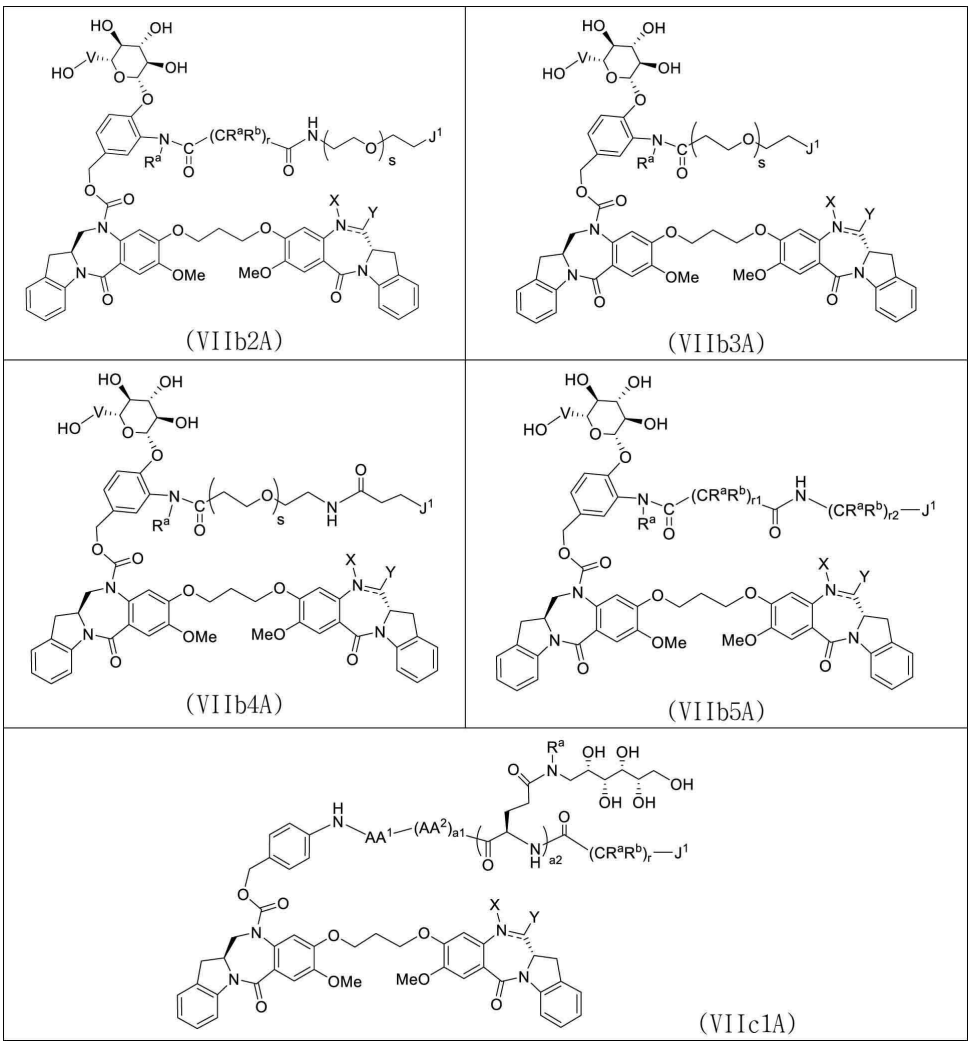
[0379]



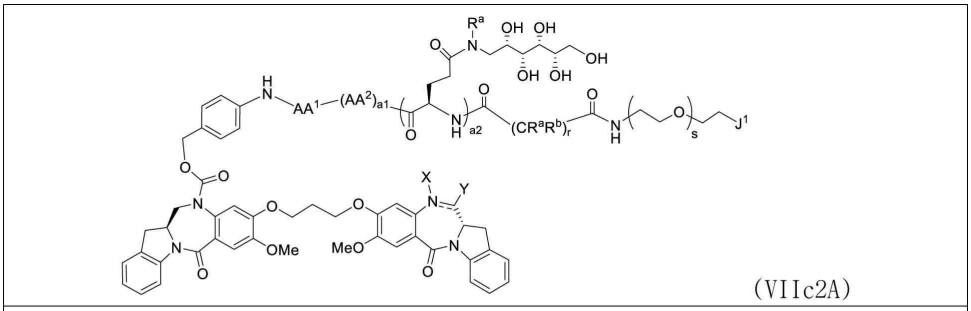


[0380]

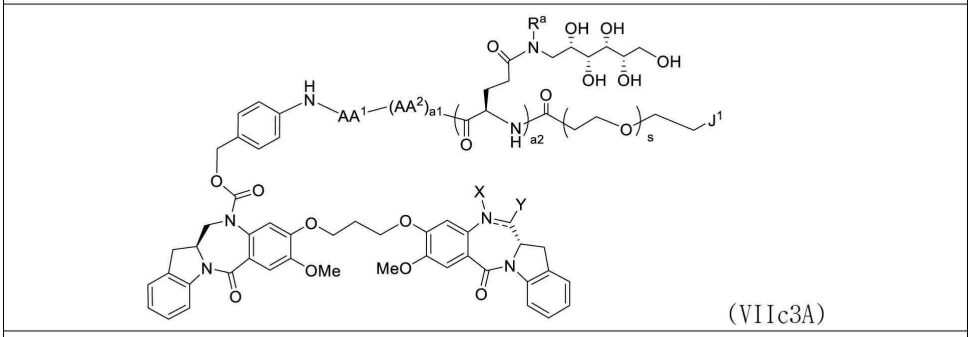
[0381]



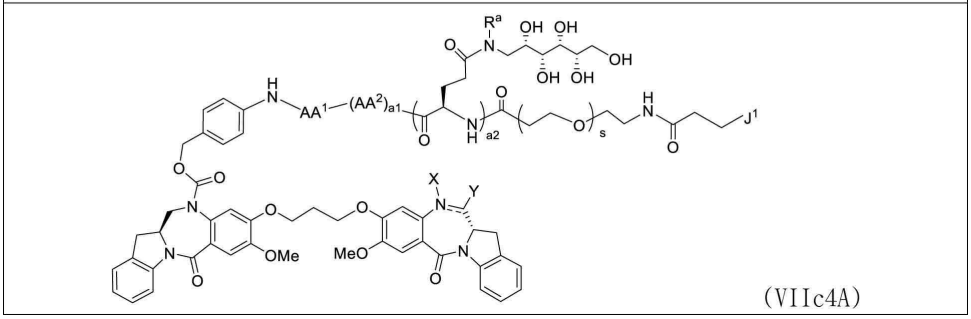
[0382]



(VIIc2A)

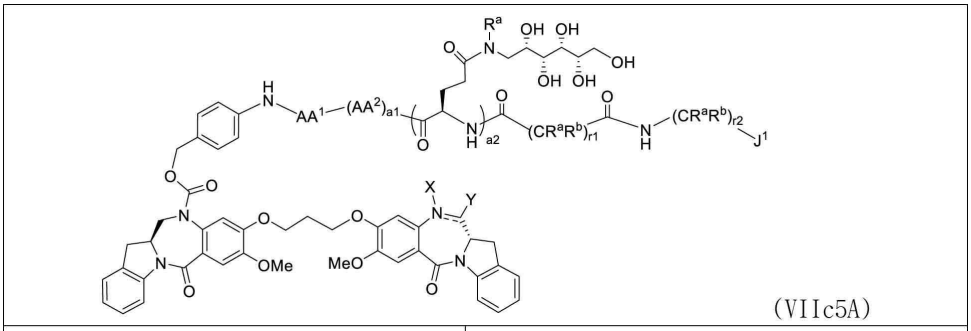


(VIIc3A)

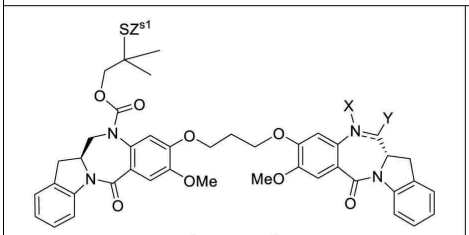


(VIIc4A)

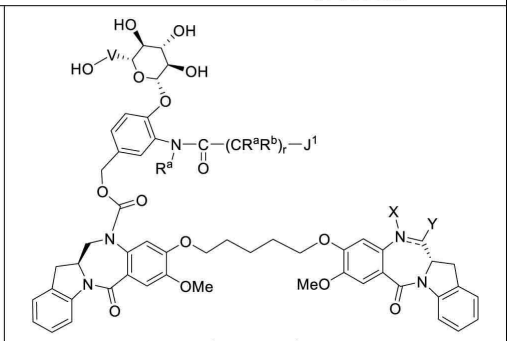
[0383]



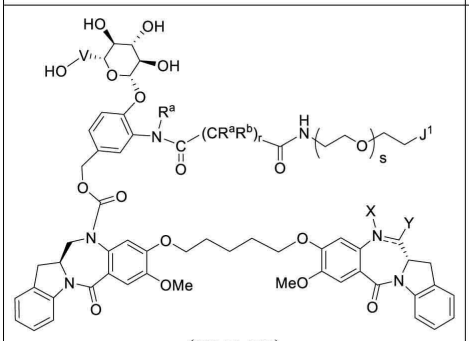
(VIIc5A)



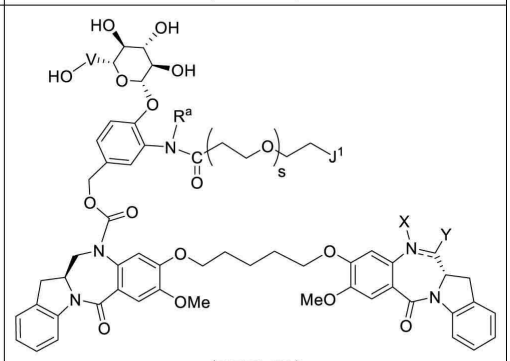
(VIId1A)



(VIIb1B)

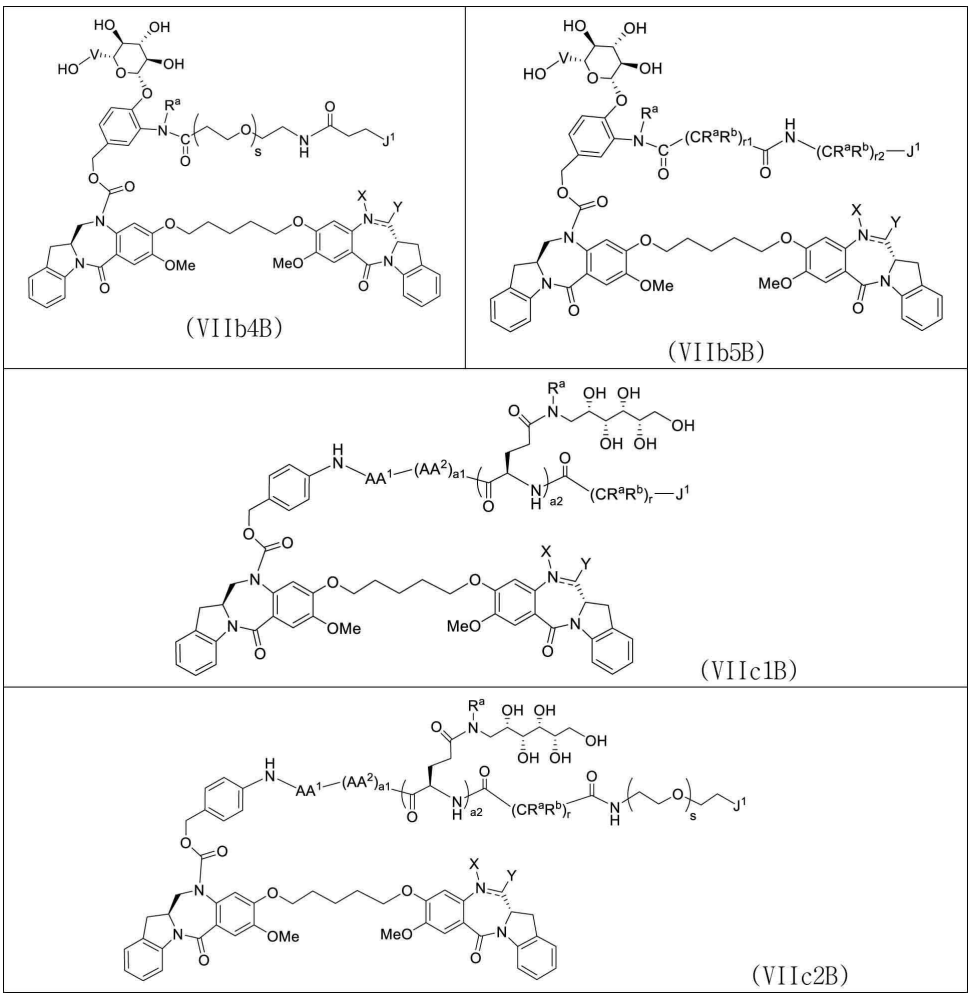


(VIIb2B)

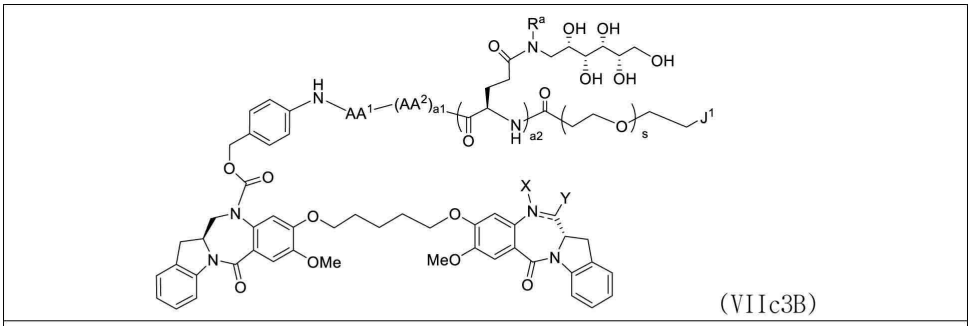


(VIIb3B)

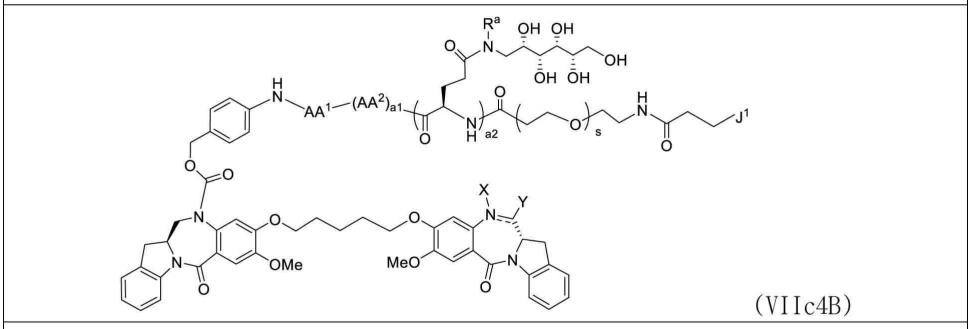
[0384]



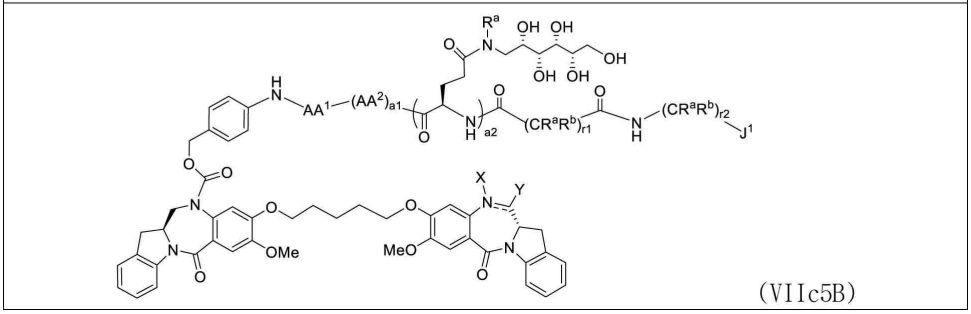
[0385]



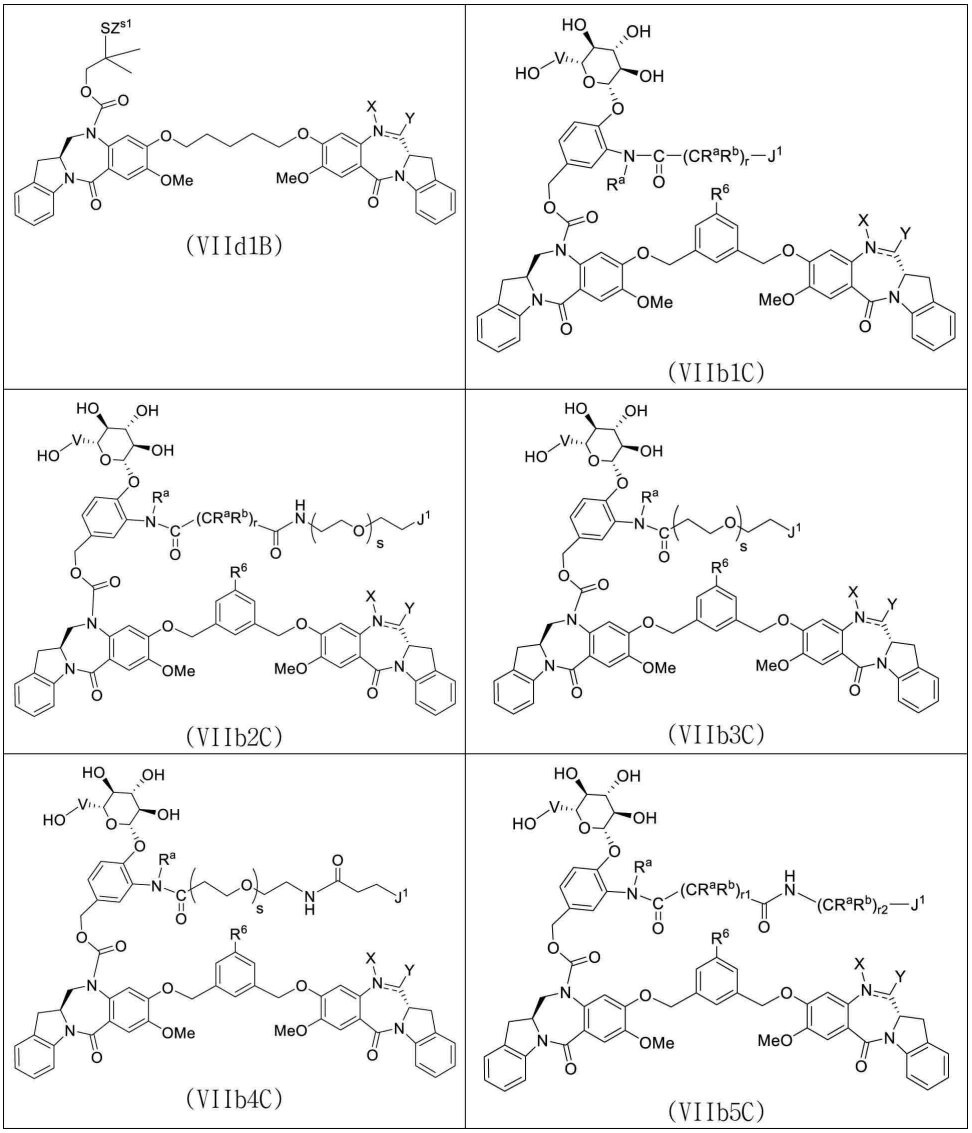
(VIIc3B)



(VIIc4B)

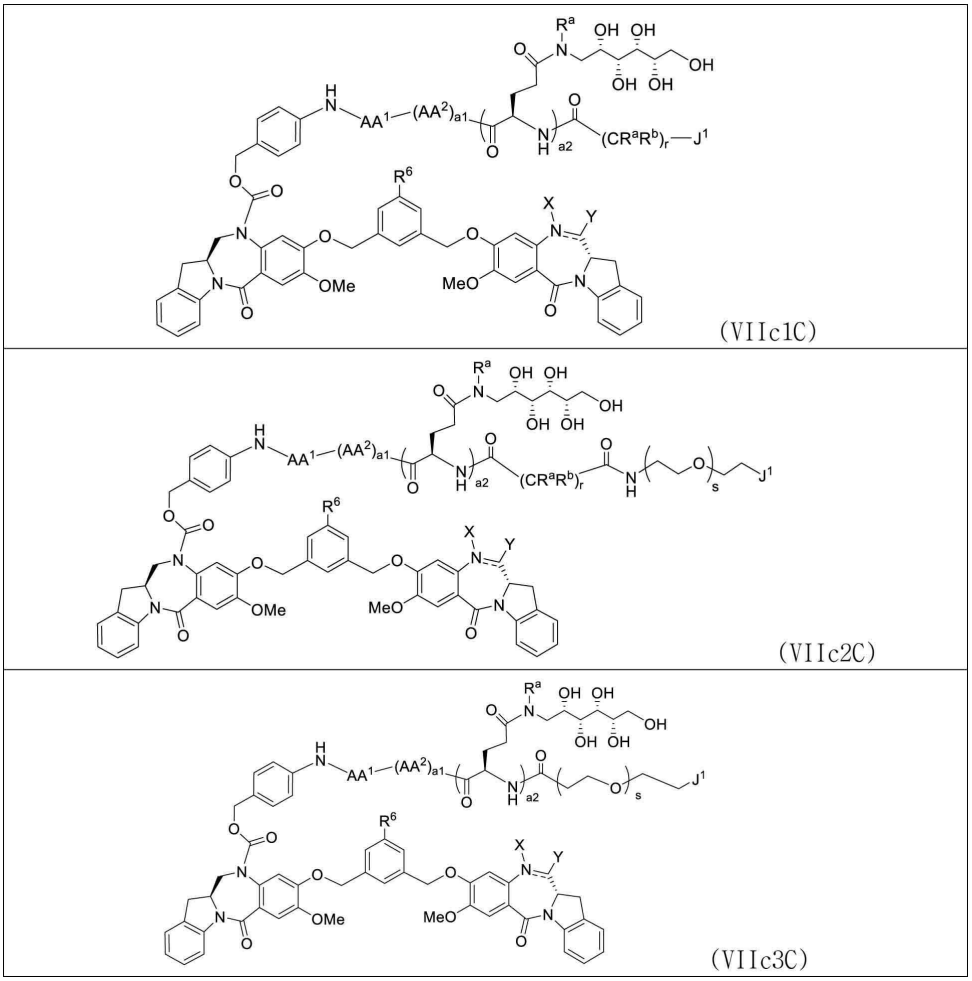


(VIIc5B)

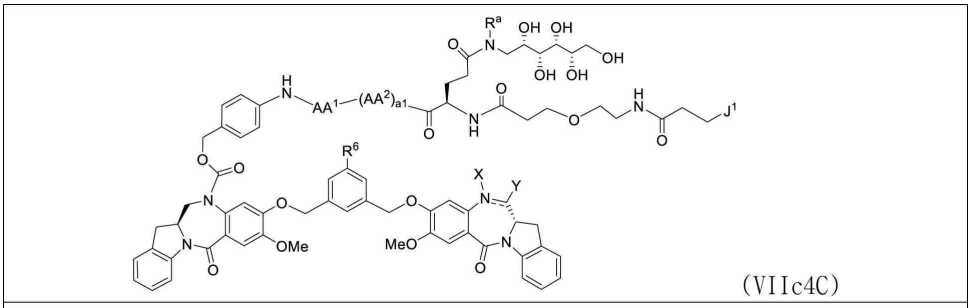


[0386]

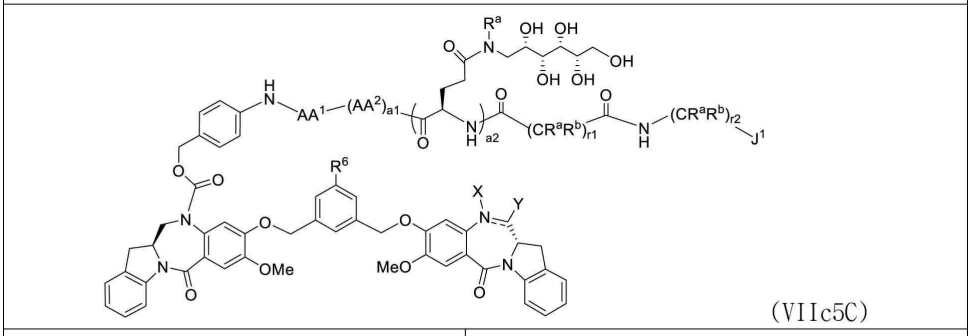
[0387]



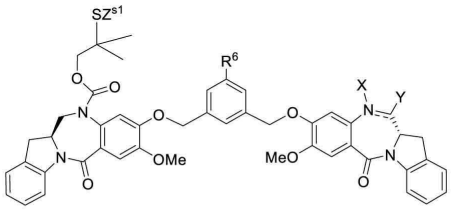
[0388]



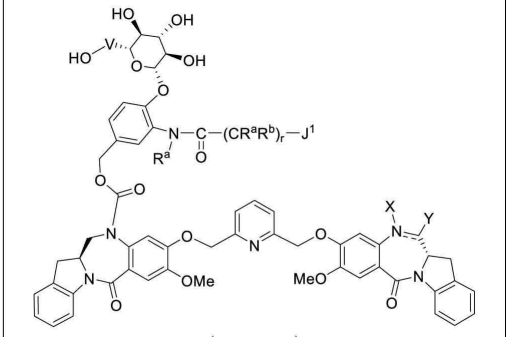
(VIIc4C)



(VIIc5C)

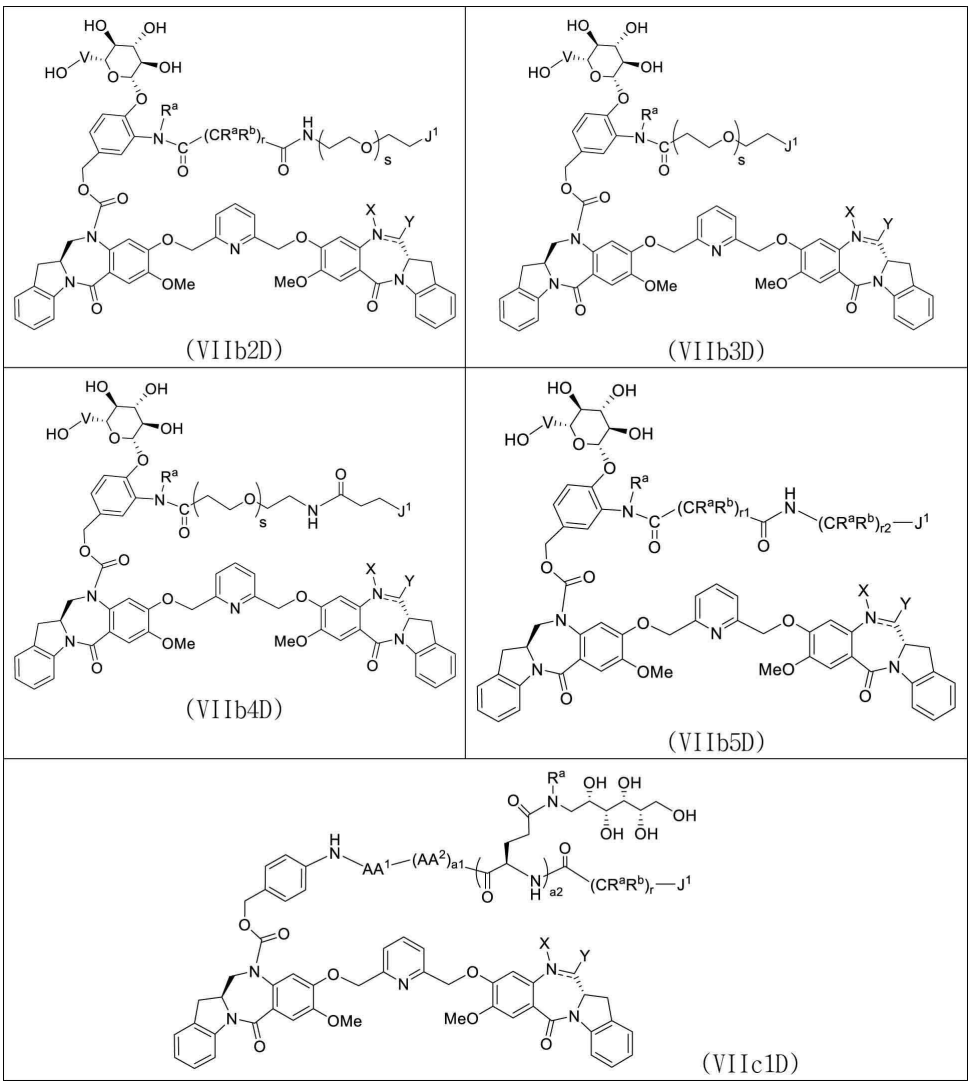


(VIId1C)

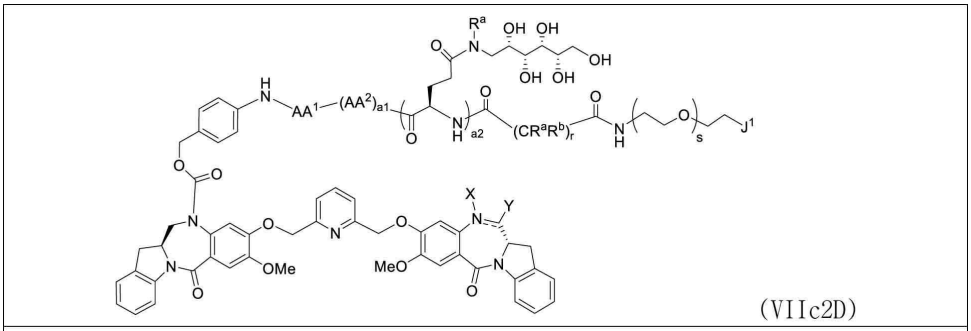


(VIIb1D)

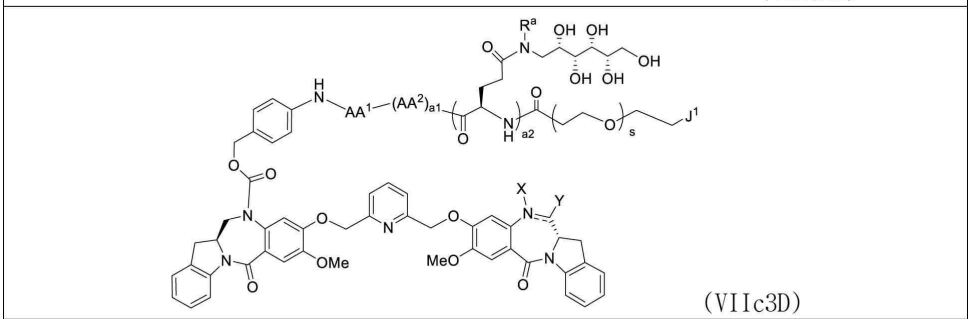
[0389]



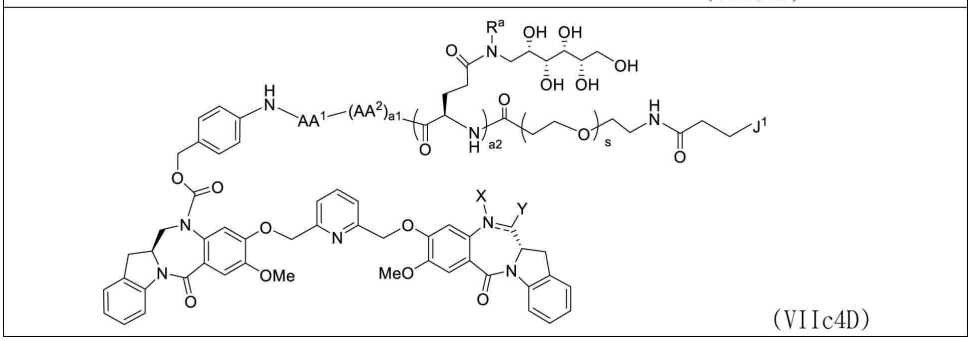
[0390]



(VIIc2D)

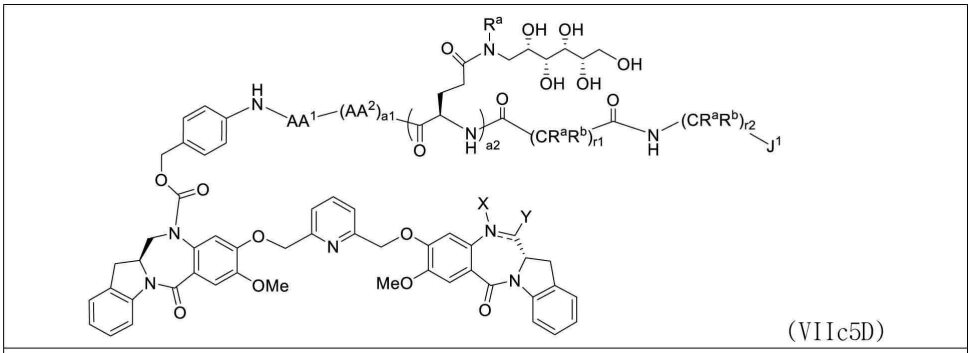


(VIIc3D)

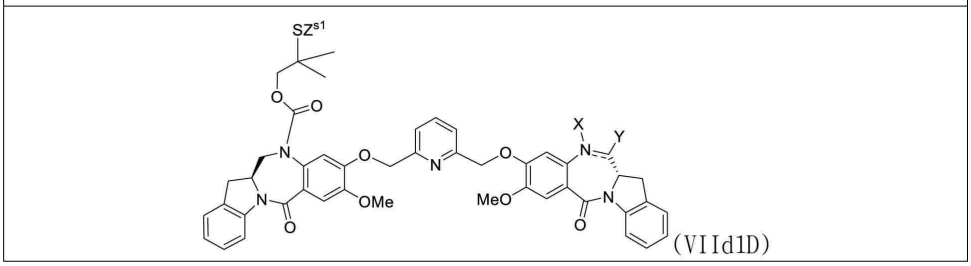


(VIIc4D)

[0391]



(VIIc5D)



(VIId1D)

[0392] 또는 이의 약제학적으로 허용되는 염, 여기서:

[0393] R^6은 $-C(=O)OR^{6a}$ 또는 $-NR^{6b}(CH_2CH_2O)_nCH_2CH_2OR^{6c}$이고;

[0394] R^{6a}, R^{6b} 및 R^{6c}는 각각 독립적으로 H 또는 C_{1-4}알킬이고;

[0395] n은 1 내지 8의 정수이고;

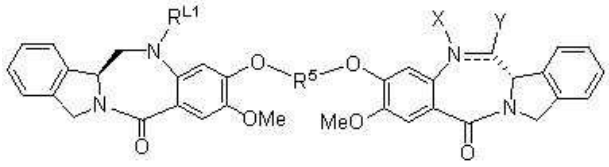
[0396] R^a 및 R^b는, 각각의 경우에, 독립적으로 H 또는 C_{1-4}알킬이고;

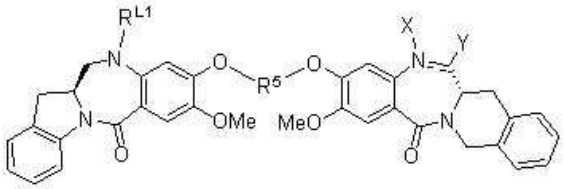
[0397] r, r1 및 r2는 각각 독립적으로 2 내지 6의 정수이고;

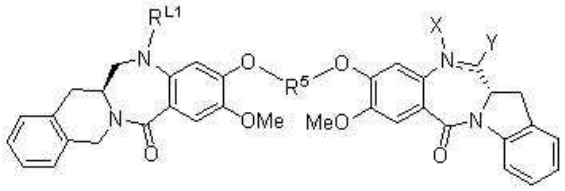
[0398] s는 2 내지 12의 정수이고;

[0399] 나머지 변수는 제2 양태 또는 제27 구체예에 정의된 바와 같다.

[0400] 또한 제32 구체예에 제2 양태의 접합체, 여기서 Cy는 다음 화학식에 의해 표시됨:

[0401]  (VI');

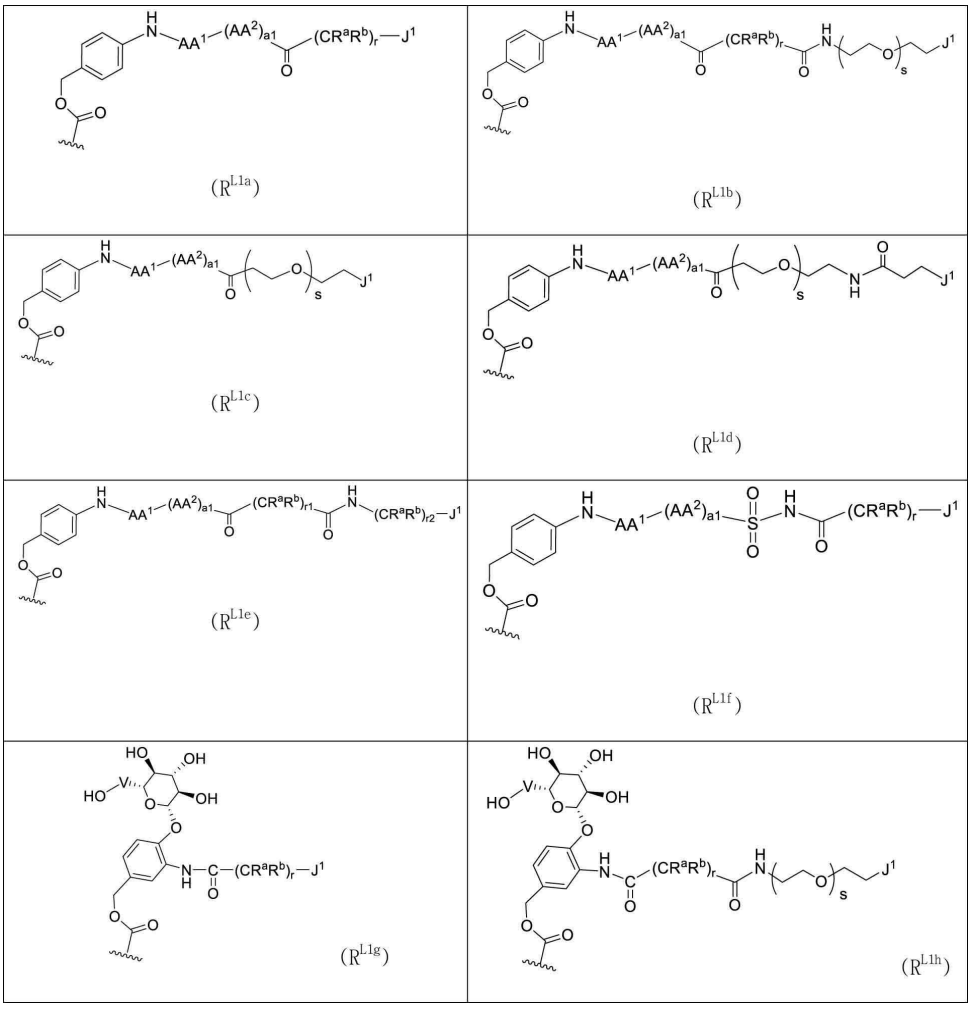
[0402]  (TC1'); 또는

[0403]  (TC2'),

[0404] 또는 이의 약제학적으로 허용되는 염이 포함되고, 여기서:

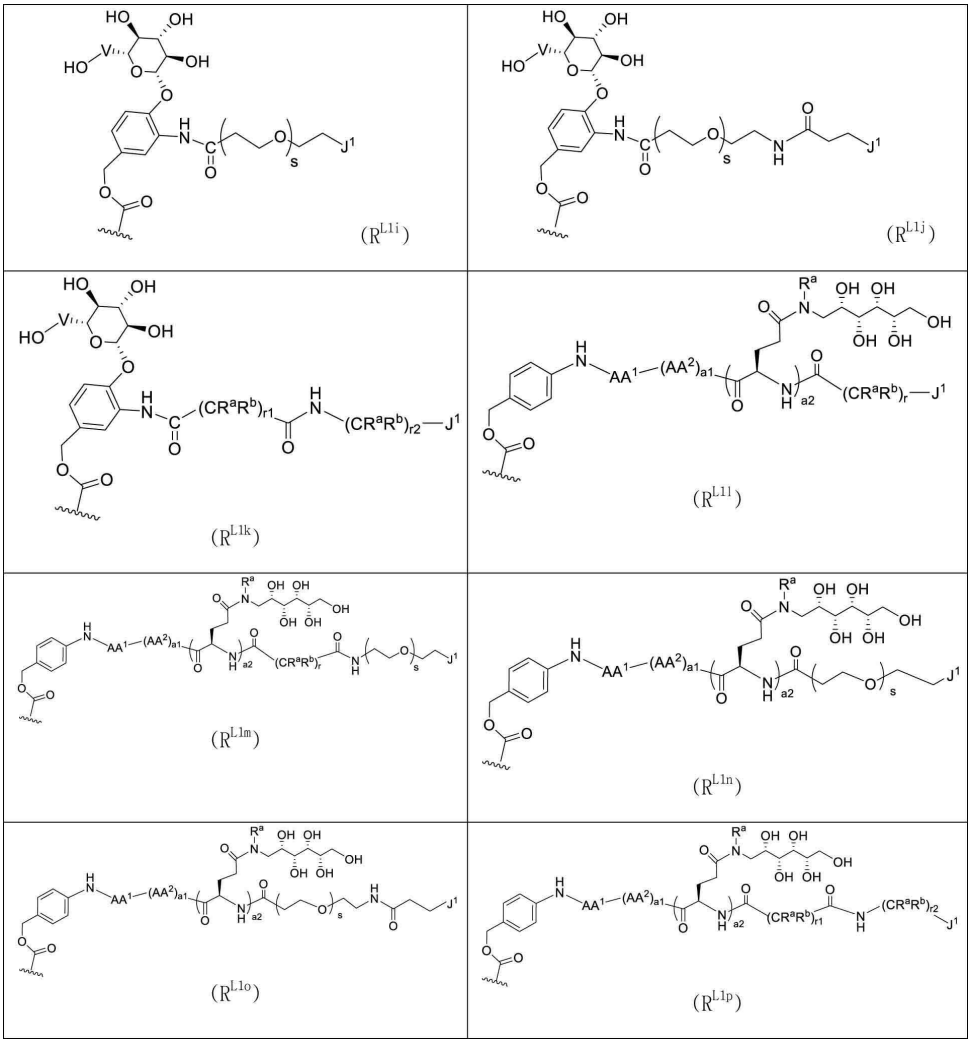
[0405] N과 C 사이의 이중선 ┅ 은 단일 결합 또는 이중 결합을 나타내고, 이중 결합인 경우 X는 부재하고 Y는 H, 또는 C_{1-4}알킬이고, 단일 결합인 경우, X는 H이고 Y는 $-SO_3H$이고;

[0406] R^{L1}은 다음 화학식 중 어느 하나에 의해 표시된다:

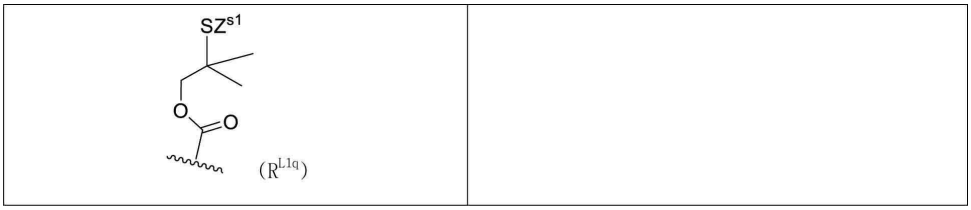


[0407]

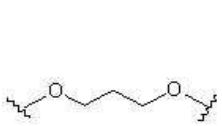
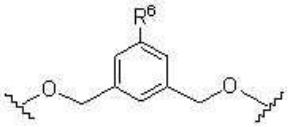
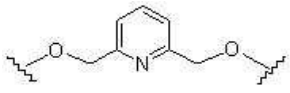
[0408]



[0409]



[0410] R^5는 다음 화학식 중 하나에 의해 표시된다:

[0411]  (R^{5a}); ;  (R^{5c}); 또는  (R^{5d}).

[0412] R^{L1} 및 R^5의 임의의 조합이 본 발명에 포함된다.

[0413] 제33 구체예에서, 제32 구체예의 접합체, 또는 이의 약제학적으로 허용되는 염에 대해:

[0414] R^{6a} 및 R^{6c}은 모두 Me이고;

[0415] R^{6b}는 H이고;

[0416] n은 1, 2, 3 또는 4;

[0417] R^a 및 R^b는, 각각의 경우에, 독립적으로 H 또는 Me이고;

[0418] r은 4이고;

[0419] r1은 4이고;

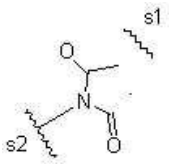
[0420] r2는 2이고;

[0421] s는 1, 2, 3 또는 4이고;

[0422] 나머지 변수는 제2 양태 또는 제32 구체예에 정의된 바와 같다.

[0423] 제34 구체예에서, 제23 내지 제33 구체예에 기재된 접합체, 또는 이의 약제학적으로 허용되는 염에 대해, J^1은 -C(=O)-이고; 나머지 변수는 제2 양태 또는 제23, 제24, 제25, 제26, 제27, 제28, 제29, 제30, 제31, 제32, 또는 제33 구체예 또는 본원에 기재된 임의의 특정 구체예에 정의된 바와 같다.

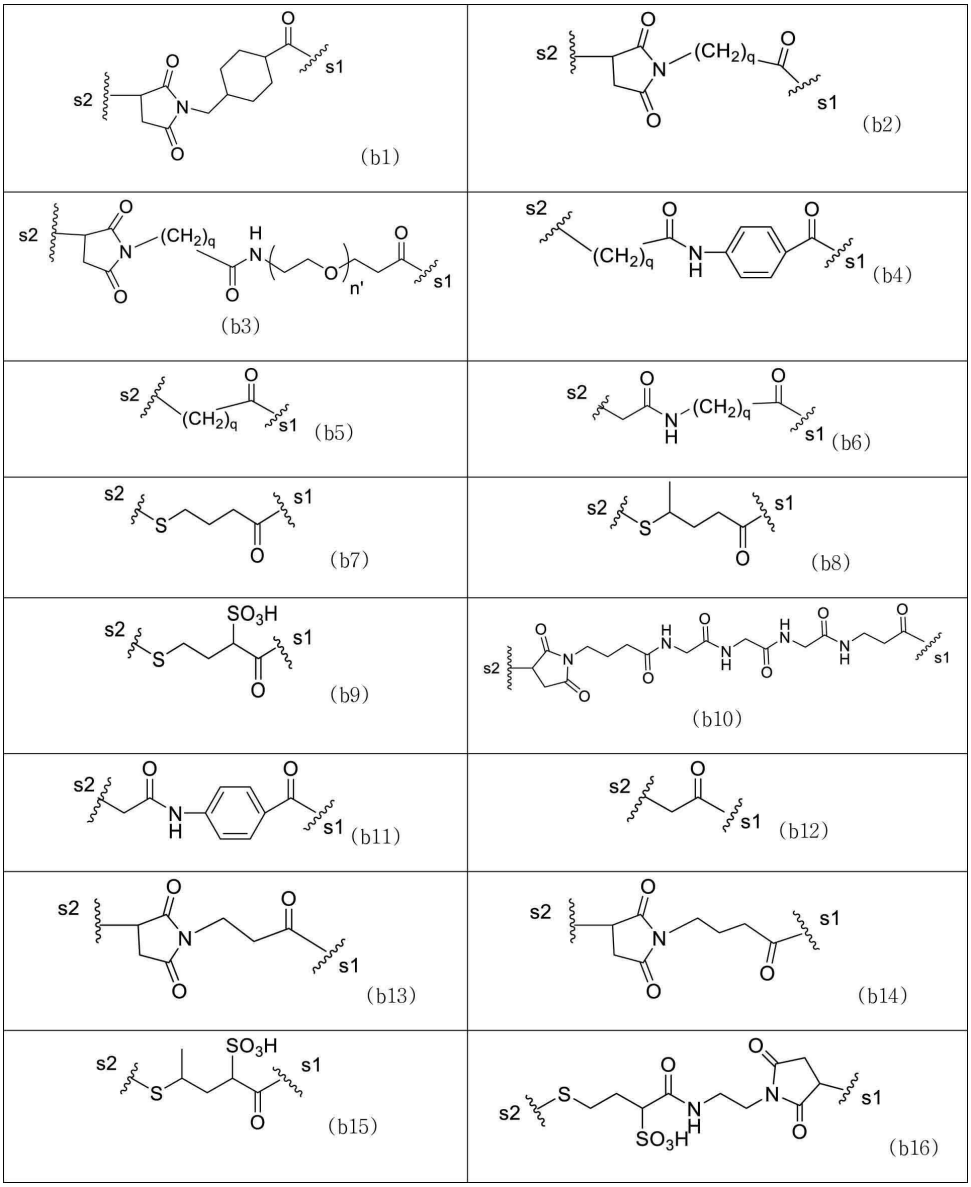
[0424] 제35 구체예에서, 제23 내지 제33 구체예에 기재된 접합체, 또는 이의 약제학적으로 허용되는 염에 대해, J^1은



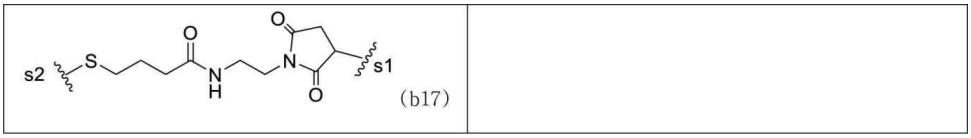
이고, 여기서 s1은 CBA에 연결된 부위이고 s2는 세포독성 화합물의 나머지에 연결된 부위이고; 나머지 변수는 제2 양태 또는 제23, 제24, 제25, 제26, 제27, 제28, 제29, 제30, 제31, 제32, 또는 제33 구체예 또는 본원에 기재된 임의의 특정 구체예에 정의된 바와 같다.

[0425] 제36 구체예에서, 제23 내지 제33 구체예에 기재된 접합체, 또는 이의 약제학적으로 허용되는 염에 대해, J^1은 $-SZ^{s1}$이고, 여기서 Z^{s1}은 다음 화학식으로부터 선택된다:

[0426]



[0427]



[0428] 여기서:

[0429] q는 1 내지 5의 정수이고;

[0430] n'은 2 내지 6의 정수이고;

[0431] s1은 CBA에 연결된 부위이고;

[0432] s2는 세포독성 화합물의 나머지에 연결된 부위이고;

[0433] 나머지 변수는 제2 양태 또는 제23, 제24, 제25, 제26, 제27, 제28, 제29, 제30, 제31, 제32, 또는 제33 구체예 또는 본원에 기재된 임의의 특정 구체예에 정의된 바와 같다.

[0434] 특정 구체예에서, Z^{s1}은 화학식 (b7) 또는 (b9)에 의해 표시된다. 또 다른 특정 구체예에서, Z^{s1}은 화학식 (b16) 또는 (b17)에 의해 표시된다.

[0435] 제37 구체예에서, 제22 내지 제36 구체예의 접합체, 또는 이의 약제학적으로 허용되는 염에 대해, N과 C 사이의 이중선 ═ 은 이중 결합을 나타내고, X는 부재하고 Y는 H이고; 나머지 변수는 제2 양태 또는 제22, 제23, 제24,

제25, 제26, 제27, 제28, 제29, 제30, 제31, 제32, 제33, 제34, 제35, 또는 제36 구체예 또는 본원에 기재된 임의의 특정 구체예에 정의된 바와 같다.

[0436] 제38 구체예에서, 제22 내지 제36 구체예의 접합체, 또는 이의 약제학적으로 허용되는 염에 대해, N와 C 사이의 이중선 ▬ 은 단일 결합을 나타내고, X는 H이고 Y는 $-SO_3H$이고; 나머지 변수는 제2 양태 또는 제22, 제23, 제24, 제25, 제26, 제27, 제28, 제29, 제30, 제31, 제32, 제33, 제34, 제35, 또는 제36 구체예 또는 본원에 기재된 임의의 특정 구체예에 정의된 바와 같다. 특정 구체예에서, 약제학적으로 허용되는 염은 소듐 또는 포타슘 염이다. 또 다른 특정 구체예에서, 약제학적으로 허용되는 염은 소듐 염이다.

[0437] 제39 구체예에서, 제23 내지 제38 구체예에 기재된 접합체, 또는 이의 약제학적으로 허용되는 염에 대해, a1은 1 내지 7의 정수이고; 나머지 변수는 제2 양태 또는 제23, 제24, 제25, 제26, 제27, 제28, 제29, 제30, 제31, 제32, 제33, 제34, 제35, 제36, 제37, 또는 제38 구체예 또는 본원에 기재된 임의의 특정 구체예에 정의된 바와 같다.

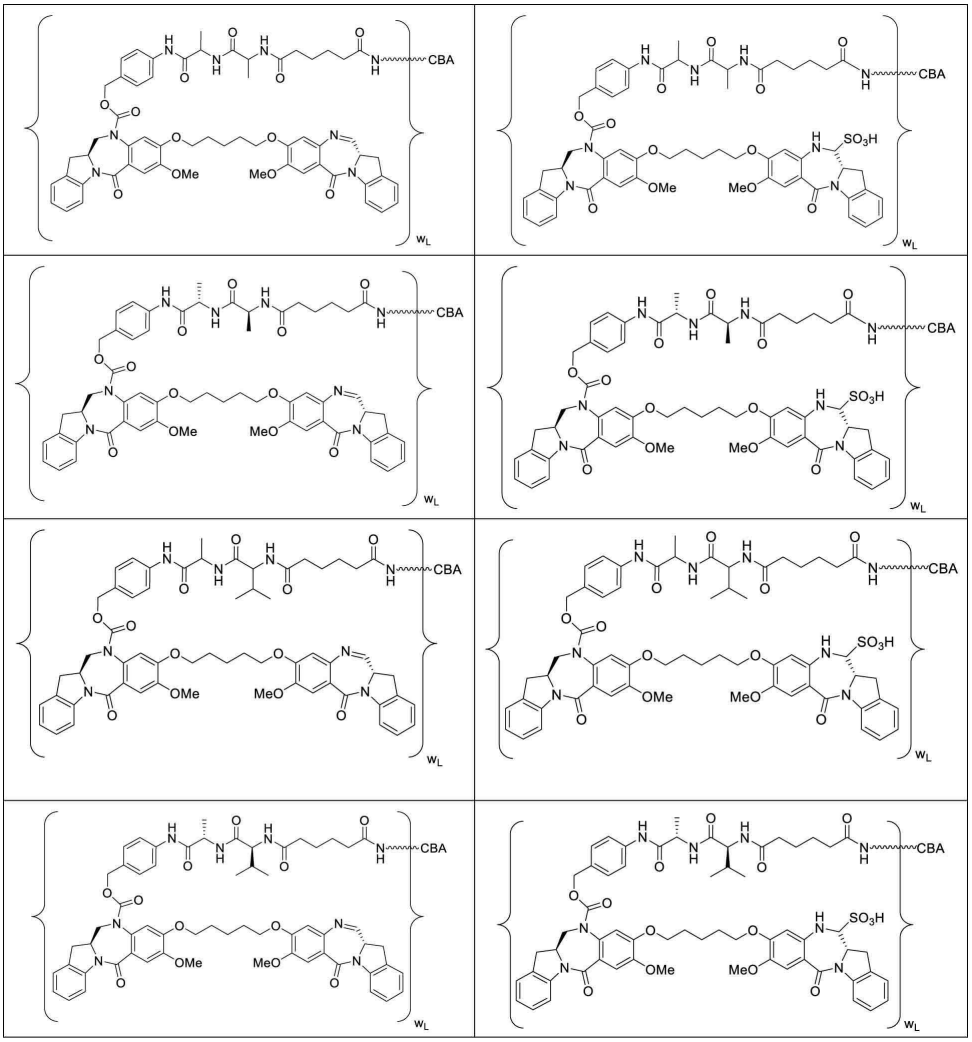
[0438] 특정 구체예에서, AA^1 및 AA^2는 각각 독립적으로 아르기(Arg), 히스티딘(His), 라이신(Lys), 아스파트산(Asp), 글루탐산(Glu), 세린(Ser), 트레오닌(Thr), 아스파라긴(Asn), 글루타민(Gln), 시스테인(Cys), 셀레노시스테인(Sec), 글라이신(Gly), 프롤린(Pro), 알라닌(Ala), 발린(Val), 이소류신(Ile), 류신(Leu), 메티오닌(Met), 페닐알라닌(Phe), 티로신(Tyr) 및 트립토판(Trp)으로부터 선택된다.

[0439] 제40 구체예에서, 제39 구체예의 접합체, 또는 이의 약제학적으로 허용되는 염에 대해, AA^1-$(AA^2)_{a1}$은 Gly-Gly-Gly, Ala-Val, Val-Ala, Val-Cit, Val-Lys, Phe-Lys, Lys-Lys, Ala-Lys, Phe-Cit, Leu-Cit, Lle-Cit, Phe-Ala, Phe-N^9-토실-Arg, Phe-N^9-니트로-Arg, Phe-Phe-Lys, D-Phe-Phe-Lys, Gly-Phe-Lys, Leu-Ala-Leu, Ile-Ala-Leu, Val-Ala-Val, Ala-Leu-Ala-Leu, β-Ala-Leu-Ala-Leu, Gly-Phe-Leu-Gly, Val-Arg, Arg-Val, Arg-Arg, Val-D-Cit, Val-D-Lys, Val-D-Arg, D-Val-Cit, D-Val-Lys, D-Val-Arg, D-Val-D-Cit, D-Val-D-Lys, D-Val-D-Arg, D-Arg-D-Arg, Ala-Ala, Ala-D-Ala, D-Ala-Ala, D-Ala-D-Ala, Ala-Met, Met-Ala, Thr-Thr, Thr-Met, Met-Thr, Leu-Ala, Cit-Val, Gln-Val, Ser-Val, Leu-Gln, Gln-Leu, Phe-Arg, Arg-Phe, Tyr-Arg, Arg-Tyr, Phe-Gln, Gln-Phe, Val-Thr, Thr-Val, Met-Tyr, 및 Tyr-Met로부터 선택되고; 나머지 변수는 제2 양태 또는 제39 구체예에 정의된 바와 같다.

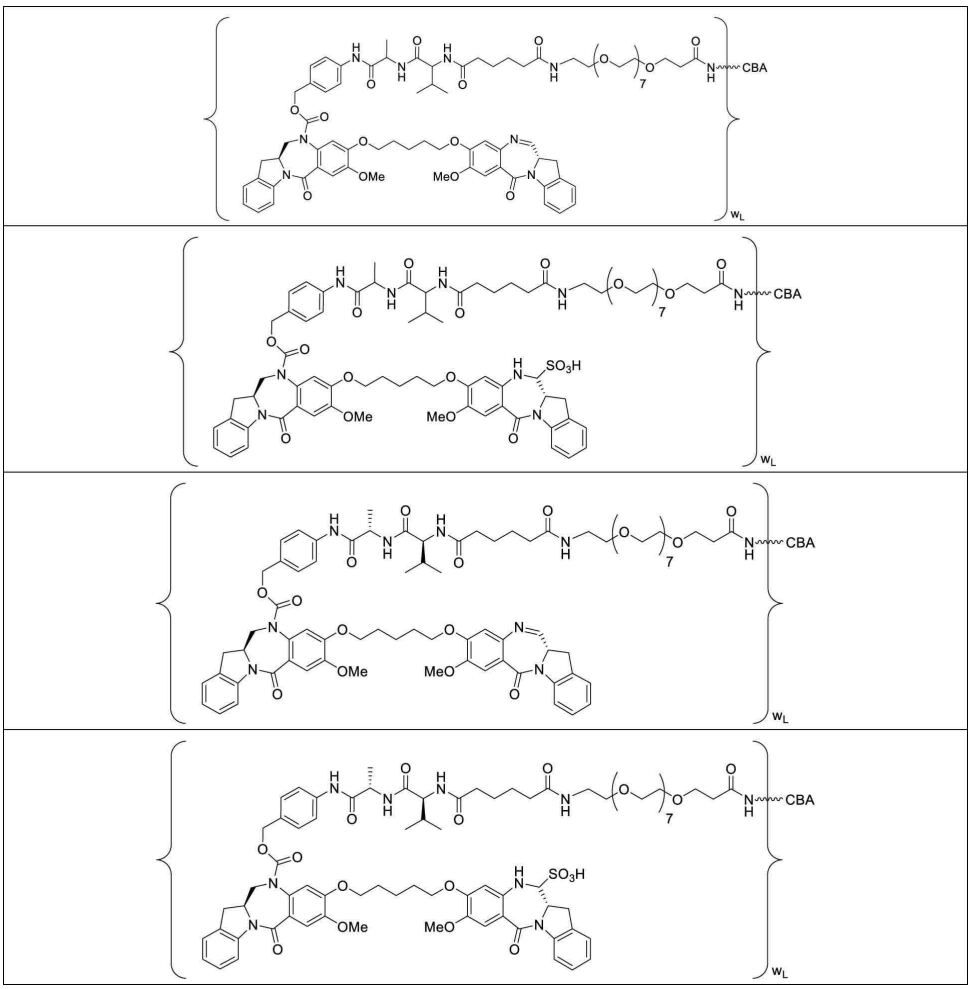
[0440] 특정 구체예에서, AA^1-$(AA^2)_{a1}$은 Ala-Ala, L-Ala-L-Ala, Ala-Val, L-Ala-L-Val, Gln-Val, L-Gln-L-Val, Gln-Leu, L-Gln-L-Leu, Ser-Val, 또는 L-Ser-L-Val이다.

[0441] 제41 구체예에서, 본 발명의 접합체는 표 H의 다음 중 하나로부터 선택된다:

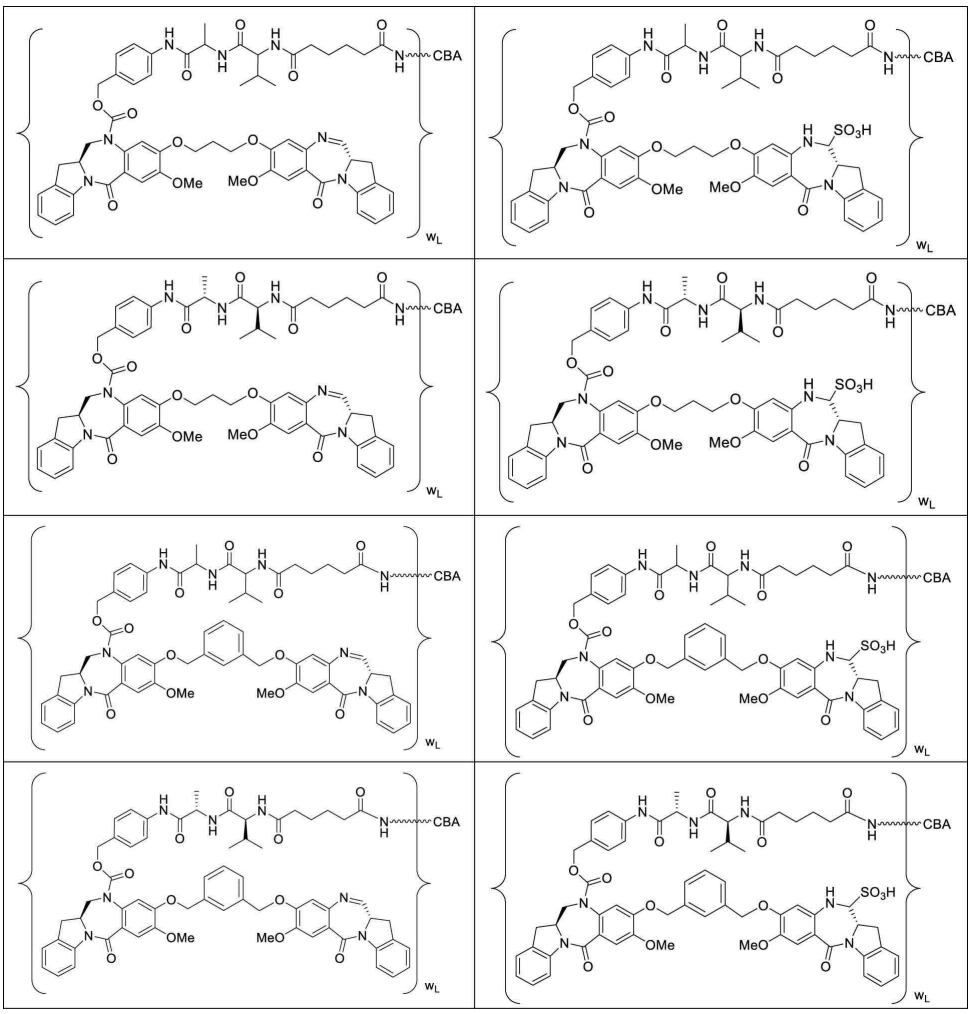
[0442]



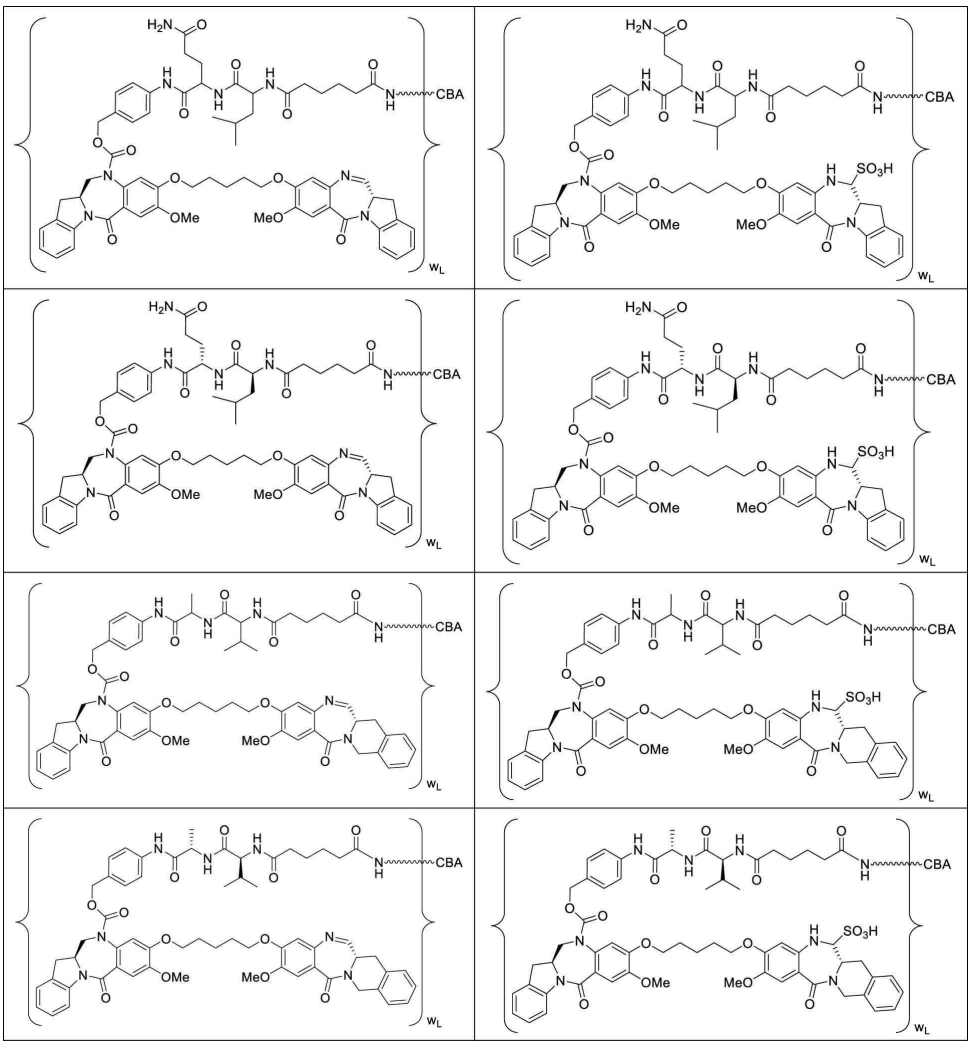
[0443]



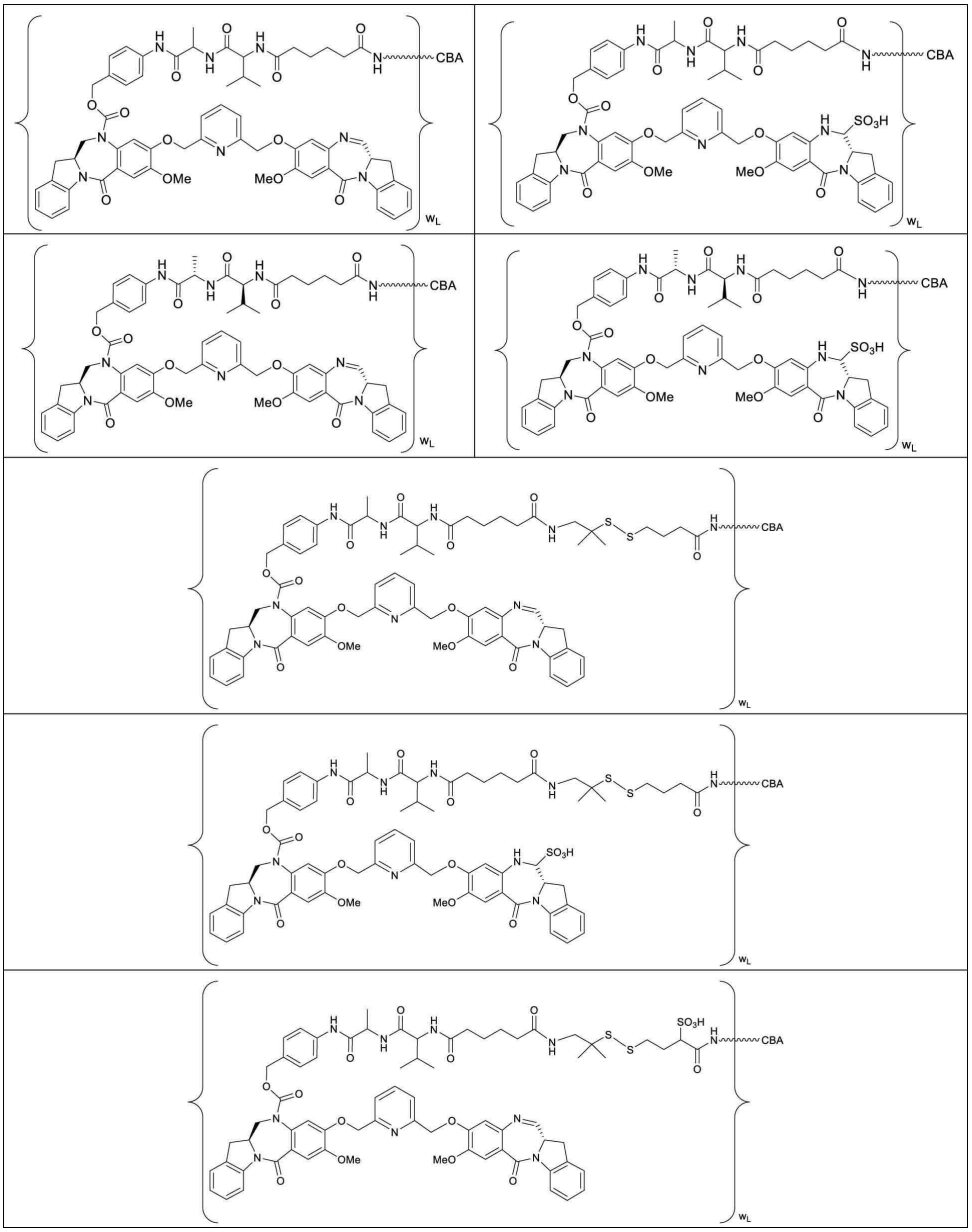
[0444]



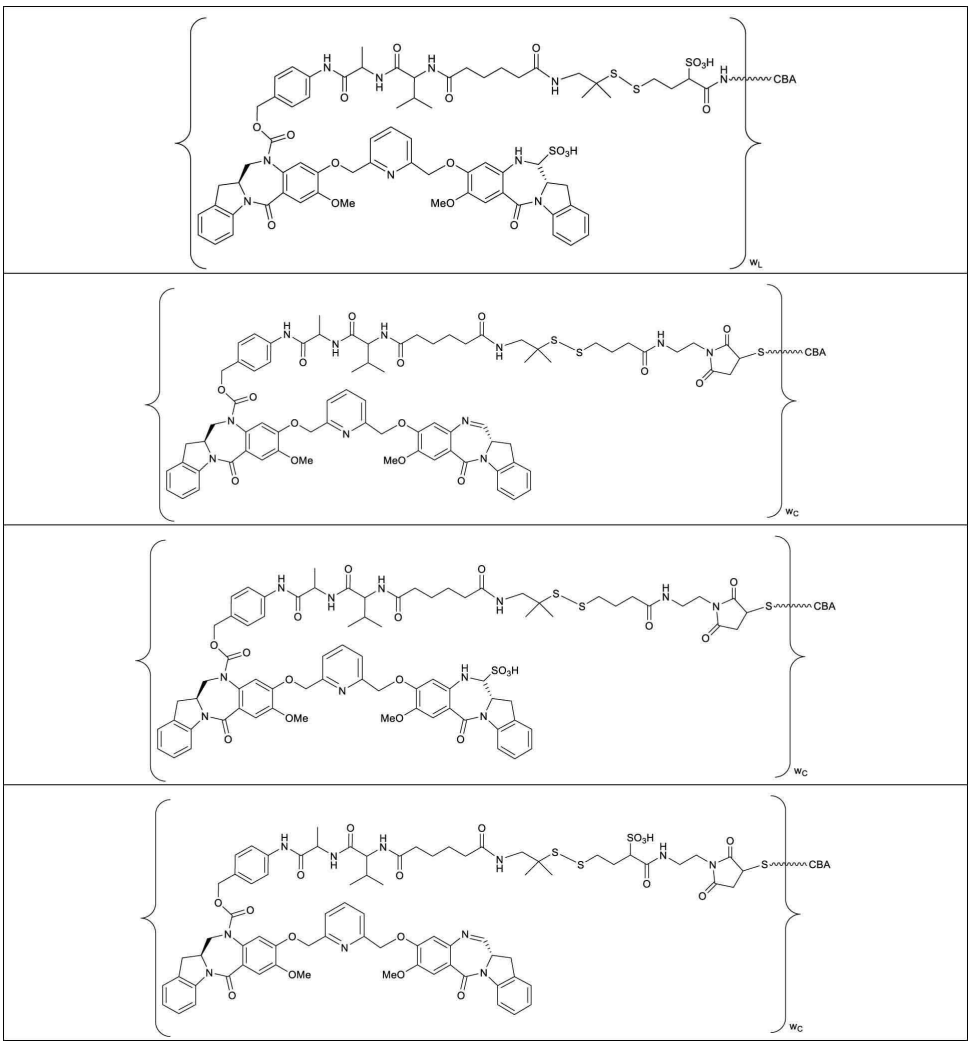
[0445]



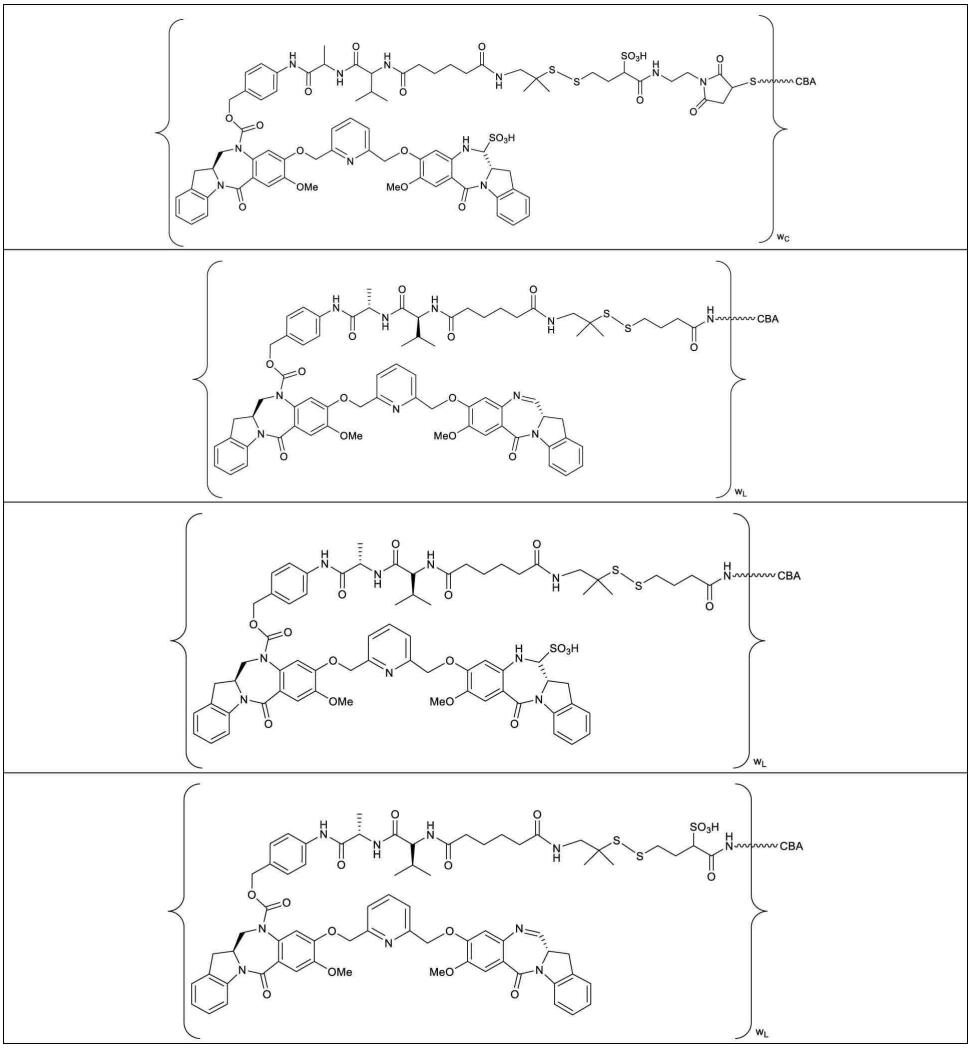
[0446]



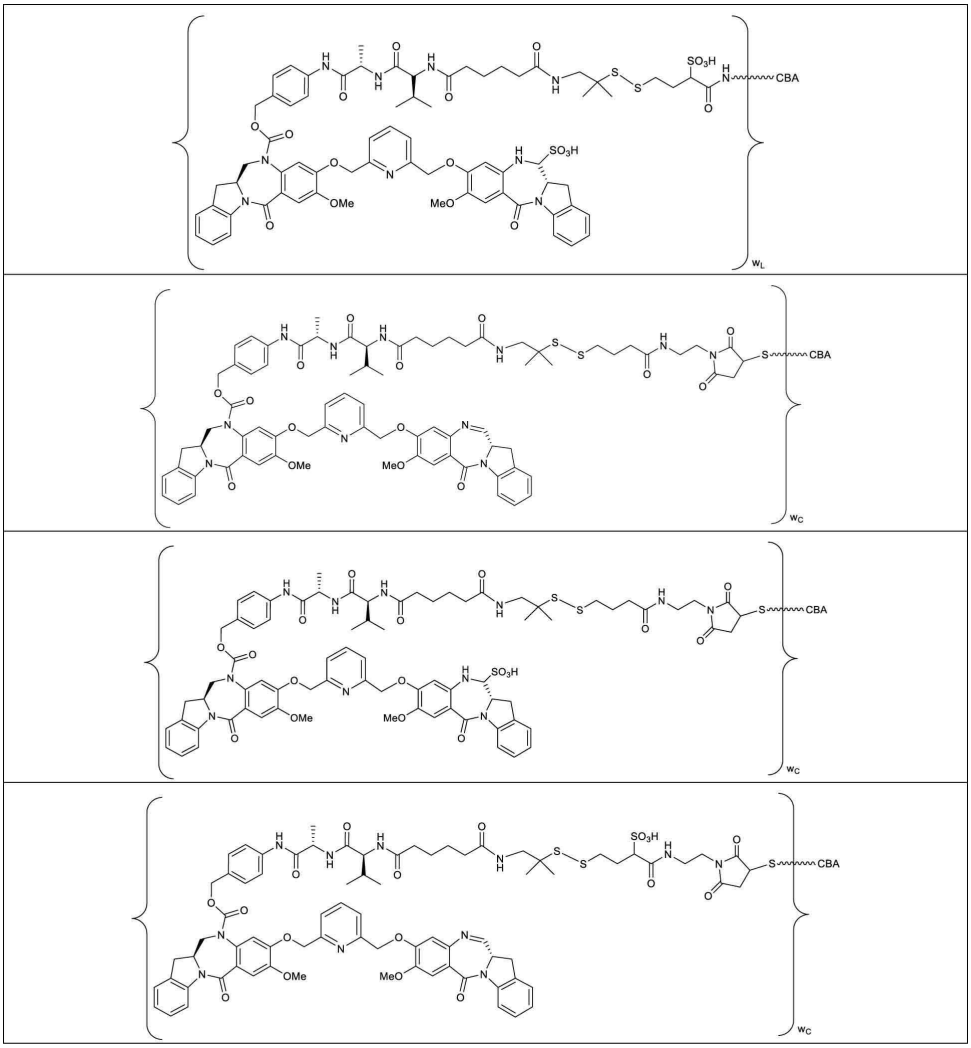
[0447]



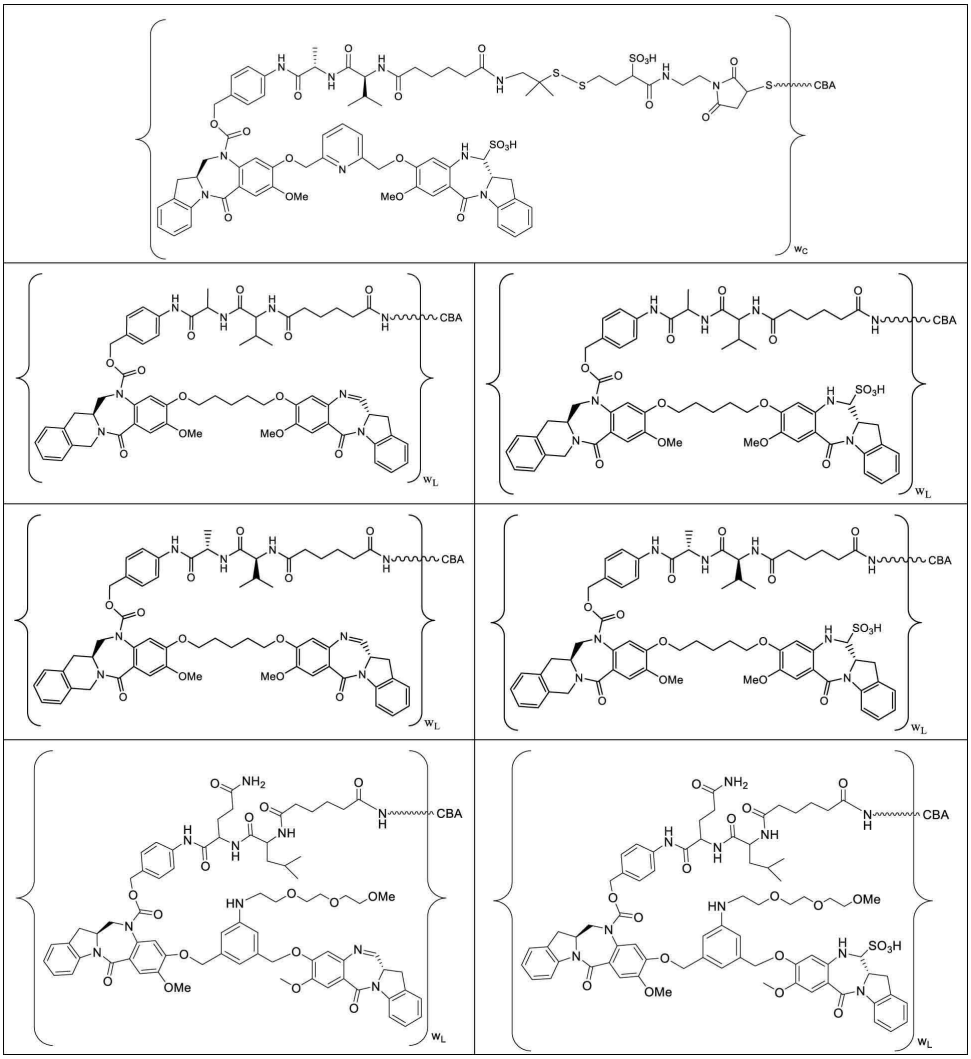
[0448]

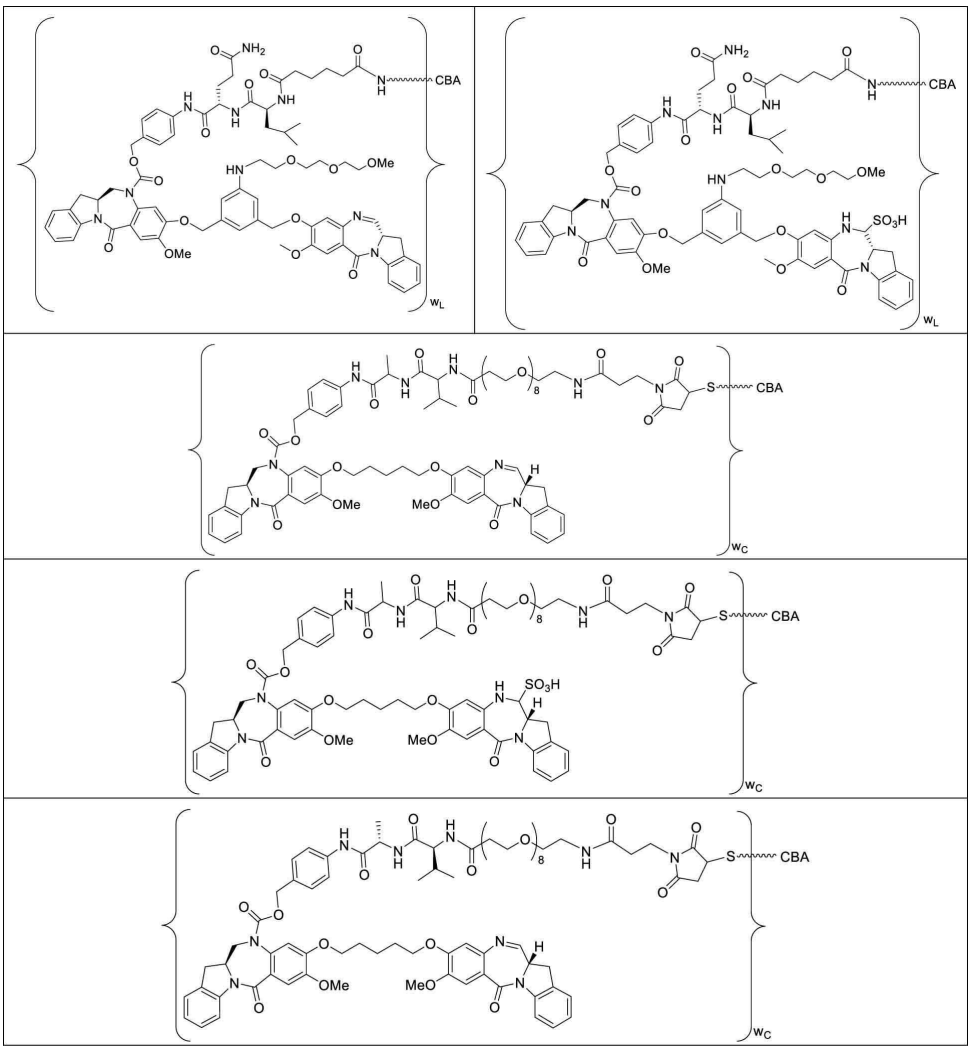


[0449]

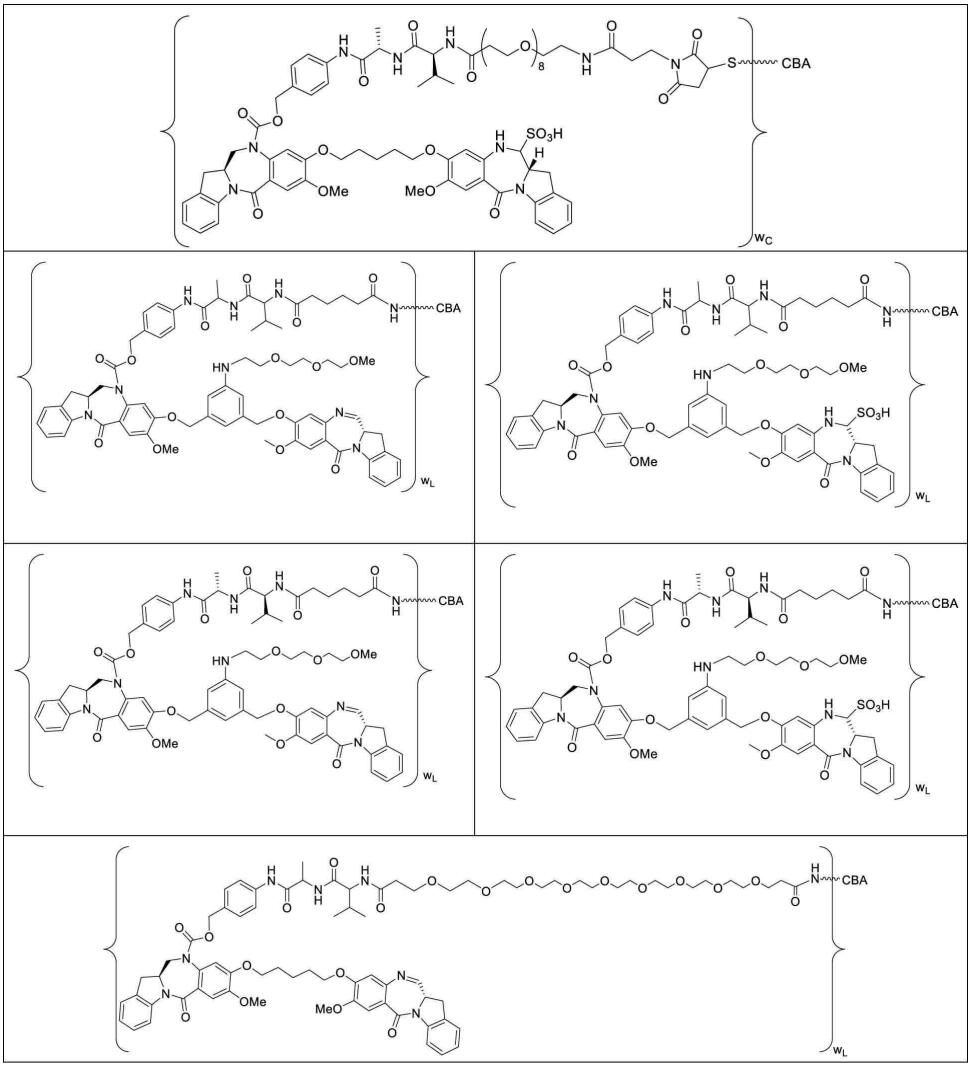


[0450]

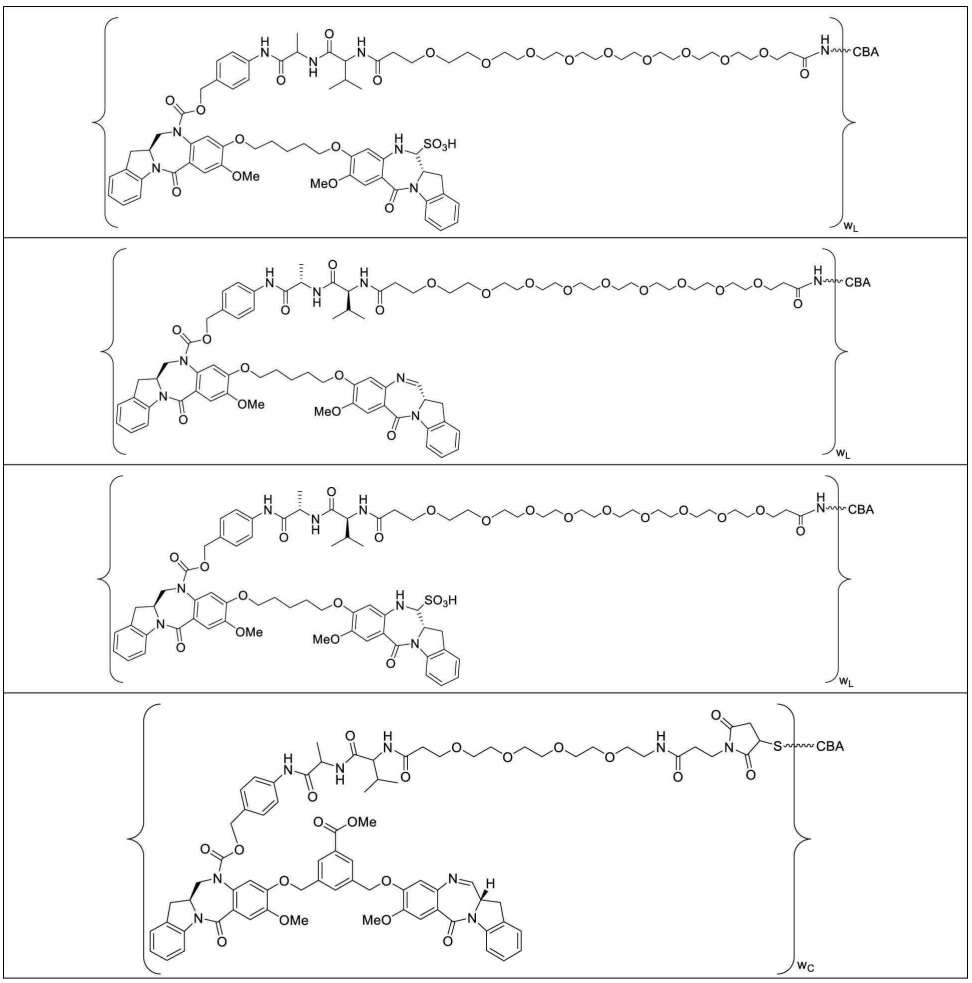


[0451] 

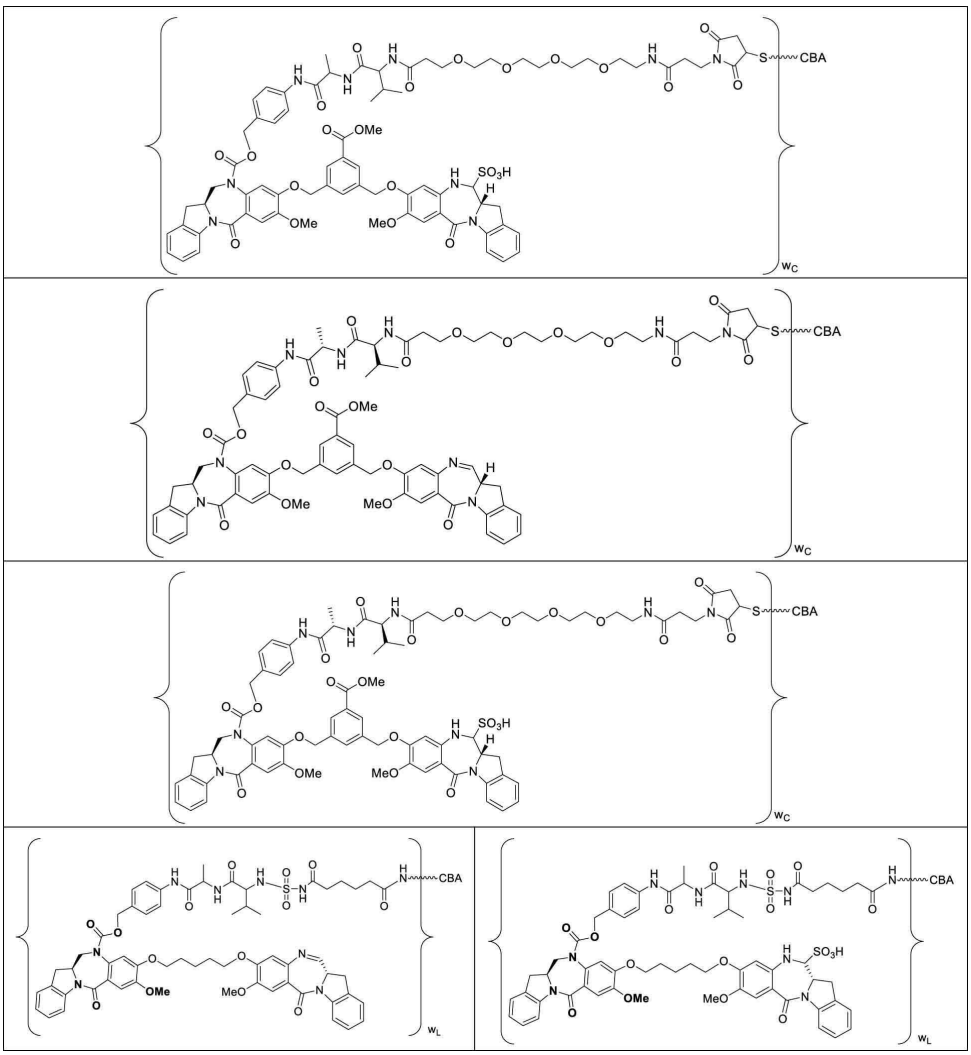
[0452]



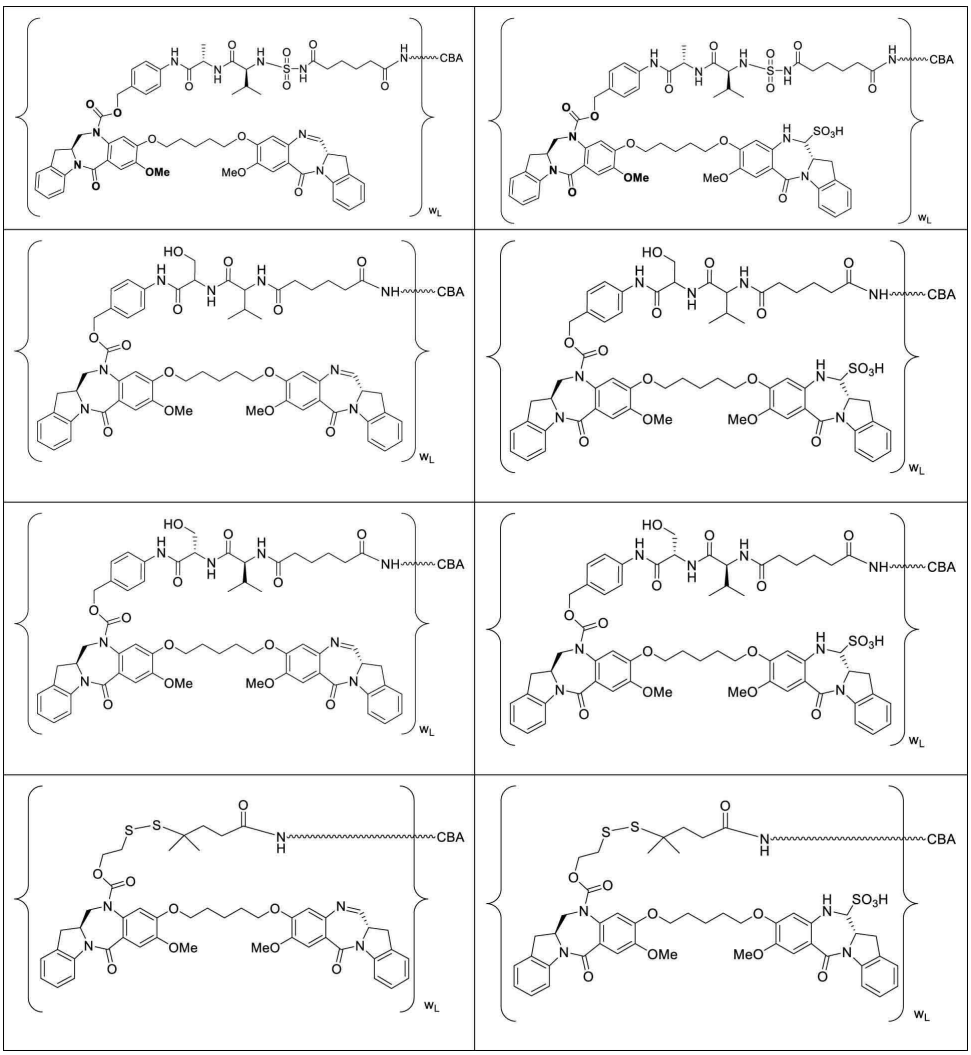
[0453]



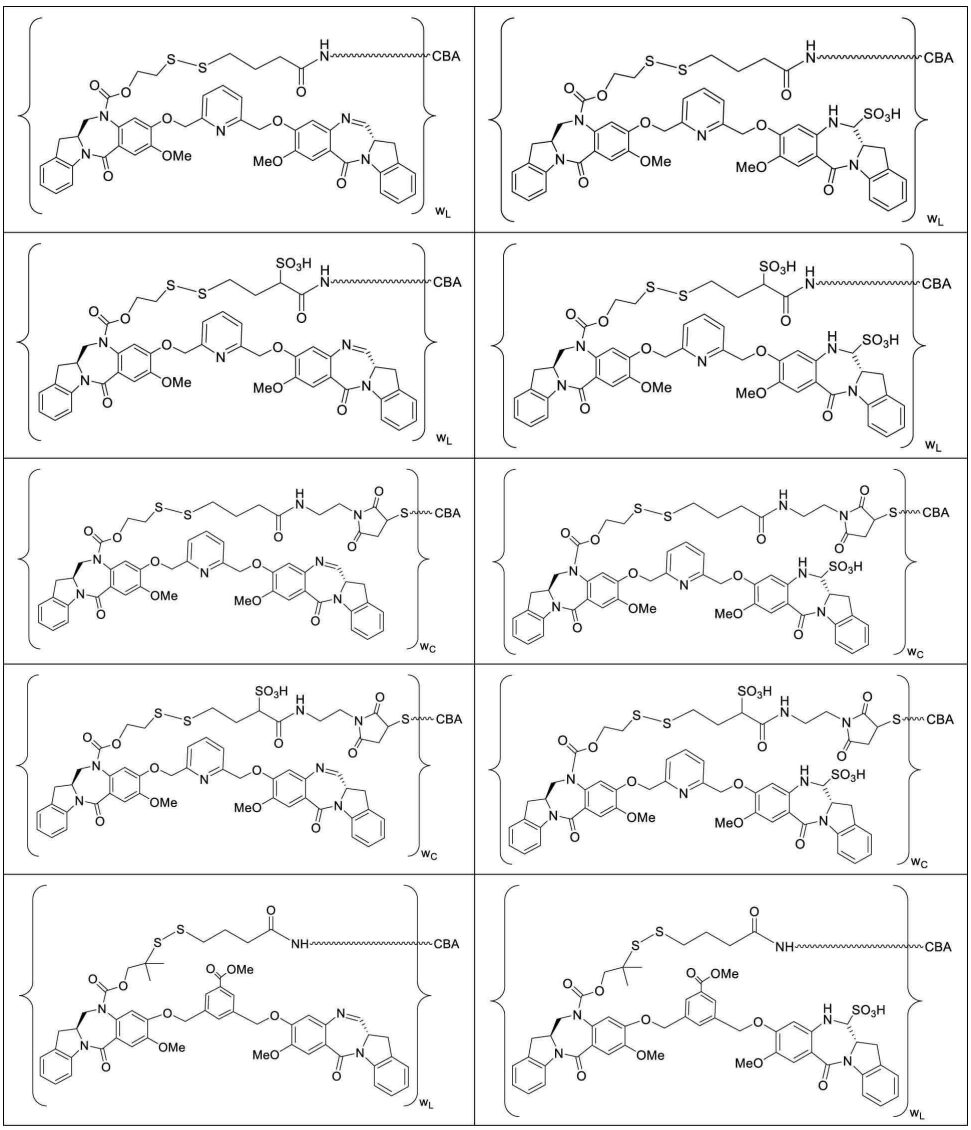
[0454]



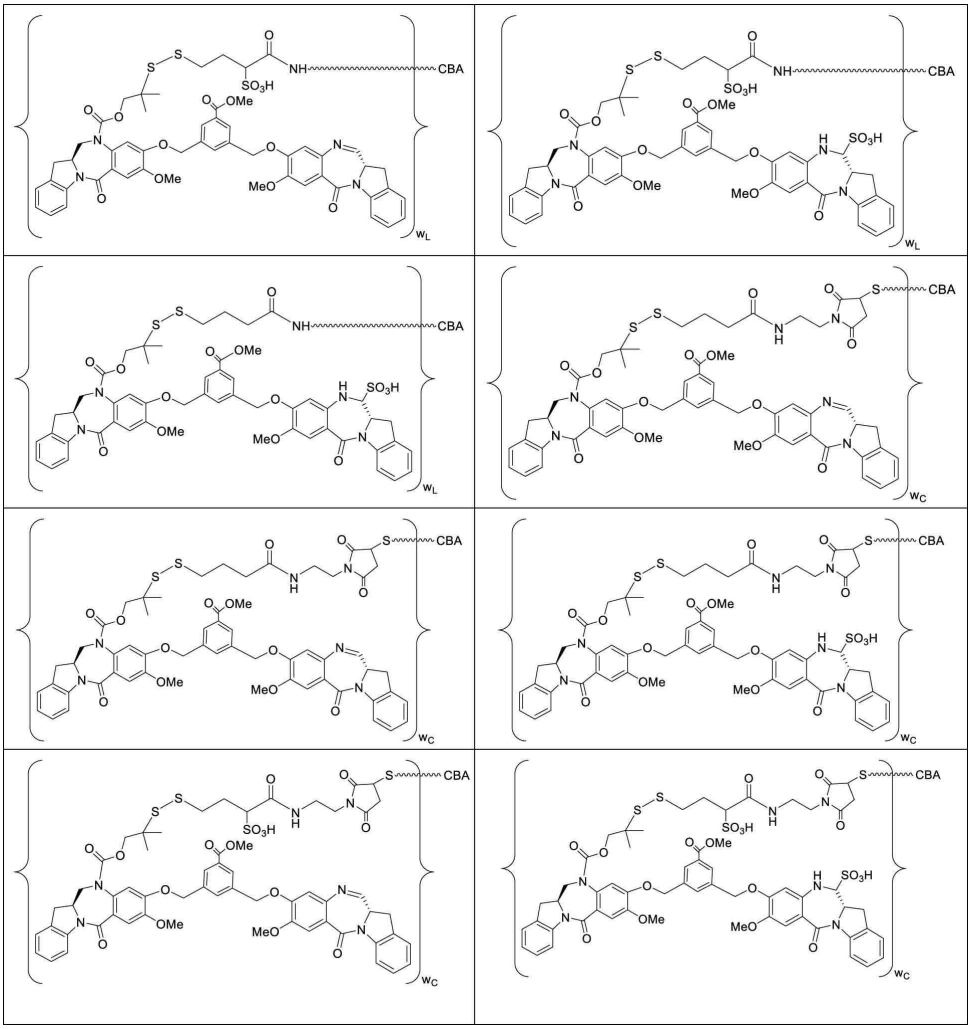
[0455]



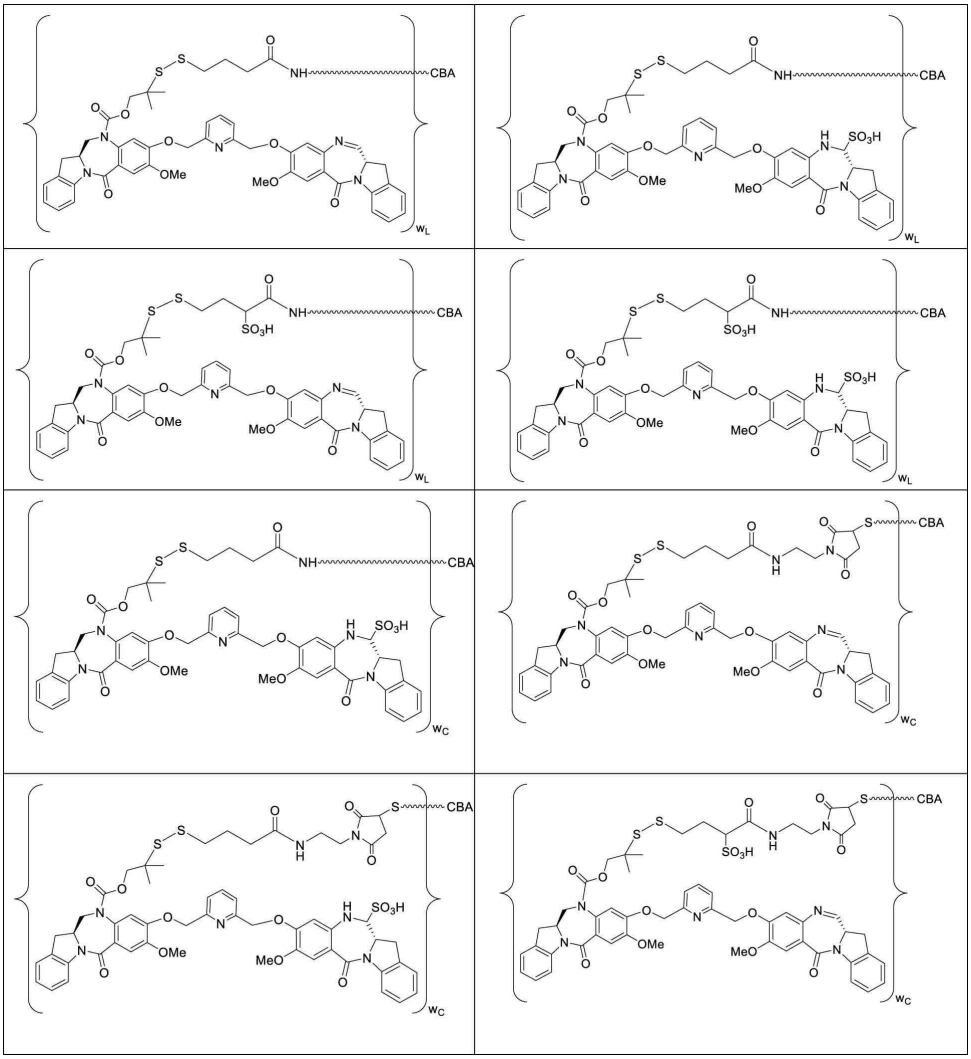
[0456]



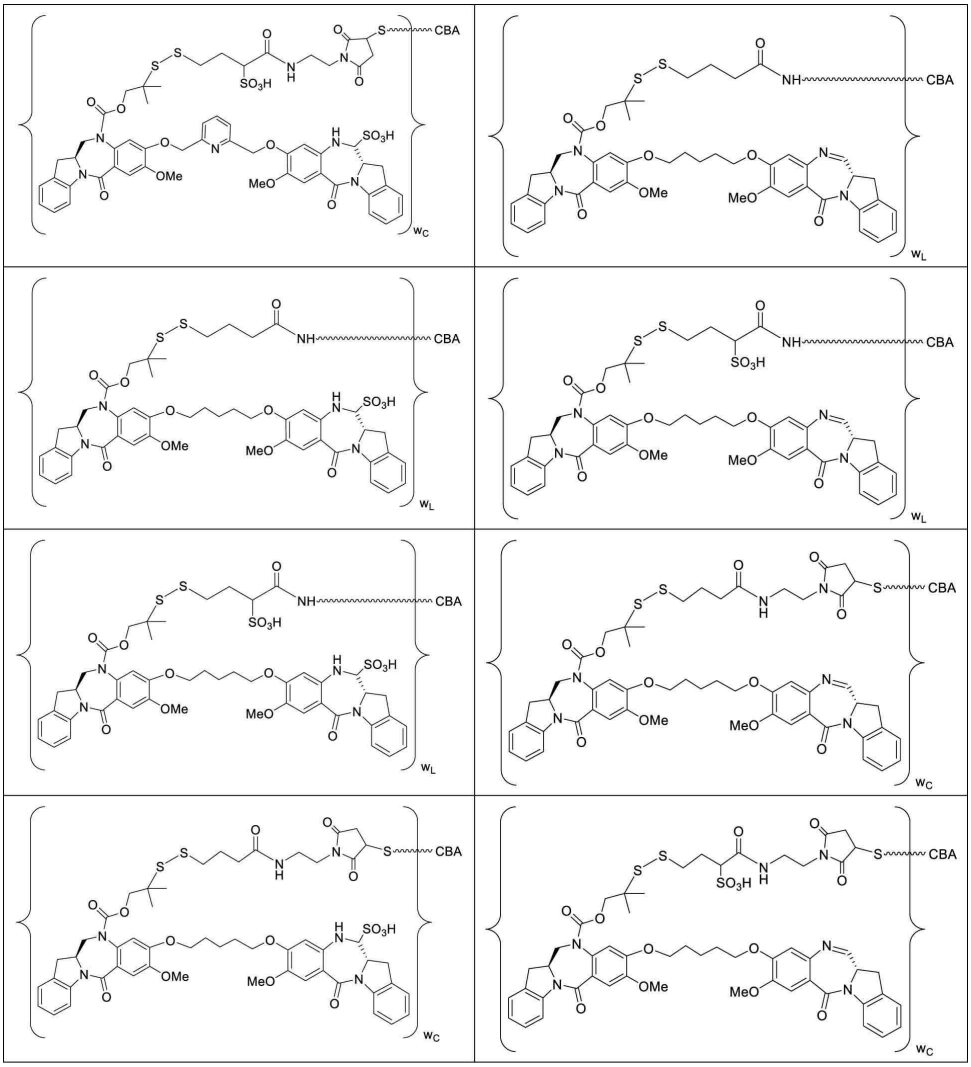
[0457]



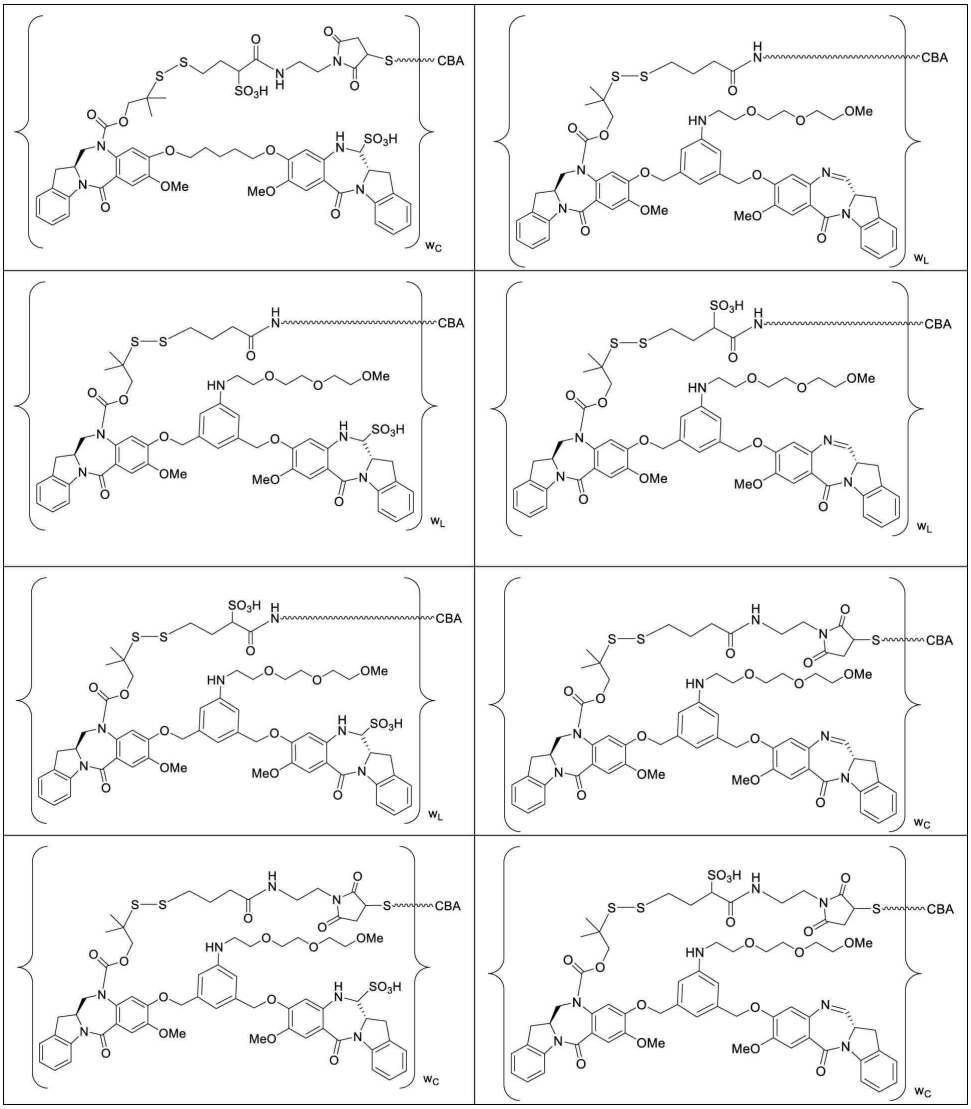
[0458]



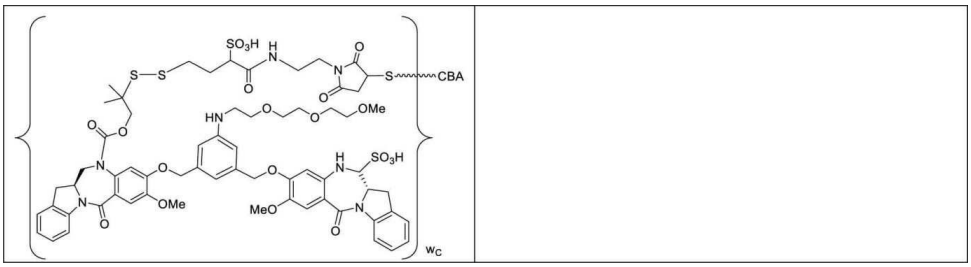
[0459]



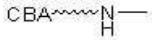
[0460]



[0461]



[0462] 또는 이의 약제학적으로 허용되는 염, 여기서:

[0463]  는 CBA에 위치한 아민 기를 통해 세포독성 화합물에 공유 결합된 세포결합제이고;

[0464] 는 CBA에 위치한 티올 기를 통해 세포독성 화합물에 공유 결합된 세포결합제이고;

[0465] w_L은 1 내지 20의 정수이고;

[0466] w_C는 1 내지 4의 정수이고;

[0467] 나머지 변수는 제2 양태 또는 제22 구체예에 정의된 바와 같다.

[0468] 제42 구체예에서, 위에 기재된 접합체(*예를 들어*, 제2 양태 또는 이에 기재된 임의의 구체예 또는 제22 내지 제41 구체예 또는 이에 기재된 임의의 구체예 또는 특정 구체예에 기재된 접합체)에 대해, 이의 약제학적으로 허용되는 염은 소듐 또는 포타슘 염이다. 한 구체예에서, 약제학적으로 허용되는 염은 소듐 염이다. 한 구체예에

서, 약제학적으로 허용되는 염은 포타슘 염이다.

[0469] *세포결합제*

[0470] 본 발명의 면역접합체에서 세포결합제는 펩타이드 및 비펩타이드를 포함하여 현재 알려져 있거나 알려지고 있는 임의의 종류일 수 있다. 일반적으로, 이들은 항체 (예컨대 다중클론 항체 및 단일클론 항체, 특히 단일클론 항체), 림포카인, 호르몬, 성장 인자, 비타민 (예컨대 세포 표면 수용체, 예를 들어, 엽산 수용체에 결합할 수 있는 엽산염 등), 영양소 수성 분자 (예컨대 트랜스페린), 또는 임의의 다른 세포-결합 분자 또는 물질일 수 있다.

[0471] 특정 구체예에서, 세포결합제는 항체, 단일 사슬 항체, 표적 세포에 특이적으로 결합하는 항체 단편, 단일클론 항체, 단일 사슬 단일클론 항체, 표적 세포에 특이적으로 결합하는 단일클론 항체 단편 (또는 "항원-결합 부분" 또는 "항원-결합 단편"), 키메라 항체, 표적 세포에 특이적으로 결합하는 키메라 항체 단편 (또는 "항원-결합 부분" 또는 "항원-결합 단편"), 도메인 항체 (*예를 들어*, sdAb), 또는 표적 세포에 특이적으로 결합하는 도메인 항체 단편이다.

[0472] 특정 구체예에서, 세포결합제는 인간화 항체, 인간화 단일 사슬 항체, 또는 인간화 항체 단편 (또는 "항원-결합 부분" 또는 "항원-결합 단편")이다.

[0473] 특정 구체예에서, 세포결합제는 재표면화 항체, 재표면화 단일 사슬 항체, 또는 재표면화 항체 단편 (또는 "항원-결합 부분" 또는 "항원-결합 단편")이다.

[0474] 특정 구체예에서, 세포결합제는 항체 또는 이의 항원-결합 부분(항체 유도체 포함)이고, CBA는 표적 세포상의 리간드, 예컨대 세포-표면 수용체를 비롯한 세포-표면 리간드에 결합할 수 있다.

[0475] 특정 구체예에서, 세포결합제(CBA)는 종양 세포, 바이러스 감염 세포, 미생물 감염 세포, 기생충 감염 세포, 자가면역 세포, 활성화 세포, 골수 세포, 활성화 T-세포, B 세포, 또는 멜라닌세포; CA6, CAK1, CD4, CD5, CD6, CD19, CD20, CD22, CD30, CD33, CD37, CD38, CD40, CD44, CD56, CD123, CD138, EpCAM, CanAg, CALLA, CEACAM5, FGFR3, LAMP1, p-카드헤린, Her-2 또는 Her-3 항원을 발현하는 세포; 또는 인슐린 성장 인자 수용체, 표피 성장 인자 수용체, 및 엽산 수용체를 발현하는 세포로부터 선택된 표적 세포에 결합한다.

[0476] 특정 구체예에서, 세포결합제는 시스테인-조작된 항체 또는 이의 항원 결합 단편이다. 특정 구체예에서, 시스테인-조작된 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 항-엽산 수용체 항체 또는 이의 항원 결합 단편, 항-EGFR 항체 또는 이의 항원 결합 단편, 항-CD33 항체 또는 이의 항원 결합 단편, 항-CD19 항체 또는 이의 항원 결합 단편, 항-Muc1 항체 또는 이의 항원 결합 단편, 항-CD37 항체 또는 이의 항원 결합 단편, 항-cMet 항체 또는 이의 항원 결합 단편, 또는 항-EpCAM 항체 또는 이의 항원 결합 단편이다.

[0477] 특정 구체예에서, 세포결합제는 (a) 인간 CD123 / IL3-Rα 항원의 아미노산 101 내지 346 내의 에피토프에 결합하고, (b) 항원-양성 TF-1 세포의 IL3-의존성 증식을 억제하는 항체 또는 이의 항원 결합 단편이다 (전체가 본원에 참조로 포함되는 WO2017/004026 참조).

[0478] 특정 구체예에서, 세포결합제는 본원에 참조로 포함되는 WO2017/004026에 기재된 항-CD123 항체 또는 이의 항원 결합 단편이다.

[0479] 특정 구체예에서, 항-CD123 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 다음을 포함할 수 있다: a) 세 개의 순차적 상보성 결정 영역 (CDR) CDR_L1, CDR_L2, 및 CDR_L3 각각을 포함하는 적어도 하나의 경쇄 가변 영역 또는 이의 단편, 여기서 CDR_L1은 RASQDINSYLS (서열 식별 번호:1)의 아미노산 서열을 가지고, CDR_L2는 RVNRLVD (서열 식별 번호:2)의 아미노산 서열을 가지고, CDR_L3은 LQYDAFPYT (서열 식별 번호:3)의 아미노산 서열을 가짐; 및 b) 세 개의 순차적 상보성 결정 영역 (CDR) CDR_H1, CDR_H2, 및 CDR_H3 각각을 포함하는 적어도 하나의 중쇄 가변 영역 또는 이의 단편, 여기서 CDR_H1은 SSIMH (서열 식별 번호:4)의 아미노산 서열을 가지고, CDR_H2는 YIKPYNDGTKYNEKFKG (서열 식별 번호:5)의 아미노산 서열을 가지고, CDR_H3은 EGGNDYYDTMDY (서열 식별 번호:6)의 아미노산 서열을 가짐.

[0480] 특정 구체예에서, 항-CD123 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 다음의 아미노산 서열을 갖는 중쇄 가변 영역 (V_H)

[0481] QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYIFT**SSIMH**WVRQAPGQGLEWIG**YIKPYNDGTKYNEKFKG**RATLTSDRSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCAR**EGGN DYYDTMDY**WGQGTLVTVSS (서열 식별 번호:7)

[0482] 및 다음의 아미노산 서열을 갖는 경쇄 가변 영역 (V_L)

[0483] DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITC**RASQDINSYLS**WFQQKPGKAPKTLIY**RVNRLVD**GVPSRFSGSGSGNDYTLTISSLQPEDFATYYC**LQYDAFPYT**FGQGT KVEIKR (서열 식별 번호:9)을 포함한다.

[0484] 특정 구체예에서, 항-CD123 항체는 다음의 중쇄 전장 서열

[0485] QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYIFT**SSIMH**WVRQAPGQGLEWIG**YIKPYNDGTKYNEKFKG**RATLTSDRSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCAR**EGGN DYYDTMDY**WGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYIC NVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRV VSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSF FLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLCLSPG (서열 식별 번호:8)

[0486] 및 다음의 경쇄 전장 서열

[0487] DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITC**RASQDINSYLS**WFQQKPGKAPKTLIY**RVNRLVD**GVPSRFSGSGSGNDYTLTISSLQPEDFATYYC**LQYDAFPYT**FGQGT KVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSP VTKSFNRGEC (서열 식별 번호:10)를 갖는다.

[0488] 특정 구체예에서, 세포결합제는 본원에 참조로 포함된 미국 특허 번호 7,342,110 및 7,557,189에 기재된 항-CD33 항체 또는 이의 항원 결합 단편이다.

[0489] 특정 구체예에서, 항-CD33 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 다음을 포함할 수 있다: a) 세 개의 순차적 상보성 결정 영역 (CDR) CDR_L1, CDR_L2, 및 CDR_L3 각각을 포함하는 적어도 하나의 경쇄 가변 영역 또는 이의 단편, 여기서 CDR_L1은 KSSQSVFFSSSQKNYLA (서열 식별 번호:11)의 아미노산 서열을 가지고, CDR_L2는 WASTRES (서열 식별 번호:12)의 아미노산 서열을 가지고, CDR_L3은 HQYLSSRT (서열 식별 번호:13)의 아미노산 서열을 가짐; 및 b) 세 개의 순차적 상보성 결정 영역 (CDR) CDR_H1, CDR_H2, 및 CDR_H3 각각을 포함하는 적어도 하나의 중쇄 가변 영역 또는 이의 단편, 여기서 CDR_H1은 SYYIH (서열 식별 번호:14)의 아미노산 서열을 가지고, CDR_H2는 VIYPGNDDISYNQKFQG (서열 식별 번호:15)의 아미노산 서열을 가지고, CDR_H3은 EVRLRYFDV (서열 식별 번호:16)의 아미노산 서열을 가짐.

[0490] 특정 구체예에서, 항-CD33 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 다음의 아미노 서열을 갖는 중쇄 가변 영역 (V_H)

[0491] QVQLQQPGAEVVKPGASVKMSCKASGYTFT**SYYIH**WIKQTPGQGLEWVG**VIYPGNDDISYNQKFQG**KATLTADKSSTTAYMQLSSLTSEDSAVYYCAR**EVRL RYFDV**WGQGTTVTVSS (서열 식별 번호:17)

[0492] 및 다음의 아미노산 서열을 갖는 경쇄 가변 영역 (V_L)

[0493] EIVLTQSPGSLAVSPGERVTMSC**KSSQSVFFSSSQKNYLA**WYQQIPGQSPRLLIY**WASTRES**GVPDRFTGSGSGTDFTLTISSVQPEDLAIYYC**HQYLSSRT** FGQGTKLEIKR (서열 식별 번호:19)을 포함한다.

[0494] 특정 구체예에서, 항-CD33 항체는 다음의 중쇄 전장 서열

[0495] QVQLQQPGAEVVKPGASVKMSCKASGYTFT**SYYIH**WIKQTPGQGLEWVG**VIYPGNDDISYNQKFQG**KATLTADKSSTTAYMQLSSLTSEDSAVYYCAR**EVRL RYFDV**WGQGTTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVN HKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSV LTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLY SKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG (서열 식별 번호:18)

[0496] 및 다음의 경쇄 전장 서열

[0497] EIVLTQSPGSLAVSPGERVTMSC**KSSQSVFFSSSQKNYLA**WYQQIPGQSPRLLIY**WASTRES**GVPDRFTGSGSGTDFTLTISSVQPEDLAIYYC**HQYLSSRT** FGQGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQ GLSSPVTKSFNRGEC (서열 식별 번호:20)를 갖는다.

[0498] 특정 구체예에서, 항-CD33 항체는 huMy9-6 항체이다.

[0499] 특정 구체예에서, 세포결합제는 각각 본원에 참조로 포함되는 WO2018/119196 및 미국 가출원 번호 62/690052 및 62/691342에 기재된 항-ADAM9 항체 또는 이의 항원 결합 단편이다.

[0500] 특정 구체예에서, 항-ADAM9 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 인간 ADAM9 및 시노 ADAM9에 특이적으로 결합하는 인간화 항-ADAM9 항체 또는 이의 항원 결합 단편이다.

[0501] 특정 구체예에서, 인간화 항-ADAM9 항체 또는 이의 ADAM9-결합 단편은 키메라 또는 뮤린 모 항체와 비교하여 시노 ADAM9에 대한 결합 친화도가 100 배 이상 향상되고 인간 ADAM9에 대한 고친화도 결합을 유지하도록 최적화된다.

[0502] 특정 구체예에서, 항-ADAM9 항체 또는 이의 항원 결합 단편 (*예를 들어*, 인간화 항-ADAM9 항체 또는 이의 항원 결합 단편)은 다음을 포함한다: a) 세 개의 순차적 상보성 결정 영역 (CDR) CDR_L1, CDR_L2, 및 CDR_L3 각각을 포함하는 적어도 하나의 경쇄 가변 영역 또는 이의 단편, 여기서 CDR_L1은 KASQSVDYSGDSYMN (서열 식별 번호:21)의 아미노산 서열을 가지고, CDR_L2는 AASDLES (서열 식별 번호:22)의 아미노산 서열을 가지고, CDR_L3은 QQSHEDPFT (서열 식별 번호:23)의 아미노산 서열을 가짐; 및 b) 세 개의 순차적 상보성 결정 영역 (CDR) CDR_H1, CDR_H2, 및 CDR_H3 각각을 포함하는 적어도 하나의 중쇄 가변 영역 또는 이의 단편, 여기서 CDR_H1은 SYWMH (서열 식별 번호:24)의 아미노산 서열을 가지고, CDR_H2는 EIIPIFGHTNYNEKFKS (서열 식별 번호:25)의 아미노산 서열을 가지고, CDR_H3은 GGYYYYPRQGFLDY (서열 식별 번호:26)의 아미노산 서열을 가짐.

[0503] 특정 구체예에서, 항-ADAM9 항체 또는 이의 항원 결합 단편 (*예를 들어*, 인간화 항-ADAM9 항체 또는 이의 항원 결합 단편)은 다음의 아미노 서열을 갖는 중쇄 가변 영역 (V_H)

[0504] EVQLVESGGG LVKPGGSLRLSCAASGFTFS **SYWMH**WVRQA PGKGLEWVG**E IIPIFGHTNY NEKFKS**RFTI SLDNSKNTLY LQMGSLRAED TAVYYCAR**GG YYYY***PRQGFL*** **DY**WGQGTTVT VSS (서열 식별 번호:27)

[0505] 및 다음의 아미노산 서열을 갖는 경쇄 가변 영역 (V_L)

[0506] DIVMTQSPDSLAVSLGERATISC**KASQSVDYSGDSYMN**WYQQKPGQPPKLLIY**AASDLES** GIPARFSGSG SGTDFTLTIS SLEPEDFATYYC**QQSHEDPFT**FGQGTKLEI K (서열 식별 번호:28)를 포함한다.

[0507] 특정 구체예에서, 항-ADAM9 항체는 다음의 중쇄 전장 서열

[0508] EVQLVESGGG LVKPGGSLRL SCAASGFTFS **SYWMH**WVRQA PGKGLEWVG**E IIPIFGHTNY NEKFKS**RFTI SLDNSKNTLY LQMGSLRAED TAVYYCAR**GG YYYYPRQGFL DY**WGQGTTVT VSSASTKGPS VFPLAPSSKS TSGGTAALGC LVKDYFPEPV TVSWNSGALT SGVHTFPAVL QSSGLYSLSS VVTVPSSSLG TQTYICNVNH KPSNTKVDKR VEPKSCDKTH TCPPCPAPEL LGGPSVFLFP PKPKDTL**Y**I**T** R**E**PEVTCVVV DVSHEDPEVK FNWYVDGVEV HNAKTKPREE QYNSTYRVVS VLTVLHQDWL NGKEYKCKVS NKALPAPIEK TISKAKGQPR EPQVYTLPPS REEMTKNQVS LTCLVKGFYP SDIAVEWESN GQPENNYKTT PPVLDSDGSF FLYSKLTVDK SRWQQGNVFS CSVMHEALHN HYTQKSL**C**LS PG (서열 식별 번호:29)

[0509] 및 다음의 경쇄 전장 서열

[0510] DIVMTQSPDSLAVSLGERATISC**KASQSVDYSGDSYMN**WYQQKPGQPPKLLIY**AASDLES**GIPARFSGSGSGTDFTLTISSLEPEDFATYYC**QQSHEDPFT**F GQGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQG LSSPVTKSFNRGEC (서열 식별 번호:30)를 갖는다.

[0511] 특정 구체예에서, 세포결합제는 본원에 참조로 포함되는 미국 가출원 번호 62/751,530에 기재된 항-EpCAM 항체 또는 이의 항원 결합 단편이다.

[0512] 특정 구체예에서, 항-EpCAM 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 다음을 포함할 수 있다: a) 세 개의 순차적 상보성 결정 영역 (CDR) CDR_L1, CDR_L2, 및 CDR_L3 각각을 포함하는 적어도 하나의 경쇄 가변 영역 또는 이의 단편, 여기서 CDR_L1은 RSSRSLLHSDGFTYLY (서열 식별 번호:31)의 아미노산 서열을 가지고, CDR_L2는 QTSNLAS (서열 식별 번호:32)의 아미노산 서열을 가지고, CDR_L3은 AQNLELPNT (서열 식별 번호:33)의 아미노산 서열을 가짐; 및 b) 세 개의 순차적 상보성 결정 영역 (CDR) CDR_H1, CDR_H2, 및 CDR_H3 각각을 포함하는 적어도 하나의 중쇄 가변 영역

또는 이의 단편, 여기서 CDR_H1은 NYYIH (서열 식별 번호:34)의 아미노산 서열을 가지고, CDR_H2는 WIYPGNVYIQYNEKFKG (서열 식별 번호:35)의 아미노산 서열을 가지고, CDR_H3은 DGPWFAY (서열 식별 번호:36)의 아미노산 서열을 가짐.

[0513] 특정 구체예에서, 항-EpCAM 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 다음의 아미노 서열을 갖는 중쇄 가변 영역 (V_H)

[0514] QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFT**NYYIH**WVRQAPGQRLEYIG**WIYPGNVYIQYNEKFKG**RATLTADKSASTAYMELSSLRSEDTAVYYCAR**DGPWFAY**WGQGTLVTVSS (서열 식별 번호:37)

[0515] 및 다음의 아미노산 서열을 갖는 경쇄 가변 영역 (V_L)

[0516] DIVLTQTPLSLSVTPGQPASISC**RSSRSLLHSDGFTYLY**WFLQKPGQSPQLLIY**QTSNLAS**GVPDRFSSSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYC**AQNLELPNT**FGQGTKLEIK (서열 식별 번호:38)를 포함한다.

[0517] 특정 구체예에서, 항-EpCAM 항체는 다음의 중쇄 전장 서열

[0518] QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFT**NYYIH**WVRQAPGQRLEYIG**WIYPGNVYIQYNEKFKG**RATLTADKSASTAYMELSSLRSEDTAVYYCAR**DGPWFAY**WGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG (서열 식별 번호:39)

[0519] 및 다음의 경쇄 전장 서열

[0520] DIVLTQTPLSLSVTPGQPASISC**RSSRSLLHSDGFTYLY**WFLQKPGQSPQLLIY**QTSNLAS**GVPDRFSSSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYC**AQNLELPNT**FGQGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (서열 식별 번호:40)을 갖는다.

[0521] 특정 구체예에서, 세포결합제는 항-엽산 수용체 항체이다. 특정 구체예에서, 세포결합제는 모두 본원에 참조로 포함되는 미국 특허 8,709,432, 미국 특허 번호 8,557,966, 및 WO2011106528에 기재된 바와 같은 항-인간 엽산 수용체 1 (FOLR1) 항체 또는 이의 항원 결합 단편이다.

[0522] 특정 구체예에서, 항-FOLR1 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 다음을 포함할 수 있다: a) 세 개의 순차적 상보성 결정 영역 (CDR) CDR_L1, CDR_L2, 및 CDR_L3 각각을 포함하는 적어도 하나의 경쇄 가변 영역 또는 이의 단편, 여기서 CDR_L1은 KASQSVSFAGTSLMH (서열 식별 번호:41)의 아미노산 서열을 가지고, CDR_L2는 RASNLEA (서열 식별 번호:42)의 아미노산 서열을 가지고, CDR_L3은 QQSREYPYT (서열 식별 번호:43)의 아미노산 서열을 가짐; 및 b) 세 개의 순차적 상보성 결정 영역 (CDR) CDR_H1, CDR_H2, 및 CDR_H3 각각을 포함하는 적어도 하나의 중쇄 가변 영역 또는 이의 단편, 여기서 CDR_H1은 GYFMN (서열 식별 번호:44) 또는 GYTFTGYFMN (서열 식별 번호:47)의 아미노산 서열을 가지고, CDR_H2는 RIHPYDGDTFYNQKFQG (서열 식별 번호:45) 또는 RIHPYDGDTF (서열 식별 번호:48)의 아미노산 서열을 가지고, CDR_H3은 YDGSRAMDY (서열 식별 번호:46)의 아미노산 서열을 가짐. 특정 구체예에서, 항-FOLR1 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 a) 서열 식별 번호:41에 제시된 아미노 서열을 갖는 CDR_L1, 서열 식별 번호:42에 제시된 아미노 서열을 갖는 CDR_L2, 및 서열 식별 번호:43에 제시된 아미노 서열을 갖는 CDR_L3을 포함하는 경쇄 가변 영역; 및 b) 서열 식별 번호:44에 제시된 아미노 서열을 갖는 CDR_H1, 서열 식별 번호:45에 제시된 아미노 서열을 갖는 CDR_H2, 및 서열 식별 번호:46에 제시된 아미노 서열을 갖는 CDR_H3을 포함하는 중쇄 가변 영역을 포함한다. 특정 구체예에서, 항-FOLR1 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 a) 서열 식별 번호:41에 제시된 아미노 서열을 갖는 CDR_L1, 서열 식별 번호:42에 제시된 아미노 서열을 갖는 CDR_L2, 및 서열 식별 번호:43에 제시된 아미노 서열을 갖는 CDR_L3을 포함하는 경쇄 가변 영역; 및 b) 서열 식별 번호:47에 제시된 아미노 서열을 갖는 CDR_H1, 서열 식별 번호:48에 제시된 아미노 서열을 갖는 CDR_H2, 및 서열 식별 번호:46에 제시된 아미노 서열을 갖는 CDR_H3을 포함하는 중쇄 가변 영역을 포함한다.

[0523] 특정 구체예에서, 항-FOLR1 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 다음 아미노 서열을 갖는 중쇄 가변 영역 (V_H)

[0524] QVQLVQSGAEVVKPGASVKISCKAS**GYTFTGYFMN**WVKQSPGQSLEWIG**RIHPYDGDTFYNQKFQG**KATLTVDKSSNTAHMELLSLTSEDFAVYYCTR**YDGS RAMDY**WGQGTTVTVSS (서열 식별 번호:49)

[0525] 및 다음의 아미노산 서열을 갖는 경쇄 가변 영역 (V_L)

[0526] DIVLTQSPLSLAVSLGQPAIISC**KASQSVSFAGTSLMH**WYHQKPGQQPRLLIY**RASNLEA**GVPDRFSGSGSKTDFTLNISPVEAEDAATYYC**QQSREYPYT**F GGGTKLEIKR (서열 식별 번호:50), 또는

[0527] DIVLTQSPLSLAVSLGQPAIISC**KASQSVSFAGTSLMH**WYHQKPGQQPRLLIY**RASNLEA**GVPDRFSGSGSKTDFTLTISPVEAEDAATYYC**QQSREYPYT**F GGGTKLEIKR (서열 식별 번호:51)을 포함한다.

[0528] 특정 구체예에서, 항-FOLR1 항체는 다음의 중쇄 전장 서열

[0529] QVQLVQSGAEVVKPGASVKISCKAS**GYTFTGYFMN**WVKQSPGQSLEWIG**RIHPYDGDTFYNQKFQG**KATLTVDKSSNTAHMELLSLTSEDFAVYYCTR**YDGS RAMDY**WGQGTTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVN HKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSV LTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLY SKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (서열 식별 번호:52)

[0530] 및 다음의 경쇄 전장 서열

[0531] DIVLTQSPLSLAVSLGQPAIISC**KASQSVSFAGTSLMH**WYHQKPGQQPRLLIY**RASNLEA**GVPDRFSGSGSKTDFTLNISPVEAEDAATYYC**QQSREYPYT**F GGGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQG LSSPVTKSFNRGEC (서열 식별 번호:53), 또는

[0532] DIVLTQSPLSLAVSLGQPAIISC**KASQSVSFAGTSLMH**WYHQKPGQQPRLLIY**RASNLEA**GVPDRFSGSGSKTDFTLTISPVEAEDAATYYC**QQSREYPYT**F GGGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQG LSSPVTKSFNRGEC (서열 식별 번호:54)를 갖는다.

[0533] 특정 구체예에서, 항-FOLR1 항체는 huMov19 또는 M9346A 항체이다.

[0534] 특정 구체예에서, 본원에 기재된 항체는 뮤린, 비인간 포유동물, 키메라, 인간화, 또는 인간 항체이다. 예를 들어, 인간화 항체는 CDR-이식 항체 또는 재표면화된 항체일 수 있다. 특정 구체예에서, 항체는 전장 항체이다. 특정 구체예에서, 이의 항원 결합 단편은 Fab, Fab', $F(ab')_2$, F_d, 단일 사슬 Fv 또는 scFv, 디설파이드 연결된 F_v, V-NAR 도메인, IgNar, 인트라바디, $IgG\Delta CH_2$, 미니바디, $F(ab')_3$, 테트라바디, 트리아바디, 디아바디, 단일-도메인 항체, DVD-Ig, Fcab, mAb_2, $(scFv)_2$, 또는 scFv-Fc이다.

[0535] 특정 구체예에서, 세포결합제는 대체 단백질 스캐폴드, 예컨대 센티린 (피브로넥틴 타입 III (FN3) 반복의 공통 서열에 기초한 단백질 스캐폴드; 본원에 참조로 포함되는 미국 특허 공개 2010/0255056, 2010/0216708 및 2011/0274623 참조), 안키린 반복 단백질 (*예를 들어*, DARPin으로도 알려진 설계된 안키린 반복 단백질; 본원에 참조로 포함되는 미국 특허 공개 번호 2004/0132028, 2009/0082274, 2011/0118146, 및 2011/0224100 참조, 및 또한 본원에 참조로 포함되는 C. Zahnd *et al.*, *Cancer Res.* (2010) 70:1595-1605; Zahnd *et al.*, *J. Biol. Chem.* (2006) 281(46):35167-35175; 및 Binz, H.K., Amstutz, P. & Pluckthun, A., *Nature Biotechnology* (2005) 23:1257-1268 참조), 안키린 유사 반복 단백질 또는 합성 펩타이드 (*예를 들어*, 본원에 참조로 포함된 미국 특허 공개 번호 2007/0238667; 미국 특허 번호 7,101,675; WO 2007/147213; 및 WO 2007/062466 참조), 아드넥틴 (피브로넥틴 도메인 스캐폴드 단백질; 본원에 참조로 포함된 미국 특허 공개 번호 2007/0082365; 2008/0139791 참조), 아비바디 (디아바디, 트리아바디, 및 테트라바디 포함; 미국 공개 번호 2008/0152586 및 2012/0171115 참조), 이중 수용체 재표적화 (DART) 분자 (P.A. Moore *et al.*, *Blood*, 2011; 117(17):4542-4551; Veri MC, *et al.*, *Arthritis Rheum*, 2010 Mar 30; 62(7):1933-43; Johnson S, *et al. J Mol Biol,* 2010 Apr 9;399(3):436-49), 및 세포 투과 초하전 단백질 (*Methods in Enzymol.* 502, 293-319 (2012)이다.

[0536] 세포결합제-약물 접합체의 생성

[0537] 본 발명의 세포독성 화합물 또는 이의 유도체를 세포결합제에 연결하기 위해, 세포독성 화합물은 반응성 기가 결합된 연결 모이어티를 포함할 수 있다. 이들 화합물은 세포결합제에 직접 연결될 수 있다. 반응성 기가 결합된 세포독성 화합물을 세포결합제와 연결하여 세포결합제-세포독성제 접합체를 생성하는 대표적인 과정이 실시예 32-36에 설명된다.

[0538] 일부 구체예에서, 이작용성 가교 시약은 먼저 세포독성 화합물과 반응하여 하나의 반응성 기가 결합된 연결 모이어티를 보유하는 화합물(즉, 약물-링커 화합물)을 제공할 수 있고, 이는 이후 세포결합제와 반응할 수 있다. 대안적으로, 이작용성 가교 시약의 한 말단은 먼저 세포결합제와 반응하여 연결 모이어티 및 결합된 하나의 반응성 기를 보유하는 세포결합제를 제공할 수 있고, 이는 이후 세포독성 화합물과 반응할 수 있다. 연결 모이어티는 특정 부위에서 세포독성 모이어티의 방출을 허용하는 화학 결합을 포함할 수 있다. 적합한 화학 결합은 당업계에 공지이고 디설파이드 결합, 티오에테르 결합, 산 불안정 결합, 광불안정 결합, 펩티데이스 불안정 결합 및 에스테레이스 불안정 결합을 포함한다 (예를 들어 미국 특허 5,208,020; 5,475,092; 6,441,163; 6,716,821; 6,913,748; 7,276,497; 7,276,499; 7,368,565; 7,388,026 및 7,414,073 참조). 디설파이드 결합, 티오에테르 및 펩티데이스 불안정 결합이 바람직하다. 본 발명에서 사용될 수 있는 다른 링커는 절단 불가능 링커, 예컨대 미국 공개 번호 2005/0169933에 상세히 설명된 것, 또는 하전된 링커 또는 친수성 링커를 포함하고 US 2009/0274713, US 2010/01293140 및 WO 2009/134976에 기재되며, 이들 각각은 본원에 참고로 명백하게 포함된다.

[0539] 일부 구체예에서, 수성 버퍼 중의 세포결합제(*예를 들어,* 항체)의 용액은 디티오피리딜 기를 도입하기 위해 몰 과량의 이작용성 가교제, 예컨대 *N*-석신이미딜-4-(2-피리딜디티오)펜타노에이트 (SPP), *N*-석신이미딜-4-(2-피리딜디티오)부타노에이트 (SPDB), *N*-석신이미딜-4-(2-피리딜디티오)2-설포 부타노에이트 (설포-SPDB)와 함께 인큐베이션될 수 있다. 이후 변형된 세포결합제(*예를 들어*, 변형된 항체)는 본원에 기재된 티올-포함 세포독성 화합물과 반응하여, 본 발명의 디설파이드-연결된 세포결합제-세포독성제 접합체를 생성한다.

[0540] 또 다른 구체예에서, 본원에 기재된 티올-포함 세포독성 화합물은 *N*-석신이미딜-4-(2-피리딜디티오)펜타노에이트 (SPP), *N*-석신이미딜-4-(2-피리딜디티오)부타노에이트 (SPDB), *N*-석신이미딜-4-(2-피리딜디티오)2-설포 부타노에이트 (설포-SPDB)와 같은 이작용성 가교제와 반응하여 세포독성제-링커 화합물을 형성할 수 있고, 이는 이후 세포결합제와 반응하여 디설파이드-연결된 세포결합제-세포독성제 본 발명의 접합체를 생성할 수 있다. 세포독성제-링커 화합물은 세포결합제와 반응하기 전에 정제 없이 원위치에서 제조될 수 있다. 대안적으로, 세포독성제-링커 화합물은 세포결합제와 반응하기 전에 정제될 수 있다.

[0541] 세포결합제-세포독성제 접합체는 모두 본원에 참조로 포함되는 미국 특허 번호 7,811,572 및 미국 공개 번호 2006/0182750에 설명된 것과 같은 당업계에 공지된 임의의 정제 방법을 사용하여 정제될 수 있다. 예를 들어, 세포결합제-세포독성제 접합체는 접선 유동 여과, 흡착 크로마토그래피, 흡착 여과, 선택적 침전, 비흡착 여과 또는 이들의 조합을 사용하여 정제될 수 있다. 바람직하게는, 접선 유동 여과(TFF, 교차 유동 여과, 한외여과 및 정용여과로도 알려짐) 및/또는 흡착 크로마토그래피 수지가 접합체의 정제에 사용된다.

[0542] 항체 분자당 결합된 세포독성 분자의 수는 280 nm 및 330 nm에서의 흡광도의 비를 측정하여 분광광도법으로 결정될 수 있다. 일부 구체예에서, 평균 1-10 개의 세포독성 화합물/항체 분자(들)는 본원에 기재된 방법에 의해 연결될 수 있다. 일부 구체예에서, 항체 분자당 연결된 세포독성 화합물의 평균 수(DAR)는 2-5, 보다 구체적으로 2.5-4.0이다. 일부 구체예에서, 본 발명의 접합체를 포함하는 조성물(*예를 들어*, 약제학적 조성물)은 2 내지 8, 2 내지 5, 보다 구체적으로 2.5 내지 4.0의 DAR 값을 갖는다.

[0543] 일부 구체예에서, 항체가 시스테인 티올 기를 통해 세포독성제에 연결되는 경우, 접합체는 항체 분자당 1 내지 4 개의 세포독성 화합물을 갖는다. 일부 구체예에서, 접합체는 항체 분자당 1 또는 2 개의 세포독성 화합물을 갖는다. 일부 구체예에서, 접합체는 항체 분자당 2 개의 세포독성 화합물을 갖는다. 일부 구체예에서, 항체 분자당 연결된 세포독성 화합물의 평균 수(DAR)는 1.5 내지 2.5, 보다 구체적으로 1.8-2.2이다. 일부 구체예에서, 본 발명의 접합체를 포함하는 조성물(*예를 들어*, 약제학적 조성물)은 1.0 내지 2.5, 1.5 내지 2.5, 보다 구체적으로 1.8 내지 2.2 또는 1.9 내지 2.1의 DAR 값을 갖는다.

[0544] 대표적인 본 발명의 세포결합제-약물 접합체 제조 방법은 8,765,740 및 미국 출원 공개 번호 2012/0238731에 설명된다. 이들 참고문헌의 전체 교시내용은 본원에 참조로 포함된다.

[0545] *조성물 및 사용 방법*

[0546] 본 발명은 본원에 기재된 세포독성 화합물, 이의 유도체, 또는 이의 접합체, (및/또는 이의 용매화물, 수화물 및/또는 염) 및 담체(약제학적으로 허용되는 담체)를 포함하는 조성물(*예를 들어*, 약제학적 조성물)을 포함한다.

[0547] 본원에 기재된 약제학적 조성물은 국소 또는 전신 치료를 위해 많은 수의 방식으로 투여될 수 있다. 투여는 경피 패치, 연고, 로션, 크림, 젤, 점적제, 좌약, 스프레이, 액체 및 분말과 같은 국소 (질 및 직장 전달을 포함

하는 점막에 대한 것); 폐 (*예를 들어*, 분말 또는 에어로졸의 흡입 또는 통기에 의해, 네뷸라이저에 의한 것 포함; 기관내, 비강내, 표피 및 경피); 경구; 또는 정맥내, 동맥내, 피하, 복강내 또는 근육내 주사 또는 주입을 포함하는 비경구; 또는 두개내 (*예를 들어*, 척수강내 또는 뇌실내) 투여일 수 있다. 일부 특정 구체예에서, 투여는 정맥내이다. 본원에 기재된 약제학적 조성물은 또한 *시험관내* 또는 *생체외* 사용될 수 있다.

[0548] 본 발명의 조성물은 포유동물(*예를 들어*, 인간)의 비정상 세포 성장 억제 또는 증식성 장애 치료에 유용하다.

[0549] 본 발명은 포유동물에게 치료적 유효량의 본원에 기재된 세포독성 화합물, 이의 유도체, 또는 이의 접합체, (및/또는 이의 용매화물 및 염) 또는 이의 조성물을 투여하는 것을 포함하는, 포유동물(*예를 들어*, 인간)의 비정상 세포 성장 억제 또는 증식성 장애, 자가면역 장애, 파괴성 골 장애, 감염성 질환, 바이러스성 질환, 섬유성 질환, 신경퇴행성 장애, 췌장염 또는 신장 질환 치료 방법을 포함한다.

[0550] 특정 구체예에서, 포유동물의 증식성 장애는 혈액암, 백혈병, 또는 림프종을 비롯함 암이다. 특정 구체예에서, 증식성 장애는 림프 기관의 암, 또는 혈액 악성종양이다.

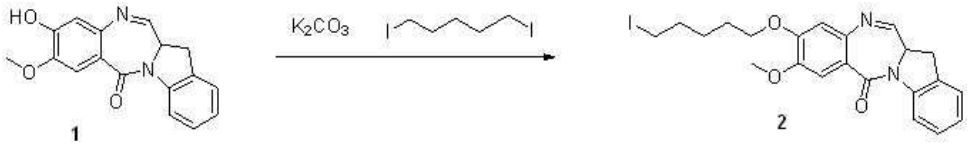
[0551] 예를 들어, 암은: 급성 골수성 백혈병 (AML, CD33-저 AML, P-당단백질 양성 AML, 재발성 AML, 또는 불응성 AML 포함), CML의 아세포 발증 및 CML과 관련된 Abelson 종양유전자 (Bcr-ABL 전위)를 포함하는 만성 골수성 백혈병 (CML), 골수이형성 증후군 (MDS), 급성 B 림프모구성 백혈병 또는 B-세포 급성 림프모구성 백혈병 (B-ALL)을 포함하지만 이에 제한되지 않는 급성 림프모구성 백혈병 (ALL), 리히터 증후군 또는 CLL의 리히터 전환을 포함하는 만성 림프구성 백혈병 (CLL), 모세포 백혈병 (HCL), 급성 전골수구성 백혈병 (APL), B-세포 만성 림프증식성 질환 (B-CLPD), 비정형 만성 림프구성 백혈병 (바람직하게는 현저한 CD11c 발현이 있음), 미만성 거대 B-세포 림프종 (DLBCL), 아세포 형질세포양 수지상 세포 신생물 (BPDCN), 외투 세포 백혈병 (MCL), 및 소림프구성 림프종 (SLL)을 포함하는 비호지킨 림프종 (NHL), 호지킨 림프종, 전신 비만세포증, 및 버킷 림프종으로 이루어진 군으로부터 선택될 수 있다.

[0552] 특정 구체예에서, 암은 폐암 (예를 들어, 비소세포 폐암), 결장직장암, 방광암, 위암, 췌장암, 신장 세포 암종, 전립선암, 식도암, 유방암, 두경부암, 자궁암, 난소암, 간암, 자궁경부암, 갑상선암, 고환암, 골수암, 흑색종, 및 림프구암으로 이루어진 군으로부터 선택될 수 있다. 특정 구체예에서, 암은 비소세포 폐암, 결장직장암, 위암, 유방암 (*예를 들어*, 삼중 음성 유방암 (TNBC)) 또는 췌장암이다. 추가 구체예에서, 본 발명의 면역접합체는 비소세포 폐암 (편평 세포, 비편평 세포, 선암종, 또는 대세포 미분화 암종), 결장직장암 (선암종, 위장관 카르시노이드 종양, 위장관 기질 종양, 원발성 결장직장 림프종, 평활근육종, 또는 편평 세포 암종) 또는 유방암 (*예를 들어*, 삼중 음성 유방암 (TNBC))의 치료에 유용할 수 있다.

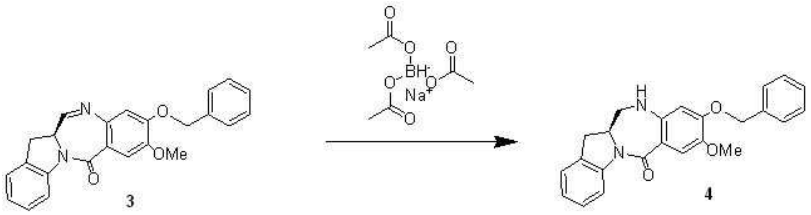
[0553] 적합한 약제학적으로 허용되는 담체, 희석제 및 부형제는 잘 알려져 있고 임상 상황이 보증하는 대로 당업자에 의해 결정될 수 있다. 적합한 담체, 희석제 및/또는 부형제의 예는: (1) 약 1 mg/mL 내지 25 mg/mL 인간 혈청 알부민을 포함하거나 포함하지 않는 둘베코 인산염 완충 식염수, pH 약 7.4, (2) 0.9% 식염수 (0.9% w/v NaCl), 및 (3) 5% (w/v) 덱스트로스를 포함하고; 트립타민과 같은 항산화제 및 Tween 20과 같은 안정화제를 또한 포함할 수 있다.

[0554] 예시

[0555] **실시예 1. 화합물 18 및 화합물 19의 합성**

[0556] 

[0557] 화합물 1 (1g, 3.40 mmol)을 디메틸포름아미드 (22.65 ml)에 용해시켰다. 1,5-디아이오도펜탄 (3.66 ml, 23.78 mmol) 및 포타슘 카르보네이트 (1.174 g, 8.49 mmol)를 첨가했다. 반응물을 빛으로부터 보호하고 실온에서 밤새 교반했다. 반응물을 메틸렌 클로라이드로 희석하고 수성 암모늄 클로라이드를 염수로 세척했다. 유기층을 무수 소듐 설페이트로 건조시키고, 여과하고 진공에서 농축시켰다. 미정제 물질을 에틸 아세테이트/디클로로메탄에서 실리카 겔 크로마토그래피에 의해 정제하여 화합물 2 (1.05g, y=63%)를 수득했다 MS (m/z): 491.1 $(M + 1)^+$. UPLC =4.93 분 (10 분 방법).

[0558] 

[0559] (S)-9-(벤질옥시)-8-메톡시-12a,13-디하이드로-6H-벤조[5,6][1,4]디아제피노[1,2-a]인돌-6-온 (4.3 g, 11.19 mmol)을 무수 1,2-디클로로에탄 (102 ml)에 질소하에 용해시키고 소듐 트리아세톡시보로하이드라이드 (7.11 g, 33.6 mmol)를 첨가했다. 반응물을 실온에서 4 시간 동안 교반했다. 혼합물을 0℃로 냉각시키고 포화 암모늄 클로라이드로 퀀칭한 다음 디클로로메탄으로 추출했다. 조합된 유기물을 염수로 세척하고, 무수 마그네슘 설페이트로 건조시키고, 여과하고 농축시켰다. 100% 수율을 가정하여 미정제 화합물 4를 추가의 정제 없이 진행시켰다. MS (m/z): 387.2 $(M + 1)^+$. UPLC = 1.65 분 (2.5 분 방법).

[0560] (UPLC 2.5분 방법) 분석적 BEH 페닐 HPLC 방법:

[0561] 컬럼: Acquity UPLC BEH- C18 2.1 x 50 mm, 1.7 μm 입자 크기,

[0562] P/N 186002350, SN 02743604615173

[0563] 유량: 0.8 mL/분

[0564] 온도: 주위

[0565] 이동상 A: 탈이온수 + 0.1% 포름산

[0566] 이동상 B: 아세토니트릴

[0567] 구배: 시간 %B

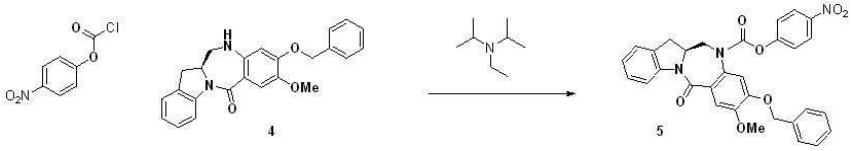
[0568] 0 5

[0569] 1.8 98

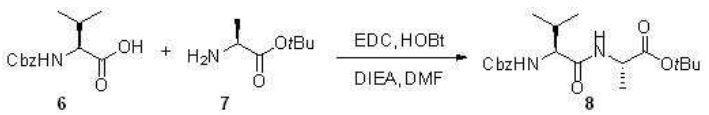
[0570] 2 98

[0571] 2.1 5

[0572] 2.5 5

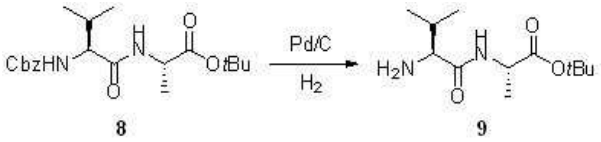
[0573] 

[0574] 화합물 4 (4.32 g, 11.19 mmol)의 용액에 실온에서 휘니히 염기 (2.339 ml, 13.43 mmol)를 첨가하고 이어서 디클로로메탄 중의 4-니트로페닐 카르보노클로리데이트 (2.58 g, 12.31 mmol)의 용액을 첨가했다. 4 시간 후 반응물을 물로 퀀칭하고, 층을 분리했다. 유기층을 물, 포화 소듐 비카르보네이트, 및 염수로 세척했다. 이를 마그네슘 설페이트로 건조시키고, 여과하고 스트리핑했다. 미정제 고체를 에틸 아세테이트/헥산에서 실리카 겔 크로마토그래피에 의해 정제하여 화합물 5를 옅은 황색의 솜털 같은 고체 (4.4g, y=71%)로 수득했디 MS (m/z): 552.5 $(M + 1)^+$. UPLC =1.87 분 (2.5 분 방법).

[0575] 

[0576] 화합물 6 (3.0 g, 11.94 mmol) 및 화합물 7 (1.907 g, 13.13 mmol)을 디메틸포름아미드 (23.88 mL)에 용해시켰다. EDC○HCl (2.52 g, 13.13 mmol) 및 HOBt (2.011 g, 13.13 mmol)를 반응 혼합물에 첨가하고, 이어서 DIEA (4.59 mL, 26.3 mmol)를 첨가했다. 반응물을 실온에서 밤새 Ar하에 교반했다. 반응 혼합물을 디클로로메탄으로

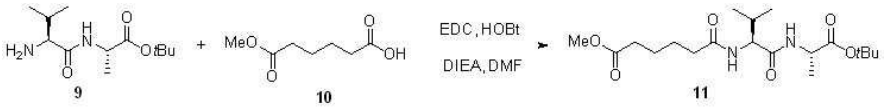
희석하고 포화 소듐 비카르보네이트, 포화 암모늄 클로라이드, 물 및 염수로 세척했다. 유기층을 소듐 설페이트로 건조시키고, 여과하고, 농축시켰다. 미정제 잔류물을 실리카 겔 플래시 크로마토그래피 (에틸 아세테이트/헥산)에 의해 정제하여 화합물 8을 백색 고체 (3.68 g, 81% 수율)로 수득했다. ^{1}H NMR (400 MHz, $CDCl_3$): δ 7.39-7.29 (m, 5H), 6.29 (bd, 1H, *J* = 6.9 Hz), 5.34 (bd, 1H, *J* = 8.4 Hz), 5.11 (s, 2H), 4.45 (p, 1H, *J* = 7.2 Hz), 4.02-3.98 (m, 1H), 2.18-2.09 (m, 1H), 1.56 (s, 9H), 1.37 (d, 3H, *J* = 7.0 Hz), 0.98 (d, 3H, *J* = 6.8 Hz), 0.93 (d, 3H, *J* = 6.8 Hz). LCMS = 5.571 분 (8 분 방법). 관찰된 질량 (ESI$^+$): 323.25 (M-*t*Bu+H).



8 9

[0577]

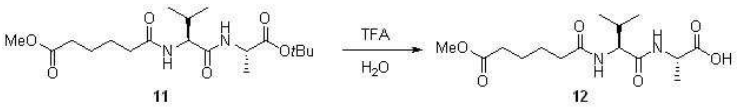
[0578] 화합물 8 (3.68 g, 9.72 mmol)을 메탄올 (30.9 mL) 및 물 (1.543 mL)에 용해시켰다. 용액을 Ar으로 퍼지하고 5 분 동안 탈기시켰다. Pd/C (10%, 습윤, 0.517 g)를 반응 혼합물에 천천히 첨가했다. 이후 H_2를 1 분 동안 버블링시켰다. 버블링을 중단하고 이후 반응물을 H_2 풍선하에 밤새 교반했다. 반응 혼합물을 셀라이트를 통해 여과하고 필터 케이크를 메탄올 (30 mL)로 세척하고 농축시켜 화합물 9를 백색 고체 (2.35 g, 99% 수율)로 수득했다. ^{1}H NMR (400 MHz, $CDCl_3$): δ 7.79-7.77 (m, 1H), 4.50 (p, 1H, *J* = 7.3 Hz), 3.27 (d, 1H, *J* = 3.9 Hz), 2.34-2.26 (m, 1H), 1.49 (s, 9H), 1.40 (d, 3H, *J* = 7.1 Hz), 1.01 (d, 3H, *J* = 7.0 Hz), 0.86 (d, 3H, *J* = 6.9 Hz).



9 10 11

[0579]

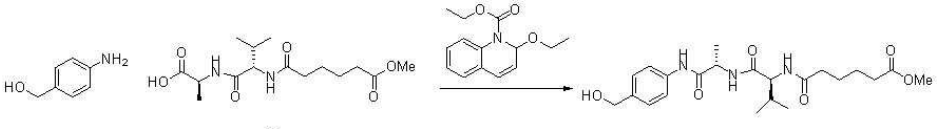
[0580] 화합물 9 (2.35 g, 9.62 mmol) 및 모노메틸아디페이트 (1.69 g, 10.58 mmol)를 디메틸포름아미드 (32.1 mL)에 용해시켰다. EDC○HCl (1.94 g, 10.10 mmol) 및 HOBt (1.47 g, 9.62 mmol)를 반응 혼합물에 첨가하고, 이어서 DIEA (3.36 mL, 19.24 mmol)를 첨가했다. 반응물을 실온에서 밤새 교반했다. 반응 혼합물을 디클로로메탄/메탄올 (20 mL, 5:1)로 희석하고 포화 암모늄 클로라이드, 포화 소듐 비카르보네이트, 물 및 염수로 세척했다. 유기층을 소듐 설페이트로 건조시키고, 여과하고, 농축시켰다. 미정제 생성물을 실리카 겔 플래시 크로마토그래피 (에틸 아세테이트/헥산, 구배, 0% 내지 50%)에 의해 정제하여 화합물 11을 백색 고체 (2.77 g, 75% 수율)로 수득했다. ^{1}H NMR (400 MHz, $CDCl_3$): δ 6.29 (d, 1H, *J* = 7.2 Hz), 6.12 (d, 1H, *J* = 8.6 Hz), 4.43(p, 1H, *J* = 7.2 Hz), 4.27 (dd, 1H, *J* = 6.4, 8.6 Hz), 3.66 (s, 3H), 2.35-2.31 (m, 2H), 2.26-2.23 (m, 2H), 2.12-2.03 (m, 1H), 1.70-1.63 (m, 4H), 1.46 (s, 9H), 1.36 (d, 3H, *J* = 7.1 Hz), 0.95 (겉보기 t, 6H, *J* = 6.6 Hz).



11 12

[0581]

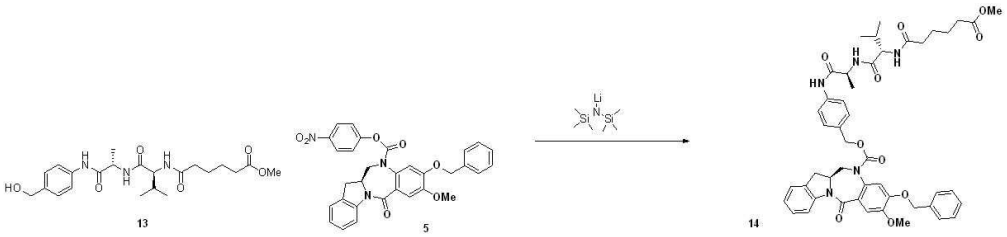
[0582] TFA (8.28 mL, 108.0 mmol) 및 물 (0.56 mL)을 순수한 화합물 11 (2.77 g, 7.17 mmol)에 첨가하고 실온에서 2.5 시간 동안 교반했다. 아세토니트릴 (30 mL)을 반응 혼합물에 첨가하고 농축시켰다. 이를 2 회 더 반복하여 화합물 12를 옅은 황색 고체 (2.0 g, 84% 수율)로 수득했다. ^{1}H NMR (400 MHz, $CDCl_3$): δ 8.11 (bs, 1H), 7.29 (d, 1H, *J* = 8.9 Hz), 7.14 (d, 1H, 6.8 Hz), 4.58 (p, 1H, *J* = 7.1 Hz), 4.37 (t, 1H, *J* = 8.7 Hz), 3.68 (s, 3H), 2.37-2.32 (m, 4H), 2.03-1.99 (m, 2H), 1.69-1.63 (m, 4H), 1.49 (d, 3H, *J* = 7.2 Hz), 0.97 (d, 3H, *J* = 4.8 Hz), 0.96 (d, 3H, *J* = 4.8 Hz).



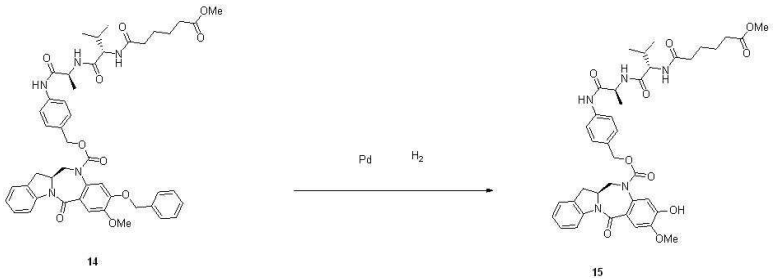
12 13

[0583]

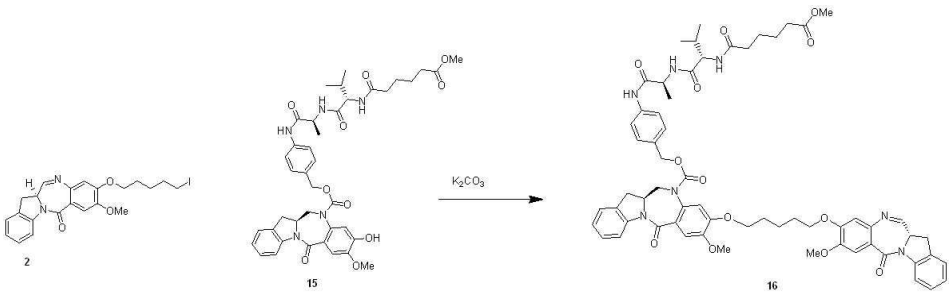
[0584] (6-메톡시-6-옥소헥사노일)-L-발릴-L-알라닌 (4.93 g, 14.92 mmol)을 무수 디클로로메탄 (49.7 ml) 및 무수 메탄올 (24.87 ml)에 현탁시켰다. EEDQ (6.64 g, 26.9 mmol) 및 이후 (4-아미노페닐)메탄올 (2.205 g, 17.91 mmol)을 첨가하고 반응물을 밤새 실온에서 교반했다. 반응 혼합물을 농축시키고 디클로로메탄과 함께 공증발시켰다. 미정제 물질을 디클로로메탄 /메탄올에서 실리카 겔 크로마토그래피에 의해 정제하여 화합물 13 (2.04g, y=31%)을 수득했다 MS (m/z): 434.3 $(M - 1)^-$. UPLC =1.23 분 (2.5 분 방법).

[0585] 

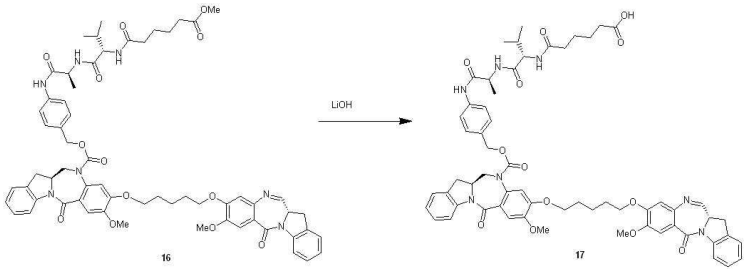
[0586] 무수 THF (3501 μl) 및 무수 디메틸아세트아미드 (7001 μl) 중의 화합물 13 (805 mg, 1.848 mmol)의 용액에 리튬 비스(트리메틸실릴)아미드 (THF 중의 1M) (1848 μl, 1.848 mmol)를 0C에서 첨가했다. 반응물을 15 분 동안 교반한 후 THF (3501 μl) 중의 화합물 5 (850 mg, 1.540 mmol)를 첨가했다. 반응 혼합물을 0 C에서 교반하고 실온으로 밤새 가온되도록 했다. 반응물을 0 C에서 포화 암모늄 클로라이드로 퀀칭하여 침전물을 형성시켰다. 용액을 디클로로메탄으로 추출했다. 조합된 유기물을 물 (2x)로 세척했다. 유기물을 마그네슘 설페이트로 건조시키고, 여과하고 농축시켰다. 이를 실리카 겔 크로마토그래피 (디클로로메탄 /메탄올)에 의해 정제하여 화합물 14 (430mg, y=33%)를 수득했다. MS (m/z): 848.7 $(M + 1)^+$. UPLC =1.74 분 (2.5 분 방법).

[0587] 

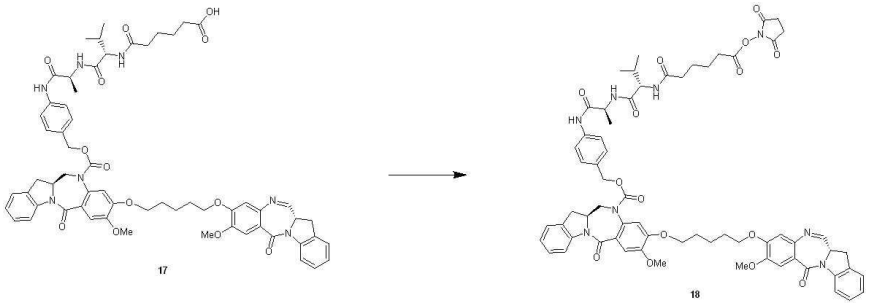
[0588] 아르곤으로 탈기된 무수 메탄올 (6.40 ml) 중의 화합물 14 (0.38 g, 0.448 mmol)의 용액에 탄소 담지 팔라듐 10 % (0.048 g)를 첨가했다. 용액을 다시 탈기시킨 다음 수소 분위기하에 실온에서 교반하고 완료될 때까지 UPLC에 의해 모니터링했다. 1 시간 및 30 분 후 반응 혼합물을 셀라이트를 통해 여과하고, 디클로로메탄/메탄올로 헹구었다. 미정제 고체를 디클로로메탄/메탄올에서 실리카 겔 크로마토그래피에 의해 정제하고 순수한 분획을 수집하여 화합물 15 (263mg, y=77%)를 수득했다. MS (m/z): 758.6 $(M + 1)^+$. UPLC =1.52 분 (2.5 분 방법).

[0589] 

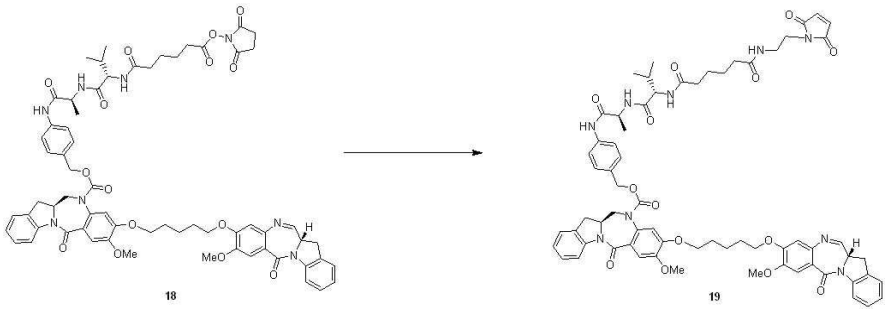
[0590] 화합물 15 (414mg, 0.0546 mmol) 및 화합물 2 (321 mg, 0.656 mmol)를 무수 디메틸아세트아미드 (5463 μl)에 용해시켰다. 포타슘 카르보네이트 (151 mg, 1.093 mmol)를 첨가하고 반응물을 밤새 실온에서 질소하에 교반했다. 반응물을 물로 침전시키고, 오 분 동안 교반하고 여과했다. 생성된 고체를 20% 메탄올/디클로로메탄에 용해시키고, 분별 깔대기로 옮기고, 물로 세척하고, 무수 마그네슘 설페이트로 건조시키고 진공에서 농축시키고 디클로로메탄/메탄올에서 실리카 겔 크로마토그래피를 통해 정제했다. 순수한 분획의 증발이 화합물 16 (329 mg, y= 54%)을 제공했다. MS (m/z): 1121.3 $(M + 1)^+$. UPLC =1.88 분 (2.5 분 방법).

[0591] 

[0592] 화합물 16 (0.329g, 0.294 mmol)을 무수 테트라하이드로퓨란 (11.01 ml) 및 탈이온수 (3.67 ml)에 용해시켰다. 리튬 하이드록사이드 (0.021 g, 0.881 mmol)를 첨가하고 반응을 원하는 생성물로 완전히 전환될 때까지 UPLC에 의해 모니터링했다. 1 시간 30 분 동안 실온에서 교반한 후 이를 30% 메탄올/디클로로메탄 및 탈이온수로 희석한 다음, 0.5 M HCl을 사용하여 pH~3로 천천히 산성화시켰다. 산성화된 수성층을 30% 메탄올/디클로로메탄으로 두 번 추출했다. 조합된 유기물을 물로 pH=5까지 세척하고, 마그네슘 설페이트로 건조시키고, 셀라이트에서 여과하고, 농축시키고 디클로로메탄과 함께 공증발시켜 화합물 17을 황색 고체로 수득했고 이를 추가의 정제 없이 사용했다. (290 mg, y= 89%). MS (m/z): 1107.2 $(M + 1)^+$. UPLC =1.78 분 (2.5 분 방법).

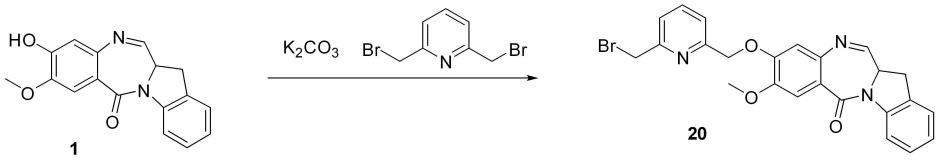
[0593] 

[0594] 화합물 17 (0.29g, 0.262 mmol)을 무수 디클로로메탄 (6.55 ml)에 현탁시켰다. N-하이드록시 석신이미드 (0.091 g, 0.786 mmol) 및 EDC.HCl (0.251 g, 1.311 mmol)을 첨가하고 출발 물질이 가용성이 되었다. 반응물을 실온에서 1 시간 동안 교반하고 완료했다. 반응물을 디클로로메탄으로 희석하고 물로 세척했다. 유기물을 마그네슘 설페이트로 건조시키고, 여과하고 스트리핑하여 310 mg 미정제 물질을 수득했고 이를 RP-HPLC (C18 Kromasil, 탈이온수/아세토니트릴)에 의해 정제했다. 원하는 물질을 함유하는 분획을 동결시키고 동결건조시켜 순수한 최종 화합물 18 (140mgs, y=56%* 정제된 양의 회수율을 기준으로 함)을 수득했다. MS (m/z): 1204.4 $(M + 1)^+$. UPLC =1.86 분 (2.5 분 방법).

[0595] 

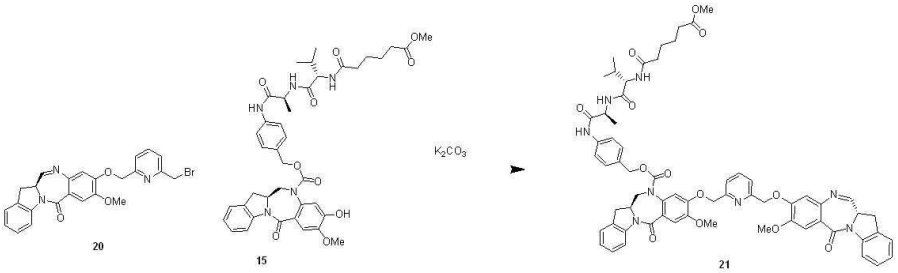
[0596] 화합물 18 (96.6 mg, 0.080 mmol)을 무수 디클로로메탄 (3211 μl)에 용해시켰다. 1-(2-아미노에틸)-1H-피롤-2,5-디온 하이드로클로라이드 (18.29 mg, 0.096 mmol)를 첨가하고 이어서 무수 DIPEA (28.0 μl, 0.161 mmol)를 첨가했다. 반응물을 UPLC에 의해 모니터링하고 1 시간 30 분 후 건조 농축시켰다. 미정제 고체를 아세토니트릴/탈이온수 및 몇 방울의 포름산에 재용해시키고 RP-HPLC (C18 Kromasil, 탈이온수/아세토니트릴)에 의해 정제했다. 원하는 물질을 함유하는 분획을 동결시키고 동결건조시켜 순수한 최종 화합물 19 (54 mgs, y=55%)를 수득했다. MS (m/z): 1229.4 $(M + 1)^+$. UPLC =1.78 분 (2.5 분 방법).

[0597] **실시예 2. 화합물 23의 합성**



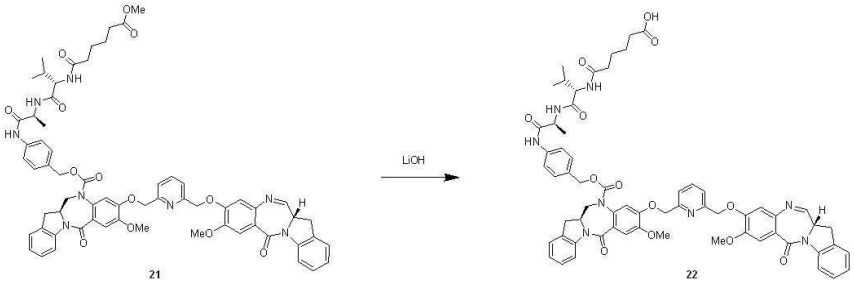
[0598]

[0599] 화합물 1 (0.173g, 0.588 mmol)을 디메틸포름아미드 (3.92 ml)에 용해시키고 2,6-비스(브로모메틸)피리딘 (1.090 g, 4.11 mmol) 및 포타슘 카르보네이트 (0.203 g, 1.470 mmol)를 첨가했다. 반응물을 화합물 1이 소모되는 4 시간 30 분 동안 교반했다. 반응물을 에틸 아세테이트로 희석하고 포화 암모늄 클로라이드, 물, 및 염수로 세척했다. 미정제 물질을 디클로로메탄에 용해시키고 실리카 겔 크로마토그래피 (디클로로메탄/에틸 아세테이트)에 의해 정제했다. 순수한 분획을 조합하여 화합물 20 (193 mgs, y= 68%)을 수득했다. MS (m/z): 478.3 $(M + 1)^+$. UPLC =1.6 분 (2.5 분 방법).



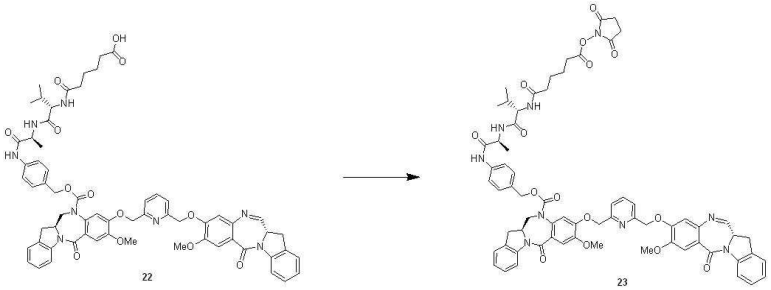
[0600]

[0601] 화합물 15 (86 mg, 0.113mmol) 및 화합물 20 (65.1 mg, 0.136 mmol)을 무수 디메틸아세트아미드 (1135 μl)에 용해시켰다. 포타슘 카르보네이트 (31.4 mg, 0.227 mmol)를 첨가하고 반응물을 밤새 실온에서 교반했다. 반응물을 물로 침전시키고, 5 분 동안 교반하고 여과했다. 생성된 고체를 20% 메탄올/디클로로메탄에 용해시키고, 분별 깔대기로 옮기고, 물로 세척하고, 무수 마그네슘 설페이트로 건조시키고 농축시켰다. 미정제 물질을 실리카 겔 컬럼 크로마토그래피 (디클로로메탄/메탄올)를 통해 정제하여 화합물 21 (96 mg, y=73%)을 수득했다. MS (m/z): 1156.2 $(M + 1)^+$. UPLC =1.84 (2.5 분 방법).



[0602]

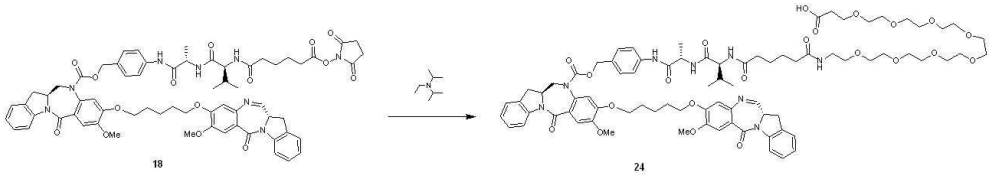
[0603] 화합물 22를 화합물 17과 유사하게 제조했다. 미정제 물질을 추가의 정제 없이 사용하여 (94 mg, y=99%)을 수득했다. MS (m/z): 1142.2 $(M + 1)^+$. UPLC =1.76 (2.5 분 방법).



[0604]

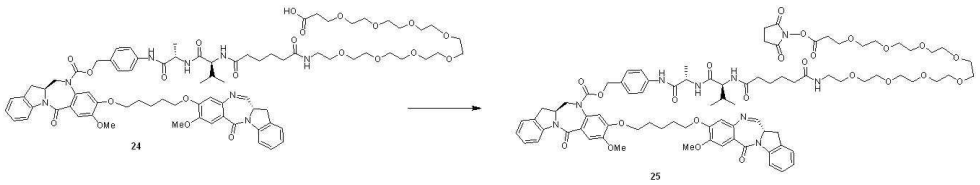
[0605] 화합물 23을 화합물 18과 유사하게 제조했다. 미정제 물질을 RPHPLC (C18 컬럼, 아세토니트릴/물)를 통해 정제하여 최종 화합물 23 (41 mg, y=40%)을 수득했다. MS (m/z): 1239.3 $(M + 1)^+$. UPLC =1.82 분 (2.5 분 방법).

[0606] **실시예 3. 화합물 25 및 26의 합성**



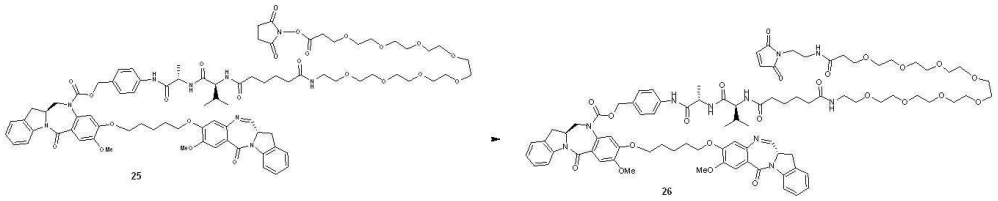
[0607]

[0608] 화합물 18 (49mg, 0.041 mmol)을 무수 디클로로메탄 (1629 μl)에 용해시켰다. 1-아미노-3,6,9,12,15,18,21,24-옥타옥사헵타코산-27-오산 (19.78 mg, 0.045 mmol) 및 DIPEA (10.64 μl, 0.061 mmol)를 실온에서 첨가했다. 반응물을 1 시간 30 분 동안 교반한 다음 건조 농축시켰다. 미정제 잔류물을 디클로로메탄/메탄올에서 실리카 겔 크로마토그래피에 의해 정제했다. 순수한 분획을 수집하고 디클로로메탄과 함께 공증발시켜 화합물 24를 솜털 같은 백색 고체 (39 mg, y=63%)로 수득했다. UPLC =1.60 분 (2.5 분 방법).



[0609]

[0610] 화합물 25를 화합물 18과 유사하게 제조했다. 미정제 물질을 다음 반응에서 직접 사용하거나 RPHPLC (C18 컬럼, 아세토니트릴/물)를 통해 정제하여 최종 순수 화합물 25 (10 mg, y=49%)를 수득했다. MS (m/z): 1627.2 $(M + 1)^+$. UPLC =1.66 분 (2.5 분 방법).



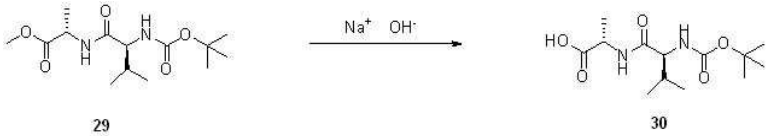
[0611]

[0612] 화합물 26을 화합물 19와 유사하게 제조했다. 미정제 물질을 RPHPLC (C18 컬럼, 아세토니트릴/물)를 통해 정제하여 최종 순수 화합물 26 (12 mg, y=48%)을 수득했다. MS (m/z): 1652.2 $(M + 1)^+$. UPLC =1.60 분 (2.5 분 방법).

[0613] **실시예 4. 화합물 36 및 화합물 37의 합성**

[0614]

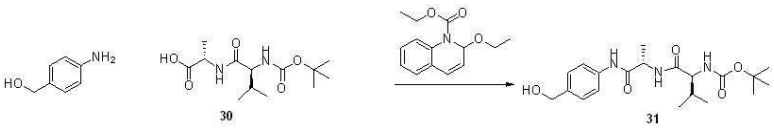
[0615] (tert-부톡시카르보닐)-L-발린 (10.58 g, 48.7 mmol)을 디클로로메탄 (97 ml)에 용해시켰다. CDI (9.48 g, 58.4 mmol)를 실온에서 일부분씩 첨가했다. 혼합물을 실온에서 아르곤하에 2.5 시간 동안 교반하고 반응물이 황색이 되었다. 메틸 L-알라니네이트 하이드로클로라이드 (7.00 g, 50.2 mmol)를 첨가하고 혼합물이 옅은 황색이 되었다. 이를 아르곤하에 밤새 계속 교반했다. 혼합물을 디클로로메탄으로 희석하고, 1 M 수성 HCl (x2), 포화 수성 소듐 비카르보네이트, 및 염수로 세척했다. 유기물을 무수 마그네슘 설페이트로 건조시키고, 여과하고 농축시켜 화합물 29를 백색 고체로 수득했고 이를 추가의 정제 없이 미정제로 사용했다 (12.85g, y=87%).



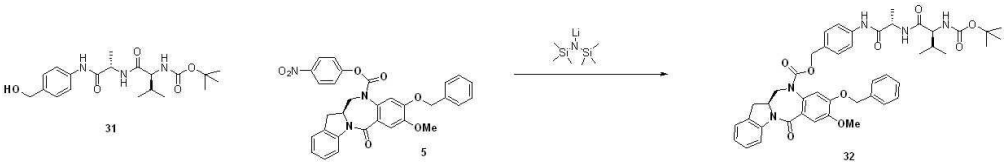
[0616]

[0617] 화합물 29 (12.85 g, 42.5 mmol)를 메탄올 (42.5 ml)에 용해시키고 0C로 냉각시켰다. 1 M 소듐 하이드록사이드 (47.8 ml, 47.8 mmol)를 반응에 첨가하고 반응물을 브로모크레졸 그린 염색을 사용하여 TLC에 의해 모니터링했다. 2.5 시간 후 물을 첨가하여 흐릿한 용액을 투명하게 했다. 이후 빙조에서 침전물이 형성되도록 하면서 용액

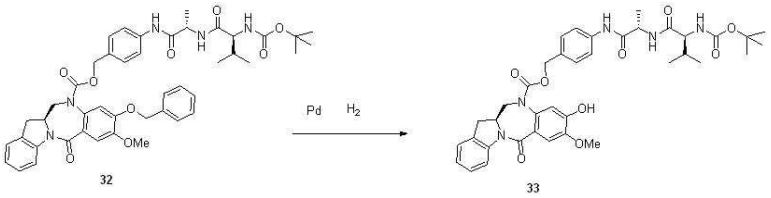
을 1M HCl을 사용하여 pH~3-4로 산성화시켰다. 이를 빙조로부터 제거하고 에틸 아세테이트로 세 번 추출하고, 염수로 세척하고, 소듐 설페이트로 건조시키고, 여과하고 스트리핑하여 백색의 끈적한 고체를 수득했다. 미정제 물질을 고진공에 두고 추가의 정제 없이 사용하여 화합물 30 (12.05g, y=98%)을 수득했다.

[0618] 

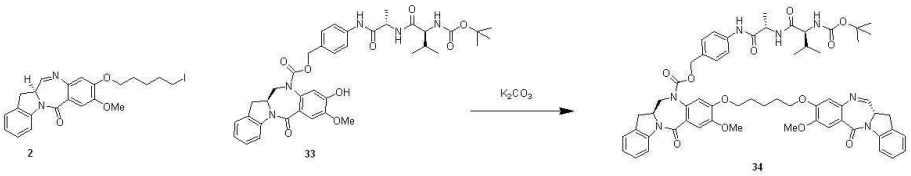
[0619] 화합물 30 (12.05 g, 41.8 mmol)을 무수 디클로로메탄(139 ml) 및 메탄올 (69.7 ml)에 현탁시켰다. EEDQ (18.60 g, 75 mmol) 및 이후 (4-아미노페닐)메탄올 (6.18 g, 50.1 mmol)을 첨가하고 반응물을 밤새 아르곤하에 실온에서 교반했다. 반응 혼합물을 농축시키고 디클로로메탄과 함께 공증발시켰다. 고체를 에틸 아세테이트로 트리터레이션한 다음 실리카 겔 크로마토그래피 (디클로로메탄/메탄올)에 의해 정제하여 화합물 31 (5.45g, y=33%)을 수득했다.

[0620] 

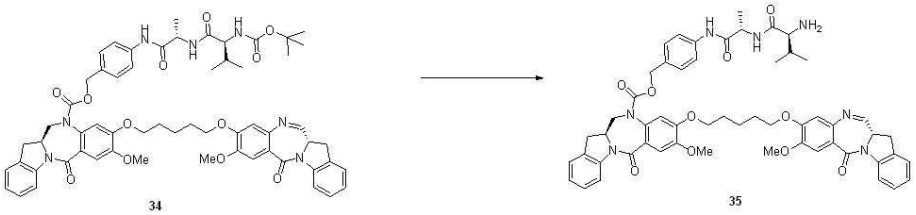
[0621] 화합물 31 및 화합물 5를 화합물 14의 형성과 유사하게 반응시켰다. 물질을 실리카 겔 크로마토그래피 (디클로로메탄/메탄올)에 의해 정제하여 화합물 32 (507mg, y=54%)를 수득했다. MS (m/z): 806.5 $(M + 1)^+$ 및 804.5 $(M - 1)^-$. UPLC =1.86 분 (2.5 분 방법).

[0622] 

[0623] 화합물 33을 화합물 15와 유사하게 제조했다. 미정제 물질을 실리카 겔 크로마토그래피에 의해 정제하여 (213 mg, y=47%)를 수득했다. MS (m/z): 716.6 $(M + 1)^+$ 및 714.5 $(M - 1)^-$. UPLC =1.61 분 (2.5 분 방법).

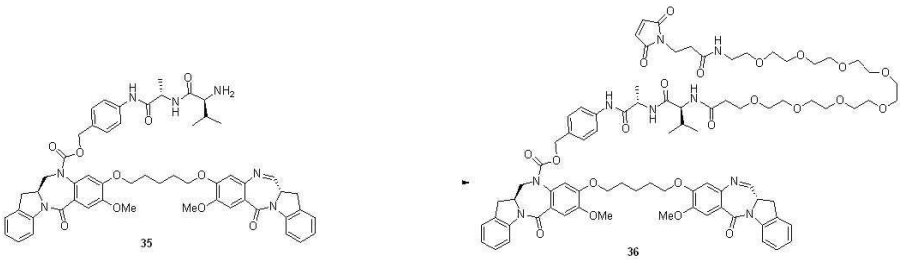
[0624] 

[0625] 화합물 2 및 화합물 33를 화합물 16의 제조에서와 유사하게 반응시켰다. 미정제 물질을 실리카 겔 크로마토그래피 (디클로로메탄/메탄올)에 의해 정제하여 화합물 34 (140mg, y=94%)를 수득했다. MS (m/z): 1078.7 $(M + 1)^+$. UPLC =1.84 분 (2.5 분 방법).

[0626] 

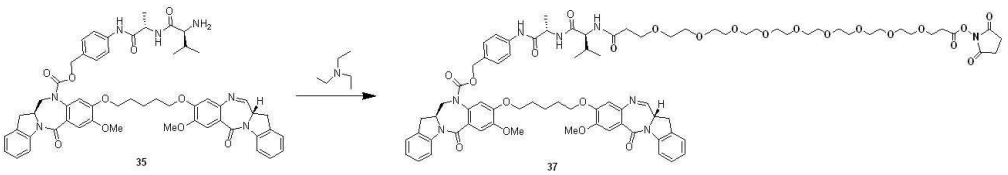
[0627] 화합물 34 (70mg, 0.065 mmol)를 무수 디클로로메탄 (600 μl)에 용해시키고 빙조에서 0C로 냉각시켰다. 무수 디클로로메탄 (600 μl) 및 TFA (601 μl)의 새로 혼합된 용액을 첨가하고 용액이 밝은 황색이 되었다. 반응물을 UPLC에 의해 모니터링하고 출발 물질이 완전히 소모될 때까지 아르곤하에 0C에서 50 분 동안 교반했다. 이를 디클로로메탄으로 희석하고 얼음/포화 소듐 비카르보네이트 용액에 부었다. 분리된 유기물을 염수로 세척하고,

마그네슘 설페이트로 건조시키고, 여과하고 스트리핑하여 화합물 35 (55 mg, y=87%)을 옅은 황색 고체로 수득했고 이를 추가의 정제 없이 직접 사용했다. MS (m/z): 978.7 $(M + 1)^+$. UPLC =1.44 분 (2.5 분 방법).



[0628]

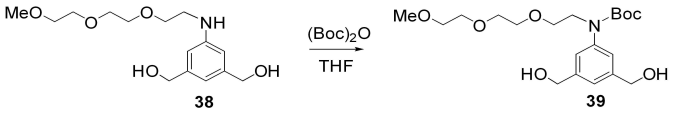
[0629] 화합물 35 (55mg, 0.056 mmol) 및 1-(2,5-디옥소-2,5-디하이드로-1H-피롤-1-일)-3-옥소-7,10,13,16,19,22,25,28-옥타옥사-4-아자헨트리아콘탄-31-오산 (33.3 mg, 0.056 mmol)을 무수 디클로로메탄 (3514 μl)에 용해시켰다. EDC (10.78 mg, 0.056 mmol)를 첨가하고 반응물을 세 번 탈기시키고 실온에서 아르곤하에 교반했다. 이를 UPLC에 의해 모니터링하고 1 시간 후 반응물을 디클로로메탄으로 희석하고 물 및 염수로 세척했다. 유기물을 마그네슘 설페이트로 건조시키고, 여과하고 스트리핑하여 65mg 미정제물을 수득했다. 미정제 물질을 RPHPLC (C18 컬럼, 아세토니트릴/물)를 통해 정제하여 최종 순수 화합물 36 (48 mg, y=55%)을 수득했다. MS (m/z): 1553.7 $(M + 1)^+$. UPLC =1.63 분 (2.5 분 방법).



[0630]

[0631] 비스(2,5-디옥소피롤리딘-1-일) 4,7,10,13,16,19,22,25,28-노나옥사헨트리아콘탄디오네이트 (34.8 mg, 0.049 mmol)를 무수 디메틸포름아미드 (981 μl)에 용해시키고 화합물 35 (48 mg, 0.049 mmol)에 직접 첨가했다. 트리에틸아민 (10.26 μl, 0.074 mmol)을 첨가한 다음 반응물을 탈기시키고 실온에서 아르곤하에 교반했다. 추가 40 μl의 트리에틸아민을 첨가하고 반응물을 35C로 2.5 시간 동안 가열한 다음 실온에서 밤새 교반했다. 반응물을 물 및 디클로로메탄으로 희석했다. 수성물은 모든 원하는 생성물을 포함했다. 분리된 수성물에 아세토니트릴을 첨가하고, 동결 및 동결건조시켰다. 미정제 동결건조된 물질을 디메틸아세트아미드에 용해시키고 RPHPLC (물/아세토니트릴)를 통해 정제했다. 순수한 분획을 동결시키고 동결건조시켜 화합물 37 (8 mg, y=10%)을 수득했다. MS (m/z): 1572.4 $(M + 1)^+$. UPLC =1.70 분 (2.5 분 방법).

[0632] **실시예 5. 화합물 46 및 화합물 47의 합성**

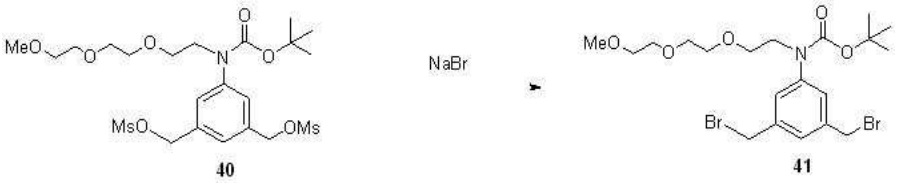


[0633]

[0634] 무수 테트라하이드로퓨란 (4.0 mL) 중의 아닐린 38 (339 mg, 1.1 mmol)의 교반되는 용액에 Boc 무수물 (272 mg, 1.2 mmol)을 첨가했다. 혼합물을 실온에서 3 일 동안 계속 교반했다. 반응 혼합물을 감압하에 농축시키고 잔류물을 실리카 겔 크로마토그래피 (디클로로메탄/메탄올)에 의해 정제하여 화합물 39 (405 mg, y = 90%)를 무색 오일로 수득했다. ^{1}H NMR (400 Hz, $CDCl_3$): δ 7.00 (s, 2H), 6.97 (s, 1H), 4.38 (s, 4H), 4.12 (s, 2h), 3.64 (t, J = 5.6 Hz, 2H), 3.48-3.44 (m, 8H), 3.40-3.38 (m, 2H), 3.21 (s, 3H), 1.31 (s, 9H); ^{13}C NMR (400 Hz, $CDCl_3$): δ 154.65, 142.3, 142.1, 124.1, 122.7, 80.2, 71.6, 70.3, 70.1, 69.9, 68.5, 63.9, 58.65, 49.4, 28.1.

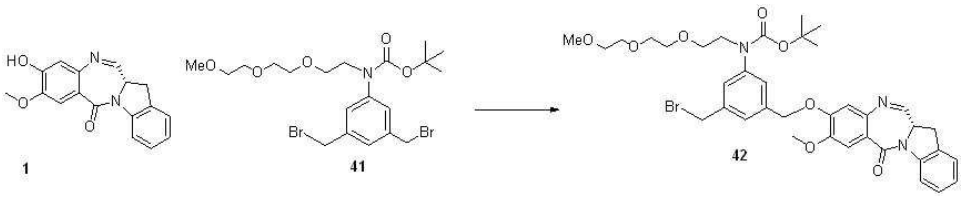
[0635]

[0636] 화합물 39 (3 g, 7.51 mmol)를 무수 디클로로메탄 (75 ml)에 용해시키고 아세톤/드라이 아이스 조에서 -5 ℃로 냉각시켰다. 트리에틸아민 (5.23 ml, 37.5 mmol)을 첨가하고 이어서 메탄설폰산 무수물 (3.27 g, 18.77 mmol)을 첨가하고 생성된 혼합물을 -5 ℃에서 두 시간 동안 교반했다. 반응물을 차가운 에틸 아세테이트로 희석하고 빙수로 두 번 세척했다. 여과액을 무수 마그네슘 설페이트로 건조시키고, 여과하고 진공에서 농축시켜 화합물 40 (3.58 g, y=86 % 수율)을 수득했다. 미정제 물질을 고진공에 둔 다음 추가의 정제 없이 직접 사용했다. MS (m/z): 556.2 $(M + 1)^+$. UPLC =1.48 분 (2.5 분 방법).



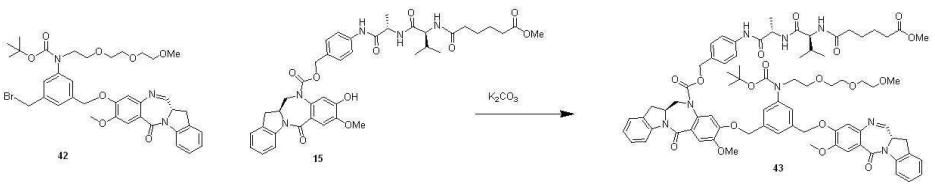
[0637]

[0638] 화합물 40 (3.58g, 6.44 mmol)을 디메틸포름아미드 (32.2 ml)에 용해시켰다. 소듐 브로마이드 (3.31 g, 32.2 mmol)를 첨가하고 반응물을 실온에서 밤새 교반하여 UPLC에 의해 하나의 새로운 피크를 얻었다. 반응 혼합물을 물로 희석하고 에틸 아세테이트로 추출했다. 유기물을 물로 세척하고 무수 마그네슘 설페이트로 건조시키고, 여과하고 스트리핑하여 화합물 41 (3.01g, y=89%)를 수득했고 이를 추가의 정제 없이 진행시켰다. UPLC =1.79 분 (2.5 분 방법).



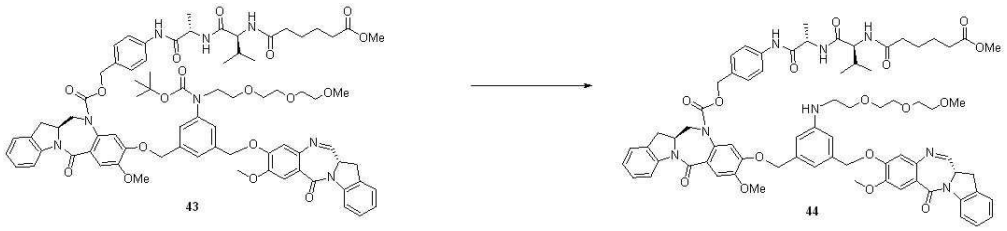
[0639]

[0640] 화합물 1 (0.241 g, 0.819 mmol) 및 화합물 41 (3.01g, 5.73 mmol)을 디메틸포름아미드 (5.46 ml)에 용해시켰다. 포타슘 카르보네이트 (0.283 g, 2.047 mmol)를 첨가하고 반응물을 화합물 1이 완전히 소모될 때까지 실온에서 2.5 시간 동안 교반했다. 반응물을 에틸 아세테이트로 희석하고 포화 암모늄 클로라이드, 물, 및 염수로 세척했다. 미정제 물질을 디클로로메탄에 용해시키고 실리카 겔 크로마토그래피 (디클로로메탄/에틸 아세테이트)에 의해 정제했다. 순수한 단일결합된 물질을 수집하여 화합물 42 (322 mg, y=53%)를 수득했다. MS (m/z): 738.3 $(M + 1)^+$. UPLC =1.80 분 (2.5 분 방법).



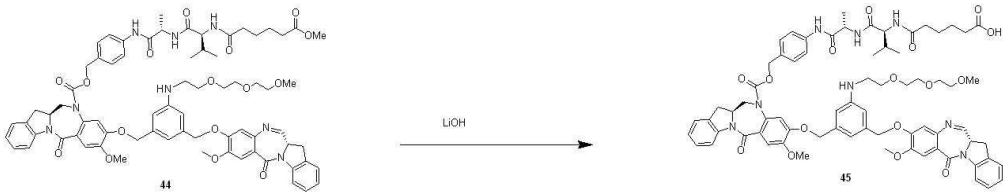
[0641]

[0642] 화합물 42 (94mg, 0.127 mmol) 및 화합물 15 (88 mg, 0.116 mmol)를 무수 디메틸아세트아미드 (1157 μl)에 용해시켰다. 포타슘 카르보네이트 (32.0 mg, 0.231 mmol)를 첨가하고 반응물을 밤새 실온에서 교반했다. 반응물을 물로 침전시키고, 5 분 동안 교반하고 여과했다. 생성된 고체를 소량의 메탄올이 있는 디클로로메탄에 용해시키고 무수 마그네슘 설페이트로 건조시키고, 여과하고, 진공에서 농축시켰다. 미정제 물질을 실리카 겔 컬럼 (디클로로메탄/메탄올)을 통해 정제하여 화합물 43을 솜털 같은 고체 (110 mg, y=67%)로 수득했다. MS (m/z): 1416.2 $(M + 1)^+$. UPLC =1.84 분 (2.5 분 방법).



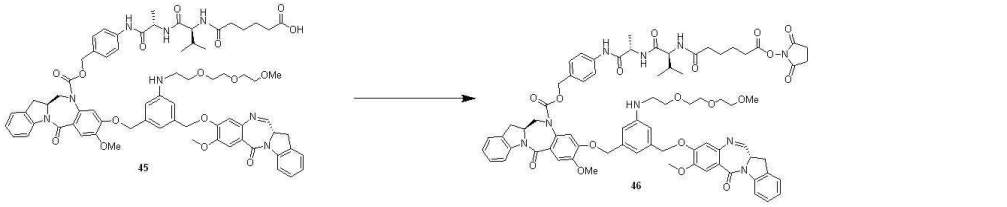
[0643]

[0644] 화합물 43 (110mg, 0.078 mmol)을 무수 디클로로메탄 (700 μl)에 용해시키고 빙조에서 0C로 냉각시켰다. 무수 디클로로메탄 (700 μl) 및 TFA (719 μl)의 새로 혼합된 용액을 첨가했다. 반응물을 0C에서 45 분 동안 교반했다. 반응물을 디클로로메탄으로 희석하고, 얼음/포화 소듐 비카르보네이트 용액에 부은 다음, 분리된 유기물을 염수로 세척하고, 마그네슘 설페이트로 건조시키고, 여과하고 스트리핑했다. 미정제물을 디클로로메탄/메탄올에서 실리카 겔 크로마토그래피에 의해 정제하여 화합물 44 (84mg, y=82%)를 수득했다. MS (m/z): 1316.2 $(M+1)^+$. UPLC =1.72 분 (2.5 분 방법).



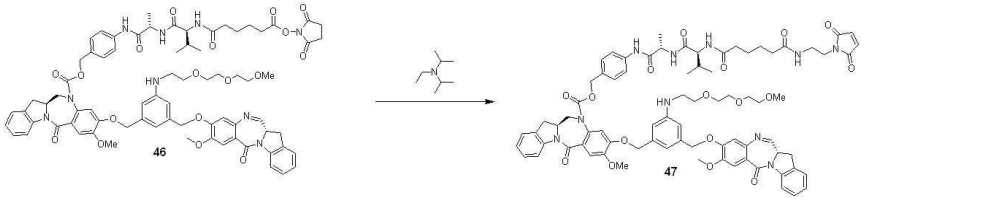
[0645]

[0646] 화합물 44 (84mg, 0.064 mmol)를 무수 테트라하이드로퓨란 (2395 μl) 및 탈이온수 (798 μl)에 용해시켰다. 리튬 하이드록사이드 (4.59 mg, 0.192 mmol)를 첨가하고 반응물을 실온에서 1 시간 동안 교반했다. 이를 30% 메탄올/디클로로메탄 및 탈이온수로 희석한 다음, 0.5 M HCl을 사용하여 pH~3로 천천히 산성화시켰다. 수성물을 30% 메탄올/디클로로메탄으로 두 번 더 추출했다. 조합된 유기물을 물을 사용하여 pH=5까지 세척하고, 마그네슘 설페이트로 건조시키고, 셀라이트로 여과하고, 농축시키고 무수 디클로로메탄과 함께 공증발시켜 89 mg 미정제 화합물 45를 수득했다. 다음 반응 질량을 100%로 가정한다. MS (m/z): 1302.4 $(M+1)^+$. UPLC = 1.64 분 (2.5 분 방법).



[0647]

[0648] 화합물 45 (83mg, 0.064 mmol)를 무수 디클로로메탄 (1594 μl)에 용해시켰다. N-하이드록시 석신이미드 (22.02 mg, 0.191 mmol) 및 EDC.HCl (61.1 mg, 0.319 mmol)을 첨가하고 반응물을 아르곤하에 50 분 동안 교반했다. 이를 디클로로메탄으로 희석하고 물로 세척했다. 유기물을 마그네슘 설페이트로 건조시키고, 여과하고 스트리핑했다. 미정제 고체를 다음 반응에서 직접 사용하거나 RP-HPLC (C18 Kromasil, 아세토니트릴/탈이온수)에 의해 정제했다. 순수한 분획을 동결시키고 동결건조시켜 화합물 46 (51 mg, y= 57%)을 수득했다. MS (m/z): 1399.3 $(M+1)^+$. UPLC=1.70 분 (2.5 분 방법).

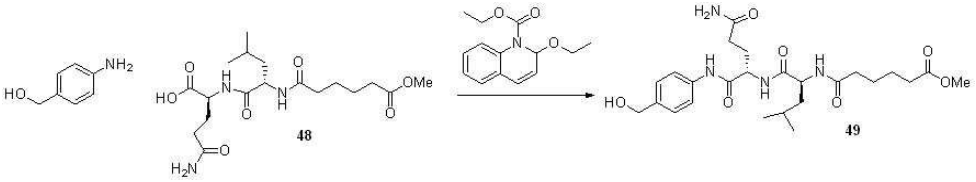


[0649]

[0650] 화합물 46 (53.7 mg, 0.038 mmol)을 무수 디클로로메탄 (1536 μl)에 용해시켰다. 1-(2-아미노에틸)-1H-피롤-2,5-디온 하이드로클로라이드 (8.02 mg, 0.042 mmol)를 첨가하고 이어서 무수 N-에틸-N-이소프로필프로판-2-아민 (13.38 μl, 0.077 mmol)을 첨가했다. 반응물을 UPLC에 의해 모니터링하고 1.5 시간 후 건조 농축시켰다. 미정제 고체를 아세토니트릴/탈이온수/테트라하이드로퓨란 및 몇 방울의 포름산에 용해시키고 RP-HPLC (C18, 물/

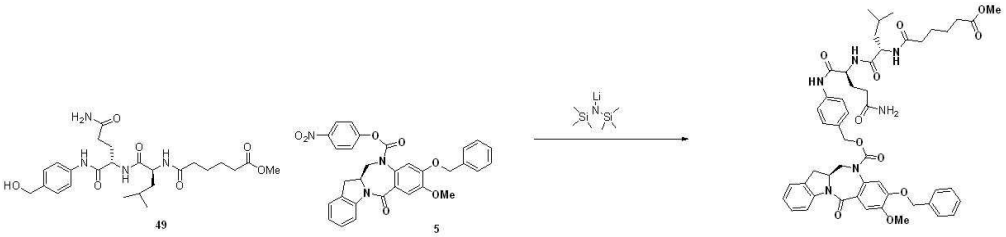
아세토니트릴)에 의해 정제했다. 순수한 분획을 조합하고 동결시키고 동결건조시켜 순수한 화합물 47 (20.4mg, 37%)을 수득했다. MS (m/z): 1424.7 $(M + 1)^+$. UPLC=1.65 분 (2.5 분 방법).

[0651] **실시예 6. 화합물 55 및 화합물 56의 합성**



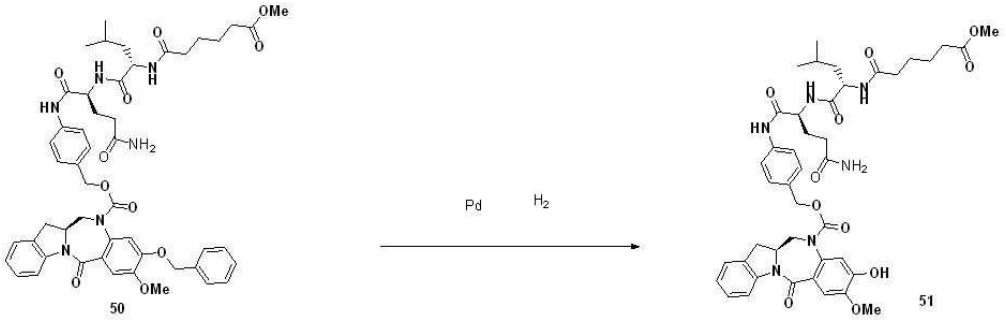
[0652]

[0653] 무수 디클로로메탄 (9.19 ml) 및 무수 메탄올 (4.59 ml) 중의 (6-메톡시-6-옥소헥사노일)-L-류실-L-글루타민 (0.83 g, 2.067 mmol) 및 (4-아미노페닐)메탄올 (0.306 g, 2.481 mmol)의 용액(밝은 황색 용액)에 EEDQ (1.023 g, 4.13 mmol)를 첨가하고 반응 혼합물을 18 시간 동안 주위 온도에서 질소하에 교반했다. 반응 혼합물을 농축시키고 생성된 잔류물을 에틸 아세테이트로 트리터레이션했다. 회백색 고체를 여과하고, 에틸 아세테이트로 세척하고 건조시켜 메틸 6-(((S)-1-(((S)-5-아미노-1-((4-(하이드록시메틸)페닐)아미노)-1,5-디옥소펜탄-2-일)아미노)-4-메틸-1-옥소펜탄-2-일)아미노)-6-옥소헥사노에이트 (0.5g, y = 48%)를 백색 고체로 수득했다. MS (m/z): 508.05 $(M + 1)^+$. LC = 3.72 분



[0654]

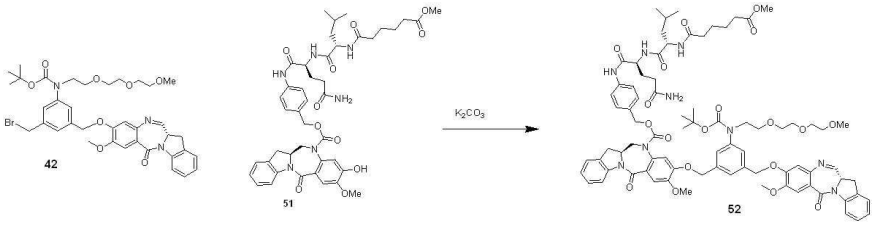
[0655] 무수 테트라하이드로퓨란 (1.68 ml) 및 무수 N,N-디메틸아세트아미드 (3.36 ml) 중의 메틸 6-(((S)-1-(((S)-5-아미노-1-((4-(하이드록시메틸)페닐)아미노)-1,5-디옥소펜탄-2-일)아미노)-4-메틸-1-옥소펜탄-2-일)아미노)-6-옥소헥사노에이트 (450 mg, 0.888 mmol)의 용액에 0 ℃에서 리튬 비스(트리메틸실릴)아미드 (테트라하이드로퓨란 중의 1M, 0.888 ml, 0.888 mmol)를 첨가했다. 투명한 황색 반응물을 15 분 동안 교반한 다음 무수 테트라하이드로퓨란 (1.68 ml) 중의 화합물 5 (408 mg, 0.740 mmol)를 첨가했다. 반응 혼합물을 0 ℃에서 교반하고 18 시간에 걸쳐 실온으로 가온되도록 했다. 혼합물을 0 ℃에서 포화 수성 암모늄 클로라이드 용액으로 퀀칭하고 디클로로메탄 (3 x 50mL)으로 추출했다. 조합된 유기층 물 (2x 50mL)로 세척한 다음 무수 마그네슘 설페이트로 건조시키고, 여과하고 농축시켰다. 미정제 물질을 ISCO (24g 실리카 컬럼, 메탄올/디클로로메탄)에 의해 정제하여 화합물 50 (95mg, 14% 수율)을 백색 고체로 수득했다. MS (m/z): 919.8 $(M + 1)^+$. UPLC = 5.54 분 (10 분 방법).



[0656]

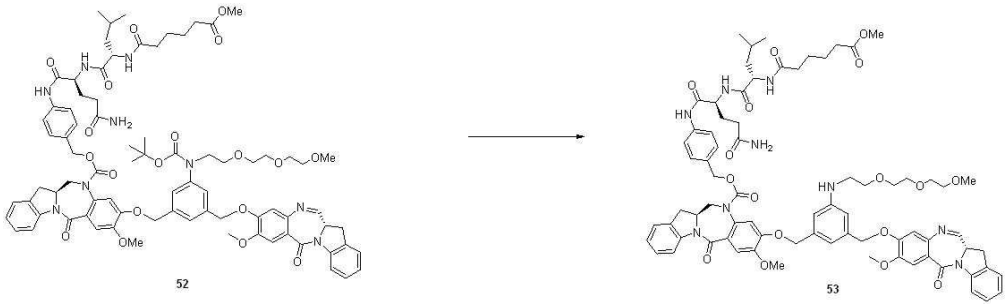
[0657] 무수 메탄올 (1.5 ml) 중의 4-((S)-5-아미노-2-((S)-2-(6-메톡시-6-옥소헥산아미도)-4-메틸펜탄아미도)-5-옥소펜탄아미도)벤질 (S)-9-(벤질옥시)-8-메톡시-6-옥소-12a,13-디하이드로-6H-벤조[5,6][1,4]디아제피노[1,2-a]인돌-11(12H)-카르복실레이트 (91 mg, 0.099 mmol)의 용액을 탈기시키고 탄소 담지 팔라듐 10 % (10.54 mg, 0.099 mmol)을 첨가했다. 혼합물을 수소 풍선하에 (1 atm) 실온에서 네 시간 동안 교반하고 그 후 이를 셀라이트를 통해 여과하고, 메탄올로 헹구었다. 여과액을 증발시켜 DP (83mg, 100%)를 백색 고체로 수득했다. MS

(m/z): 829.6 (M + 1)$^{+}$ 827.5 (M - 1)$^{-}$ UPLC = 4.25 분 (10 분 방법).



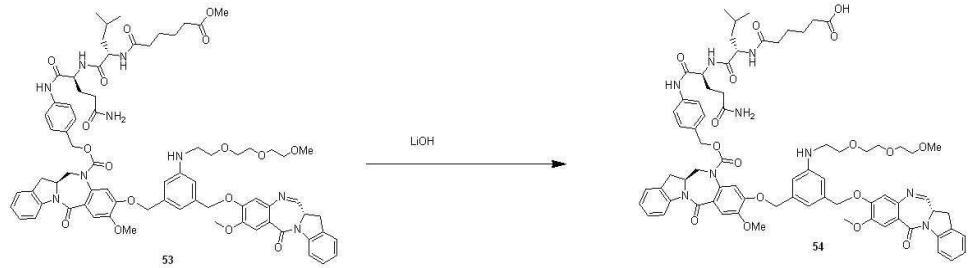
[0658]

[0659] 화합물 42 (215 mg, 0.291 mmol) 및 화합물 51 (201mg, 0.242 mmol)을 무수 디메틸아세트아미드 (2425 μl)에 용해시켰다. 포타슘 카르보네이트 (67.0 mg, 0.485 mmol)를 첨가하고 반응물을 밤새 실온에서 교반했다. 반응물을 물로 침전시키고, 5 분 동안 교반하고 여과했다. 생성된 황색 고체를 디클로로메탄 / 5% 메탄올에 용해시키고 물로 세척했다. 유기물을 무수 마그네슘 설페이트로 건조시키고, 여과하고 스트리핑했다. 물질을 실리카 겔 크로마토그래피 (디클로로메탄/메탄올)에 의해 정제하여 원하는 생성물, 화합물 52 (323mg, y =64%)를 수득했다. MS (m/z): 1487.6 (M + 1)$^{+}$. UPLC = 1.77 분 (2.5 분 방법).



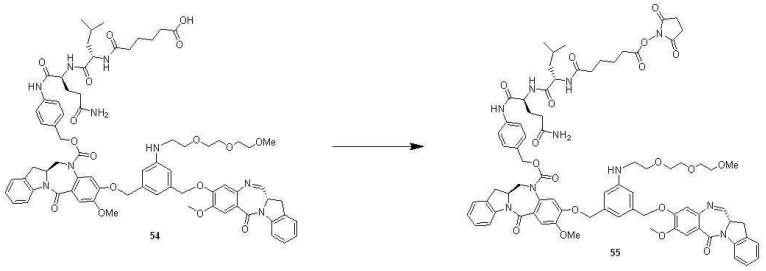
[0660]

[0661] 화합물 53을 화합물 44와 유사하게 제조했다. 미정제 생성물을 실리카 겔 크로마토그래피 (디클로로메탄/메탄올)에 의해 정제했다. MS (m/z): 1387.7 (M + 1)$^{+}$. UPLC =1.8 (2.5 분 방법).



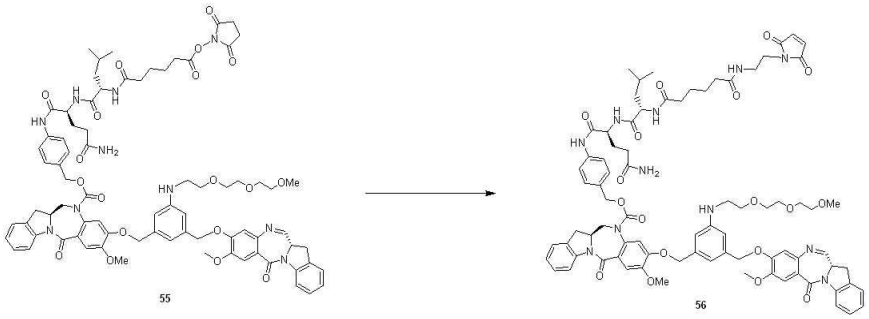
[0662]

[0663] 화합물 54를 화합물 45와 유사하게 제조했다. 미정제 생성물을 실리카 겔 크로마토그래피 (디클로로메탄/메탄올)에 의해 정제했다 (117mg, y = 45.5%). MS (m/z): 1373.9 (M + 1)$^{+}$. UPLC =1.71 (2.5 분 방법).



[0664]

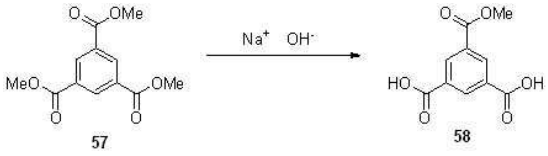
[0665] 화합물 55를 화합물 46과 유사하게 제조했다. 미정제 생성물을 다음 반응에서 직접 사용하거나 RPHPLC (물/아세토니트릴)에 의해 정제했다 (34.5mg, y = 49%). MS (m/z): 1470.8 (M + 1)$^{+}$. UPLC =1.74 (2.5 분 방법).



[0666]

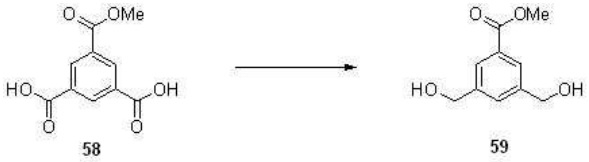
[0667] 화합물 56을 화합물 47과 유사하게 제조했다. 미정제 생성물을 RPHPLC (물/아세토니트릴)에 의해 정제했다 (26mg, y = 47%). MS (m/z): 1495.9 $(M + 1)^+$. UPLC =1.71 (2.5 분 방법).

[0668] **실시예 7. 화합물 65의 합성**



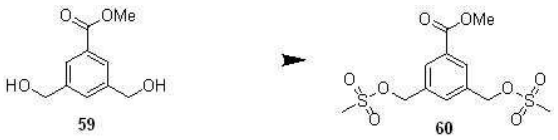
[0669]

[0670] 소듐 하이드록사이드 (2.065 g, 51.6 mmol)를 메탄올 (82 ml) 및 물 (16.39 ml) 중의 트리메틸 벤젠-1,3,5-트리카르복실레이트 (6.2 g, 24.58 mmol)의 교반되는 용액에 첨가했다. 반응 혼합물을 아르곤하에 3 시간 동안 환류시키고 (85 ℃의 유조) 백색 침전물이 형성되었다. 반응물을 실온으로 냉각시키고 모든 고체가 용해될 때까지 물로 희석했다. 용액을 수성 5N HCl을 사용하여 pH~2-3으로 산성화했다. 메탄올을 진공에서 제거하고 생성된 수성물을 에틸 아세테이트로 세 번 추출했다. 조합된 유기물을 소듐 설페이트로 건조시키고, 여과하고 스트리핑했다. 백색 생성물을 뜨거운 에틸 아세테이트에 용해시킨 다음 냉각시켰다. 용액을 여과하고 (침전물은 부산물임) 여과액을 증발시켜 원하는 화합물 58 (4.34g, y=79%)을 수득했다. MS (m/z): 225.0 $(M + 1)^+$ 및 224.0 $(M - 1)^-$. UPLC =1.07 분 (2.5 분 방법). ^{1}H NMR (400 MHz, DMSO-*d6*): δ 13.62 (bs, 2H), 8.65 (s, 3H), 3.93 (s, 3H).



[0671]

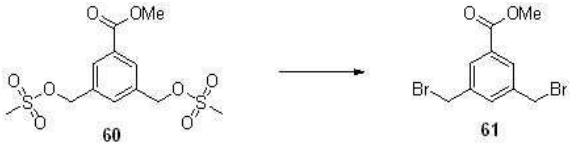
[0672] 화합물 58 (1.94g, 8.65 mmol)을 THF (34.6 ml)에 용해시키고 0 ℃로 냉각시켰다. BH3.DMS (THF 중의 2M, 17.31 ml, 34.6 mmol)을 아르곤하에 천천히 첨가하여 격렬한 버블링을 유발했다. 반응물을 실온으로 가온하고 밤새 교반했다. 이를 거품 형성의 강도가 감소할 때까지 메탄올로 천천히 퀀칭한 다음 기체 발생이 멈추고 모든 고체가 용해될 때까지 물을 첨가했다. 용액을 에틸 아세테이트로 두 번 추출했다. 조합된 유기물을 75ml의 ~3% H_2O_2 용액, 150ml의 0.5M 시트르산 수용액 및 염수로 순차적으로 세척했다. 유기물을 건조시키고, 농축시키고 실리카 겔 크로마토그래피 (헥산/에틸 아세테이트)에 의해 정제하여 화합물 59 (0.82g, y=32%)를 수득했다. ^{1}H NMR (400 MHz, DMSO-*d6*): δ 7.81 (s, 2H), 7.52 (s, 1H), 5.33 (bs, 2H), 4.56 (s, 4H), 3.86 (s, 3H).



[0673]

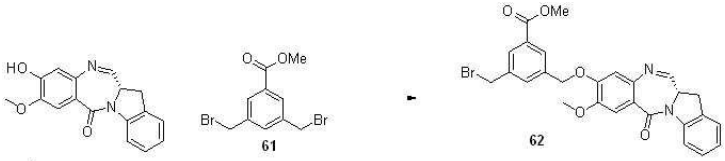
[0674] 화합물 59 (0.82g, 4.18 mmol)를 무수 디클로로메탄 (41.8 ml)에 용해시키고 아세톤/ 빙조에서 -5 ℃로 냉각시켰다. 트리에틸아민 (2.91 ml, 20.90 mmol)을 첨가하고 이어서 메탄설폰산 무수물 (1.820 g, 10.45 mmol)을 첨가하고 생성된 혼합물을 -5 ℃에서 1.5 시간 동안 교반했다. 이를 차가운 에틸 아세테이트 및 물로 희석하고 에틸 아세테이트로 두 번 더 추출했다. 조합된 유기물을 물로 세척하고, 무수 마그네슘 설페이트로 건조시키고,

여과하고 진공에서 농축시켜 (<25 C) 화합물 60 (1.12g, y=76 %)을 수득했고 이를 다음 반응에서 직접 사용했다.



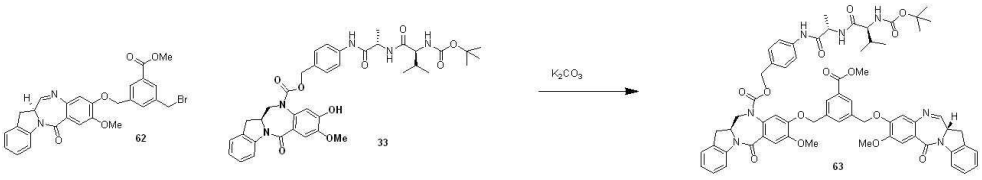
[0675]

[0676] 화합물 60 (1.12g, 3.18 mmol)을 무수 디메틸포름아미드 (15.89 ml)에 용해시키고 소듐 브로마이드 (1.635 g, 15.89 mmol)를 첨가했다. 반응물을 실온에서 밤새 교반했다. 이를 물로 희석하고 에틸 아세테이트로 추출했다. 유기물을 물로 세척하고 무수 마그네슘 설페이트로 건조시키고, 여과하고 스트리핑했다. 미정제 물질을 건조될 때까지 고진공에 두어 화합물 61 (0.97g, y=94%)을 수득했고 이를 추가의 정제 없이 사용했다. UPLC =1.66 분 (2.5 분 방법).



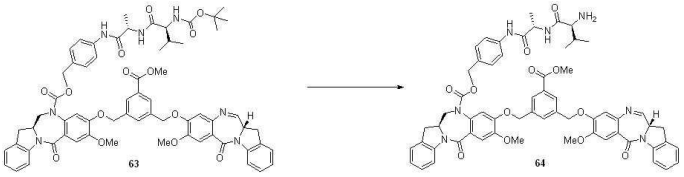
[0677]

[0678] 화합물 1 (0.126 g, 0.429 mmol) 및 화합물 61 (0.967g, 3.00 mmol)을 무수 디메틸포름아미드 (4.29 ml)에 용해시키고 포타슘 카르보네이트 (0.148 g, 1.073 mmol)를 첨가했다. 1 시간 20 분 후 모든 화합물 1이 소모되었고 반응물을 에틸 아세테이트로 희석하고 포화 암모늄 클로라이드, 물, 및 염수로 세척했다. 유기물을 마그네슘 설페이트로 건조시키고, 여과하고 스트리핑했다. 순수한 화합물 62를 실리카 겔 크로마토그래피에 의해 단리했다 (133mg, y=58%). UPLC =1.71 분 (2.5 분 방법).



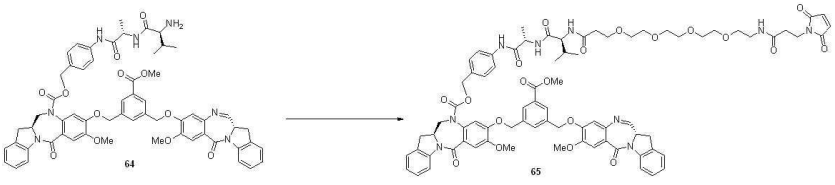
[0679]

[0680] 화합물 33 (63.6 mg, 0.089 mmol) 및 화합물 62 (63mg, 0.098 mmol)를 무수 디메틸아세트아미드 (888 μl)에 용해시켰다. 포타슘 카르보네이트 (24.54 mg, 0.178 mmol)를 첨가하고 반응물을 밤새 아르곤하에 교반했다. 반응물을 물로 침전시키고, 5 분 동안 교반하고 여과했다. 생성된 백색 고체를 디클로로메탄에 용해시키고, 분별 깔대기로 옮기고, 물로 세척하고, 무수 마그네슘 설페이트로 건조시키고, 여과하고 스트리핑했다. 미정제물을 컬럼을 통해 정제하여 화합물 63 (79 mg, y =76%)을 수득했다. MS (m/z): 1171.0 $(M + 1)^+$. UPLC = 1.89 분 (2.5 분 방법).



[0681]

[0682] 화합물 64를 화합물 35와 유사하게 제조했다. 미정제 물질을 추가의 정제 없이 직접 사용했다 (54 mg, y=75%). MS (m/z): 1171.1 $(M + 1)^+$. UPLC =1.51 분 (2.5 분 방법).

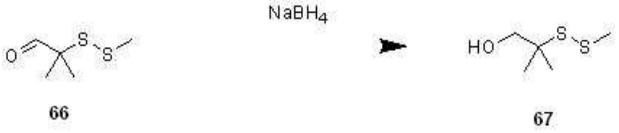


[0683]

[0684] 화합물 64 (54mg, 0.050 mmol) 및 1-(2,5-디옥소-2,5-디하이드로-1H-피롤-1-일)-3-옥소-7,10,13,16-테트라옥사

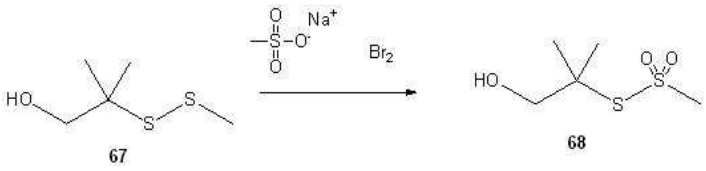
-4-아자노나데칸-19-오산 (21.01 mg, 0.050 mmol)을 무수 디클로로메탄(3154 μl)에 용해시켰다. EDC (9.67 mg, 0.050 mmol)를 첨가하고 반응물을 탈기시키고 실온에서 아르곤하에 교반했다. 1 시간에 반응물을 디클로로메탄으로 희석하고 물 및 염수로 세척했다. 유기물을 마그네슘 설페이트로 건조시키고, 여과하고 스트리핑했다. 미정제 물질을 아세토니트릴 및 테트라하이드로퓨란 및 몇 방울의 포름산에 용해시키고 반 분취용 RP-HPLC (C18, 물/아세토니트릴)에 의해 정제했다. 순수한 분획을 동결시키고 동결건조시켜 화합물 65 (29.5 mg, y=40 %)를 수득했다. MS (m/z): 1469.6 $(M + 1)^+$. UPLC =1.68 분 (2.5 분 방법).

[0685] **실시예 8. 화합물 73의 합성**



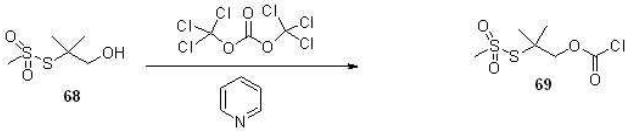
[0686]

[0687] 무수 메탄올 (44.4 ml) 중의 2-메틸-2-(메틸디설파닐)프로판알 (1 g, 6.66 mmol)의 용액에 소듐 보로하이드라이드 (0.252 g, 6.66 mmol)를 첨가했다. 반응물을 90 분 동안 실온에서 교반하고 이를 수성 염산 (0.5M)으로 퀀칭하고 에틸 아세테이트 (100ml)로 희석했다. 수성 포화 소듐 비카르보네이트 용액을 pH ~10까지 첨가한 다음 에틸 아세테이트 (2 x 50ml)로 추출했다. 유기 추출물을 조합하고, 염수로 세척하고, 무수 마그네슘 설페이트로 건조시키고, 여과하고 농축시켰다. 100% 수율을 가정하여 미정제물을 추가의 정제 없이 진행시켰다.



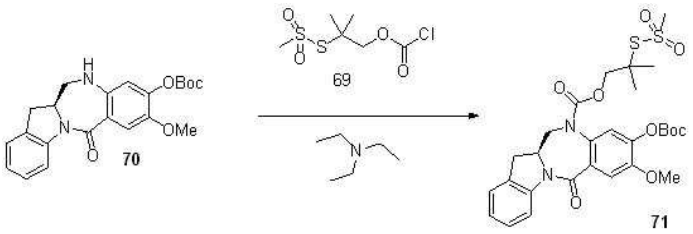
[0688]

[0689] 무수 디클로로메탄 (52.5 ml) 중의 2-메틸-2-(메틸디설파닐)프로판-1-올 (1.2 g, 7.88 mmol)의 냉각된 용액에 소듐 메탄설포네이트 (4.65 g, 39.4 mmol) 및 디브로민 (1.009 ml, 19.70 mmol)을 0 ℃에서 첨가했다. 주위 온도에서 90 분 동안 교반한 후 반응 혼합물을 셀라이트를 통해 여과하고 디클로로메탄으로 헹구었다. 여과액을 농축시키고 ISCO (40g 실리카 컬럼, 에틸 아세테이트/ 헥산)에 의해 정제하여 S-(1-하이드록시-2-메틸프로판-2-일) 메탄설포노티오에이트 (1.1g, y= 76%)를 수득했다. ^{1}H NMR (400 Hz, d_6-DMSO): δ 5.39 (t, J=5.6Hz, 1H), 3.54 (d, J=5.6Hz, 2H), 3.50 (s, 3H), 1.44 (s, 6H)



[0690]

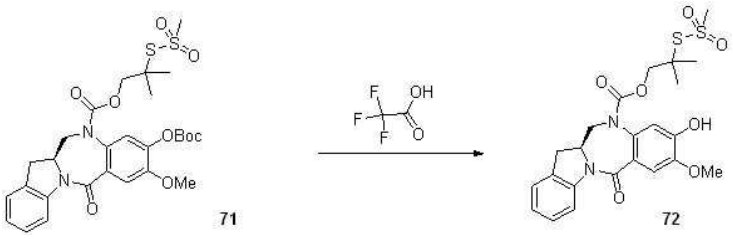
[0691] 무수 디클로로메탄 (1.27 ml) 중의 S-(1-하이드록시-2-메틸프로판-2-일) 메탄설포노티오에이트 (47 mg, 0.255 mmol) 및 트리포스겐 (26.5 mg, 0.089 mmol)의 용액에 피리딘 (19.60 μl, 0.242 mmol)을 첨가했다. 반응물을 주위 온도에서 네 시간 동안 교반하고 그 후 디클로로메탄으로 희석하고 물로 세척했다. 유기층을 무수 마그네슘 설페이트로 건조시키고, 여과하고 농축시켜 투명한 무색 오일을 수득했다. 100% 수율을 가정하여 미정제 화합물 69를 추가의 정제 없이 진행시켰다.



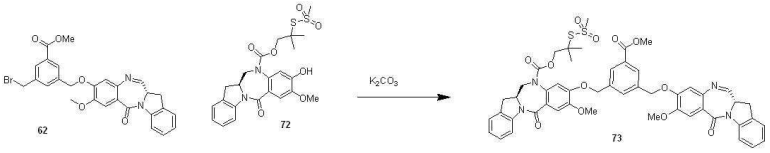
[0692]

[0693] 무수 1,2-디클로로에탄 (1.00 ml) 중의 (S)-tert-부틸 (8-메톡시-6-옥소-11,12,12a,13-테트라하이드로-6H-벤조[5,6][1,4]디아제피노[1,2-a]인돌-9-일) 카르보네이트 (40 mg, 0.101 mmol) 및 S-(1-((클로로카르보닐)옥시)-2-메틸프로판-2-일) 메탄설포노티오에이트 (62.2 mg, 0.252 mmol)의 용액에 트리에틸아민 (56.3 μl, 0.404

mmol)을 첨가했다. 혼합물을 주위 온도에서 30 분 동안 교반한 다음 디클로로메탄으로 희석했다. 유기층을 염수로 세척하고, 건조시키고 농축시켰다. 미정제 물질을 에틸 아세테이트/헥산에서 실리카 겔 크로마토그래피에 의해 정제하여 화합물 71을 백색 고체 (50mg, y = 82%)로 수득했다. MS (m/z): 607.6 $(M + 1)^+$. UPLC = 1.81 분 (2.5 분 방법).

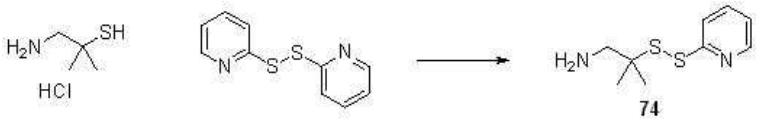
[0694] 

[0695] 무수 디클로로메탄 (15.00 ml) 중의 2-메틸-2-((메틸설포닐)티오)프로필 (S)-9-((tert-부톡시카르보닐)옥시)-8-메톡시-6-옥소-12a,13-디하이드로-6H-벤조[5,6][1,4]디아제피노[1,2-a]인돌-11(12H)-카르복실레이트 (0.910 g, 1.5 mmol)의 용액에 트리플루오로아세트산 (1.733 ml, 22.50 mmol)을 천천히 첨가했다. 혼합물을 주위 온도에서 다섯 시간 동안 교반한 후 디클로로메탄으로 희석하고 수성 포화 소듐 비카르보네이트 및 염수로 세척했다. 유기층을 무수 마그네슘 설페이트로 건조시키고, 여과하고 농축시켰다. 미정제 물질을 에틸 아세테이트/디클로로메탄에서 실리카 겔 크로마토그래피에 의해 정제하여 화합물 72를 백색 결정질 고체 (0.68g, y =89%)로 수득했다. MS (m/z): 507.1 $(M + 1)^+$ 505.1 $(M - 1)^-$ UPLC = 1.51 분 (2.5 분 방법).

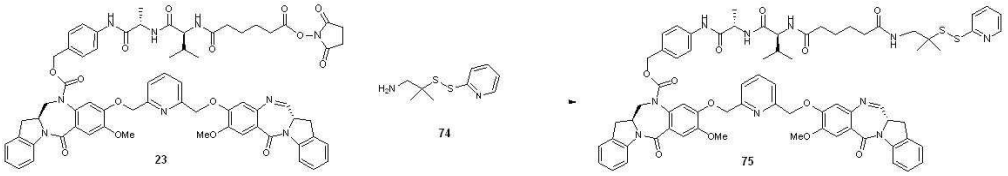
[0696] 

[0697] 화합물 62 (69.6 mg, 0.130 mmol) 및 화합물 72 (59mg, 0.108 mmol)를 무수 디메틸아세트아미드 (1083 μl)에 용해시켰다. 포타슘 카르보네이트 (29.9 mg, 0.217 mmol)를 첨가하고 반응물을 밤새 실온에서 교반했다. 반응물을 물로 슬러리화하고 여과했다. 생성된 고체를 약간의 메탄올이 있는 디클로로메탄에 용해시키고, 무수 마그네슘 설페이트로 건조시키고 농축시켜 0.114 mg의 화합물 73 (70% 순도, y=76%)을 미정제 황색 고체로 수득했다. 순수한 물질을 RP-HPLC (C18, 탈이온수/아세토니트릴)에 의해 수득했다. MS (m/z): 961.7 $(M + 1)^+$. UPLC =1.85 분 (2.5 분 방법).

[0698] **실시예 9. 화합물 75의 합성**

[0699] 

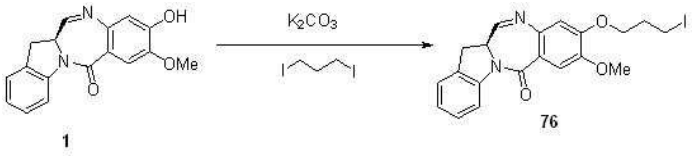
[0700] 디메틸시스테아민 HCl (500 mg, 3.53 mmol)을 메탄올 (11.765 mL)에 용해시켰다. 알드리티올 (1166 mg, 5.29 mmol)을 첨가하고 황색 용액을 밤새 교반했다. LCMS는 0.394 분에 생성물 형성을 나타냈다. 트리에틸아민 (0.492 mL, 3.53 mmol)을 첨가하고 5 분 동안 교반한 다음 반응 혼합물을 농축시켰다. 미정제 잔류물을 실리카 겔 크로마토그래피 (디클로로메탄/메탄올)에 의해 정제하여 화합물 74을 회백색의 끈적한 고체 (700 mg, 93%)로 수득했다.

[0701] 

[0702] 화합물 23 (10mg, 8.08 μmol)을 무수 디클로로메탄 (0.25ml)에 용해시켰다. 화합물 74 (2.077 mg, 9.69 μmol) 및 이후 DIPEA (2.81 μl, 0.016 mmol)를 첨가했다. 반응물을 1 시간 동안 교반하고 건조 농축시켰다. 미정제 물질을 2 방울의 포름산과 함께 아세토니트릴/H2O에 용해시키고 RP-HPLC (C18, 탈이온수/아세토니트릴)에

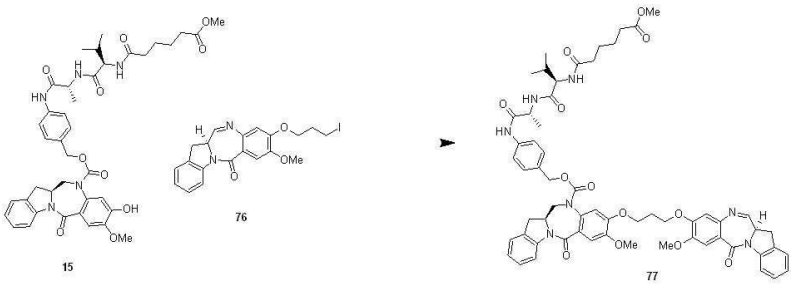
의해 정제했다. 원하는 분획을 동결시키고 동결건조시켜 화합물 75 (8mg, y= 74%)를 수득했다. MS (m/z): 1338.5 $(M + 1)^+$. UPLC =1.88 분 (2.5 분 방법).

[0703] **실시예 10. 화합물 79의 합성**



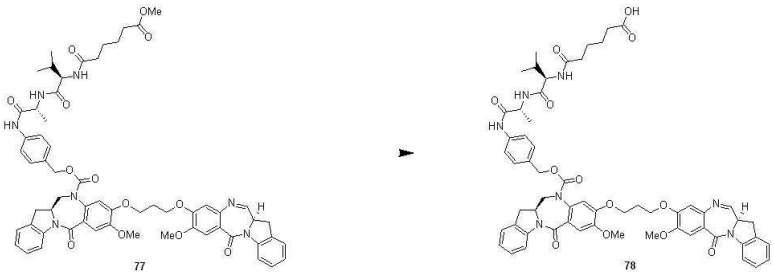
[0704]

[0705] 화합물 1 (250 mg, 0.807 mmol)을 무수 디메틸포름아미드 (4035 μl)에 용해시켰다. 1,3-디아이오도프로판 (1399 μl, 12.10 mmol) 및 포타슘 카르보네이트 (335 mg, 2.421 mmol)를 첨가했다. 반응물을 밤새 실온에서 교반했다. 이를 에틸 아세테이트 및 물로 희석했다. 유기물을 분리하고 물로 세 번 세척했다. 이를 건조시키고, 농축시키고, 실리카 겔 크로마토그래피 (헥산/에틸 아세테이트)에 의해 정제하여 화합물 76 (215 mg, 57%)을 수득했다.



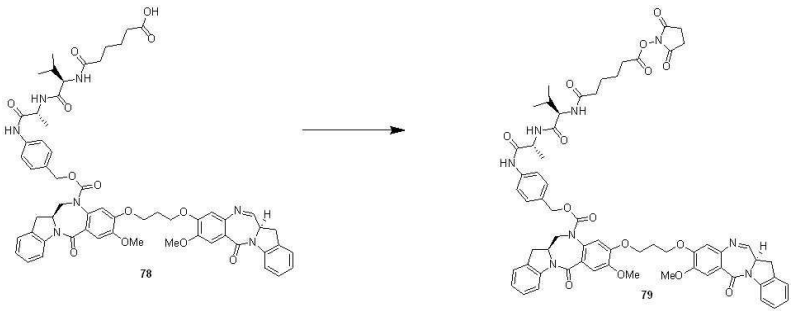
[0706]

[0707] 화합물 15 및 76을 화합물 16과 유사하게 반응시켰다. 미정제 물질을 실리카 겔 크로마토그래피 (디클로로메탄/메탄올)에 의해 정제하여 화합물 77 (54.3 mg, 85% 순도, y=30%)을 수득했다. MS (m/z): 1093.0 $(M + 1)^+$. UPLC =1.83 분 (2.5 분 방법).



[0708]

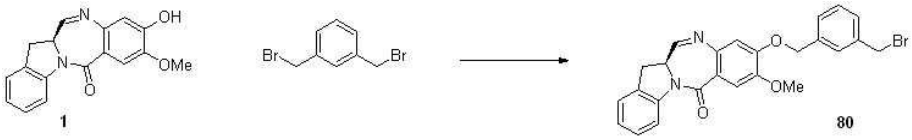
[0709] 화합물 78을 화합물 17과 유사하게 제조했다. 100% 수율을 가정하여 미정제 물질을 다음 반응에서 직접 사용했다. MS (m/z): 1078.8 $(M + 1)^+$. UPLC =1.74 (2.5 분 방법).



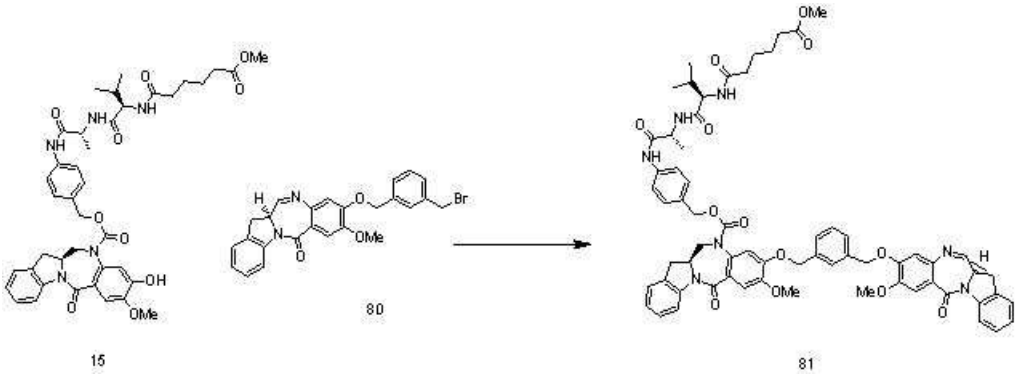
[0710]

[0711] 화합물 79를 화합물 18과 유사하게 제조했다. 미정제 물질을 RPHPLC (C18 컬럼, 물/아세토니트릴)를 통해 정제하여 최종 화합물 79 (38 mg, y=65%)를 수득했다. MS (m/z): 1175.8 $(M + 1)^+$. UPLC =1.80 분 (2.5 분 방법).

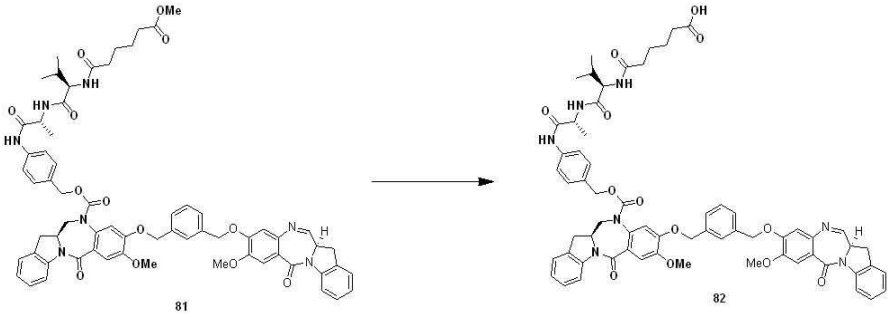
[0712] **실시예 11. 화합물 83의 합성**

[0713] 

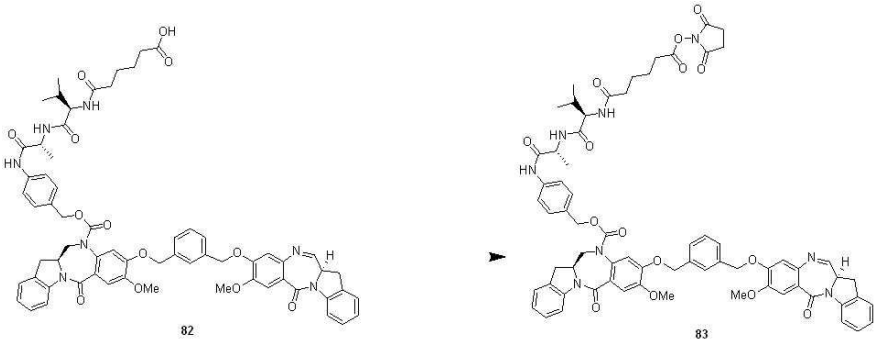
[0714] 화합물 1(250 mg, 0.807 mmol)을 무수 디메틸포름아미드 (4035 μl)에 용해시켰다. 1,3-비스(브로모메틸)벤젠 (1704 mg, 6.46 mmol) 및 포타슘 카르보네이트 (335 mg, 2.421 mmol)를 첨가했다. 반응물을 밤새 실온에서 교반했다. 이를 물로 부수고 여과했다. 고체를 실리카 겔 크로마토그래피에 의해 정제하여 과량의 출발 물질을 제거하고 화합물 80을 다음 반응에서 즉시 사용했다. MS (m/z): 477.4 $(M + 1)^+$. UPLC =1.77 (2.5 분 방법).

[0715] 

[0716] CoC화합물 80 (64.6 mg, 0.135 mmol)을 무수 디메틸아세트아미드 (3260 μl)에 용해시켰다. 포타슘 카르보네이트 (45.1 mg, 0.326 mmol) 및 화합물 15 (124 mg, 0.163 mmol)를 순차적으로 첨가하고 실온에서 아르곤하에 반응을 완료(12-15 시간)까지 진행시켰다. 반응물을 물로 침전시키고 여과했다. 수집된 고체를 디클로로메탄에 용해시키고, 분별 깔대기로 옮기고, 물, 염수로 세척하고, 무수 소듐 설페이트로 건조시키고 진공에서 농축시켰다. 이를 실리카 겔 크로마토그래피 (디클로로메탄/메탄올)를 통해 정제하여 화합물 81 (93.7mg, y=50%)을 수득했다. MS (m/z): 1154.8 $(M + 1)^+$. UPLC =1.92 (2.5 분 방법).

[0717] 

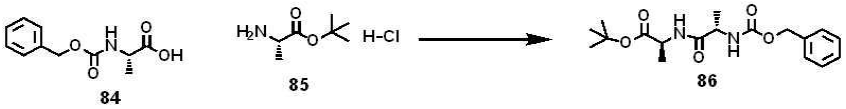
[0718] 화합물 82를 화합물 17과 유사하게 제조했다. 미정제 물질을 추가의 정제 없이 사용했다. 100% 수율을 가정한다. MS (m/z): 1140.9$(M + 1)^+$. UPLC =1.85 (2.5 분 방법).

[0719] 

[0720] 화합물 83을 화합물 18과 유사하게 제조했다. 미정제 물질을 RPHPLC (C18 컬럼, 물/아세토니트릴)를 통해 정제

하여 최종 화합물 83 (13.8 mg, y=14%)을 수득했다. MS (m/z): 1237.7 (M + 1)$^+$. UPLC =1.92 분 (2.5 분 방법).

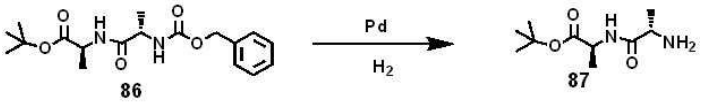
[0721] **실시예 12. 화합물 95의 합성**



84 85 86

[0722]

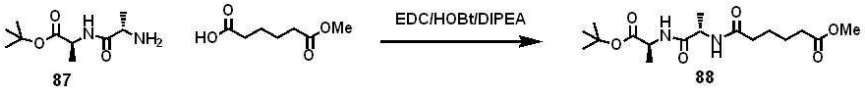
[0723] (S)-2-(((벤질옥시)카르보닐)아미노)프로판산 (5 g, 22.40 mmol) 및 (S)-tert-부틸 2-아미노프로파노에이트 하이드로클로라이드 (4.48 g, 24.64 mmol)를 무수 *N,N*-디메틸포름아미드 (44.8 ml)에 용해시켰다. 3-(3-디메틸아미노프로필)-1-에틸-카르보디이미드 하이드로클로라이드 (4.72 g, 24.64 mmol), 1-하이드록시벤조트리아졸 수화물 (3.43 g, 22.40 mmol), 및 디이소프로필에틸아민 (9.75 ml, 56.0 mmol)을 첨가했다. 반응물을 아르곤하에, 실온에서, 밤새 교반했다. 반응 혼합물을 디클로로메탄으로 희석한 다음 포화 암모늄 클로라이드, 포화 소듐 비카르보네이트, 물, 및 염수로 세척했다. 유기물을 소듐 설페이트로 건조시키고 농축시켰다. 미정제 오일을 실리카 겔 크로마토그래피 (헥산/에틸 아세테이트)를 통해 정제하여 화합물 86 (6.7g, y=85%)을 수득했다 ^{1}H NMR (400 Hz, $CDCl_3$): δ 7.38-7.31 (m, 5H), 6.53-6.42 (m, 1H), 5.42-5.33 (m, 1H), 5.14 (s, 2H), 4.48-4.41 (m, 1H), 4.32-4.20 (m, 1H), 1.49 (s, 9H), 11.42 (d, J=6.8Hz, 3H), 1.38 (d, J=7.2Hz, 3H).



86 87

[0724]

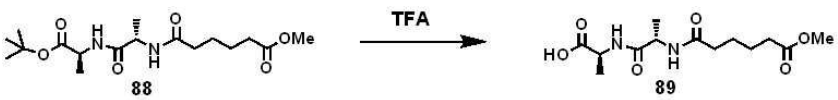
[0725] 화합물 86 (6.7g, 19.12 mmol)을 메탄올 (60.7 ml) 및 물 (3.03 ml)에 용해시켰다. 용액을 아르곤으로 5 분 동안 퍼지했다. 탄소 담지 팔라듐 (습윤, 10%) (1.017g, 0.956 mmol)을 천천히 첨가했다. 반응물을 수소 분위기하에 밤새 교반했다. 용액을 셀라이트를 통해 여과하고, 메탄올로 헹구고 농축시켰다. 이를 메탄올 및 아세토니트릴과 공비하고 생성된 오일을 고진공에 직접 배치하여 화합물 87 (4.02g, y=97%)을 수득하고 이를 다음 단계에서 직접 사용했다. ^{1}H NMR (400 Hz, $CDCl_3$): δ 7.78-7.63 (m, 1H), 4.49-4.42 (m, 1H), 3.55-3.50 (m, 1H), 1.73 (s, 2H), 1.48 (s, 9H), 1.39 (d, J=7.2Hz, 3H), 1.36 (d, J=6.8Hz, 3H).



87 88

[0726]

[0727] 화합물 87 (4.02 g, 18.59 mmol) 및 모노메틸아디페이트 (3.03 ml, 20.45 mmol)를 무수 *N,N*-디메틸포름아미드 (62.0 ml)에 용해시켰다. 3-(3-디메틸아미노프로필)-1-에틸-카르보디이미드 하이드로클로라이드 (3.92 g, 20.45 mmol) 및 1-하이드록시벤조트리아졸 수화물 ((2.85 g, 18.59 mmol) 및 디이소프로필에틸아민 (6.49 ml, 37.2 mmol)을 첨가했다. 혼합물을 밤새 실온에서 교반했다. 반응물을 디클로로메탄 /메탄올 (150 mL, 5:1)로 희석하고 포화 암모늄 클로라이드, 포화 소듐 비카르보네이트, 및 염수로 세척했다. 이를 소듐 설페이트로 건조시키고, 여과하고 스트리핑했다. 화합물을 아세토니트릴 (5x)과 공비시킨 다음, 고진공으로 35 ℃에서 펌핑하여 화합물 88 (6.66g, y=100%)을 수득했다. 미정제 물질을 정제 없이 다음 단계로 보냈다. ^{1}H NMR (400 Hz, $CDCl_3$): δ 6.75 (d, J=6.8Hz, 1H), 6.44 (d, J=6.8Hz, 1H), 4.52-4.44 (m, 1H), 4.43-4.36 (m, 1H), 3.65 (s, 3H), 2.35-2.29 (m, 2H), 2.25-2.18 (m, 2H), 1.71-1.60 (m, 4H), 1.45 (s, 9H), 1.36 (t, J=6Hz, 12.8Hz, 6H)

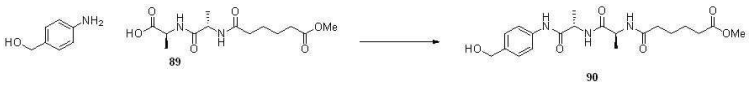


88 89

[0728]

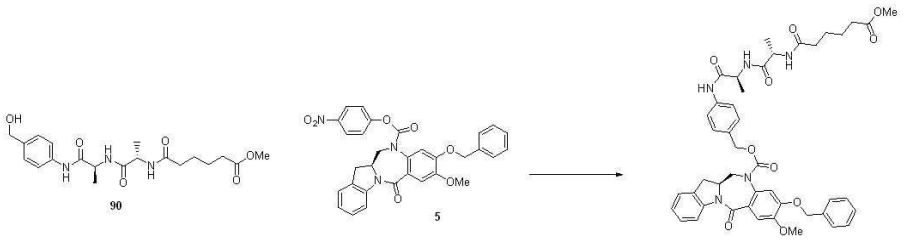
[0729] 화합물 88 (5.91 g, 16.5mmol)을 트리플루오로아세트산 (28.6 ml, 372mmol) 및 탈이온수 (1.5ml)에서 실온에서 세 시간 동안 교반했다. 이를 아세토니트릴로 회전증발시키고 용매가 제거될 때까지 고진공에 두어 미정제 화합물 89를 끈적한 고체 (5.88g y=105%)로 수득했다. ^{1}H NMR (400 Hz, $CDCl_3$): δ 7.21 (d, J=6.8Hz, 1H), 6.81

(d, J=7.6Hz, 1H), 4.69-4.60 (m, 1H), 4.59-4.51 (m, 1H), 3.69 (s, 3H), 2.40-2.33 (m, 2H), 2.31-2.24 (m, 2H), 1.72-1.63 (m, 4H), 1.51-1.45 (m, 3H), 1.42-1.37 (m, 3H)

[0730] 

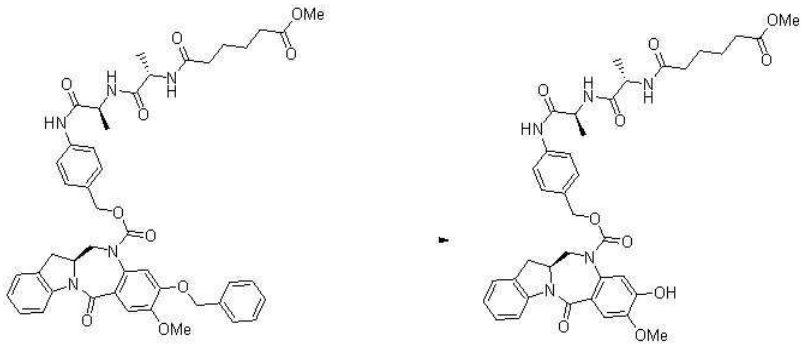
89 90

[0731] 화합물 90을 화합물 13과 유사하게 제조했다. 미정제 물질을 에틸 아세테이트로 슬러리화하고 여과했다. (800 mg, y=81%). LCMS=3.1 분 (8 분 방법).

[0732] 

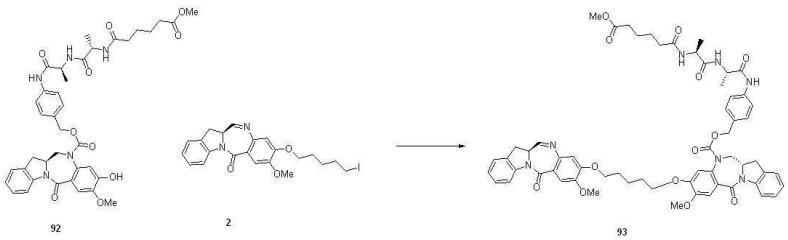
90 5 91

[0733] 화합물 91을 화합물 14와 유사하게 제조했다. 미정제 물질을 실리카 겔 크로마토그래피 (디클로로메탄/메탄올)에 의해 정제했다 (52mg, y=17.5%). MS (m/z): 820.6 $(M + 1)^+$. MS (m/z): 818.7 $(M - 1)^-$. UPLC=5.5 분 (10 분 방법).

[0734] 

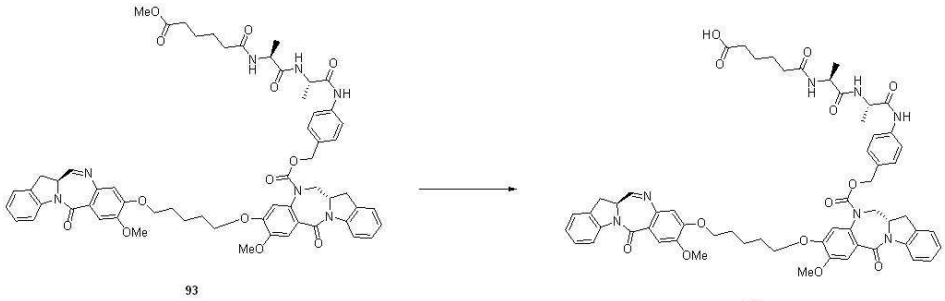
91 92

[0735] 에탄올 (47.7 μl, 0.817 mmol) 중의 화합물 91 (10 mg, 0.012 mmol)의 용액에 사이클로헥사-1,4-디엔 (1.745 μl, 0.018 mmol), (디메틸-13-설파닐)-11-옥시단 (0.077 μl, 1.085 μmol)을 첨가하고 이어서 팔라듐 (1.953 mg, 0.018 mmol)을 첨가했다. 반응물을 45C에서 밤새 교반하고 이 시점에 ~50% 전환이 있었다. 추가의 Pd/Alox, DMSO, 사이클로헥사디엔을 선례와 유사한 비율과 양을 사용하여 첨가했다. 반응은 4 시간 후에 완료되었다. 이후 Pd를 셀라이트에서 여과하고 미정제 용액을 증발시켰다. 여과된 생성물을 추가의 정제 없이 다음 단계에서 사용했다.

[0736] 

92 2 93

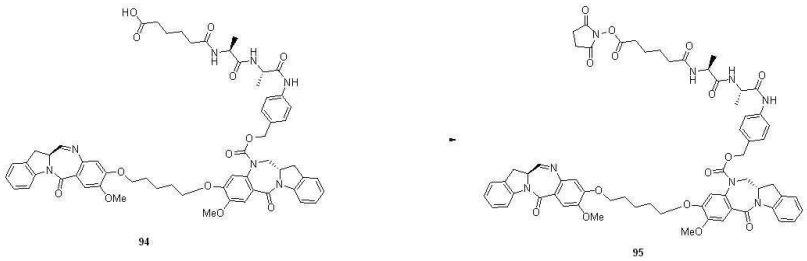
[0737] 화합물 92 및 화합물 2를 화합물 16의 합성에서와 유사하게 반응시켰다. 화합물 93을 정제 없이 다음 반응에서 사용했다. (52 mg, y=67%). MS (m/z): 1093.2 $(M + 1)^+$. UPLC =5.78 분 (10 분 방법).



93 94

[0738]

[0739] 화합물 94를 화합물 17과 유사하게 제조했다. 미정제 물질을 추가의 정제 없이 사용했다 (33mg, y=96%). MS (m/z): 1079.2 $(M + 1)^+$. UPLC =1.76 (2.5 분 방법).

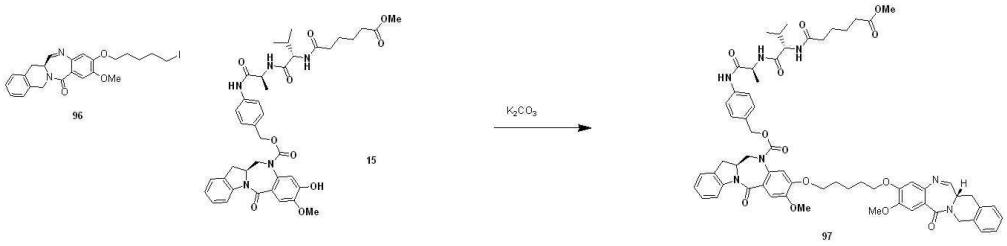


94 95

[0740]

[0741] 무수 디클로로메탄 (1 ml) 중의 화합물 94 (33 mg, 0.031 mmol)의 용액에 실온에서 N-에틸-N-이소프로필프로판-2-아민 (8.23 μl, 0.046 mmol)을 첨가하고 이어서 비스(2,5-디옥소피롤리딘-1-일) 카르보네이트 (10.19 mg, 0.040 mmol)를 첨가했다. 출발 물질이 소모될 때까지 반응물을 교반했다. 이후 이를 물로 퀀칭하고, 층을 분리하고, 수성층을 디클로로메탄으로 한 번 추출했다. 조합된 유기층을 염수로 세척하고, 마그네슘 설페이트로 건조시키고 여과했다. 용매를 제거하고 미정제 물질을 RPHPLC (물/아세토니트릴)에 의해 정제하여 최종 화합물 95 (12mg, y= 33%)를 수득했다. MS (m/z): 1176.4 $(M + 1)^+$. UPLC =1.84 (2.5 분 방법).

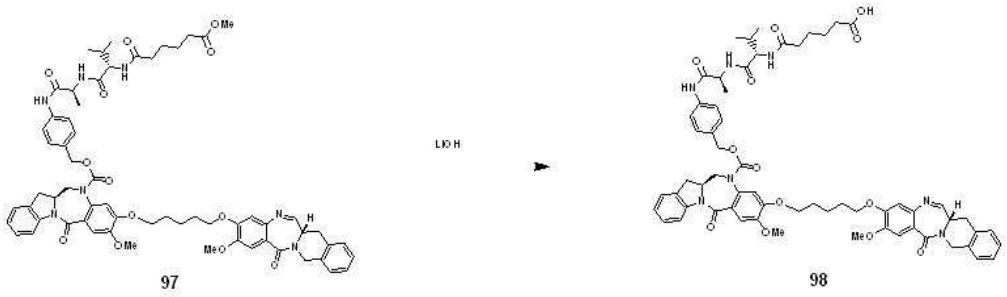
[0742] **실시예 13. 화합물 99의 합성**



96 15 97

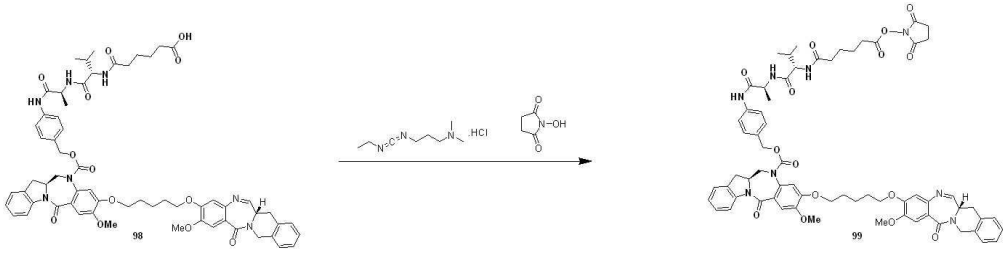
[0743]

[0744] 무수 N,N-디메틸아세트아미드 (845 μl) 중의 (S)-3-((5-아이오도펜틸)옥시)-2-메톡시-7,12-디하이드로벤조[5,6][1,4]디아제피노[1,2-b]이소퀴놀린-14(6aH)-온 (51.1 mg, 0.101 mmol) 및 4-((S)-2-((S)-2-(6-메톡시-6-옥소헥산아미도)-3-메틸부탄아미도)프로판아미도)벤질 (S)-9-하이드록시-8-메톡시-6-옥소-12a,13-디하이드로-6H-벤조[5,6][1,4]디아제피노[1,2-a]인돌-11(12H)-카르복실레이트 (64 mg, 0.084 mmol)의 용액에 포타슘 카르보네이트 (23.34 mg, 0.169 mmol)를 첨가하고 반응물을 질소하에 주위 온도에서 18 시간 동안 교반했다. 탈이온수 (10 mL)를 반응물에 첨가하고 생성된 백색 고체를 여과한 다음, 디클로로메탄에 재용해키시고, 분별 깔대기로 옮기고, 물로 세척했다. 유기층을 무수 마그네슘 설페이트로 건조시키고, 여과하고 진공에서 농축시켰다. 미정제 고체를 메탄올/디클로로메탄에서 실리카 겔 크로마토그래피를 통해 정제하여 화합물 97 (80mg, y = 84%)을 백색 고체로 수득했다. MS (m/z): 1135.1 $(M + 1)^+$. UPLC = 5.91 분 (10 분 방법).



[0745]

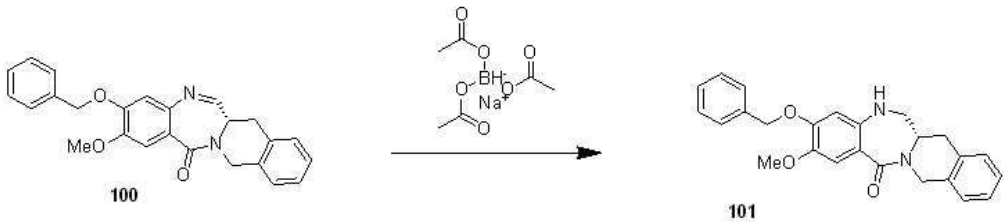
[0746] 무수 테트라하이드로퓨란 (2.0 ml) 및 탈이온수 (683 μl) 중의 4-((S)-2-((S)-2-(6-메톡시-6-옥소헥산아미도)-3-메틸부탄아미도)프로판아미도)벤질 (S)-8-메톡시-9-((5-(((S)-2-메톡시-14-옥소-6a,7,12,14-테트라하이드로벤조[5,6][1,4]디아제피노[1,2-b]이소퀴놀린-3-일)옥시)펜틸)옥시)-6-옥소-12a,13-디하이드로-6H-벤조[5,6][1,4]디아제피노[1,2-a]인돌-11(12H)-카르복실레이트 (62 mg, 0.055 mmol)의 냉각된 용액 (0 ℃)에 리튬 하이드록사이드 (3.93 mg, 0.164 mmol)를 첨가했다. 반응물을 주위 온도에서 질소하에 90 분 동안 교반하고 그 후 혼합물을 20% 메탄올/디클로로메탄 (10 ml) 및 탈이온수 (5ml)로 희석했다. 혼합물을 수성 염산 (0.5M, 1mL)을 사용하여 pH = 3으로 산성화시키고 20% 메탄올/디클로로메탄 (2 x 20mL)으로 추출했다. 유기층을 탈이온수로 세척하고, 무수 마그네슘 설페이트로 건조시키고, 셀라이트를 통해 여과하고 농축시켰다. 미정제 물질을 메탄올/디클로로메탄에서 실리카 겔 크로마토그래피에 의해 정제하여 DP (36mg, y = 58%)를 수득했다. MS (m/z): 1121.3 $(M + 1)^+$. UPLC = 1.66 분 (2.5 분 방법).



[0747]

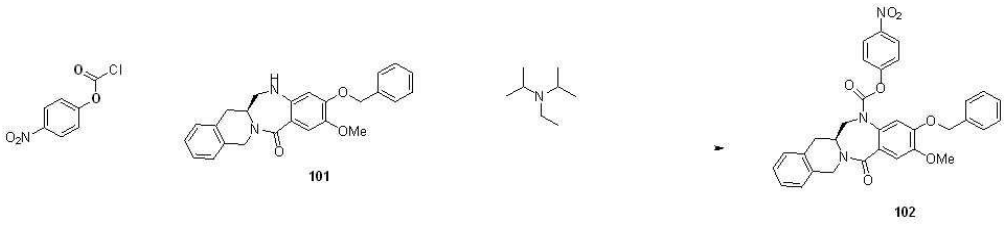
[0748] 무수 디클로로메탄 (321 μl) 중의 화합물 98 (36 mg, 0.032 mmol) 및 N-하이드록시 석신이미드 (11.10 mg, 0.096 mmol)의 용액에 1-에틸-3-(3-디메틸아미노프로필) 카르보디이미드 하이드로클로라이드 (30.8 mg, 0.161 mmol)를 첨가했다. 반응물을 두 시간 동안 질소하에 주위 온도에서 교반하고 이를 디클로로메탄으로 희석하고 물로 세척했다. 유기층을 무수 마그네슘 설페이트로 건조시키고, 여과하고 진공에서 농축시켰다. 미정제 생성물을 RP-HPLC (Kromasil C18, 아세토니트릴/탈이온수, 30 분에 걸쳐 50-65%)에 의해 정제하고 생성물을 함유하는 분획을 동결시키고 동결건조시켜 화합물 99 (18mg, y = 46%)를 백색 고체로 수득했다. MS (m/z): 1218.1 $(M + 1)^+$. UPLC = 1.75 분 (2.5 분 방법).

[0749] **실시예 14. 화합물 106의 합성**



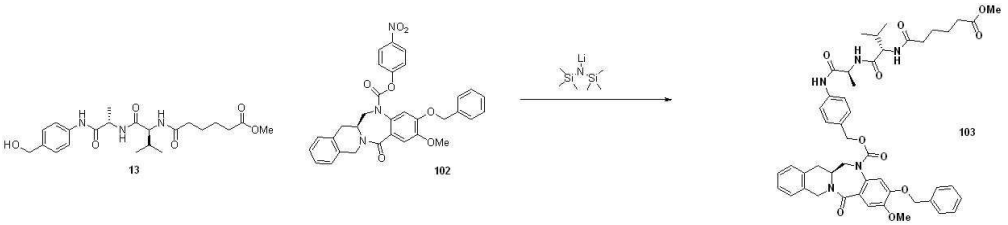
[0750]

[0751] 무수 1,2-디클로로에탄 (18.40 ml) 중의 (S)-3-(벤질옥시)-2-메톡시-7,12-디하이드로벤조[5,6][1,4]디아제피노[1,2-b]이소퀴놀린-14(6aH)-온 (1.1 g, 2.76 mmol)의 현탁액에 소듐 트리아세톡시보로하이드라이드 (1.755 g, 8.28 mmol)를 첨가하고 혼합물을 20 시간 동안 주위 온도에서 교반했다. 혼합물을 포화 수성 암모늄 클로라이드 용액으로 퀀칭하고 디클로로메탄으로 추출했다. 유기 추출물을 염수 용액으로 세척하고, 무수 마그네슘 설페이트로 건조시키고, 여과하고 농축시켜 미정제 (S)-3-하이드록시-2-메톡시-6,6a,7,12-테트라하이드로벤조[5,6][1,4]디아제피노[1,2-b]이소퀴놀린-14(5H)-온을 밝은 황색 고체로 수득했고, 이를 추가의 정제 없이 다음 반응을 위해 사용했다 (1.1g, y= 99%). MS (m/z): 401.6 $(M + 1)^+$. UPLC = 1.69 분 (2.5 분 방법).



[0752]

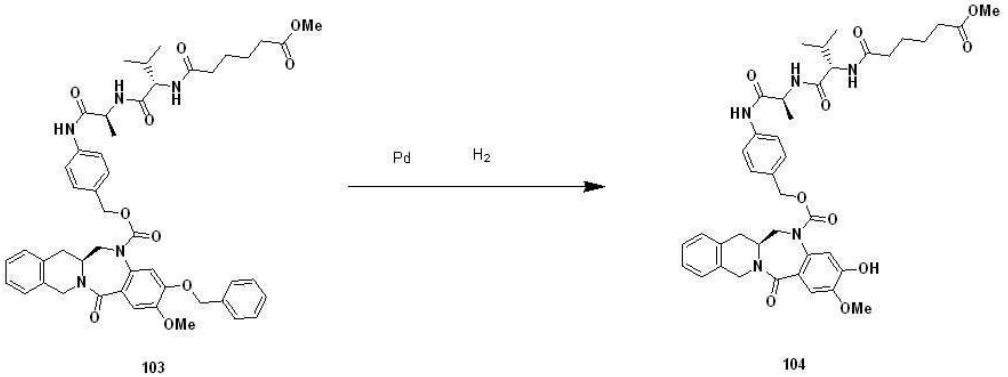
[0753] 무수 디클로로메탄 (12.21 ml) 중의 (S)-3-(벤질옥시)-2-메톡시-6,6a,7,12-테트라하이드로벤조[5,6][1,4]디아제피노[1,2-b]이소퀴놀린-14(5H)-온 (1.1 g, 2.75 mmol)의 현탁액에 N-에틸-N-이소프로필프로판-2-아민 (0.591 ml, 3.30 mmol)을 첨가했다. 이후 무수 디클로로메탄 (6.10 ml) 중의 4-니트로페닐 카르보노클로리데이트 (0.634 g, 3.02 mmol)의 용액을 첨가했다. 백색 슬러리는 투명한 황색이 되었고 주위 온도에서 20 시간 동안 교반을 계속했다. 반응물을 디클로로메탄 및 물로 희석하고 층을 분리했다. 유기층을 물 (50ml), 포화 수성 소듐 비카르보네이트 용액 (50ml), 염수 용액 (50mL)으로 세척하고, 무수 마그네슘 설페이트로 건조시키고, 여과하고 농축시켰다. 생성된 고체를 ISCO (에틸 아세테이트/헥산, 40g 실리카 컬럼)에서 정제하여 화합물 102 (1.2g, 77% 수율)를 수득했다. MS (m/z): 566.5 $(M + 1)^+$. UPLC = 1.94 분 (2.5 분 방법).



[0754]

[0755] 무수 테트라하이드로퓨란 (1.78 ml) 및 무수 N,N-디메틸아세트아미드 (3.56 ml) 중의 메틸 6-(((S)-1-(((S)-1-((4-(하이드록시메틸)페닐)아미노)-1-옥소프로판-2-일)아미노)-3-메틸-1-옥소부탄-2-일)아미노)-6-옥소헥사노에이트 (410 mg, 0.941 mmol)의 용액에 0 ℃에서 리튬 비스(트리메틸실릴)아미드 (테트라하이드로퓨란 중의 1M, 0.94 ml, 0.941 mmol)을 첨가했다. 투명한 황색 반응물을 15 분 동안 교반한 후 무수 테트라하이드로퓨란 (1.78 ml) 중의 4-니트로페닐 (S)-3-(벤질옥시)-2-메톡시-14-옥소-6,6a,7,12-테트라하이드로벤조[5,6][1,4]디아제피노[1,2-b]이소퀴놀린-5(14H)-카르복실레이트 (444 mg, 0.785 mmol)를 첨가했다.

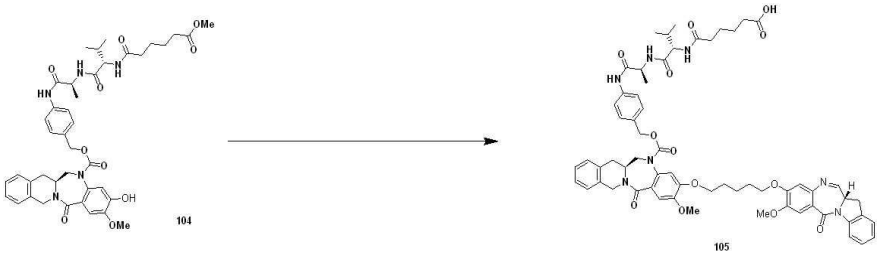
[0756] 반응 혼합물을 18 시간 동안 질소하에 0 ℃로부터 주위 온도까지 교반하고, 이를 빙조에서 냉각시키고 포화 수성 암모늄 클로라이드 용액으로 퀀칭했다. 혼합물을 디클로로메탄으로 추출하고 조합된 유기층을 물 및 염수로 세척한 다음, 무수 마그네슘 설페이트로 건조시키고, 여과하고 고진공에서 농축시켜 N,N-디메틸아세트아미드를 제거했다. 미정제 황색 오일을 메탄올/디클로로메탄에서 실리카 겔 크로마토그래피에 의해 정제하여 4-((S)-2-((S)-2-(6-메톡시-6-옥소헥산아미도)-3- 메틸부탄아미도)프로판아미도)벤질 (S)-3-(벤질옥시)-2-메톡시-14-옥소-6,6a,7,12-테트라하이드로벤조[5,6][1,4]디아제피노[1,2-b]이소퀴놀린-5(14H)-카르복실레이트 (81mg, y = 27%)를 수득했다. MS (m/z): 862.8 $(M + 1)^+$ 860.5 $(M - 1)^-$. UPLC = 1.82 분 (2.5 분 방법).



[0757]

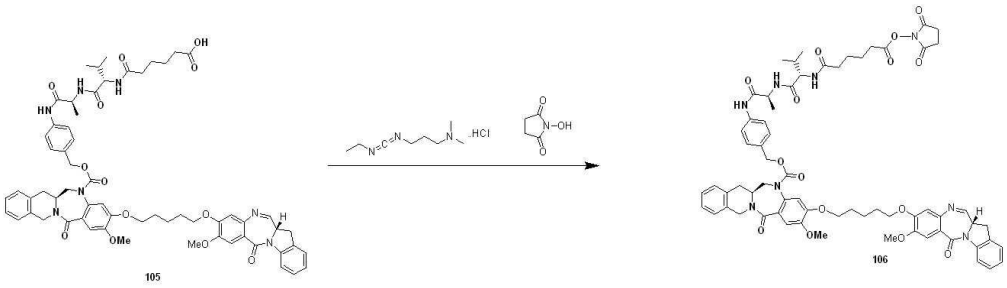
[0758] 무수 메탄올 (2.28 ml) 중의 4-((S)-2-((S)-2-(6-메톡시-6-옥소헥산아미도)-3-메틸부탄아미도)프로판아미도)벤질 (S)-3-(벤질옥시)-2-메톡시-14-옥소-6,6a,7,12-테트라하이드로벤조[5,6][1,4]디아제피노[1,2-b]이소퀴놀린-5(14H)-카르복실레이트 (197 mg, 0.229 mmol)의 용액을 질소로 탈기시키고 탄소 담지 팔라듐 (10%, 24.32 mg,

0.229 mmol)을 첨가했다. 혼합물을 배기시키고 주위 온도에서 수소 풍선하에 (1 atm) 두 시간 동안 교반했다. 반응 혼합물을 여과하고 20% 메탄올/디클로로메탄으로 헹구었다. 여과액을 농축시키고 메탄올/디클로로메탄 중의 실리카 겔 크로마토그래피에 의해 정제하여 화합물 104를 밝은 백색 고체 (111mg, y = 63%)로 수득했다. MS (m/z): 772.8 $(M + 1)^+$, 770.7 $(M - 1)^-$. UPLC = 1.52 분 (2.5 분 방법).



[0759]

[0760] 화합물 105를 두 단계에 걸쳐 화합물 15를 화합물 17로 전환시키는 것과 유사한 접근법으로 화합물 104로부터 제조했다.



[0761]

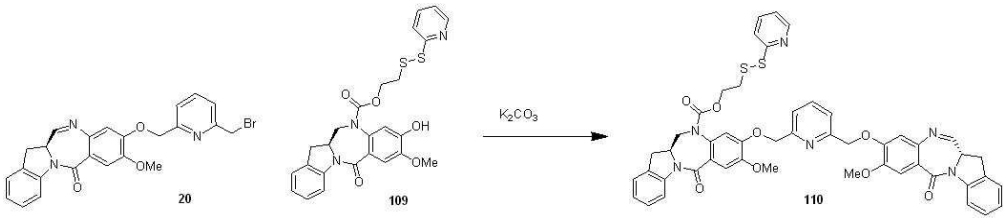
[0762] 무수 디클로로메탄 (1.25 ml) 중의 6-(((S)-1-(((S)-1-((4-((((S)-2-메톡시-3-((5-(((S)-8-메톡시-6-옥소-12a,13-디하이드로-6H-벤조[5,6][1,4]디아제피노[1,2-a]인돌-9-일)옥시)펜틸)옥시)-14-옥소-5,6,6a,7,12,14-헥사하이드로벤조[5,6][1,4]디아제피노[1,2-b]이소퀴놀린-5-카르보닐)옥시)메틸)페닐)아미노)-1-옥소프로판-2-일)아미노)-3-메틸-1-옥소부탄-2-일)아미노)-6-옥소헥산산 (70 mg, 0.062 mmol) 및 N-하이드록시 석신이미드 (21.57 mg, 0.187 mmol)의 용액에 1-에틸-3-(3-디메틸아미노프로필) 카르보디이미드 하이드로클로라이드 (59.9 mg, 0.312 mmol)를 첨가했다. 반응물을 주위 온도에서 질소하에 90 분 동안 교반하고 이를 디클로로메탄으로 희석하고 물로 세척했다. 유기층을 무수 마그네슘 설페이트로 건조시키고, 여과하고 농축시켰다. 미정제 백색 고체를 RP-HPLC (C18 Kromasil, 아세토니트릴/탈이온수, 30 분에 걸쳐 50-65%)에 의해 정제했다. 생성물을 함유하는 분획을 동결시키고 동결건조시켜 순수한 화합물 106을 밝은 백색 고체 (48mg, y = 63% 수율)로 수득했다. MS (m/z): 1121.2 $(M + 1)^+$. UPLC = 1.94 분 (2.5 분 방법).

[0763] **실시예 15. 화합물 108의 합성**

[0764]

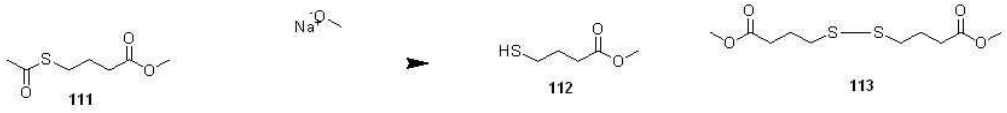
[0765] 무수 N,N-디메틸아세트아미드 (601 μl) 중의 화합물 2 (48.7 mg, 0.099 mmol) 및 (S)-3-하이드록시-2-메톡시-6,6a,7,12-테트라하이드로벤조[5,6][1,4]디아제피노[1,2-b]이소퀴놀린-14(5H)-온 (28 mg, 0.090 mmol)의 용액에 무수 포타슘 카르보네이트 (18.70 mg, 0.135 mmol)를 첨가했다. 혼합물을 18 시간 동안 실온에서 교반했다. 반응 완료시 물을 첨가하고 생성된 고체를 여과하고, 디클로로메탄에 재용해시키고, 물로 세척했다. 유기층을 무수 마그네슘 설페이트로 건조시키고, 여과하고 농축시켰다. 미정제 물질을 메탄올/디클로로메탄에서 실리카 겔 크로마토그래피에 의해 정제하여 화합물 108 (31mg, y=50%)을 수득했다. MS (m/z): 673.4 $(M + 1)^+$. UPLC = 1.63 분 (2.5 분 방법).

[0766] **실시예 16. 화합물 110의 합성**

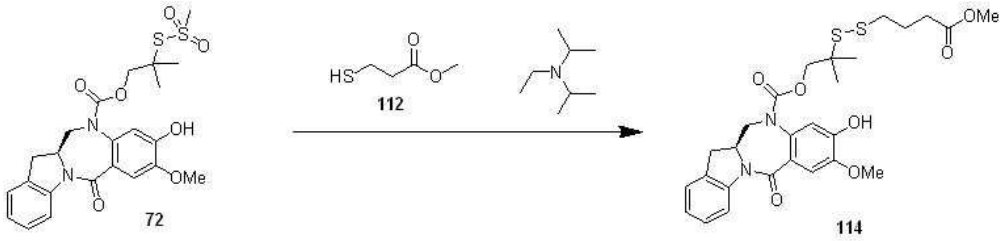
[0767] 

[0768] 무수 N,N-디메틸아세트아미드 (1.76 ml) 중의 화합물 20 (101 mg, 0.212 mmol) 및 2-(피리딘-2-일디설파닐)에틸 (S)-9-하이드록시-8-메톡시-6-옥소-12a,13-디하이드로-6H-벤조[5,6][1,4]디아제피노[1,2-a]인돌-11(12H)-카르복실레이트 (90 mg, 0.177 mmol)의 용액에 포타슘 카르보네이트 (48.8 mg, 0.353 mmol)를 첨가하고 반응물을 주위 온도에서 18 시간 동안 질소하에 교반했다. 반응 혼합물을 물로 희석하고 생성된 백색 고체를 여과했다. 이후 고체를 디클로로메탄에 용해시키고, 분별 깔대기로 옮기고 물로 세척했다. 유기층을 무수 마그네슘 설페이트로 건조시키고 진공에서 농축시켰다. 미정제 물질의 삼분의 일을 RP-HPLC (C18 Kromasil, 아세토니트릴/탈이온수, 30 분에 걸쳐 50-65%)를 통해 정제했다. 생성물을 함유하는 분획을 동결시키고 동결건조시켜 화합물 110 (18mg, y= 33%)을 백색 고체로 수득했다. MS (m/z): 907.9 $(M + 1)^+$. UPLC = 1.91 분 (2.5 분 방법).

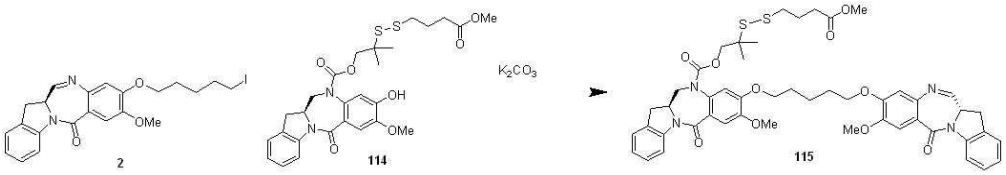
[0769] **실시예 17. 화합물 117의 합성**

[0770] 

[0771] 메탄올 (369 ml) 중의 메틸 4-(아세틸티오)부타노에이트 (2.6 g, 14.75 mmol)의 용액에 소듐 메톡사이드 (0.895 g, 16.23 mmol)를 첨가하고 생성된 투명한 주황색 용액을 실온에서 3.5 시간 동안 교반했다. 혼합물을 건조 농축시킨 다음 디클로로메탄에 재용해시켰다. 유기층을 물로 세 번 세척한 다음 무수 소듐 설페이트로 건조시키고, 여과하고 농축시켜 2:1 티올/디설파이드 혼합물을 황색 오일 (0.82g, 40%)로 수득했고 이를 추가의 정제 없이 사용했다. ^{1}H NMR (400 Hz, $CDCl_3$): δ 33.67 (s, 6H), 2.71 (t, J=7.2Hz, 2H), 2.61-54 (m, 2H), 2.48-2.42 (m, 4H), 2.05-1.99 (m, 2H), 1.98-1.91 (m, 2H), 1.33 (t, J=8.0 Hz, 1H).

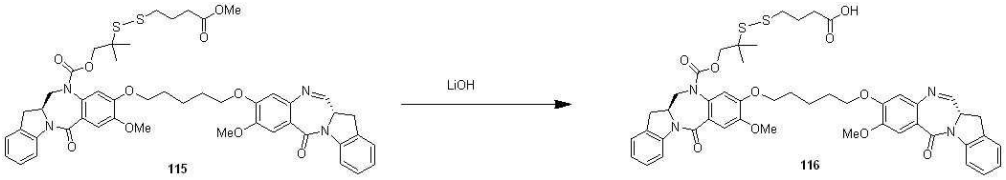
[0772] 

[0773] 무수 디클로로메탄 (13 mL) 중의 2-메틸-2-((메틸설포닐)티오)프로필 (S)-9-하이드록시-8-메톡시-6-옥소-12a,13-디하이드로-6H-벤조[5,6][1,4]디아제피노[1,2-a]인돌-11(12H)-카르복실레이트 (670 mg, 1.323 mmol)의 용액에 디이소프로필에틸아민 (0.461 mL, 2.65 mmol) 및 메틸 3-머캅토프로파노에이트 (477 mg, 1.984 mmol)를 첨가했다. 혼합물을 실온에서 질소하에 18 시간에 걸쳐 교반한 다음 디클로로메탄으로 희석하고 물로 세척했다. 유기층을 무수 마그네슘 설페이트로 건조시키고, 여과하고 농축시켰다. 미정제 물질을 에틸 아세테이트/헥산에서 실리카 겔 크로마토그래피에 의해 정제하여 화합물 114 (0.54g, y = 73%)를 백색 결정질 고체로 수득했다. MS (m/z): 561.3 $(M + 1)^+$ 559.3 $(M -1)^-$ UPLC = 1.67 분 (2.5 분 방법). ^{1}H NMR (400 Hz, d_6-DMSO): δ 9.85 (s, 1H), 8.02 (d, J=8.0Hz, 1H), 7.28 (d, J=7.2Hz, 1H), 7.22 (t, J=7.6Hz, 1H), 7.12 (s, 1H), 7.06 (t, J=7.2Hz, 1H), 6.77 (bs, 1H), 4.38-4.29 (m, 1H), 4.02 (t, J=12.4Hz, 2H), 3.82 (s, 3H), 3.57 (s, 3H), 3.39-3.33 (m, 1H), 2.89 (d, J=16.0Hz, 1H), 2.59 (t, J=6.8Hz, 2H), 2.35 (t, J=7.2Hz, 2H), 1.81-1.76 (m, 2H), 1.17-1.05 (m, 6H).



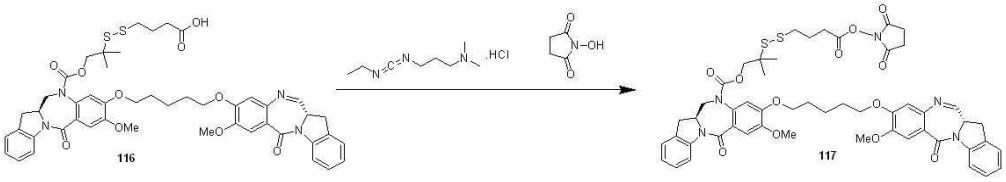
[0774]

[0775] 무수 N,N-디메틸아세트아미드 (1.60 ml) 중의 화합물 2 (105 mg, 0.193 mmol) 및 2-((4-메톡시-4-옥소부틸)디설파닐)-2-메틸프로필 (S)-9-하이드록시-8-메톡시-6-옥소-12a,13-디하이드로-6H-벤조[5,6][1,4]디아제피노[1,2-a]인돌-11(12H)-카르복실레이트 (90 mg, 0.161 mmol)의 현탁액에 포타슘 카르보네이트 (44.4 mg, 0.321 mmol)를 실온에서 질소하에 첨가했다. 혼합물을 18 시간 동안 교반하고 그 후 이를 물로 퀀칭했다. 생성된 백색 고체를 여과한 다음 디클로로메탄에 재용해시키고, 분별 깔대기로 옮기고 물로 세척했다. 유기층을 무수 마그네슘 설페이트로 건조시키고, 여과하고 진공에서 농축시켰다. 미정제 물질을 메탄올/디클로로메탄에서 실리카 겔 크로마토그래피에 의해 정제하여 화합물 115 (0.15g, y = 100%)를 수득했다. MS (m/z): 941.7 $(M + 1)^+$ UPLC = 1.95 분 (2.5 분 방법).



[0776]

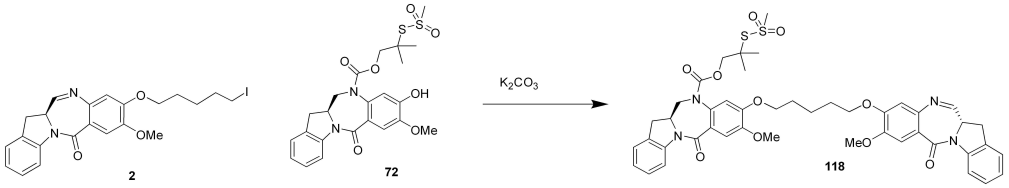
[0777] 무수 테트라하이드로퓨란 (6.25 ml) 및 탈이온수 (2.08 ml) 중의 2-((4-메톡시-4-옥소부틸)디설파닐)-2-메틸프로필 (S)-8-메톡시-9-((5-(((S)-8-메톡시-6-옥소-12a,13-디하이드로-6H-벤조[5,6][1,4]디아제피노[1,2-a]인돌-9-일)옥시)펜틸)옥시)-6-옥소-12a,13-디하이드로-6H-벤조[5,6][1,4]디아제피노[1,2-a]인돌-11(12H)-카르복실레이트--메탄 (180 mg, 0.167 mmol)의 냉각된 용액에 리튬 하이드록사이드 (19.97 mg, 0.834 mmol)를 0 ℃에서 첨가했다. 반응물을 0 ℃로부터 실온까지 세 시간 동안 교반한 후 이를 디클로로메탄 및 탈이온수으로 희석했다. 혼합물을 염산 (0.5 M 수성, 1mL)을 사용하여 pH=3으로 산성화시키고 디클로로메탄 (2 x 20ml)으로 추출했다. 유기층을 물로 세척하고, 무수 마그네슘 설페이트로 건조시키고, 여과하고 농축시켰다. 100% 수율을 가정하여 미정제물을 추가의 정제 없이 진행시켰다. MS (m/z): 927.6 $(M + 1)^+$ 925.6 $(M - 1)^-$. UPLC =1.76 분 (2.5 분 방법).



[0778]

[0779] 무수 디클로로메탄 (3.30 ml) 중의 4-((1-(((S)-8-메톡시-9-((5-(((S)-8-메톡시-6-옥소-12a,13-디하이드로-6H-벤조[5,6][1,4]디아제피노[1,2-a]인돌-9-일)옥시)펜틸)옥시)-6-옥소-11,12,12a,13-테트라하이드로-6H-벤조[5,6][1,4]디아제피노[1,2-a]인돌-11-카르보닐)옥시)-2-메틸프로판-2-일)디설파닐)부탄산 (150 mg, 0.165 mmol) 및 N-하이드록시 석신이미드 (57.0 mg, 0.495 mmol)의 용액에 1-에틸-3-(3-디메틸아미노프로필) 카르보디이미드 하이드로클로라이드 (158 mg, 0.825 mmol)를 첨가하고 혼합물을 세 시간 동안 실온에서 질소하에 교반했다. 반응물을 디클로로메탄으로 희석하고 물로 세척했다. 유기층을 무수 마그네슘 설페이트로 건조시키고, 여과하고 농축시켰다. 미정제 물질의 절반을 RP-HPLC (C18, 아세토니트릴/탈이온수)에 의해 정제했다. DP를 함유하는 분획을 동결시키고 동결건조시켜 화합물 117 (38mg, y = 46%)을 백색 고체로 수득했다. MS (m/z): 1006.7 $(M + 1)^+$. UPLC =1.89 분 (2.5 분 방법).

[0780] **실시예 18. 화합물 118의 합성**

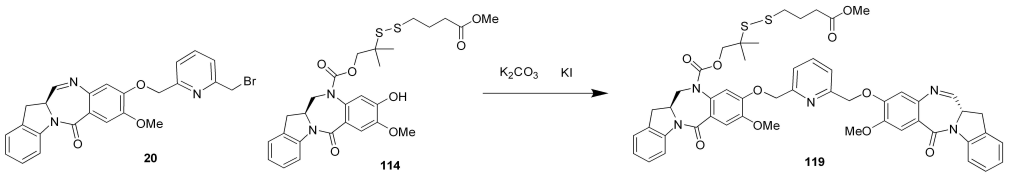


[0781]

[0782] 무수 N,N-디메틸아세트아미드 (1.77 ml) 중의 화합물 2 (116 mg, 0.213 mmol) 및 2-메틸-2-((메틸설포닐)티오)프로필 (S)-9-하이드록시-8-메톡시-6-옥소-12a,13-디하이드로-6H-벤조[5,6][1,4]디아제피노[1,2-a]인돌-11(12H)-카르복실레이트 (90 mg, 0.178 mmol)의 현탁액에 무수 포타슘 카르보네이트 (49.1 mg, 0.355 mmol)를 첨가하고 반응물을 18 시간 동안 실온에서 질소하에 교반했다. 물을 반응 혼합물에 첨가하고 생성된 백색 고체를 여과하고, 디클로로메탄에 재용해시키고, 분별 깔대기로 옮기고, 물로 세척했다. 유기층을 무수 마그네슘 설페이트로 건조시키고 진공에서 농축시켰다. 미정제 물질의 절반을 RP-HPLC (C18 Kromasil, 아세토니트릴/탈이온수, 30 분에 걸쳐 55-65%)를 통해 정제했다. 순수한 분획을 디클로로메탄으로 추출하고, 무수 마그네슘 설페이트로 건조시키고, 여과하고 농축시켜 화합물 118 (45mg, y = 58%)을 백색 고체로 수득했다.

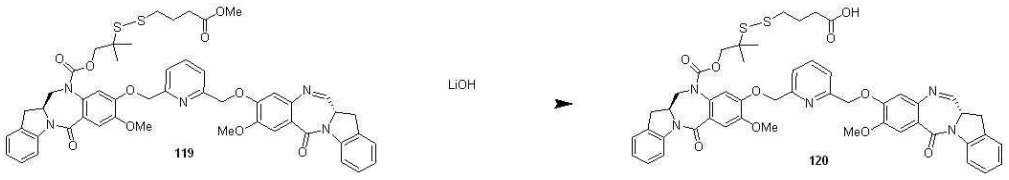
[0783] MS (m/z): 869.6 $(M + 1)^+$. UPLC =1.85 분 (2.5 분 방법).

[0784] **실시예 19. 화합물 121의 합성**



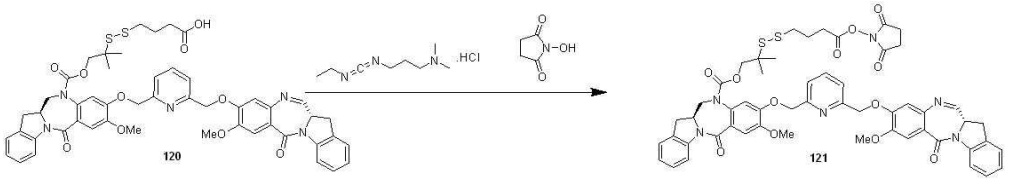
[0785]

[0786] 무수 N,N-디메틸아세트아미드 (1.96 ml) 중의 화합물 20 (132 mg, 0.235 mmol) 및 2-((4-메톡시-4-옥소부틸)디설파닐)-2-메틸프로필 (S)-9-하이드록시-8-메톡시-6-옥소-12a,13-디하이드로-6H-벤조[5,6][1,4]디아제피노[1,2-a]인돌-11(12H)-카르복실레이트 (110 mg, 0.196 mmol)의 현탁액에 무수 포타슘 카르보네이트 (54.2 mg, 0.392 mmol)를 첨가하고 반응물을 18 시간 동안 실온에서 질소하에 교반했다. 물을 반응 혼합물에 첨가하고 생성된 백색 고체를 여과하고, 디클로로메탄에 재용해시키고 물로 세척했다. 유기층을 무수 마그네슘 설페이트로 건조시키고 진공에서 농축시켰다. 미정제 물질을 플래시 크로마토그래피 (메탄올/디클로로메탄)에 의해 정제하여 화합물 119 (172mg, y= 90%)를 수득했다. MS (m/z): 976.7 $(M + 1)^+$. UPLC =1.91 분 (2.5 분 방법).



[0787]

[0788] 무수 테트라하이드로퓨란 (6.62 ml) 및 물 (2.20 ml) 중의 화합물 119 (200 mg, 0.177 mmol)을 빙조에서 0 ℃로 냉각시키고 리튬 하이드록사이드 (21.14 mg, 0.883 mmol)를 첨가했다. 반응물을 0 ℃로부터 실온까지 세 시간 동안 교반한 후 이를 디클로로메탄 및 탈이온수으로 희석했다. 혼합물을 염산 (0.5 M 수성, 1ml)을 사용하여 pH=3으로 산성화시킨 다음 디클로로메탄 (2 x 20ml)으로 추출했다. 유기층을 물로 세척하고, 무수 마그네슘 설페이트로 건조시키고, 여과하고 농축시켜 미정제 화합물 120을 수득했고 이를 정제 없이 다음 단계에서 사용했다. MS (m/z): 962.6 $(M + 1)^+$ 960.7 $(M - 1)^-$. UPLC =1.73 분 (2.5 분 방법).



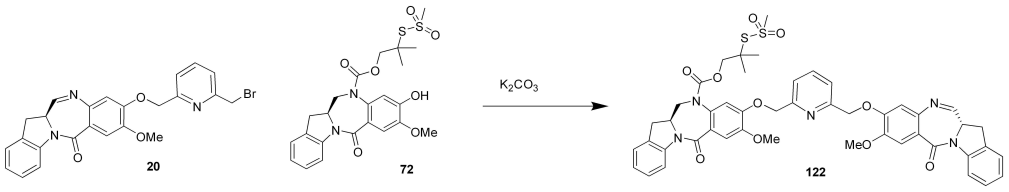
[0789]

[0790] 무수 디클로로메탄 (3284 μl) 중의 4-((1-(((S)-8-메톡시-9-((6-((((S)-8-메톡시-6-옥소-12a,13-디하이드로-

6H-벤조[5,6][1,4]디아제피노[1,2-a]인돌-9-일)옥시)메틸)피리딘-2-일)메톡시)-6-옥소-11,12,12a,13-테트라하이드로-6H-벤조[5,6][1,4]디아제피노[1,2-a]인돌-11-카르보닐)옥시)-2-메틸프로판-2-일)디설파닐)부탄산 (155 mg, 0.164 mmol) 및 N-하이드록시 석신이미드 (56.7 mg, 0.493 mmol)의 용액에 1-에틸-3-(3-디메틸아미노프로필) 카르보디이미드 하이드로클로라이드 (157 mg, 0.821 mmol)를 첨가했다. 반응물을 실온에서 세 시간 동안 교반한 다음 디클로로메탄으로 희석하고 물로 세척했다. 유기층을 무수 마그네슘 설페이트로 건조시키고, 여과하고 농축시켰다. 생성된 미정제 물질의 절반을 RP-HPLC (Kromasil C18, 아세토니트릴/탈이온수)에 의해 정제했다. 생성물을 함유하는 분획을 동결시키고 동결건조시켜 화합물 121 (43.5mg, y = 50%)을 백색 고체로 수득했다. MS (m/z): 1041.7 $(M + 1)^+$. UPLC =1.85 분 (2.5 분 방법).

[0791]

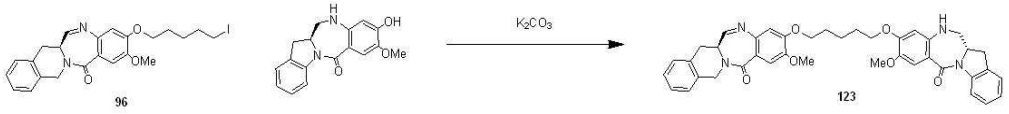
[0792] **실시예 20. 화합물 122의 합성**



[0793]

[0794] 무수 N,N-디메틸아세트아미드 (1.24 ml) 중의 화합물 20 (71.4 mg, 0.149 mmol) 및 2-메틸-2-((메틸설포닐)티오)프로필 (S)-9-하이드록시-8-메톡시-6-옥소-12a,13-디하이드로-6H-벤조[5,6][1,4]디아제피노[1,2-a]인돌-11(12H)-카르복실레이트 (63 mg, 0.124 mmol)의 현탁액에 무수 포타슘 카르보네이트 (34.4 mg, 0.249 mmol)를 첨가하고 반응물을 18 시간 동안 실온에서 질소하에 교반했다. 물을 반응 혼합물에 첨가하고 생성된 백색 고체를 여과하고, 디클로로메탄에 재용해시키고, 분별 깔대기로 옮기고, 물로 세척했다. 유기층을 무수 마그네슘 설페이트로 건조시키고, 여과하고 진공에서 농축시켰다. 미정제물을 RP-HPLC (C18 Kromasil, 아세토니트릴/탈이온수, 30 분에 걸쳐 50-70%)를 통해 정제했다. DP를 함유하는 분획을 동결시키고 동결건조시켜 화합물 122를 백색 고체 (64mg, y= 57%)로 수득했다. MS (m/z): 904.6 $(M + 1)^+$. UPLC =1.85 분 (2.5 분 방법).

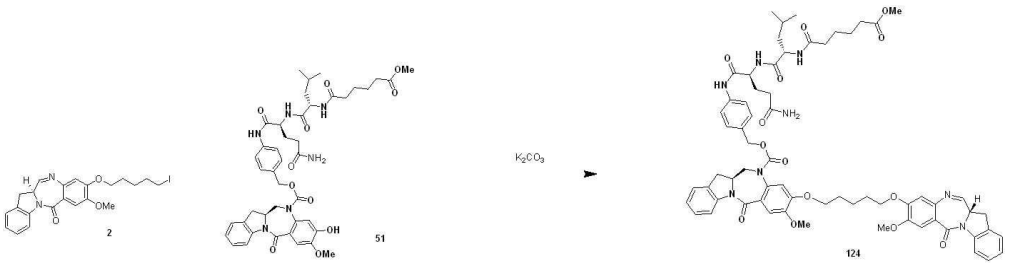
[0795] **실시예 21. 화합물 123의 합성**



[0796]

[0797] 무수 N,N-디메틸아세트아미드 (1.58 ml) 중의 화합물 96 및 (S)-9-하이드록시-8-메톡시-11,12,12a,13-테트라하이드로-6H-벤조[5,6][1,4]디아제피노[1,2-a]인돌-6-온 (78 mg, 0.262 mmol)의 용액에 포타슘 카르보네이트 (49.3 mg, 0.357 mmol)를 첨가했다. 반응물을 18 시간 동안 실온에서 교반하고 그 후 물로 희석했다. 생성된 고체를 여과한 다음 디클로로메탄에 재용해시키고 물로 세척했다. 유기층을 무수 마그네슘 설페이트로 건조시키고, 여과하고 농축시켰다. 미정제 물질을 RP-HPLC (아세토니트릴/탈이온수, 30 분에 걸쳐 55-75%)에 의해 정제하고 생성물을 함유하는 분획을 조합하고 디클로로메탄으로 추출했다. 유기층을 무수 마그네슘 설페이트로 건조시키고, 여과하고 농축시켜 화합물 123 (75mg, y = 46%)을 수득했다. MS (m/z): 673.6 $(M + 1)^+$. UPLC = 1.66 분 (2.5 분 방법).

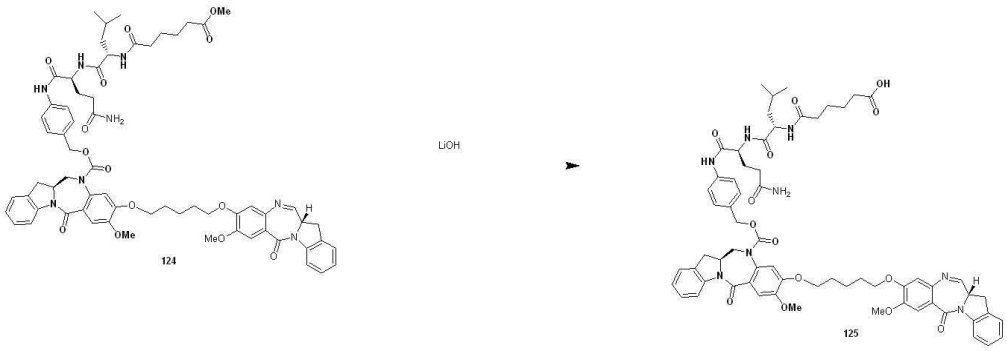
[0798] **실시예 22. 화합물 126의 합성**



[0799]

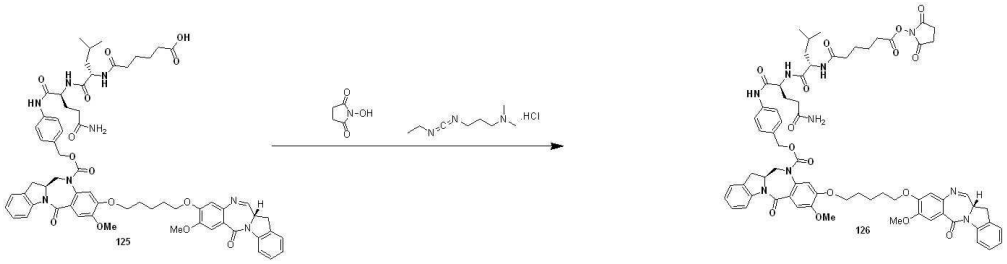
[0800] 무수 N,N-디메틸아세트아미드 (965 μl) 중의 4-((S)-5-아미노-2-((S)-2-(6-메톡시-6-옥소헥산아미도)-4-메틸펜

탄아미도)-5-옥소펜탄아미도)벤질 (S)-9-하이드록시-8-메톡시-6-옥소-12a,13-디하이드로-6H-벤조[5,6][1,4]디아제피노[1,2-a]인돌-11(12H)-카르복실레이트 (80 mg, 0.097 mmol) 및 화합물 2 (56.8 mg, 0.116 mmol)의 용액에 포타슘 카르보네이트 (26.7 mg, 0.193 mmol)를 첨가하고 반응물을 18 시간 동안 실온에서 질소하에 교반했다. 물을 반응 혼합물에 첨가하고 생성된 고체를 여과한 다음, 20% 메탄올/디클로로메탄에 재용해시키고, 분별 깔대기로 옮기고, 물로 세척했다. 유기층을 무수 마그네슘 설페이트로 건조시키고 진공에서 농축시켰다. 미정제 물질을 실리카 겔 크로마토그래피 (12g 실리카 컬럼, 메탄올/디클로로메탄)를 통해 정제하여 화합물 124 (70mg, y= 61%)를 수득했다. MS (m/z): 1192.0 $(M + 1)^+$. UPLC = 5.55 분 (10 분 방법).



[0801]

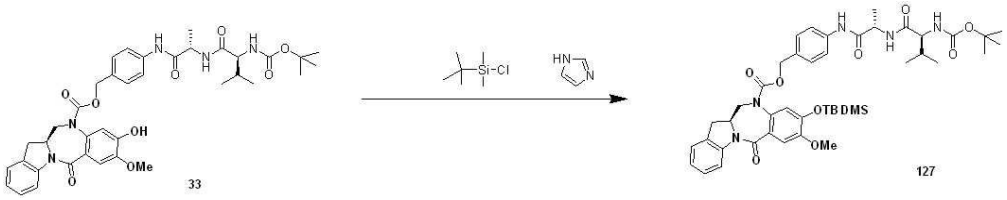
[0802] 무수 테트라하이드로퓨란 (1.88 ml) 및 탈이온수 (630 μl) 중의 4-((S)-5-아미노-2-((S)-2-(6-메톡시-6-옥소헥산아미도)-4-메틸펜탄아미도)-5-옥소펜탄아미도)벤질 (S)-8-메톡시-9-((5-(((S)-8-메톡시-6-옥소-12a,13-디하이드로-6H-벤조[5,6][1,4]디아제피노[1,2-a]인돌-9-일)옥시)펜틸)옥시)-6-옥소-12a,13-디하이드로-6H-벤조[5,6][1,4]디아제피노[1,2-a]인돌-11(12H)-카르복실레이트 (60 mg, 0.050 mmol)의 용액에 리튬 하이드록사이드 (3.62 mg, 0.151 mmol)를 첨가했다. 90 분 동안 실온에서 교반한 후 혼합물을 디클로로메탄 중의 30% 메탄올 및 탈이온수로 희석하고 염산 (0.5 M 수성)을 사용하여 pH=3로 산성화시켰다. 혼합물을 30% 메탄올/디클로로메탄 (3 x 50mL)으로 추출했다. 유기층을 물로 세척하고, 무수 마그네슘 설페이트로 건조시키고, 셀라이트를 통해 여과하고 증발시켰다. 100% 수율을 가정하여 미정제 생성물 125를 추가의 정제 없이 진행시켰다. MS (m/z): 1178.0 $(M + 1)^+$. UPLC = 5.53 분 (10 분 방법).



[0803]

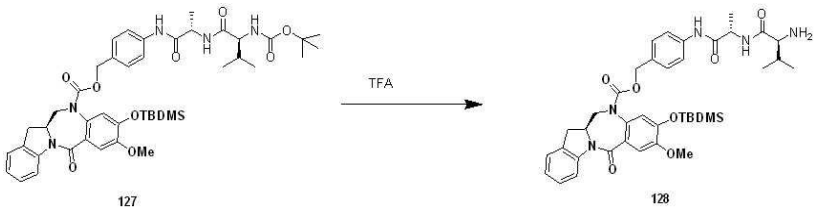
[0804] 무수 디클로로메탄 (750 μl) 및 무수 N,N-디메틸포름아미드 (250 μl) 중의 화합물 125 (58.9 mg, 0.05 mmol) 및 N-하이드록시 석신이미드 (17.26 mg, 0.150 mmol)의 용액에 1-에틸-3-(3-디메틸아미노프로필) 카르보디이미드 하이드로클로라이드 (47.9 mg, 0.250 mmol)를 첨가했다. 반응물을 실온에서 질소하에 세 시간 동안 교반되도록 하고, 혼합물을 농축시켜 디클로로메탄을 제거했다. 아세토니트릴 및 탈이온수를 첨가하고 혼합물을 동결시키고 동결건조시켰다. 미정제 물질을 RP-HPLC (C18 Kromasil, 아세토니트릴/탈이온수)에 의해 정제했다. DP를 함유하는 분획을 동결시키고 동결건조시켜 순수한 화합물 126 (32mg, 2 단계에 걸쳐 y = 51%)을 수득했다. MS (m/z): 1275.0 $(M + 1)^+$. UPLC = 5.77 분 (10 분 방법).

[0805] 실시예 23. 화합물 134의 합성



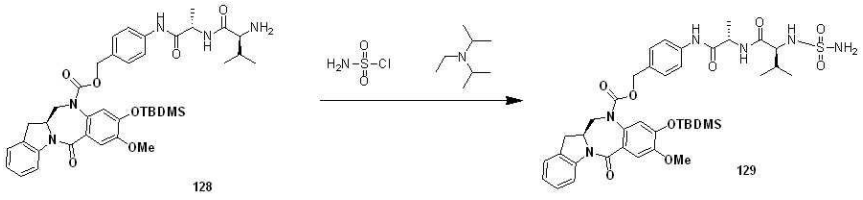
[0806]

[0807] 무수 디메틸포름아미드 (2.61 ml) 중의 4-((S)-2-((S)-2-((tert-부톡시카르보닐)아미노)-3-메틸부탄아미도)프로판아미도)벤질 (S)-9-하이드록시-8-메톡시-6-옥소-12a,13-디하이드로-6H-벤조[5,6][1,4]디아제피노[1,2-a]인돌-11(12H)-카르복실레이트 (0.28 g, 0.391 mmol) 및 t-부틸디메틸실릴 클로라이드 (0.077 g, 0.509 mmol)의 용액에 이미다졸 (0.067 g, 0.978 mmol)을 첨가했다. 반응 혼합물을 주위 온도에서 20 시간 동안 교반하고 에틸 아세테이트로 추출했다. 유기층을 물 및 염수 용액으로 세척한 다음, 무수 마그네슘 설페이트로 건조시키고, 여과하고 농축시켰다. 미정제 물질을 에틸 아세테이트/헥산에서 실리카 겔 크로마토그래피에 의해 정제하여 화합물 127을 백색 결정질 고체 (0.30g, y = 92%)로 수득했다. MS (m/z): 830.8 $(M + 1)^+$. UPLC = 2.04 분 (2.5 분 방법).

[0808] 

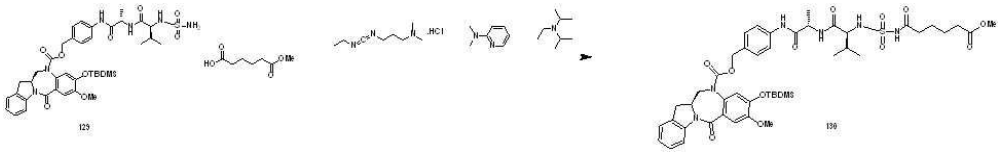
127 128

[0809] 무수 디클로로메탄 (2.5ml) 중의 4-((S)-2-((S)-2-((tert-부톡시카르보닐)아미노)-3-메틸부탄아미도)프로판아미도)벤질 (S)-9-((tert-부틸디메틸실릴)옥시)-8-메톡시-6-옥소-12a,13-디하이드로-6H-벤조[5,6][1,4]디아제피노[1,2-a]인돌-11(12H)-카르복실레이트 (0.30 g, 0.361 mmol)의 용액을 빙조에서 0 ℃로 냉각시켰다. 무수 디클로로메탄 (2.5ml) 중의 트리플루오로아세트산 (1.807 ml)의 새로운 혼합물을 첨가했다. 30 분 동안 0 ℃에서 질소하에 교반한 후 반응물을 얼음/소듐 비카르보네이트 혼합물에 부은 다음 디클로로메탄으로 추출했다. 추출물을 염수로 세척하고, 무수 마그네슘 설페이트로 건조시키고, 여과하고 농축시켰다. 100% 수율을 가정하여 미정제 화합물 128을 추가의 정제 없이 진행시켰다. MS (m/z): 730.6 $(M + 1)^+$. UPLC = 1.53 분 (2.5 분 방법).

[0810] 

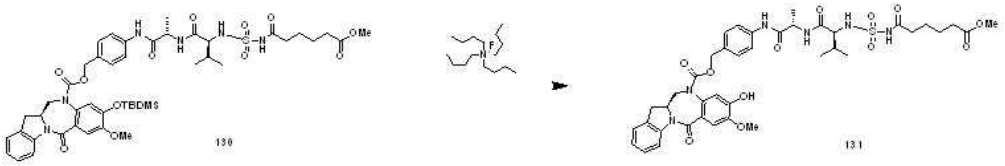
128 129

[0811] 무수 N,N-디메틸아세트아미드 (1.050 ml) 중의 4-((S)-2-((S)-2-아미노-3-메틸부탄아미도)프로판아미도)벤질 (S)-9-((tert-부틸디메틸실릴)옥시)-8-메톡시-6-옥소-12a,13-디하이드로-6H-벤조[5,6][1,4]디아제피노[1,2-a]인돌-11(12H)-카르복실레이트 (0.23 g, 0.315 mmol)의 용액에 디이소프로필에틸아민 (0.137 ml, 0.788 mmol)을 첨가했다. 반응물을 빙조에서 0 ℃로 냉각시킨 다음, 무수 N,N-디메틸아세트아미드 (0.25ml) 중의 설파모일 클로라이드 (0.073 g, 0.630 mmol)를 첨가했다. 혼합물을 0 ℃에서 20 분 동안 이후 실온에서 20 시간 동안 교반하고 그 후 이를 포화 수성 소듐 비카르보네이트 용액으로 퀀칭했다. 혼합물을 에틸 아세테이트로 추출하고 추출물을 물 및 염수로 세척했다. 유기층을 무수 마그네슘 설페이트로 건조시키고, 여과하고 농축시켰다. 100% 수율을 가정하여 미정제물을 추가의 정제 없이 진행시켰다. MS (m/z): 809.8 $(M + 1)^+$ 807.8 $(M - 1)^-$. UPLC = 1.84 분 (2.5 분 방법).

[0812] 

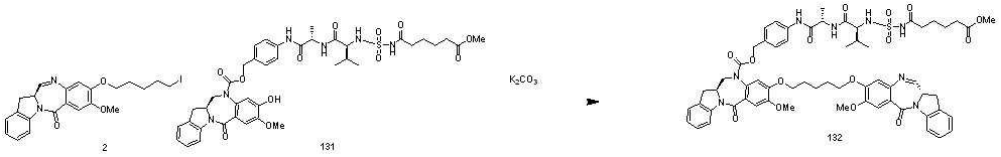
[0813] 무수 디클로로메탄 (1.895 ml) 중의 4-((S)-2-((S)-3-메틸-2-(설파모일아미노)부탄아미도)프로판아미도)벤질 (S)-9-((tert-부틸디메틸실릴)옥시)-8-메톡시-6-옥소-12a,13-디하이드로-6H-벤조[5,6][1,4]디아제피노[1,2-a]인돌-11(12H)-카르복실레이트 (0.23 g, 0.284 mmol) 및 모노-메틸 아디페이트 (0.063 ml, 0.426 mmol)의 용액에 1-에틸-3-(3-디메틸아미노프로필) 카르보디이미드 하이드로클로라이드 (0.082 g, 0.426 mmol), 4-디메틸아미노피리딘 (0.017 g, 0.142 mmol)를 첨가하고 디이소프로필에틸아민 (0.059 ml, 0.341 mmol)을 첨가했다. 반응 혼합물을 주위 온도에서 20 시간 동안 교반하고, 이를 디클로로메탄으로 희석하고 물 및 염수로 세척했다. 유기층을 무수 소듐 설페이트로 건조시키고 감압하에 농축시켰다. 미정제 물질을 메탄올/디클로로메탄에서 실리

카 겔 크로마토그래피에 의해 정제하여 4-((S)-2-((S)-2-((N-(6-메톡시-6-옥소헥사노일)설파모일)아미노)-3-메틸부탄아미도)프로판아미도)벤질 (S)-9-((tert-부틸디메틸실릴)옥시)-8-메톡시-6-옥소-12a,13-디하이드로-6H-벤조[5,6][1,4]디아제피노[1,2-a]인돌-11(12H)-카르복실레이트 (86mg, 4 단계에 걸쳐 y = 29%)을 수득했다. MS (m/z): 952.0 $(M + 1)^+$ 949.9 $(M - 1)^-$. UPLC = 1.92 분 (2.5 분 방법).



[0814]

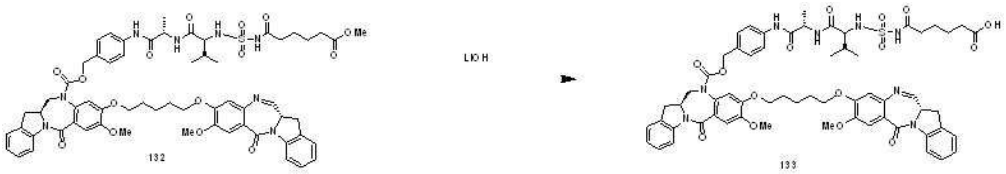
[0815] 무수 테트라하이드로퓨란 (904 μl) 중의 4-((S)-2-((S)-2-((N-(6-메톡시-6-옥소헥사노일)설파모일)아미노)-3-메틸부탄아미도)프로판아미도)벤질 (S)-9-((tert-부틸디메틸실릴)옥시)-8-메톡시-6-옥소-12a,13-디하이드로-6H-벤조[5,6][1,4]디아제피노[1,2-a]인돌-11(12H)-카르복실레이트 (86 mg, 0.090 mmol)의 용액을 빙조 (0 ℃)에서 냉각시키고 테트라부틸암모늄 플루오라이드 용액 (테트라하이드로퓨란 중의 1M, 181 μl, 0.181 mmol)을 첨가했다. 혼합물을 두 시간 동안 0 ℃에서 질소하에 교반했다. 반응 혼합물을 포화 수성 암모늄 클로라이드 용액으로 퀀칭하고 에틸 아세테이트로 추출했다. 유기 추출물을 염수로 세척하고, 무수 마그네슘 설페이트로 건조시키고, 여과하고 농축시켰다. 미정제 물질을 메탄올/디클로로메탄에서 실리카 겔 크로마토그래피에 의해 정제하여 4-((S)-2-((S)-2-((N-(6-메톡시-6-옥소헥사노일)설파모일)아미노)-3-메틸부탄아미도)프로판아미도)벤질 (S)-9-하이드록시-8-메톡시-6-옥소-12a,13-디하이드로-6H-벤조[5,6][1,4]디아제피노[1,2-a]인돌-11(12H)-카르복실레이트 (59mg, y =78%)를 수득했다. MS (m/z): 837.8 $(M + 1)^+$ 835.7 $(M - 1)^-$. UPLC = 1.54 분 (2.5 분 방법).



[0816]

[0817] 무수 N,N-디메틸아세트아미드 (705 μl) 중의 (S)-9-((5-아이오도펜틸)옥시)-8-메톡시-12a,13-디하이드로-6H-벤조[5,6][1,4]디아제피노[1,2-a]인돌-6-온 (44.9 mg, 0.092 mmol) E003650-18 및 4-((S)-2-((S)-2-((N-(6-메톡시-6-옥소헥사노일)설파모일)아미노)-3-메틸부탄아미도)프로판아미도)벤질 (S)-9-하이드록시-8-메톡시-6-옥소-12a,13-디하이드로-6H-벤조[5,6][1,4]디아제피노[1,2-a]인돌-11(12H)-카르복실레이트 (59 mg, 0.070 mmol)의 용액에 무수 포타슘 카르보네이트 (19.49 mg, 0.141 mmol)를 첨가하고 반응물을 18 시간 동안 실온에서 교반했다.

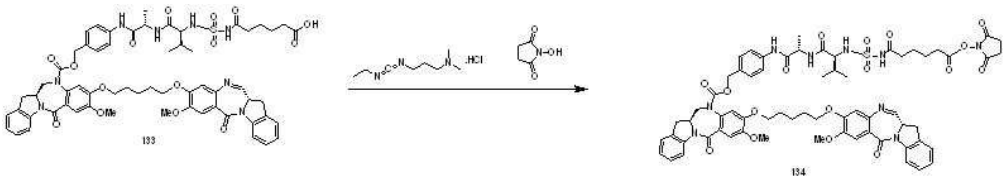
[0818] 반응 혼합물을 물로 희석하고 디클로로메탄으로 추출했다. 추출물을 물로 세척하고, 무수 마그네슘 설페이트로 건조시키고 진공에서 농축시켰다. 미정제 물질을 메탄올/디클로로메탄에서 실리카 겔 크로마토그래피에 의해 정제하여 화합물 132 (42mg, y = 50%)를 백색 고체로 수득했다. MS (m/z): 1200.2 $(M + 1)^+$ UPLC = 1.74 분 (2.5 분 방법).



[0819]

[0820] 무수 테트라하이드로퓨란 (875 μl) 및 탈이온수 (292 μl) 중의 4-((S)-2-((S)-2-((N-(6-메톡시-6-옥소헥사노일)설파모일)아미노)-3-메틸부탄아미도)프로판아미도)벤질 (S)-8-메톡시-9-((5-(((S)-8-메톡시-6-옥소-12a,13-디하이드로-6H-벤조[5,6][1,4]디아제피노[1,2-a]인돌-9-일)옥시)펜틸)옥시)-6-옥소-12a,13-디하이드로-6H-벤조[5,6][1,4]디아제피노[1,2-a]인돌-11(12H)-카르복실레이트 (28 mg, 0.023 mmol)의 용액을 빙조에서 냉각시키고 리튬 하이드록사이드 (1.677 mg, 0.070 mmol)를 첨가했다. 반응물을 0 ℃로부터 실온까지 세 시간 동안 교반한 후 이를 디클로로메탄 및 탈이온수으로 희석했다. 혼합물을 염산 (0.5 M 수성, 1mL)을 사용하여 pH=3으로 산성화시키고 디클로로메탄 (2x~20mL) 중의 20% 메탄올로 추출했다. 유기층을 물로 세척하고, 무수 마그네

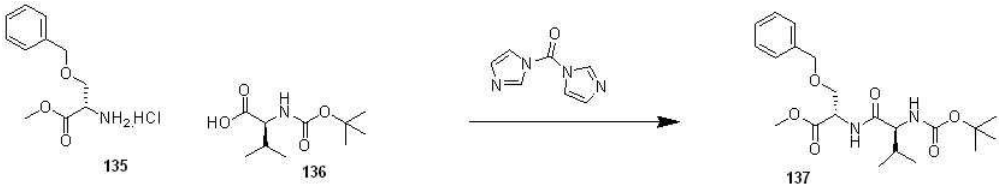
슘 설페이트로 건조시키고, 여과하고 농축시켜 화합물 133 (17.6mg, y = 63%)을 수득했고, 이를 추가의 정제 없이 사용했다. MS (m/z): 1186.3 $(M + 1)^+$ UPLC = 1.67 분 (2.5 분 방법).



[0821]

[0822] 무수 디클로로메탄 (607 μl) 중의 6-((N-((S)-1-(((S)-1-((4-((((S)-8-메톡시-9-((5-(((S)-8-메톡시-6-옥소-12a,13-디하이드로-6H-벤조[5,6][1,4]디아제피노[1,2-a]인돌-9-일)옥시)펜틸)옥시)-6-옥소-11,12,12a,13-테트라하이드로-6H-벤조[5,6][1,4]디아제피노[1,2-a]인돌-11-카르보닐)옥시)메틸)페닐)아미노)-1-옥소프로판-2-일)아미노)-3-메틸-1-옥소부탄-2-일)설파모일)아미노)-6-옥소헥산산 (18 mg, 0.015 mmol)의 용액에 N-하이드록시석신이미드 (5.24 mg, 0.046 mmol) 및 1-에틸-3-(3-디메틸아미노프로필) 카르보디이미드 하이드로클로라이드 (14.56 mg, 0.076 mmol)를 첨가했다. 반응 혼합물을 90 분 동안 실온에서 질소하에 교반한 다음 디클로로메탄으로 희석하고 물로 세척했다. 유기층을 무수 마그네슘 설페이트로 건조시키고, 여과하고 농축시켰다. 미정제 물질을 RP-HPLC (아세토니트릴/물에서 C18, 30 분에 걸쳐 50-70%)에 의해 정제하고 생성물을 함유하는 분획을 조합하고, 동결시키고 동결건조시켜 화합물 134 (5.3mg, y = 27%)를 수득했다. MS (m/z): 1283.3 $(M + 1)^+$ UPLC = 1.75 분 (2.5 분 방법).

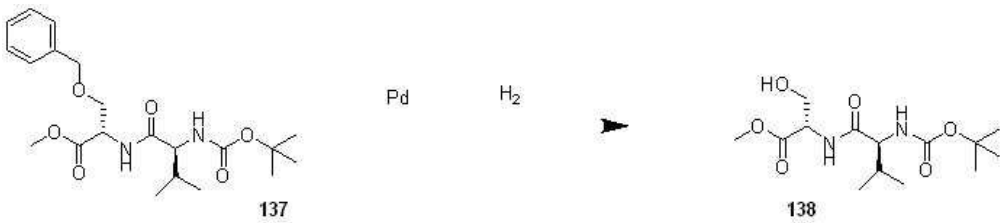
[0823] **실시예 24. 화합물 147의 합성**



[0824]

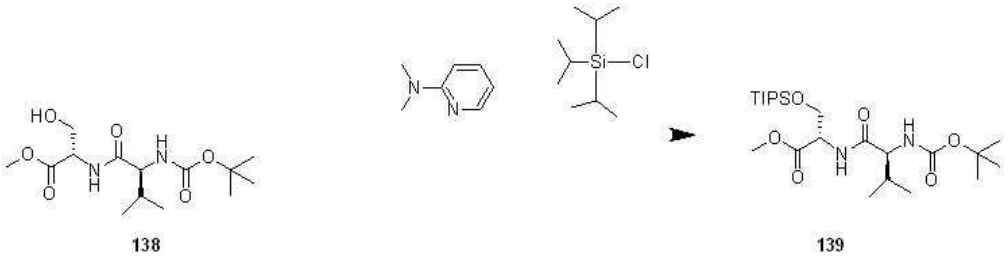
[0825] 디클로로메탄 (78 ml) 중의 (tert-부톡시카르보닐)-L-발린 (8.5 g, 39.1 mmol) (Boc-Val-OH)의 용액에 1,1'-카르보닐디이미다졸 (7.61 g, 46.9 mmol)을 실온에서 일부분씩 첨가했다.

[0826] 반응물을 실온에서 질소하에 30 분 동안 교반했다. 디클로로메탄 (19.56 ml) 중의 메틸 O-벤질-L-세리네이트 하이드로클로라이드 (9.90 g, 40.3 mmol) ChemImpex를 첨가하고 혼합물을 질소하에 추가 18 시간 동안 실온에서 교반했다. 반응물을 디클로로메탄으로 희석하고, 염산 (1 M 수성), 포화 수성 소듐 비카르보네이트 및 염수로 세척했다. 유기층을 무수 마그네슘 설페이트로 건조시키고, 여과하고 농축시켜 메틸 O-벤질-N-((tert-부톡시카르보닐)-L-발릴)-L-세리네이트 17.8g을 백색 고체로 수득했다. 100% 수율을 가정하여 미정제물을 추가의 정제 없이 진행시켰다. MS (m/z): 409.6 $(M + 1)^+$ UPLC = 1.60 분 (2.5 분 방법).



[0827]

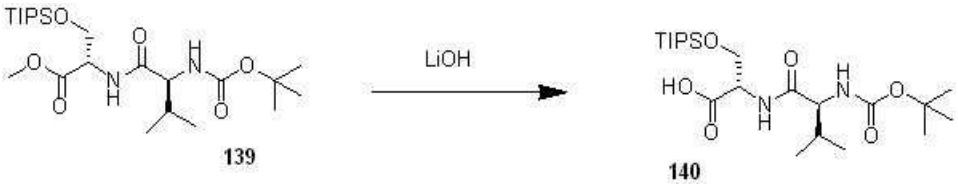
[0828] 무수 메탄올 (120 ml) 중의 메틸 O-벤질-N-((tert-부톡시카르보닐)-L-발릴)-L-세리네이트 (12.7 g, 31.1 mmol)의 용액에 건조 탄소 담지 팔라듐 (10%, 1.654 g, 1.554 mmol)을 첨가했다. 흑색 현탁액을 탈기시키고 수소로 세 번 퍼지했다. 혼합물을 수소 풍선하에 (1atm) 실온에서 18 시간 동안 교반하고 그 후 셀라이트를 통해 여과하고 메탄올로 헹구어 메틸 (tert-부톡시카르보닐)-L-발릴-L-세리네이트 (10.6g)를 끈적한 백색 고체로 수득했다. 100% 수율을 가정하여 미정제물을 추가의 정제 없이 진행시켰다.



138 139

[0829]

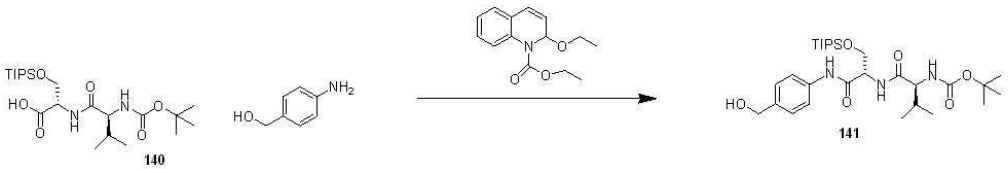
[0830] 무수 디메틸포름아미드 (100 ml) 중의 메틸 (tert-부톡시카르보닐)-L-발릴-L-세리네이트 (4 g, 12.56 mmol)의 용액에 트리이소프로필실릴 클로라이드 (4.16 ml, 18.85 mmol) 및 4-디메틸아미노피리딘 (4.60 g, 37.7 mmol)을 첨가했다. 혼합물을 18 시간 동안 실온에서 아르곤하에 교반했다. 이후 에틸 아세테이트로 희석하고 물 및 염수로 세척했다. 유기층을 무수 마그네슘 설페이트로 건조시키고, 여과하고 농축시켰다. 미정제물을 에틸 아세테이트/헥산에서 실리카 겔 크로마토그래피에 의해 정제하여 메틸 N-((tert-부톡시카르보닐)-L-발릴)-O-(트리이소프로필실릴)-L-세리네이트 (5.9g, y = 99%)를 백색 고체로 수득했다.



139 140

[0831]

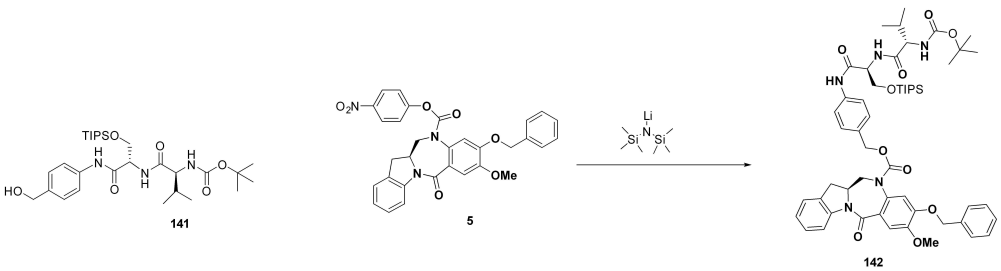
[0832] 테트라하이드로퓨란 (237 ml) 및 탈이온수 (118 ml) 중의 메틸 N-((tert-부톡시카르보닐)-L-발릴)-O-(트리이소프로필실릴)-L-세리네이트 (5.9 g, 12.43 mmol)의 용액을 빙조에서 0 ℃로 냉각시켰다. 리튬 하이드록사이드 (0.893 g, 37.3 mmol)를 첨가하고 반응물을 2.5 시간 동안 0 ℃에서 교반했다. 혼합물을 물로 희석하고 염산 (1M 수성)으로 산성화했다. 이후 이를 에틸 아세테이트로 추출했다. 추출물을 염수로 세척하고, 무수 마그네슘 설페이트로 건조시키고, 여과하고 농축시켜 tert-부틸 ((S)-1-(((S)-1-((4-(하이드록시메틸)페닐)아미노)-1-옥소-3-((트리이소프로필실릴)옥시)프로판-2-일)아미노)-3-메틸-1-옥소부탄-2-일)카르바메이트 (5.5g, 96%)를 백색 결정질 고체로 수득했고 이를 추가의 정제 없이 사용했다.



140 141

[0833]

[0834] 무수 디클로로메탄 (196 ml) 중의 tert-부틸 ((S)-1-(((S)-1-((4-(하이드록시메틸)페닐)아미노)-1-옥소-3-((트리이소프로필실릴)옥시)프로판-2-일)아미노)-3-메틸-1-옥소부탄-2-일)카르바메이트 및 EEDQ (5.62 g, 22.74 mmol)의 용액을 실온에서 한 시간 동안 교반했다. 이후 (4-아미노페닐)메탄올 (1.4 g, 11.37 mmol)을 첨가하고 혼합물을 추가 18 시간 동안 실온에서 교반했다. 반응물을 건조 농축시킨 다음, 디클로로메탄에 재용해시키고 셀라이트를 통해 여과했다. 여과액을 증발시키고 에틸 아세테이트/헥산 중에서 실리카 겔 크로마토그래피에 의해 정제하여 tert-부틸 ((S)-1-(((S)-1-((4-(하이드록시메틸)페닐)아미노)-1-옥소-3-((트리이소프로필실릴)옥시)프로판-2-일)아미노)-3-메틸-1-옥소부탄-2-일)카르바메이트 (1.47g, y = 23%)를 결정질 백색 고체로 수득했다. MS (m/z): 566.7 $(M + 1)^+$ 564.7 $(M - 1)^-$ UPLC = 1.92 분 (2.5 분 방법).

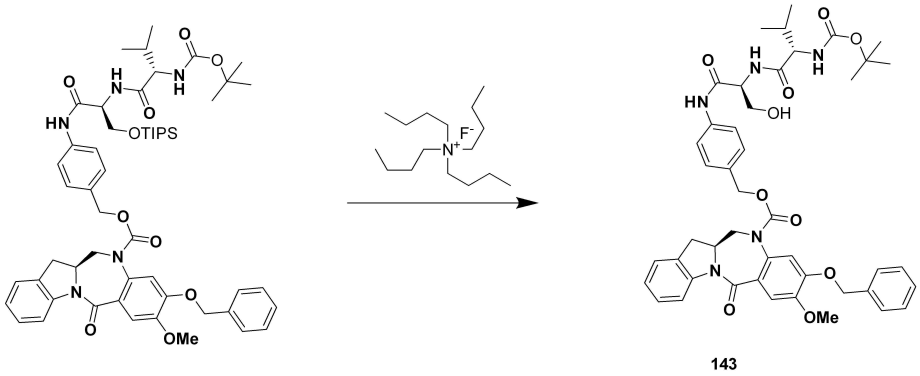


141 5 142

[0835]

[0836] 무수 테트라하이드로퓨란 (5.77 ml) 및 무수 N,N-디메틸아세트아미드 (11.54 ml) 중의 tert-부틸 ((S)-1-(((S)-1-((4-(하이드록시메틸)페닐)아미노)-1-옥소-3-((트리이소프로필실릴)옥시)프로판-2-일)아미노)-3-메틸-1-옥소부탄-2-일)카르바메이트 (1.436 g, 2.54 mmol)의 용액을 빙조에서 0 ℃로 냉각시켰다. 리튬 비스(트리메틸실릴)아미드 (테트라하이드로퓨란 중의 1M, 3.05 ml, 3.05 mmol)를 첨가하고 혼합물을 20 분 동안 아르곤하에 교반한 다음 무수 테트라하이드로퓨란 (5.77 ml) 중의 4-니트로페닐 (S)-9-(벤질옥시)-8-메톡시-6-옥소-12a,13-디하이드로-6H-벤조[5,6][1,4]디아제피노[1,2-a]인돌-11(12H)-카르복실레이트 (1.4 g, 2.54 mmol)를 첨가했다.

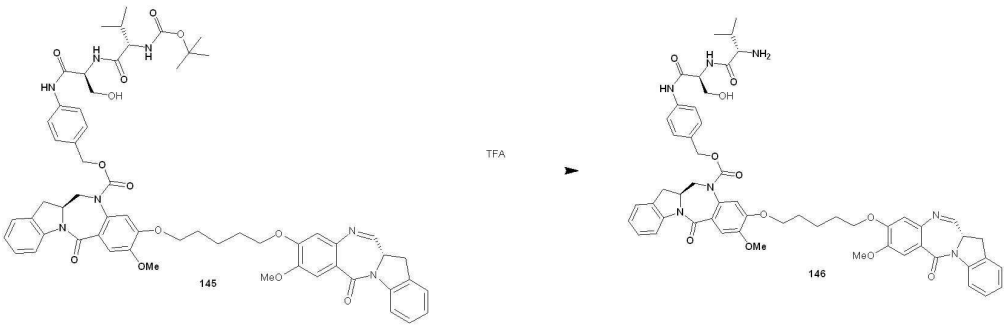
[0837] 반응 혼합물을 0 ℃로부터 실온까지 18 시간 동안 아르곤하에 교반한 다음, 포화 암모늄 클로라이드 용액으로 퀀칭했다. 혼합물을 에틸 아세테이트로 추출하고 유기층을 물 및 염수로 세척했다. 유기층을 무수 마그네슘 설페이트로 건조시키고, 여과하고 농축시켰다. 미정제 물질을 에틸 아세테이트/디클로로메탄에서 실리카 겔 크로마토그래피에 의해 정제하여 4-((S)-2-((S)-2-((tert-부톡시카르보닐)아미노)-3-메틸부탄아미도)-3-((트리이소프로필실릴)옥시)프로판아미도)벤질 (S)-9-(벤질옥시)-8-메톡시-6-옥소-12a,13-디하이드로-6H-벤조[5,6][1,4]디아제피노[1,2-a]인돌-11(12H)-카르복실레이트 (0.91g, y=36%)를 백색 고체로 수득했다. MS (m/z): 979.2 $(M+1)^+$ UPLC = 2.24 분 (2.5 분 방법).



142 143

[0838]

[0839] 무수 테트라하이드로퓨란 (5.11 ml) 중의 4-((S)-2-((S)-2-((tert-부톡시카르보닐)아미노)-3-메틸부탄아미도)-3-((트리이소프로필실릴)옥시)프로판아미도)벤질 (S)-9-(벤질옥시)-8-메톡시-6-옥소-12a,13-디하이드로-6H-벤조[5,6][1,4]디아제피노[1,2-a]인돌-11(12H)-카르복실레이트 (0.5 g, 0.511 mmol)의 용액을 빙조에서 0 ℃로 냉각시키고 테트라부틸암모늄 플루오라이드 용액 (테트라하이드로퓨란 중의 1M, 1.022 ml, 1.022 mmol)을 첨가했다. 반응 혼합물을 0 ℃에서 두 시간 동안 아르곤하에 교반하고 완료시 포화 암모늄 클로라이드 용액으로 퀀칭했다. 혼합물을 에틸 아세테이트로 추출했다. 추출물을 염수로 세척하고, 무수 마그네슘 설페이트로 건조시키고, 여과하고 농축시켰다. 미정제 물질을 에틸 아세테이트/디클로로메탄에서 실리카 겔 크로마토그래피에 의해 정제하여 화합물 143 (356mg, y = 85%)을 백색 고체로 수득했다. MS (m/z): 822.9 $(M+1)^+$ UPLC = 1.82 분 (2.5 분 방법).

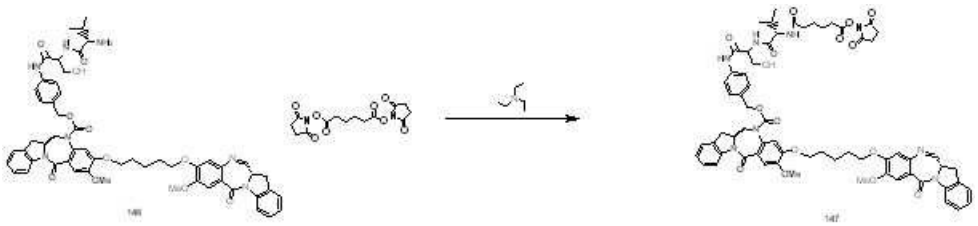


145 146

[0840]

[0841] 무수 디클로로메탄 (0.8 ml) 중의 4-((S)-2-((S)-2-((tert-부톡시카르보닐)아미노)-3-메틸부탄아미도)-3-하이드록시프로판아미도)벤질 (S)-8-메톡시-9-((5-(((S)-8-메톡시-6-옥소-12a,13-디하이드로-6H-벤조[5,6][1,4]디아제피노[1,2-a]인돌-9-일)옥시)펜틸)옥시)-6-옥소-12a,13-디하이드로-6H-벤조[5,6][1,4]디아제피노[1,2-a]인돌-11(12H)-카르복실레이트 (90 mg, 0.082 mmol)의 용액을 빙조에서 0 ℃로 냉각시켰다. 무수 디클로로메탄 (411 μl) 중의 트리플루오로아세트산 (0.4ml)의 새로운 혼합물을 첨가했다. 반응물을 한 시간 동안 0 ℃에서 아르곤하에 교반하고 완료시 혼합물을 얼음/포화 소듐 비카르보네이트 혼합물에 부었다. 이 혼합물을 디클로로메탄으

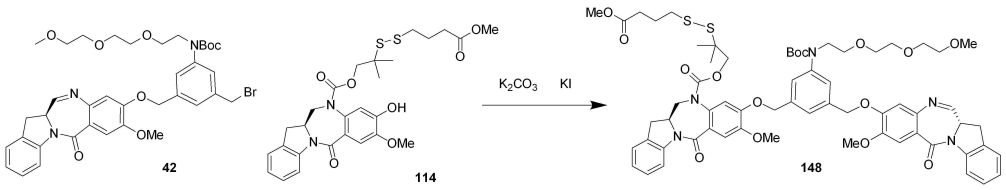
로 추출하고, 염수로 세척하고 무수 마그네슘 설페이트로 건조시키고, 여과하고 농축시켜 화합물 146 (63mg, y = 77%)을 황색 고체로 수득했다. MS (m/z): 995.2 $(M + 1)^+$ UPLC = 1.51 분 (2.5 분 방법).



[0842]

[0843] 무수 N,N-디메틸포름아미드 (724 μl) 중의 4-((S)-2-((S)-2-아미노-3-메틸부탄아미도)-3-하이드록시프로판아미도)벤질 (S)-8-메톡시-9-((5-(((S)-8-메톡시-6-옥소-12a,13-디하이드로-6H-벤조[5,6][1,4]디아제피노[1,2-a]인돌-9-일)옥시)펜틸)옥시)-6-옥소-12a,13-디하이드로-6H-벤조[5,6][1,4]디아제피노[1,2-a]인돌-11(12H)-카르복실레이트 (36 mg, 0.036 mmol)의 용액에 비스(2,5-디옥소피롤리딘-1-일) 아디페이트 (24.65 mg, 0.072 mmol)를 첨가하고 트리에틸아민 (15.14 μl, 0.109 mmol)을 첨가했다. 반응물을 실온에서 아르곤하에 한 시간 동안 교반한 다음 디클로로메탄으로 희석하고 물로 세척했다. 유기층을 건조시키고, 여과하고 아세토니트릴과 함께 공증발시켰다. 미정제 물질을 RP-HPLC (아세토니트릴/물에서 C18, 30 분에 걸쳐 50-70%)에 의해 정제하여 화합물 147을 수득했다. MS (m/z): 1220.4 $(M + 1)^+$ UPLC = 1.75 분 (2.5 분 방법).

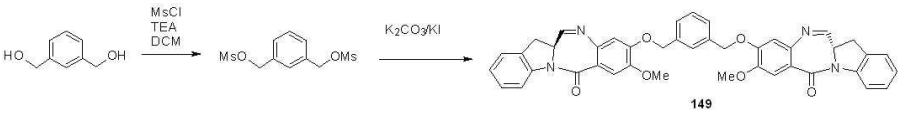
[0844] **실시예 25. 화합물 148의 합성**



[0845]

[0846] 무수 N,N-디메틸아세트아미드 (1.34ml) 중의 tert-부틸 (S)-(3-(브로모메틸)-5-(((8-메톡시-6-옥소-12a,13-디하이드로-6H-벤조[5,6][1,4]디아제피노[1,2-a]인돌-9-일)옥시)메틸)페닐)(2-(2-(2-메톡시에톡시)에톡시)에틸)카르바메이트 (119 mg, 0.161 mmol) 및 2-((4-메톡시-4-옥소부틸)디설파닐)-2-메틸프로필 (S)-9-하이드록시-8-메톡시-6-옥소-12a,13-디하이드로-6H-벤조[5,6][1,4]디아제피노[1,2-a]인돌-11(12H)-카르복실레이트 (75 mg, 0.134 mmol)의 현탁액에 포타슘 카르보네이트 (37.0 mg, 0.268 mmol)를 첨가하고 반응물을 18 시간 동안 실온에서 질소하에 교반했다. 물을 반응물에 첨가하고 생성된 백색 고체를 여과한 다음, 디클로로메탄에 재용해시키고, 분별 깔대기로 옮기고, 물로 세척하고, 무수 마그네슘 설페이트로 건조시키고 진공에서 농축시켰다. 미정제 물질을 RP-HPLC (C18 Kromasil, 아세토니트릴/물)를 통해 정제했다. 순수한 분획을 디클로로메탄으로 추출했다. 마그네슘 설페이트로 건조시키고, 여과하고 농축시켜 화합물 148을 수득한다.

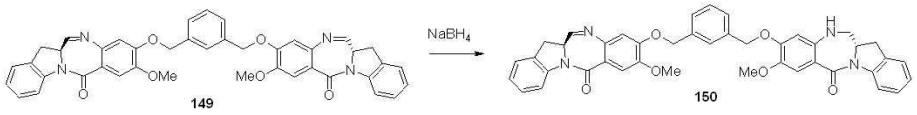
[0847] **실시예 26. 화합물 150의 합성**



[0848]

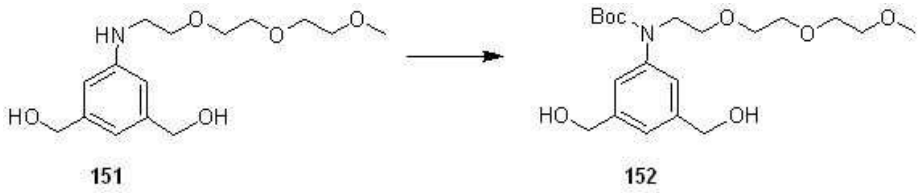
[0849] 무수 디클로로메탄 (0.8 mL) 중의 1,3-벤젠디메탄올 (11 mg, 0.08 mmol)의 교반되는 용액에 트리에틸아민 (33 μl, 0.24 mmol) 이후 메탄설포닐 클로라이드 (16 μl, 0.21 mmol)을 15 분 동안 -5 ~ -10 ℃에서 적가했다. 용액을 -5 ~ -10 ℃에서 추가 60 분 동안 교반하고 얼음/물로 퀀칭하고, 차가운 에틸 아세테이트로 희석했다. 혼합물을 분리하고 유기층을 냉수로 세척하고, 무수 소듐 설페이트로 건조시켰다. 이를 여과하고 여과액을 진공에서 회전 증발에 의해 (온도 < 35 ℃) 증발시켰다. 수득된 디메실레이트를 몇 시간 동안 고진공 처리한 후 무수 디메틸포름아미드 (1.5 mL)에 용해시켰다. 화합물 1 (94 mg, 0.32 mmol), 무수 포타슘 카르보네이트 (50 mg, 0.36 mmol) 및 포타슘 아이오다이드 (27 mg, 0.16 mmol)를 후속적으로 첨가했다. 혼합물을 실온에서 17 시간 동안 교반하고 (질량 스펙트럼으로 확인) 디클로로메탄로 희석했다. 이를 염수로 세척하고, 무수 소듐 설페이트로 건조시키고 여과했다. 여과액을 감압하에 증발시키고 잔류물을 역상 HPLC (C18 컬럼, 아세토니트릴/H_2O, 아세토니트릴/H_2O으로 로딩된 컬럼, 3:1, 30 분 동안 교반하고 주입 전에 원심분리)에 의해 정제하여 이량체 화

합물 149 (6.6 mg)를 백색 고체로 수득했다. ^{1}H NMR (400 Hz, $CDCl_3$): δ 8.21 (d, J = 8.0 Hz, 2H), 7.79 (d, J = 4.4 Hz, 2H), 7.51 (s, 2H), 7.46 (s, 1H), 7.36 (bs, 3H), 7.23-7.18 (m, 4H), 7.06-7.03 (m, 2H), 6.79 (s, 2H), 5.20 (d, J = 12.4 Hz, 2H), 5.14 (d, J = 12.4 Hz, 2H), 4.41 (ddd, J1 = 10.8 Hz, J2 = 4.4 Hz, J3 = 4.0 Hz, 2H), 3.92 (s, 6H), 3.64 (dd, J1 = 17.2 Hz, J2 = 11.2 Hz, 2H), 3.42 (dd, J1 = 16.8 Hz, J2 = 4.0 Hz, 2H); HRMS (ESI, m/z): 계산 691.2557 $(M + H)^+$, 확인 691.2570.

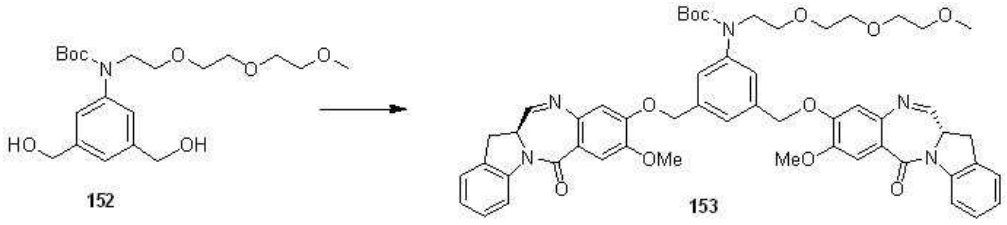
[0850] 

[0851] 화합물 149 (60 mg, 0.043 mmol)를 디클로로메탄 (0.25ml) 및 에탄올 (0.5 ml)의 무수 혼합물에 용해시키고 빙조에서 0 ℃로 냉각시켰다. 이후 에탄올 (50 ul)에 용해된 소듐 보로하이드라이드 (0.493 mg, 0.013 mmol) 용액을 첨가하고 혼합물을 5 분 동안 교반하고 빙조를 제거했다. 반응물을 3 시간 동안 교반되도록 하고, 저온에서 포화 암모늄 클로라이드 및 디클로로메탄을 첨가하여 퀀칭하고, 분리하고 유기층을 염수로 세척하고, 무수 소듐 설페이트로 건조시키고, 여과하고, 진공에서 농축시켰다. 잔류물을 반-분취용 RP-HPLC (C18 컬럼, 아세토니트릴/H_2O)에 의해 정제하고 원하는 생성물을 함유하는 분획을 디클로로메탄으로 추출하고 농축시켜 모노-이민 화합물 150 (20 mg, 33%)을 수득했다 MS (m/z), 예상: 692.7, 확인: 715.2 $(M + Na)^+$, 733.2 $(M + H_2O + Na)^+$, 749.2 $(M + H_2O + K)^+$.

[0852] **실시예 27. 화합물 155의 합성**

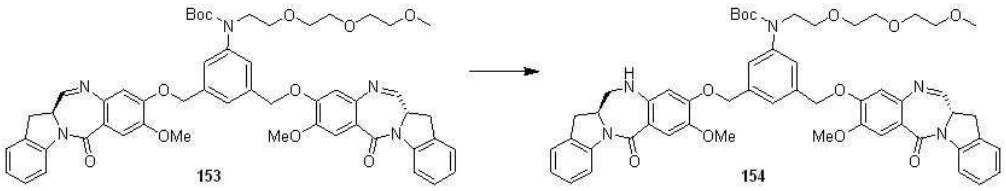
[0853] 

[0854] 무수 테트라하이드로퓨란 (4.0 mL) 중의 화합물 151 (339 mg, 1.1 mmol)의 교반되는 용액에 Boc 무수물 (272 mg, 1.2 mmol)을 첨가했다. 혼합물을 실온에서 3 일 동안 계속 교반했다. 반응 혼합물을 감압하에 농축시키고 잔류물을 실리카 겔 크로마토그래피 (디클로로메탄/메탄올)에 의해 정제하여 화합물 152 (405 mg, y = 90%)를 무색 오일로 수득했다. 1H NMR (400 Hz, $CDCl_3$): δ 7.00 (s, 2H), 6.97 (s, 1H), 4.38 (s, 4H), 4.12 (s, 2h), 3.64 (t, J = 5.6 Hz, 2H), 3.48-3.44 (m, 8H), 3.40-3.38 (m, 2H), 3.21 (s, 3H), 1.31 (s, 9H); ^{13}C NMR (400 Hz, $CDCl_3$): δ 154.65, 142.3, 142.1, 124.1, 122.7, 80.2, 71.6, 70.3, 70.1, 69.9, 68.5, 63.9, 58.65, 49.4, 28.1.

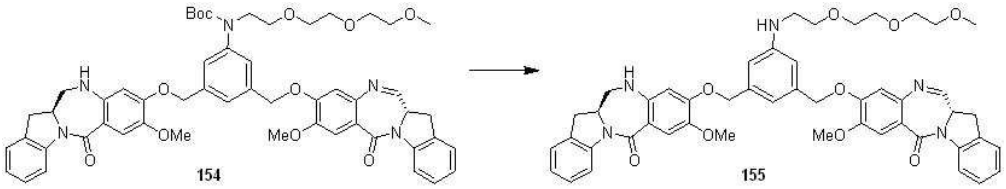
[0855] 

[0856] 무수 디클로로메탄 중의 화합물 152 (51 mg, 0.128 mmol)의 교반되는 용액에 트리에틸아민 (0.053 mL, 0.383 mmol)을 -5-10 ℃에서 첨가했다. 이후 메탄설포닐 클로라이드 (0.026 mL, 0.332 mmol)를 주사기로 15 분 내에 천천히 첨가했다. 혼합물을 -5-10 ℃에서 1 시간 동안 교반했다 (TLC, 디클로로메탄/메탄올 10:1). 반응물을 얼음/물로 퀀칭하고, 차가운 AcOEt로 희석하고, 분리하고 유기층을 냉수로 세척하고, 무수 Na_2SO_4/$MgSO_4$로 건조시키고, 여과하고 스트리핑했다. 잔류물을 디클로로메탄이 있는 작은 반응 플라스크로 옮기고, 스트리핑하고 고진공 처리했다. 이를 무수 디메틸포름아미드 (0.8 mL)에 용해시키고 이어서 화합물 1 (90 mg, 0.31 mmol) 및 포타슘 (53 mg, 0.38 mmol)을 첨가했다. 혼합물을 실온에서 밤새 교반했다. 이를 디클로로메탄으로 희석하고, 염수로 세척하고, 무수 소듐 설페이트로 건조시키고, 여과하고 스트리핑했다. 잔류물을 역상 HPLC (CI 8, 아세토니

트릴/물)에 의해 정제하여 화합물 32b (56 mg, 46%)를 황색을 띠는 고체로 수득했다. 1H NMR (400 Hz, $CDCl_3$): δ 8.29 (d, J = 8.0 Hz, 2H), 7.87 (d, J = 4.8 Hz, 2H), 7.60 (s, 2H), 7.38-7.36 (m, 3H), 7.33- 7.27 (m, 4H), 7.13 (t, J = 7.6 Hz, 2H), 6.88 (s, 2H), 5.21 (dd, = 20.0 Hz, J_2 = 12.4 Hz, 4H), 4.49 (dt, Jj = 11.2 Hz, J_2 = 4.0 Hz, 2H), 3.99 (s, 6H), 3.83 (t, J = 6.0 Hz, 2H), 3.76- 3.48 (m, 14H), 3.35 (s, 3H), 1.43 (s, 9H); MS (m/z): 확인 992.2 $(M + H_2O + Na)^+$, 101 $^+$.

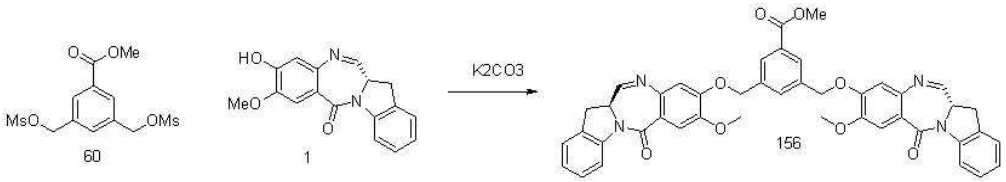
[0857] 

[0858] 무수 디클로로메탄 (0.3 mL) 및 무수 에탄올 (0.9 mL) 중의 화합물 153 (56 mg, 0.059 mmol)의 교반되는 용액에 $NaBH_4$ (2.7 mg, 0.07 mmol)를 0 ℃에서 첨가했다. 빙조를 제거하고 혼합물을 실온에서 3 시간 동안 교반한 다음 포화 암모늄 클로라이드로 퀀칭하고, 디클로로메탄으로 희석하고, 분리하고 유기층을 염수로 세척하고, 무수 Na_2SO_4로 건조시키고 셀라이트를 통해 여과하고 스트리핑했다. 순수한 생성물을 함유하는 모든 분획을 디클로로메탄으로 추출하고 스트리핑하여 화합물 154 (20.7 mg, y = 37%)를 밝은 황색을 띠는 고체로 수득했다. MS (m/z): 확인 954.2 $(M + H)^+$.

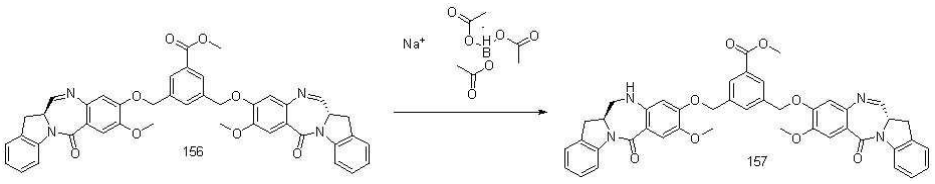
[0859] 

[0860] Tert-부틸 (3-((((S)-8-메톡시-6-옥소-11,12,12a,13-테트라하이드로-6H-벤조[5,6][1,4]디아제피노[1,2-a]인돌-9-일)옥시)메틸)-5-((((S)-8-메톡시-6-옥소-12a,13-디하이드로-6H-벤조[5,6][1,4]디아제피노[1,2-a]인돌-9-일)옥시)메틸)페닐)(2-(2-(2-메톡시에톡시)에톡시)에틸)카르바메이트 (273mg, 0.286 mmol)를 2.65ml 무수 디클로로메탄에 용해시키고 빙조에서 0C로 냉각시켰다. 2.65ml 무수 디클로로메탄 및 트리플루오로아세트산 (2649 μl)의 새로 혼합된 용액을 첨가했다. 반응물을 아르곤하에 0C에서 55 분 동안 교반했다. 이를 디클로로메탄으로 희석하고, 얼음/포화 소듐 비카르보네이트에 부었다. 분리된 유기물을 염수로 세척하고 마그네슘 설페이트로 건조시키고, 여과하고 스트리핑하여 210 mg의 옅은 황색 고체를 수득했다. 46 mg을 제거하고 RPHPLC (물/아세토니트릴)에 의해 정제했다. 원하는 화합물을 함유하는 분획을 동결시키고 동결건조시켜 최종 화합물 155 (32mg, y= 60%)를 수득했다. MS (m/z): 854.8 $(M + 1)^+$. UPLC =1.65 (2.5 분 방법).

[0861] **실시예 28. 화합물 157의 합성**

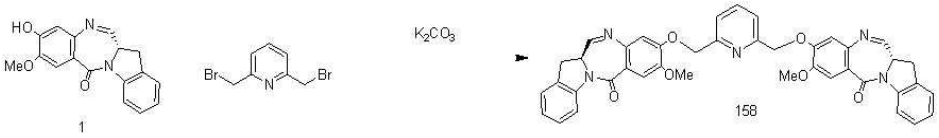
[0862] 

[0863] 화합물 60 (180 mg, 0.511 mmol) 및 화합물 1 (336 mg, 1.073 mmol)을 디메틸포름아미드 (2554 μl)에 용해시켰다. 포타슘 카르보네이트 (176 mg, 1.277 mmol)를 실온에서 첨가하여 색상을 밝은 주황색으로 변화시켰다. 반응물을 Ar하에 밤새 교반했다. 반응물을 디클로로메탄으로 희석하고 물 (2x)로 세척했다. 유기물을 건조시키고, 농축시키고, 실리카 겔 크로마토그래피 (에틸 아세테이트/헥산 및 이후 5% 메탄올/디클로로메탄)에 의해 정제했다. 순수한 생성물을 수집하여 화합물 156 (300mg, y= 78%)을 수득했다. MS (m/z): 849.5 $(M + 1)^+$. LCMS =8.2 (15 분 방법).

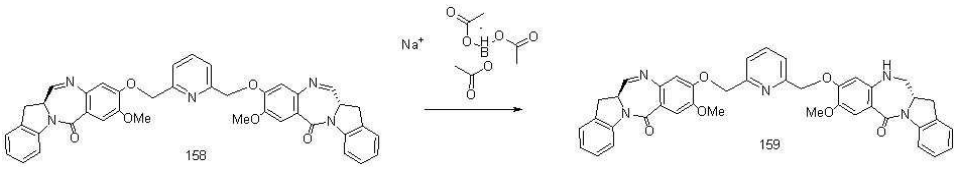
[0864] 

[0865] 화합물 156 (45 mg, 0.060 mmol)을 1, 2-디클로로에탄 (601 μl)에 용해시켰다. 소듐 트리아세톡시보로하이드라이드 (11.46 mg, 0.054 mmol)를 실온에서 첨가하고 1 시간 동안 교반했다. 추가의 ~2 mg의 STAB를 첨가하고 15 분 동안 교반했다. 반응물을 에틸 아세테이트 및 몇 방울의 메탄올로 희석하고 수성 시트르산 용액으로 퀀칭했다. 층을 분리하고 유기물을 염수로 세척하고, 건조시키고 농축시켰다. 미정제 고체를 디메틸포름아미드/아세토니트릴/물/포름산에 희석하고 역상 C18 HPLC에 의해 정제했다. 모노 환원된 생성물을 함유하는 순수한 분획을 동결시키고 동결건조시켜 화합물 157을 원하는 생성물 (10mg, y= 21%)로 수득했다. MS (m/z): 751.7 $(M + 1)^+$. LCMS =5.8 (8 분 방법).

[0866] **실시예 29. 화합물 159의 합성**

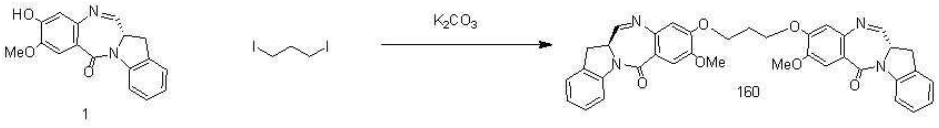
[0867] 

[0868] 화합물 1 (120 mg, 0.407 mmol) 및 2,6-비스(브로모메틸)피리딘 (50mg, 0.185 mmol)을 무수 디메틸포름아미드 (1233 μl)에 용해시키고 포타슘 카르보네이트 (77 mg, 0.555 mmol)를 첨가했다. 반응물을 실온에서 5 시간 동안 교반하고 완료했다. 물을 침전된 생성물에 첨가했다. 생성된 고체를 여과하고 물로 세척했다. 고체를 디클로로메탄/메탄올에 용해시켰다. 유기물을 마그네슘 설페이트로 건조시키고, 여과하고, 농축시켜 163 mg의 미정제 화합물 158을 수득했다. 100% 수율을 가정하여 미정제 물질을 추가의 정제 없이 진행시켰다. MS (m/z): 692.5 $(M + 1)^+$. UPLC =1.68 (2.5 분 방법).

[0869] 

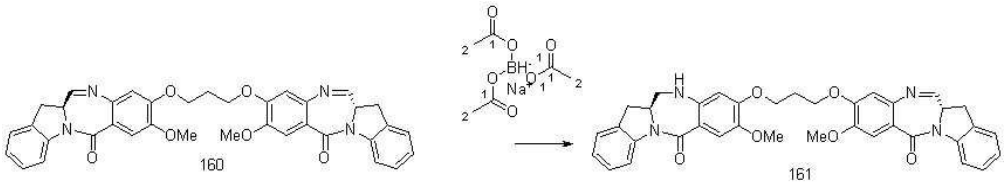
[0870] (12aS,12a'S)-9,9'-((피리딘-2,6-디일비스(메틸렌))비스(옥시))비스(8-메톡시-12a,13-디하이드로-6H-벤조[5,6][1,4]디아제피노[1,2-a]인돌-6-온) (128mg, 0.185 mmol)을 1,2-디클로로에탄 (1850 μl)에 용해시키고 소듐 트리아세톡시보로하이드라이드 (39.2 mg, 0.185 mmol)를 실온에서 첨가했다. 반응을 45 분에 확인했다. 추가의 15 mg의 STAB를 첨가하고 30 분 동안 교반하도록 두었다. 반응물을 디클로로메탄으로 희석하고 포화 암모늄 클로라이드로 퀀칭했다. 유기물을 염수로 세척하고 마그네슘 설페이트로 건조시키고, 여과하고 스트리핑하여 165mg의 미정제 물질을 수득했고. 미정제 물질의 대략 절반을 테트라하이드로퓨란/아세토니트릴/물에 용해시키고 RPHPLC (물/아세토니트릴)에 의해 정제했다. 모노 환원된 생성물을 함유하는 분획을 동결시키고 동결건조시켜 원하는 화합물 159 (19.5mg, y=30%)을 수득했다. MS (m/z): 694.6 $(M + 1)^+$. UPLC =1.77 (2.5 분 방법).

[0871] **실시예 30. 화합물 161의 합성**

[0872] 

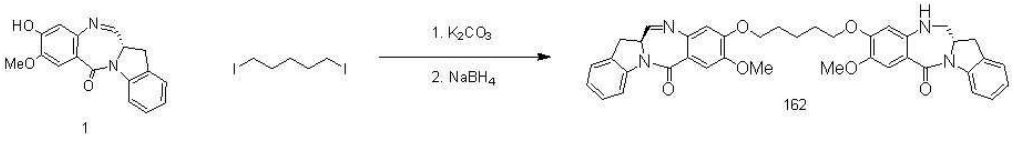
[0873] 무수 디메틸포름아미드 (1.0 mL) 중의 화합물 1 (147 mg, 0.5 mmol) 및 1,3-디아이오도프로판 (23 ul, 0.2 mmol)의 용액에 포타슘 카르보네이트 (111 mg, 0.8 mmol)를 첨가했다. 혼합물을 실온에서 밤새 (16 시간) 교반하고 디클로로메탄으로 희석했다. 이를 포화 암모늄 클로라이드 및 염수로 세척하고, 무수 소듐 설페이트로 건조시키고 여과했다. 여과액을 감압하에 증발시키고 잔류물을 분취용 역상 HPLC (C18 컬럼, 아세토니트릴/물)을

통해 정제하여 화합물 160 (18.9 mg, 15%)을 백색 고체로 수득했다. ^{1}H NMR (400 Hz, $CDCl_3$): δ 8.26 (d, J = 8.0 Hz, 2H), 7.87 (d, J = 4.4 Hz, 2H), 7.55 (s, 2H), 7.26 (s, 4H), 7.12-7.08 (m, 2H), 6.88 (s, 2H), 4.45 (ddd, J_1 = 10.8 Hz, J_2 = 4.4 Hz, J_3 = 4.0 Hz, 2H), 4.36-4.26 (m, 4H), 3.94 (s, 6H), 3.70 (dd, J_1 = 16.8 Hz, J_2 = 10.8 Hz, 2H), 3.50 (dd, J_1 = 16.8 Hz, J_2 = 4.0 Hz, 2H), 2.45 (p, J = 6.0 Hz, 2H); HRMS (ESI, m/z): 계산 629.2400 $(M + H)^+$, 확인 629.2400.

[0874] 

[0875] 절차: 무수 1,2-디클로로에탄 (3.5 ml) 중의 화합물 160 (331 mg, 0.527 mmol)의 교반되는 용액에 소듐 트리아세톡시보로하이드라이드 (117 mg, 0.527 mmol)를 첨가하고 혼합물을 실온에서 90분 동안 질소하에 교반했다. 반응물을 메탄올 (~1 mL) 및 포화 소듐 비카르보네이트로 퀀칭하고 DCM으로 희석하고, 분리하고 유기층을 염수로 세척하고, 무수 소듐 설페이트로 건조시키고, 여과하고 스트리핑했다. 미정제물을 반-분취용 HPLC (C18 컬럼, 아세토니트릴/탈이온수)에 의해 정제하여 화합물 161 (4.2 mg y = 12%)을 백색 고체로 수득했다. MS (m/z): 630.9 $(M + 1)^+$. UPLC =2.5 분 (7분 방법, 30-98%) Agilent.

[0876] **실시예 31. 화합물 162의 합성**

[0877] 

[0878] 화합물 162를 실시예 30에 기재된 2 단계 절차와 유사한 방식으로 제조하여 화합물 62 (0.055 g, 0.083 mmol, 34.3 % 수율)를 수득했다. MS (m/z): 659.1 $(M+1)^+$.

[0879] **실시예 32. 화합물 18의 항-FRα 접합체(항-FRα-18)의 제조**

[0880] 50 mM HEPES (4-(2-하이드록시에틸)-1-피페라진 에탄설폰산) pH 8.5 버퍼 및 10% v/v 디메틸아세트아미드 (*N,N*-디메틸아세트아미드) 공용매 중에 2.0 mg/mL 항-FRα 항체 및 3.4 몰당량 화합물 18 (5-배 과량의 5% 수성 디메틸아세트아미드 중의 소듐 비설파이트로 6 시간 동안 25 ℃에서 전처리)를 포함하는 반응물을 8 시간 동안 25 ℃에서 인큐베이션했다. 반응 후, 접합체를 정제하고 버퍼를 NAP 탈염 컬럼 (Illustra Sephadex G-25 DNA Grade, GE Healthcare)을 사용하여 10 mM 히스티딘, 250 mM 글라이신, 1.0% w/v 수크로스, 0.01% Tween-20, 50 μm 소듐 비설파이트 pH 5.5 제제 버퍼로 교환했다. Slide-a-Lyzer 투석 카세트 (ThermoScientific 30,000 MWCO)를 사용하여 동일한 버퍼에서 4 시간 동안 실온에서 이후 밤새 4 ℃에서 투석을 수행했다.

[0881] 정제된 접합체는 1.2 mg/ml의 최종 단백질 농도 및 항체당 평균 2.6 개의 연결된 화합물 18 분자 (몰 흡광 계수 화합물 18에 대해 $\varepsilon_{330\ nm}$= 11, 971 $cm^{-1}M^{-1}$ 및 $\varepsilon_{280\ nm}$= 30, 188 $cm^{-1}M^{-1}$, 및 항-FRα 항체에 대해 $\varepsilon_{280\ nm}$= 201,400 $cm^{-1}M^{-1}$을 사용하는 UV-Vis에 의해); 97.5% 단량체 (크기 배제 크로마토그래피에 의해); 및 <1.1% 비접합 화합물 18 (이중 컬럼, 역상 HPLC 분석에 의해)을 갖는 것으로 밝혀졌다.

[0882] **실시예 33. 화합물 79의 항-EGFR 접합체(항-EGFR-79)의 제조**

[0883] 50 mM HEPES (4-(2-하이드록시에틸)-1-피페라진 에탄설폰산) pH 8.5 버퍼 및 10% v/v 디메틸아세트아미드 (*N,N*-디메틸아세트아미드) 공용매 중에 2.0 mg/mL 항-EGFR 항체 및 4.5 몰당량 화합물 79 (5-배 과량의 5% 수성 디메틸아세트아미드 중의 소듐 비설파이트로 6 시간 동안 25 ℃에서 전처리)를 포함하는 반응물을 8 시간 동안 25 ℃에서 인큐베이션했다. 반응 후, 접합체를 정제하고 버퍼를 NAP 탈염 컬럼 (Illustra Sephadex G-25 DNA Grade, GE Healthcare)을 사용하여 10 mM 히스티딘, 250 mM 글라이신, 1.0% w/v 수크로스, 0.01% Tween-20, 50 μm 소듐 비설파이트 pH 5.5 제제 버퍼로 교환했다. Slide-a-Lyzer 투석 카세트 (ThermoScientific 30,000 MWCO)를 사용하여 동일한 버퍼에서 4 시간 동안 실온에서 이후 밤새 4 ℃에서 투석을 수행했다.

[0884] 정제된 접합체는 1.2 mg/ml의 최종 단백질 농도 및 항체당 평균 3.4 개의 연결된 화합물 79 분자 (몰 흡광 계수 화합물 79에 대해 $\varepsilon_{330\ nm}$= 11, 971 $cm^{-1}M^{-1}$ 및 $\varepsilon_{280\ nm}$= 30, 188 $cm^{-1}M^{-1}$, 및 항-EGFR 항체에 대해 $\varepsilon_{280\ nm}$= 201,400 $cm^{-1}M^{-1}$을 사용하는 UV-Vis에 의해); 96.3% 단량체 (크기 배제 크로마토그래피에 의해); 및 <1.0% 비접합 화합물 79 (이중 컬럼, 역상 HPLC 분석에 의해)을 갖는 것으로 밝혀졌다.

[0885] **실시예 34. 화합물 46의 항-FRα 접합체(항-FRα-46)의 제조**

[0886] 50 mM HEPES (4-(2-하이드록시에틸)-1-피페라진 에탄설폰산) pH 8.5 버퍼 및 10% v/v 디메틸아세트아미드 (*N,N*-디메틸아세트아미드) 공용매 중에 2.0 mg/mL 항-FRα 항체 및 5 몰당량 화합물 46 (5-배 과량의 5% 수성 디메틸아세트아미드 중의 소듐 비설파이트로 6 시간 동안 25 ℃에서 전처리)를 포함하는 반응물을 8 시간 동안 25 ℃에서 인큐베이션했다. 반응 후, 접합체를 정제하고 버퍼를 NAP 탈염 컬럼 (Illustra Sephadex G-25 DNA Grade, GE Healthcare)을 사용하여 10 mM 히스티딘, 250 mM 글라이신, 1.0% w/v 수크로스, 0.01% Tween-20, 50 μm 소듐 비설파이트 pH 5.5 제제 버퍼로 교환했다. Slide-a-Lyzer 투석 카세트 (ThermoScientific 30,000 MWCO)를 사용하여 동일한 버퍼에서 4 시간 동안 실온에서 이후 밤새 4 ℃에서 투석을 수행했다.

[0887] 정제된 접합체는 1.2 mg/ml의 최종 단백질 농도 및 항체당 평균 3.3 개의 연결된 화합물 46 분자 (몰 흡광 계수 화합물 46에 대해 $\varepsilon_{330\ nm}$= 15,280 $cm^{-1}M^{-1}$ 및 $\varepsilon_{280\ nm}$= 30, 115 $cm^{-1}M^{-1}$, 및 항-FRα 항체에 대해 $\varepsilon_{280\ nm}$= 201,400 $cm^{-1}M^{-1}$을 사용하는 UV-Vis에 의해); 95.1% 단량체 (크기 배제 크로마토그래피에 의해); 및 <0.8% 비접합 화합물 46 (이중 컬럼, 역상 HPLC 분석에 의해)을 갖는 것으로 밝혀졌다.

[0888] **실시예 35. 화합물 55의 항-FRα 접합체(항-FRα-55)의 제조**

[0889] 50 mM HEPES (4-(2-하이드록시에틸)-1-피페라진 에탄설폰산) pH 8.5 버퍼 및 10% v/v 디메틸아세트아미드 (*N,N*-디메틸아세트아미드) 공용매 중에 2.0 mg/mL 항-FRα 항체 및 5 몰당량 화합물 55 (5-배 과량의 5% 수성 디메틸아세트아미드 중의 소듐 비설파이트로 6 시간 동안 25 ℃에서 전처리)를 포함하는 반응물을 8 시간 동안 25 ℃에서 인큐베이션했다. 반응 후, 접합체를 정제하고 버퍼를 NAP 탈염 컬럼 (Illustra Sephadex G-25 DNA Grade, GE Healthcare)을 사용하여 10 mM 히스티딘, 250 mM 글라이신, 1.0% w/v 수크로스, 0.01% Tween-20, 50 μm 소듐 비설파이트 pH 5.5 제제 버퍼로 교환했다. Slide-a-Lyzer 투석 카세트 (ThermoScientific 30,000 MWCO)를 사용하여 동일한 버퍼에서 4 시간 동안 실온에서 이후 밤새 4 ℃에서 투석을 수행했다.

[0890] 정제된 접합체는 2.5 mg/ml의 최종 단백질 농도 및 항체당 평균 2.4 개의 연결된 화합물 55 분자 (몰 흡광 계수 화합물 55에 대해 $\varepsilon_{330\ nm}$= 15,280 $cm^{-1}M^{-1}$ 및 $\varepsilon_{280\ nm}$= 30, 115 $cm^{-1}M^{-1}$, 및 항-FRα 항체에 대해 $\varepsilon_{280\ nm}$= 201,400 $cm^{-1}M^{-1}$을 사용하는 UV-Vis에 의해); 95.1% 단량체 (크기 배제 크로마토그래피에 의해); 및 <0.8% 비접합 화합물 55 (이중 컬럼, 역상 HPLC 분석에 의해)을 갖는 것으로 밝혀졌다.

[0891] **실시예 36. 화합물 19 (항-FRα-19, 항-EGFR-19) 및 화합물 47 (항-FRα-47, 항-EGFR-47)의 항-FRα-C442 또는 항-EGFR-C442 접합체의 일반저인 제조**

[0892] 짝을 이루지 않은 두 개의 시스테인 잔기를 보유하는 항체를 표준 절차에 따라 제조했다.

[0893] 15 mM 포타슘 포스페이트, 5 mM N,N,N',N'-에틸렌디아민테트라아세트산 (EDTA) pH 6.0 중의 이 중간체의 용액에 N,N-디메틸아세트아미드 (디메틸아세트아미드) 중의 스탁 용액으로서 프로필렌 글리콜 및 5-10 eq 말레이미드 (화합물 19 또는 화합물 47)를 첨가하여 15 mM 포타슘 포스페이트, 5 mM EDTA pH 6.0 중의 ~48% 프로필렌 글리콜 및 ~2% 디메틸아세트아미드의 최종 용매 조성을 갖는 반응 혼합물을 수득했다. 반응이 25 ℃에서 밤새 진행되도록 했다. 접합체를 Sephadex G-25 탈염 컬럼을 사용하여 20 mM 석시네이트, 8.5% 수크로스, 0.01% Tween-20, 50 μm 소듐 비설파이트 pH 4.2로 정제했다. 잔여 비접합 약물을 제거하기 위해 필요에 따라 정제를 반복했다.

[0894] 정제된 접합체는 ~2.5 mg/ml의 최종 단백질 농도 및 일반적으로 항체당 평균 ~1.8 개의 연결된 IGN 분자 (위와 같이 몰 흡광 계수를 사용하여 UV-Vis에 의해); ~94% 단량체 (크기 배제 크로마토그래피에 의해); 및 <1% 비접합 IGN (이중 컬럼, 역상 HPLC 분석에 의해)을 갖는 것으로 밝혀졌다.

[0895] **실시예 37. 세포독성 분석**

[0896] 연구를 위해 다음 세포주를 사용했다: KB (자궁경부 암종, ATCC), NCI-H2110 (비소세포 폐 암종, ATCC), 나말와

(Namalwa) (버킷 림프종, ATCC), 및 T47D (유방 상피암, ATCC). 세포는 제조사가 권장하는 배지에서 세포독소 실험을 위해 유지되고 플레이팅되었다. 세포를 웰당 1,000 개의 세포 (KB, 나말와) 또는 웰당 2,000 개의 세포의 (NCI H2110, T47D) 파종 밀도로 96-웰 플랫 바텀 플레이트에 플레이팅했다. 접합체 또는 유리 약물 화합물을 열-불활성화된 10% FBS (Life Technologies) 및 0.1 mg/ml 젠타마이신 (Life Technologies)이 보충된 RPMI-1640 (Life Technologies)에 희석하고, 플레이팅된 세포에 첨가했다. 접합체의 세포독성 활성의 특이성을 결정하기 위해 과량의 비접합 항체를 별도의 희석된 접합체 세트에 첨가했다 (+블록 샘플, IC_{50} 표). 플레이트를 37 ℃, 5% CO_2에서 4 일 (T47D 세포) 또는 5 일 (KB, NCI H2110 세포) 동안 인큐베이션했다. T47D 세포의 생존율을 결정하기 위해 알라마 블루 분석(Invitrogen)을 사용했고, KB, NCI H2110, 나말와 세포의 생존율에 대해 WST-8 분석(Donjindo Molecular Technologies, Inc.)을 적용했다. 분석은 제조사의 프로토콜에 따라 수행되었다. S자형 용량-반응 비선형 회귀 곡선 피팅을 사용하여 (GraphPad Software Inc.) 사멸 곡선 및 IC_{50}을 생성했다. 표 1-3에 나타난 바와 같이, 본 발명의 세포독성 화합물 및 접합체는 *시험관내* 세포독성 분석에서 다양한 암세포에 대해 매우 강력하다.

[0897] **표 1.** *시험관내* 세포독성 분석에 의해 결정된 유리 세포독성 화합물에 대한 IC_{50} 값 (몰, M).

표 1

[0898]

IGN 이화산물	KB	나말와
150	8.00E-12	1.00E-12
162	2.00E-11	3.00E-12
157	3.00E-12	1.00E-12
155	2.00E-11	2.00E-12
161	2.50E-10	3.00E-11
159	3.00E-12	1.00E-12
123	3.00E-12	1.00E-12
108	5.00E-11	1.00E-11

[0899] **표 2.** *시험관내* 세포독성 분석에 의해 결정된 항-FRα-접합체에 대한 IC_{50} 값 (몰, M).

표 2

[0900]

펩타이드 링커	화합물 #	KB	KB	T47D	T47D
		-블록	+블록	-블록	+블록
Ala-Ala	95	2.00E-11	2.00E-9	3.00E-10	4.00E-9
Ala-Val	18	3.00E-11	3.00E-9	1.00E-10	1.00E-8
Ala-Val	79	1.00E-10	>3.00E-8		
Ala-Val	83	7.00E-12	2.00E-9	7.00E-11	1.00E-8
Gln-Leu	126	1.00E-11	>3.50E-9	5.00E-11	1.00E-8
Ala-Val	23	2.00E-12	4.00E-10	6.00E-12	2.00E-9
Gln-Leu	55	1.00E-11	2.00E-9	2.00E-10	7.00E-9
Ala-Val	26	2.00E-11	>3.50E-9	3.00E-11	9.00E-9
Ala-Val	46	2.00E-11	3.50E-9	3.00E-10	2.00E-8
Ala-Val	65	1.00E-12	7.00e-10	8.00E-12	7.00e-9
--	110	2.00E-11	6.00E-11	2.00E-10	8.00E-10
--	121	1.00E-11	1.00E-10	5.00E-10	2.00E-9
--	117	1.00E-10	9.00E-10	3.00E-9	3.00E-9
--	148	3.00E-11	4.00E-10	5.00E-9	5.00E-9
Ala-Val	99	2.00E-12	6.00E-10	1.00E-11	3.00E-9
Ala-Val	106	7.00E-11	>3.50E-9	2.00E-10	3.00E-8

[0901] **표 3.** *시험관내* 세포독성 분석에 의해 결정된 항-EGFR-접합체에 대한 IC_{50} 값 (몰, M).

표 3

[0902]

펩타이드 링커	화합물 #	HSC2 -블록	HSC2 +블록	KB -블록	KB +블록	H2110 -블록	H2110 +블록
Ala-Val	18	6.00E-12	1.00E-9	4.00E-11	3.50E-9	4.00E-10	8.00E-9
Ala-Val	79	3.00E-10	>3.50E-9	3.00E-9	>3.50E-9	>1.00E-8	>3.50E-8
Gln-Leu	55	4.00E-12	9.00E-10	3.00E-11	2.00E-9	1.00E-10	6.00E-9
Ala-Val	46	6.00E-12	1.00E-9	4.00E-11	2.00E-9	1.00E-10	1.00E-8
Ala-Val	65	1.50E-12	1.20E-9	4.80E-12	1.50E-9		
Ala-Val	134	9.00E-11	8.00E-9	6.00E-10	1.00E-8		
Ser-Val	147	5.00E-11	5.00E-9	2.50E-10	7.00E-9		

[0903] **실시예 38. OV90 이종이식편을 보유하는 SCID 마우스에서 항-FRα-55의 항종양 활성 (종양 부피 중앙값, mm^3).**

[0904] 6 주령 암컷 CB.17 SCID 마우스를 Charles River Laboratories로부터 수령했다. 마우스는 오른쪽 옆구리에 피하 주사에 의해 0.1 ml 50% 마트리겔/무혈청 배지에 현탁된 1 x 10^7 OV-90 종양 세포를 접종받았다. 종양 부피가 약 100 mm^3에 도달했을 때 (접종 후 7 일째), 동물을 종양 부피를 기준으로 각각 6 마리 마우스의 4 그룹으로 무작위화했다. 마우스는 0 일 (접종 후 7 일)에 비히클 대조군 (0.15 ml/마우스) 또는 0.7, 1.4 또는 2.7 mg/kg의 항-FRα-55의 단일 IV 투여를 받았다.

[0905] 종양 크기는 캘리퍼스를 사용하여 삼차원으로 매주 두 번 내지 세 번 측정되었다. 종양 부피는 공식 V = 길이 x 너비 x 높이 x 1/2를 사용하여 mm^3로 표현되었다. 마우스는 종양 부피가 50% 이상 감소된 경우 부분 관해(PR)로, 만져지는 종양을 검출할 수 없을 경우 종양 완전 관해(CR)로 간주되었다. 종양 부피는 StudyLog 소프트웨어에 의해 결정되었다.

[0906] 종양 성장 억제(T/C 값)는 다음 화학식을 사용하여 결정되었다:

[0907] T/C (%) = 처리된 종양 부피 중앙값 / 대조군의 종양 부피의 중앙값 x 100.

[0908] 비히클 대조군의 종양 부피가 1000 mm^3의 사전 결정된 크기에 도달했을 때 처리된 군 (T) 및 비히클 대조군 (C) 군에 대해 종양 부피를 동시에 측정했다. 종양이 없는 마우스 (0 mm^3)를 포함하여 각 처리군의 일일 종양 부피 중앙값을 측정했다. NCI 표준에 따르면, T/C ≤ 42%가 항종양 활성의 최소 수준이다. T/C <10%는 높은 항종양 활성 수준으로 간주된다.

[0909] 도 1에 나타난 바와 같이 항-FRα-55 접합체는 테스트된 모든 용량에서 매우 활성이다.

[0910] **실시예 39. NCI-H2110 이종이식편을 보유하는 SCID 마우스에서 항-FRα-18의 항종양 활성 (종양 부피 중앙값, mm^3).**

[0911] 6 주령 암컷 CB.17 SCID 마우스를 Charles River Laboratories로부터 수령했다. 마우스는 오른쪽 옆구리에 피하 주사에 의해 0.1 ml 50% 마트리겔/무혈청 배지에 현탁된 1 x 10^7 NCI-H2110 종양 세포를 접종받았다. 종양 부피가 약 100 mm^3에 도달했을 때 (접종 후 6 일째), 동물을 종양 부피를 기준으로 각각 6 마리 마우스의 3 그룹으로 무작위화했다. 마우스는 0 일 (접종 후 6 일)에 비히클 대조군 (0.15 ml/마우스) 또는 1.1 또는 2.2 mg/kg의 항-FRα-18의 단일 IV 투여를 받았다.

[0912] 종양 크기는 캘리퍼스를 사용하여 삼차원으로 매주 두 번 내지 세 번 측정되었다. 종양 부피는 공식 V = 길이 x 너비 x 높이 x 1/2를 사용하여 mm^3로 표현되었다. 마우스는 종양 부피가 50% 이상 감소된 경우 부분 관해(PR)로, 만져지는 종양을 검출할 수 없을 경우 종양 완전 관해(CR)로 간주되었다. 종양 부피는 StudyLog 소프트웨어에 의해 결정되었다.

[0913] 종양 성장 억제(T/C 값)는 다음 화학식을 사용하여 결정되었다:

[0914] T/C (%) = 처리된 종양 부피 중앙값 / 대조군의 종양 부피의 중앙값 x 100.

[0915] 비히클 대조군의 종양 부피가 1000 mm^3의 사전 결정된 크기에 도달했을 때 처리된 군 (T) 및 비히클 대조군 (C) 군에 대해 종양 부피를 동시에 측정했다. 종양이 없는 마우스 (0 mm^3)를 포함하여 각 처리군의 일일 종양 부피 중앙값을 측정했다.

[0916] NCI 표준에 따르면, T/C ≤ 42%가 항종양 활성의 최소 수준이다. T/C <10%는 높은 항종양 활성 수준으로 간주된다.

[0917] 도 2에 나타난 바와 같이, 항-FRα-18 접합체는 테스트된 모든 용량에서 매우 활성이다.

[0918] **실시예 40. FaDu 이종이식편을 보유하는 SCID 마우스에서 항-EGFR-79의 항종양 활성 (종양 부피 중앙값, mm^3).**

[0919] 6 주령 암컷 CB.17 SCID 마우스를 Charles River Laboratories로부터 수령했다. 마우스는 오른쪽 옆구리에 피하 주사에 의해 0.1 ml 50% 마트리겔/무혈청 배지에 현탁된 1 x 10^7 FaDu 종양 세포를 접종받았다. 종양 부피가 약 100 mm^3에 도달했을 때 (접종 후 6 일째), 동물을 종양 부피를 기준으로 각각 6 마리 마우스의 4 그룹으로 무작위화했다. 마우스는 0 일 (접종 후 6 일)에 비히클 대조군 (0.15 ml/마우스) 또는 3.7, 7.4 또는 14.9 mg/kg의 항-EGFR-79의 단일 IV 투여를 받았다.

[0920] 종양 크기는 캘리퍼스를 사용하여 삼차원으로 매주 두 번 내지 세 번 측정되었다. 종양 부피는 공식 V = 길이 x 너비 x 높이 x 1/2를 사용하여 mm^3로 표현되었다. 마우스는 종양 부피가 50% 이상 감소된 경우 부분 관해(PR)로, 만져지는 종양을 검출할 수 없을 경우 종양 완전 관해(CR)로 간주되었다. 종양 부피는 StudyLog 소프트웨어에 의해 결정되었다.

[0921] 종양 성장 억제(T/C 값)는 다음 화학식을 사용하여 결정되었다:

[0922] T/C (%) = 처리된 종양 부피 중앙값 / 대조군의 종양 부피의 중앙값 x 100.

[0923] 비히클 대조군의 종양 부피가 1000 mm^3의 사전 결정된 크기에 도달했을 때 처리된 군 (T) 및 비히클 대조군 (C) 군에 대해 종양 부피를 동시에 측정했다. 종양이 없는 마우스 (0 mm^3)를 포함하여 각 처리군의 일일 종양 부피 중앙값을 측정했다. NCI 표준에 따르면, T/C ≤ 42%가 항종양 활성의 최소 수준이다. T/C <10%는 높은 항종양 활성 수준으로 간주된다.

[0924] 도 3에 나타난 바와 같이, 항-EGFR-79 접합체는 테스트된 모든 용량에서 매우 활성이다.

[0925] **실시예 41. 이시카와 이종이식편을 보유하는 SCID 마우스에서 항-FRα-46의 항종양 활성 (종양 부피 중앙값, mm^3).**

[0926] 6 주령 암컷 CB.17 SCID 마우스를 Charles River Laboratories로부터 수령했다. 마우스는 오른쪽 옆구리에 피하 주사에 의해 0.1 ml 50% 마트리겔/무혈청 배지에 현탁된 1 x 10^7 이시카와 종양 세포를 접종받았다. 종양 부피가 약 100 mm^3에 도달했을 때 (접종 후 23 일째), 동물을 종양 부피를 기준으로 각각 6 마리 마우스의 4 그룹으로 무작위화했다. 마우스는 0 일 (접종 후 23 일)에 비히클 대조군 (0.15 ml/마우스) 또는 0.5, 0.9 및 1.9 mg/kg의 항-FRα-46의 단일 IV 투여를 받았다.

[0927] 종양 크기는 캘리퍼스를 사용하여 삼차원으로 매주 두 번 내지 세 번 측정되었다. 종양 부피는 공식 V = 길이 x 너비 x 높이 x 1/2를 사용하여 mm^3로 표현되었다. 마우스는 종양 부피가 50% 이상 감소된 경우 부분 관해(PR)로, 만져지는 종양을 검출할 수 없을 경우 종양 완전 관해(CR)로 간주되었다. 종양 부피는 StudyLog 소프트웨어에 의해 결정되었다.

[0928] 종양 성장 억제(T/C 값)는 다음 화학식을 사용하여 결정되었다:

[0929] T/C (%) = 처리된 종양 부피 중앙값 / 대조군의 종양 부피의 중앙값 x 100.

[0930] 비히클 대조군의 종양 부피가 1000 mm^3의 사전 결정된 크기에 도달했을 때 처리된 군 (T) 및 비히클 대조군 (C)

군에 대해 종양 부피를 동시에 측정했다. 종양이 없는 마우스 (0 mm^3)를 포함하여 각 처리군의 일일 종양 부피 중앙값을 측정했다. NCI 표준에 따르면, T/C ≤ 42%가 항종양 활성의 최소 수준이다. T/C <10%는 높은 항종양 활성 수준으로 간주된다.

[0931] 도 4에 나타난 바와 같이, 항-FRα-46 접합체는 테스트된 모든 용량에서 활성이다.

[0932] **실시예 42. KB 이종이식편을 보유하는 SCID 마우스에서 항-FRα-18의 항종양 활성 (종양 부피 중앙값, mm^3).**

[0933] 6 주령 암컷 CB.17 SCID 마우스를 Charles River Laboratories로부터 수령했다. 마우스는 오른쪽 옆구리에 피하 주사에 의해 0.1 ml 50% 마트리겔/무혈청 배지에 현탁된 1 x 10^7 이시카와 종양 세포를 접종받았다. 종양 부피가 약 100 mm^3에 도달했을 때 (접종 후 6 일째), 동물을 종양 부피를 기준으로 각각 6 마리 마우스의 3 그룹으로 무작위화했다. 마우스는 0 일 (접종 후 6 일)에 비히클 대조군 (0.15 ml/마우스) 또는 1.3 및 2.7 mg/kg의 항-FRα-18의 단일 IV 투여를 받았다.

[0934] 종양 크기는 캘리퍼스를 사용하여 삼차원으로 매주 두 번 내지 세 번 측정되었다. 종양 부피는 공식 V = 길이 x 너비 x 높이 x 1/2를 사용하여 mm^3로 표현되었다. 마우스는 종양 부피가 50% 이상 감소된 경우 부분 관해(PR)로, 만져지는 종양을 검출할 수 없을 경우 종양 완전 관해(CR)로 간주되었다. 종양 부피는 StudyLog 소프트웨어에 의해 결정되었다.

[0935] 종양 성장 억제(T/C 값)는 다음 화학식을 사용하여 결정되었다:

[0936] T/C (%) = 처리된 종양 부피 중앙값 / 대조군의 종양 부피의 중앙값 x 100.

[0937] 비히클 대조군의 종양 부피가 1000 mm^3의 사전 결정된 크기에 도달했을 때 처리된 군 (T) 및 비히클 대조군 (C) 군에 대해 종양 부피를 동시에 측정했다. 종양이 없는 마우스 (0 mm^3)를 포함하여 각 처리군의 일일 종양 부피 중앙값을 측정했다. NCI 표준에 따르면, T/C ≤ 42%가 항종양 활성의 최소 수준이다. T/C <10%는 높은 항종양 활성 수준으로 간주된다.

[0938] 도 5에 나타난 바와 같이, 항-FRα-18 접합체는 테스트된 모든 용량에서 매우 활성이다.

[0939] **실시예 43. KB 이종이식편을 보유하는 SCID 마우스에서 항-FRα-46의 항종양 활성 (종양 부피 중앙값, mm^3).**

[0940] 6 주령 암컷 CB.17 SCID 마우스를 Charles River Laboratories로부터 수령했다. 마우스는 오른쪽 옆구리에 피하 주사에 의해 0.1 ml 50% 마트리겔/무혈청 배지에 현탁된 1 x 10^7 KB 종양 세포를 접종받았다. 종양 부피가 약 100 mm^3에 도달했을 때 (접종 후 6 일째), 동물을 종양 부피를 기준으로 각각 6 마리 마우스의 4 그룹으로 무작위화했다. 마우스는 0 일 (접종 후 6 일)에 비히클 대조군 (0.15 ml/마우스) 또는 0.5, 0.9 및 1.9 mg/kg의 항-FRα-46의 단일 IV 투여를 받았다.

[0941] 종양 크기는 캘리퍼스를 사용하여 삼차원으로 매주 두 번 내지 세 번 측정되었다. 종양 부피는 공식 V = 길이 x 너비 x 높이 x 1/2를 사용하여 mm^3로 표현되었다. 마우스는 종양 부피가 50% 이상 감소된 경우 부분 관해(PR)로, 만져지는 종양을 검출할 수 없을 경우 종양 완전 관해(CR)로 간주되었다. 종양 부피는 StudyLog 소프트웨어에 의해 결정되었다.

[0942] 종양 성장 억제(T/C 값)는 다음 화학식을 사용하여 결정되었다:

[0943] T/C (%) = 처리된 종양 부피 중앙값 / 대조군의 종양 부피의 중앙값 x 100.

[0944] 비히클 대조군의 종양 부피가 1000 mm^3의 사전 결정된 크기에 도달했을 때 처리된 군 (T) 및 비히클 대조군 (C) 군에 대해 종양 부피를 동시에 측정했다. 종양이 없는 마우스 (0 mm^3)를 포함하여 각 처리군의 일일 종양 부피 중앙값을 측정했다. NCI 표준에 따르면, T/C ≤ 42%가 항종양 활성의 최소 수준이다. T/C <10%는 높은 항종양 활성 수준으로 간주된다.

[0945] 도 6에 나타난 바와 같이, 항-FRα-46 접합체는 테스트된 모든 용량에서 매우 활성이다.

[0946] **실시예 44. OCI-Ly18 이종이식편을 보유하는 SCID 마우스에서 huCD19-55의 항종양 활성 (종양 부피 중앙값,**

mm^3).

[0947] 6 주령 암컷 CB.17 SCID 마우스를 Charles River Laboratories로부터 수령했다. 마우스는 오른쪽 옆구리에 피하 주사에 의해 0.1 ml 50% 마트리겔/무혈청 배지에 현탁된 1 x 10^7 OCI-Ly18 종양 세포를 접종받았다. 종양 부피가 약 100 mm^3에 도달했을 때 (접종 후 14 일째), 동물을 종양 부피를 기준으로 각각 6 마리 마우스의 4 그룹으로 무작위화했다. 마우스는 0 일 (접종 후 14 일)에 비히클 대조군 (0.15 ml/마우스) 또는 1.1 및 2.1 mg/kg의 huCD19-55의 단일 IV 투여를 받았다.

[0948] 종양 크기는 캘리퍼스를 사용하여 삼차원으로 매주 두 번 내지 세 번 측정되었다. 종양 부피는 공식 V = 길이 x 너비 x 높이 x 1/2를 사용하여 mm^3로 표현되었다. 마우스는 종양 부피가 50% 이상 감소된 경우 부분 관해(PR)로, 만져지는 종양을 검출할 수 없을 경우 종양 완전 관해(CR)로 간주되었다. 종양 부피는 StudyLog 소프트웨어에 의해 결정되었다.

[0949] 종양 성장 억제(T/C 값)는 다음 화학식을 사용하여 결정되었다:

[0950] T/C (%) = 처리된 종양 부피 중앙값 / 대조군의 종양 부피의 중앙값 x 100.

[0951] 비히클 대조군의 종양 부피가 1000 mm^3의 사전 결정된 크기에 도달했을 때 처리된 군 (T) 및 비히클 대조군 (C) 군에 대해 종양 부피를 동시에 측정했다.

[0952] 종양이 없는 마우스 (0 mm^3)를 포함하여 각 처리군의 일일 종양 부피 중앙값을 측정했다. NCI 표준에 따르면, T/C ≤ 42%가 항종양 활성의 최소 수준이다. T/C <10%는 높은 항종양 활성 수준으로 간주된다.

[0953] 도 7에 나타난 바와 같이, huCD19-55 접합체는 테스트된 모든 용량에서 매우 활성이다.

[0954] **실시예 45. 선택된 항-EGFR-IGN 접합체의 방관자 활성**

[0955] 세포를 열 불활성화 10% FBS (Thermo Fisher) 및 0.1 mg/ml 젠타마이신 (Thermo Fisher)으로 보충된 RPMI-1640 (Thermo Fisher)에서 웰당 1000 개의 MDA-MB-468 세포 또는 웰당 500 개의 나말와 세포의 파종 밀도로 96-웰 U-바텀, 로우 클러스터 플레이트(Costar)에 플레이팅했다. 항원 양성 MDA-MDA-468 세포 및 항원 음성 나말와 세포의 혼합 배양물 (또는 개별적으로 배양된 각 세포)을 동일한 배지에서 연속 희석된 접합체에 노출시키고 플레이팅된 세포에 첨가했다. 세포를 5 일 동안 인큐베이션하고, 제조사의 프로토콜에 따라 Cell Titer Glo (Promega)에 의해 전체 세포 생존율의 억제를 결정했다. 표 4에 나타난 바와 같은 결과는 모든 접합체가 항원 음성 세포에 대한 방관자 활성을 나타냄을 보여준다.

[0956] **표 4.** *시험관내* 전체 세포 생존율 분석에 의해 결정된 항-EGFR-접합체에 대한 IC_{50} 값 (몰, M).

표 4

[0957]

화합물 #	대조군, IC_{50}, M		방관자
	나말와	MDA-MB-468	(MDA-MB-468 + 나말와)
18	2.00E-9	2.30E-11	3.00E-11
79	6.00E-9	1.70E-10	2.70E-10
46	3.00E-9	1.00E-11	1.00E-11

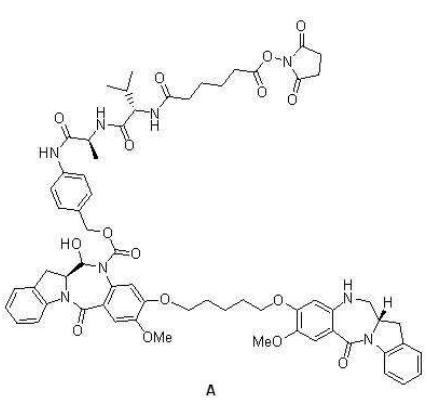
[0958] **실시예 46. DNA에 대한 본 발명의 화합물의 이화산물의 결합**

[0959] 디곡시제닌-표지된 헤어핀 올리고뉴클레오타이드에 대한 본 발명의 화합물의 이화산물의 결합은 경쟁 ELISA를 사용하여 측정되었고, 여기서 여러 농도의 이화산물을 비오틴화된 참조 분자와 미리 혼합하고 이어서 디곡시제닌-표지된 헤어핀 올리고뉴클레오타이드와 함께 인큐베이션했다. 디곡시제닌-표지된 헤어핀 올리고뉴클레오타이드에 대한 비오틴화된 참조 화합물의 결합은, 본 발명의 경쟁 이화산물의 존재에서, ELISA에 의해 평가되었다. ELISA 방법은 포획을 위해 코팅된 스트렙타비딘을 사용하여 검출을 위해 항-디곡시제닌 항체-홀스래디쉬 과산화효소(HRP) 접합체를 사용했다. 결과가 도 8에 나타난다.

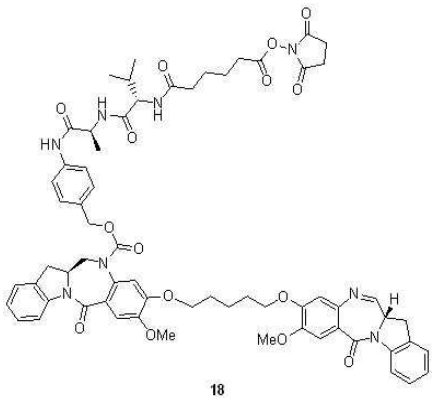
[0960] **실시예 47. 접합 효율에 대한 비교 데이터**

[0961] 비교 인돌리노벤조디아제핀 화합물인, 화합물 **A**는 WO2013/177481에 기재된 것과 유사한 절차를 사용하여 합성되었다.

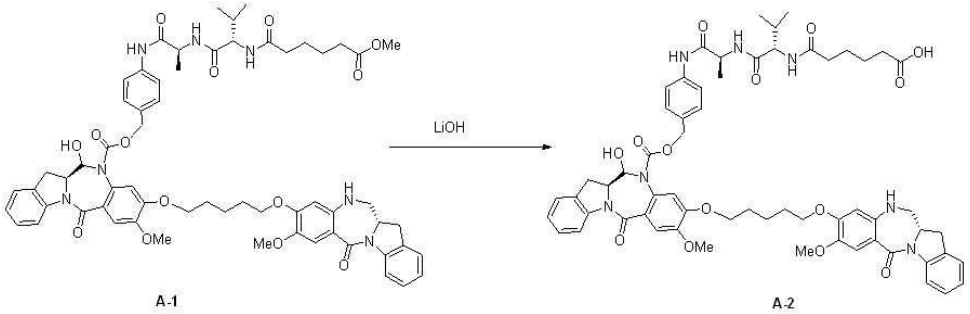
[0962] 화합물 **A**는 마스킹된 이민 벤조디아제핀 단량체의 N-10 위치에서 자가 희생 링커를 갖는다 (즉, 자가 희생 링커의 절단은 N10-C11 위치에서 이민 결합의 형성을 야기한다). 대조적으로, 화합물 **18**과 같은 본 발명의 화합물은 환원된-이민 벤조디아제핀 단량체의 N-10 위치에서 자가 희생 링커를 갖는다. 본 발명의 화합물은 자가 희생 링커를 보유하지 않는 벤조디아제핀 단량체에서 이민 작용성을 갖는다. 이민 작용성은 화합물을 소듐 비설파이트로 처리하여 항체와의 접합 반응 전에 용해도가 증가된 설폰화된 화합물을 형성함으로써 변형될 수 있다.

[0963] 
A

;

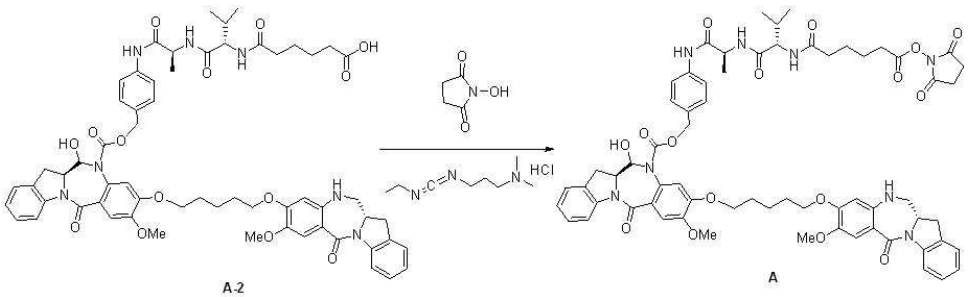

18

[0964] *화합물 **A**의 합성*

[0965] 

A-1 A-2

[0966] 4-((S)-2-((S)-2-(6-메톡시-6-옥소헥산아미도)-3-메틸부탄아미도)프로판아미도)벤질 (12S,12aS)-12-하이드록시-8-메톡시-9-((5-(((S)-8-메톡시-6-옥소-11,12,12a,13-테트라하이드로-6H-벤조[5,6][1,4]디아제피노[1,2-a]인돌-9-일)옥시)펜틸)옥시)-6-옥소-12a,13-디하이드로-6H-벤조[5,6][1,4]디아제피노[1,2-a]인돌-11(12H)-카르복실레이트 (30 mg, 0.026 mmol) (화합물 **A-1**)를 WO2013/177481에 기재된 것과 유사한 절차를 사용하여 제조했다. 화합물 **A-1**을 무수 테트라하이드로퓨란 (988 μl) 및 탈이온수 (329 μl)에 용해시켰다. 리튬 하이드록사이드 (3.16 mg, 0.132 mmol)를 첨가했다. 반응 혼합물을 LCMS에 의해 모니터링했다. 90 분 동안 실온에서 교반한 후 이를 30% MeOH/DCM 및 탈이온수로 희석한 다음, 0.5 M HCl (~1mL)을 사용하여 pH~3으로 산성화시켰다. 백색 침전물이 형성되었다. 용액을 30% MeOH/DCM으로 2 회 추출했다. 유기층을 물로 세척하고, 마그네슘 설페이트로 건조시키고, 셀라이트를 통해 여과하고 농축시켜 20mg 미정제 생성물을 회백색 고체, 화합물 **A-2**로 수득했다.

[0967] 

A-2 A

[0968] 6-(((S)-1-(((S)-1-((4-((((12S,12aS)-12-하이드록시-8-메톡시-9-((5-(((S)-8-메톡시-6-옥소-11,12,12a,13-테트라하이드로-6H-벤조[5,6][1,4]디아제피노[1,2-a]인돌-9-일)옥시)펜틸)옥시)-6-옥소-11,12,12a,13-테트라하

이드로-6H-벤조[5,6][1,4]디아제피노[1,2-a]인돌-11-카르보닐)옥시)메틸)페닐)아미노)-1-옥소프로판-2-일)아미노)-3-메틸-1-옥소부탄-2-일)아미노)-6-옥소헥산산, 화합물 **A-2** (20 mg, 0.018 mmol) 및 N-하이드록시 석신이미드 (6.14 mg, 0.053 mmol)를 무수 디클로로메탄 (356 μl)에 용해시켰다. EDC○HCl (17.05 mg, 0.089 mmol)을 첨가하고 반응 혼합물을 실온에서 90 분 동안 교반했다. 반응 완료시, 혼합물을 DCM으로 희석하고 물로 세척했다. 유기층을 무수 마그네슘 설페이트로 건조시키고, 여과하고 농축시켰다. 미정제 생성물을 RP-HPLC (C18 Kromasil, ACN/탈이온수, 30 분에 걸쳐 50-65%)에 의해 정제했다. 생성물을 함유하는 분획을 조합하고, 동결시키고 동결건조시켜 화합물 **A**를 수득했다.

[0969] *화합물 **A**의 항체 접합체의 제조*

[0970] 화합물 **A**의 항체 접합체를 50 mM HEPES pH 8.5 포함 버퍼 용액 및 공용매 (15% 또는 30% v/v 디메틸아세트아미드 (DMA) 또는 40% 프로필렌 글리콜 (PG))에서 항체를 과잉의 화합물 **A**와 실온에서 24 시간 이상 동안 반응시켜 제조했다. 하기 **표 5**는 접합 수율, 단량체 백분율 및 DAR 값을 보여 준다.

표 5

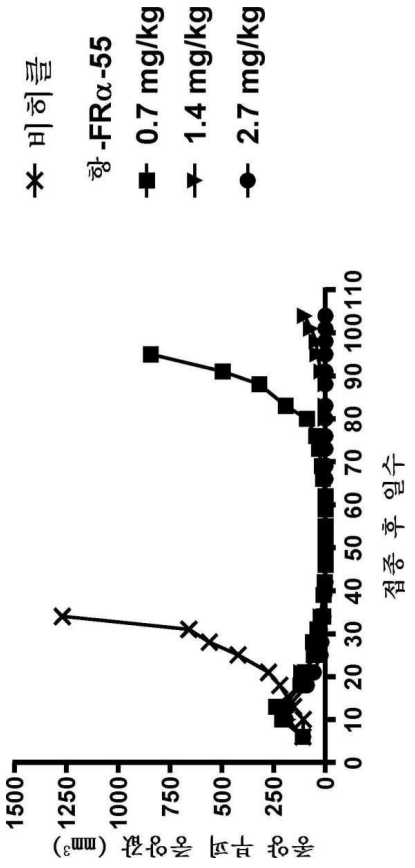
[0971]

조건	**단량체**	**DAR**	**수율**
50mM HEPES, pH 8.5, 15% DMA, RT, 24 h	61 %	1.3	45 %
50mM HEPES, pH 8.5, 30% DMA, RT, 24-72 h	87 %	~ 1.0	NA
50mM HEPES, pH 8.5, 40% PG, RT, 24-72 h	79 %	~1.1	NA

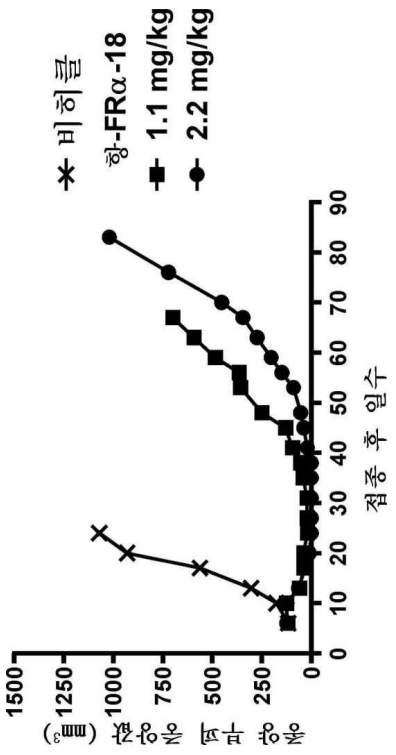
[0972] 부분적으로 화합물 **A**의 낮은 용해도로 인해, 접합체에서 화합물 **A**의 혼입 정도는 현저하게 더 낮은 DAR 값에 의해 나타나는 바와 같이 본 발명의 접합체보다 훨씬 더 낮은 것으로 밝혀졌다. 이에 비해, 화합물 **18**의 항체 접합체의 DAR 값은 ~2.6이다 (위의 실시예 32 참조). 또한, **도 9**는 다량의 비접합 항체 (DO)가 생성된 접합체에 존재함을 나타낸다. 또한, 화합물 **A**의 접합체의 단량체 백분율이 본 발명의 접합체보다 훨씬 낮은 것으로 관찰된다. 이에 비해, 화합물 **18**의 항체 접합체는 97.5%의 단량체 백분율을 갖는 반면; 화합물 **A**의 접합체는 사용된 반응 조건에 따라 61% 내지 87의 단량체 백분율을 갖는다 화합물 **A**를 가용화하기 위한 접합 반응에 사용되는 공용매의 양 증가는 DAR 값의 증가를 야기하지 않았다.

도면

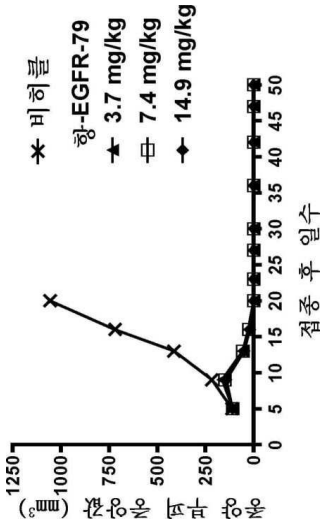
도면1


비히클
항-FRα-55
0.7 mg/kg
1.4 mg/kg
2.7 mg/kg
종양 부피 종양값 (㎣)
0
250
500
750
1000
1250
1500
0
10
20
30
40
50
60
70
80
90
100
110
접종 후 일수

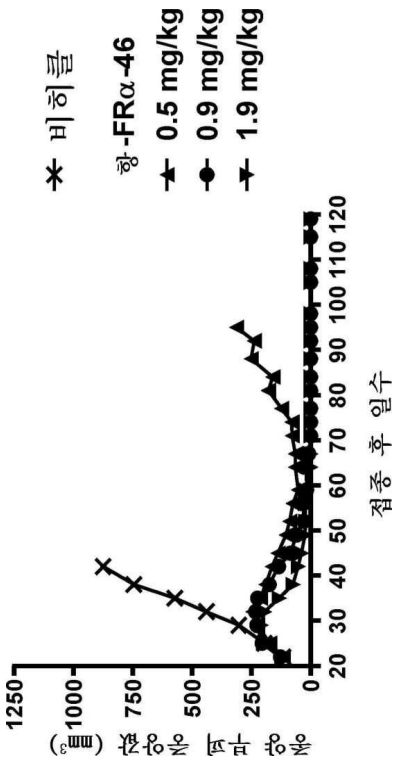
도면2


비히클
항-FRα-18
1.1 mg/kg
2.2 mg/kg
종양 부피 종양값 (㎣)
0
250
500
750
1000
1250
1500
0
10
20
30
40
50
60
70
80
90
접종 후 일수

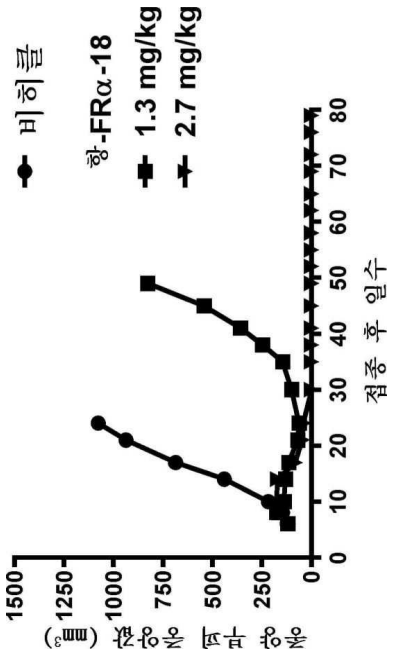
도면3


비히클
항-EGFR-79
3.7 mg/kg
7.4 mg/kg
14.9 mg/kg
종양 부피 중앙값 (㎣)
0
250
500
750
1000
1250
0 5 10 15 20 25 30 35 40 45 50
접종 후 일수

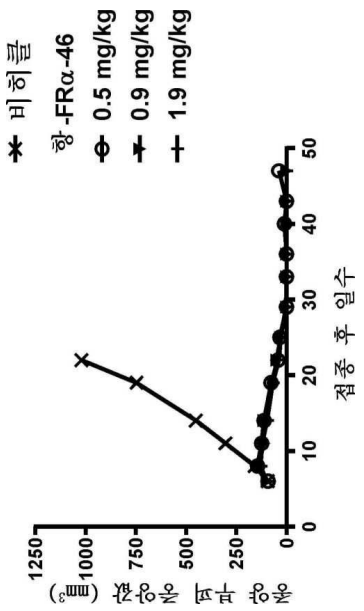
도면4


비히클
항-FRα-46
0.5 mg/kg
0.9 mg/kg
1.9 mg/kg
종양 부피 중앙값 (㎣)
0
250
500
750
1000
1250
20 30 40 50 60 70 80 90 100 110 120
접종 후 일수

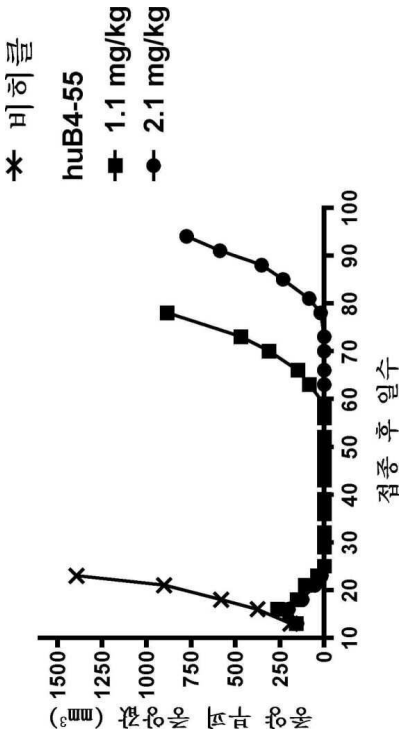
도면5


비히클
항-FRα-18
1.3 mg/kg
2.7 mg/kg
종양 부피 중앙값 (㎣)
접종 후 일수
0
250
500
750
1000
1250
1500
0
10
20
30
40
50
60
70
80

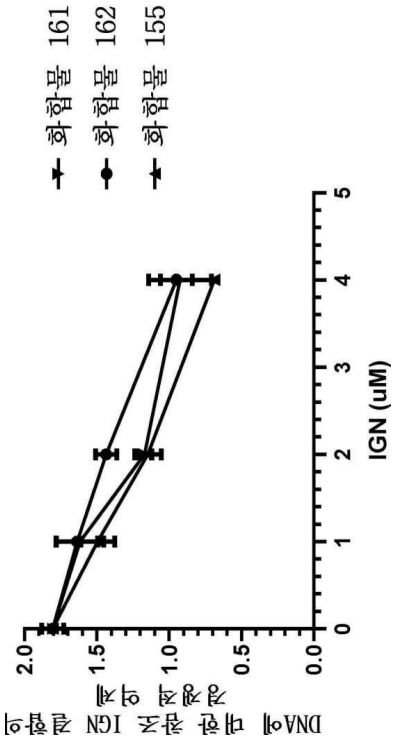
도면6


비히클
항-FRα-46
0.5 mg/kg
0.9 mg/kg
1.9 mg/kg
종양 부피 중앙값 (㎣)
접종 후 일수
0
250
500
750
1000
1250
0
10
20
30
40
50

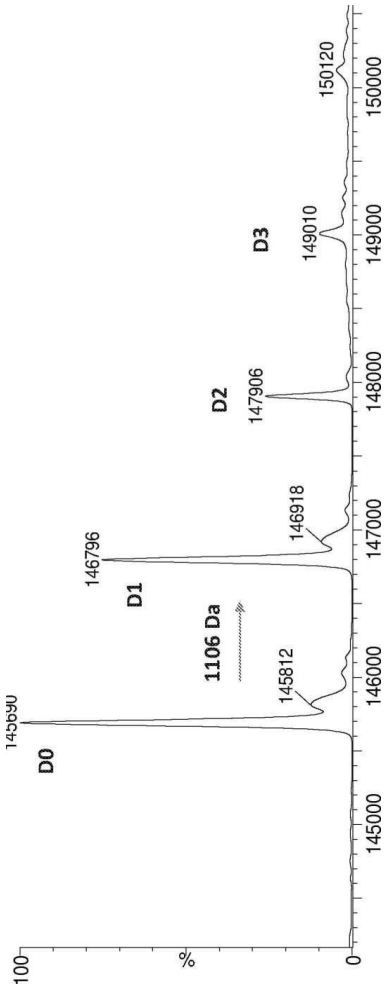
도면7


비히클
huB4-55
1.1 mg/kg
2.1 mg/kg
종양 부피 중앙값 (mm³)
0
250
500
750
1000
1250
1500
10
20
30
40
50
60
70
80
90
100
접종 후 일수

도면8


화합물 161
화합물 162
화합물 155
DNA에 대한 참조 IGN 결합의 경쟁적 억제
0.0
0.5
1.0
1.5
2.0
0
1
2
3
4
5
IGN (uM)

도면9



서 열 목 록

SEQUENCE LISTING

<110> IMMUNOGEN, INC.

<120> BENZODIAZEPINE DERIVATIVES

<130> 121162-04520

<140> PCT/US2020/025341

<141> 2020-03-27

<150> 62/825,954

<151> 2019-03-29

<160> 57

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide"

<400> 1

Arg Ala Ser Gln Asp Ile Asn Ser Tyr Leu Ser

1 5 10

<210> 2

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide"

<400> 2

Arg Val Asn Arg Leu Val Asp

1 5

<210> 3

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide"

<400> 3

Leu Gln Tyr Asp Ala Phe Pro Tyr Thr

1 5

<210> 4

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic

peptide"

<400> 4

Ser Ser Ile Met His

1 5

<210> 5

<211> 17

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide"

<400> 5

Tyr Ile Lys Pro Tyr Asn Asp Gly Thr Lys Tyr Asn Glu Lys Phe Lys

1 5 10 15

Gly

<210> 6

<211> 12

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide"

<400> 6

Glu Gly Gly Asn Asp Tyr Tyr Asp Thr Met Asp Tyr

1 5 10

<210> 7

<211> 121

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic polypeptide"

<400> 7

Gln 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 Ile Phe Thr Ser Ser
20 25 30
Ile Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile
35 40 45
Gly Tyr Ile Lys Pro Tyr Asn Asp Gly Thr Lys Tyr Asn Glu Lys Phe
50 55 60
Lys Gly Arg Ala Thr Leu Thr Ser Asp Arg Ser Thr 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 Glu Gly Gly Asn Asp Tyr Tyr Asp Thr Met Asp Tyr Trp Gly
100 105 110
Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 8
<211> 450
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220><221> source
<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic polypeptide"
<400> 8

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

50 55 60

Lys Gly Arg Ala Thr Leu Thr Ser Asp Arg Ser Thr 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 Glu Gly Gly Asn Asp Tyr Tyr Asp Thr Met Asp Tyr Trp Gly
100 105 110
Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser
115 120 125

Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala
130 135 140
Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val
145 150 155 160
Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala
165 170 175
Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val
180 185 190

Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His
195 200 205
Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys
210 215 220
Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly
225 230 235 240
Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met
245 250 255

Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His
260 265 270
Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val
275 280 285
His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr
290 295 300

Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly
305 310 315 320

Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile
325 330 335
Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val
340 345 350
Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser
355 360 365
Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu
370 375 380

Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro
385 390 395 400
Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val
405 410 415
Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met
420 425 430
His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Cys Leu Ser
435 440 445

Pro Gly
450

<210> 9
<211> 108
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220><221> source
<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic polypeptide"
<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 Arg Ala Ser Gln Asp Ile Asn Ser Tyr
20 25 30

Leu Ser Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Thr Leu Ile

35 40 45

Tyr Arg Val Asn Arg Leu Val Asp Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly

50 55 60

Ser Gly Ser Gly Asn Asp Tyr Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro

65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Leu Gln Tyr Asp Ala Phe Pro Tyr

85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg

100 105

<210> 10

<211> 214

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic polypeptide"

<400> 10

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 Gln Asp Ile Asn Ser Tyr

20 25 30

Leu Ser Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Thr Leu Ile

35 40 45

Tyr Arg Val Asn Arg Leu Val Asp Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly

50 55 60

Ser Gly Ser Gly Asn Asp Tyr Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro

65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Leu Gln Tyr Asp Ala Phe Pro Tyr

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 Lys 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> 11

<211> 17

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic

peptide"

<400> 11

Lys Ser Ser Gln Ser Val Phe Phe Ser Ser Ser Gln Lys Asn Tyr Leu

1 5 10 15

Ala

<210> 12

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic

peptide"

<400> 12

Trp Ala Ser Thr Arg Glu Ser

1 5

<210> 13

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic

peptide"

<400> 13

His Gln Tyr Leu Ser Ser Arg Thr

1 5

<210> 14

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic

peptide"

<400> 14

Ser Tyr Tyr Ile His

1 5

<210> 15

<211> 17

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic

peptide"

<400> 15

Val Ile Tyr Pro Gly Asn Asp Asp Ile Ser Tyr Asn Gln Lys Phe Gln

1 5 10 15

Gly

<210> 16

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide"

<400> 16

Glu Val Arg Leu Arg Tyr Phe Asp Val

1 5

<210> 17

<211> 118

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic polypeptide"

<400> 17

Gln Val Gln Leu Gln Gln Pro Gly Ala Glu Val Val Lys Pro Gly Ala

1 5 10 15

Ser Val Lys Met Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr

20 25 30

Tyr Ile His Trp Ile Lys Gln Thr Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Val

35 40 45

Gly Val Ile Tyr Pro Gly Asn Asp Asp Ile Ser Tyr Asn Gln Lys Phe

50 55 60

Gln Gly Lys Ala Thr Leu Thr Ala Asp Lys Ser Ser Thr Thr Ala Tyr

65 70 75 80

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

85 90 95

Ala Arg Glu Val Arg Leu Arg Tyr Phe Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr
100 105 110
Thr Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 18

<211> 447

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic

polypeptide"

<400> 18

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

Gln Gly Lys Ala Thr Leu Thr Ala Asp Lys Ser Ser Thr Thr Ala Tyr
65 70 75 80
Met Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95
Ala Arg Glu Val Arg Leu Arg Tyr Phe Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr
100 105 110
Thr Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro
115 120 125

Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly
130 135 140
Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn
145 150 155 160

Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln
165 170 175
Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser
180 185 190

Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser
195 200 205
Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr
210 215 220
His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser
225 230 235 240
Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg
245 250 255

Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro
260 265 270
Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala
275 280 285
Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val
290 295 300
Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr
305 310 315 320

Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr
325 330 335
Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu
340 345 350
Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys
355 360 365
Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser
370 375 380

Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp
385 390 395 400
Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser

405 410 415

Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala

420 425 430

Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly

435 440 445

<210> 19

<211> 113

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic polypeptide"

<400> 19

Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Gly Ser Leu Ala Val Ser Pro Gly

1 5 10 15

Glu Arg Val Thr Met Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser Val Phe Phe Ser

20 25 30

Ser Ser Gln Lys Asn Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Ile Pro Gly Gln

35 40 45

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

50 55 60

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

65 70 75 80

Ile Ser Ser Val Gln Pro Glu Asp Leu Ala Ile Tyr Tyr Cys His Gln

85 90 95

Tyr Leu Ser Ser Arg Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys

100 105 110

Arg

<210> 20

<211> 219

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic polypeptide"

<400> 20

Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Gly Ser Leu Ala Val Ser Pro Gly
1 5 10 15

Glu Arg Val Thr Met Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser Val Phe Phe Ser
20 25 30

Ser Ser Gln Lys Asn Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Ile Pro Gly Gln
35 40 45

Ser Pro Arg Leu Leu Ile Tyr Trp Ala Ser Thr Arg Glu Ser Gly Val
50 55 60

Pro Asp Arg Phe Thr Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr
65 70 75 80

Ile Ser Ser Val Gln Pro Glu Asp Leu Ala Ile Tyr Tyr Cys His Gln
85 90 95

Tyr Leu Ser Ser Arg Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu 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 Lys 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> 21

<211> 15

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223>

/note="Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide"

<400> 21

Lys Ala Ser Gln Ser Val Asp Tyr Ser Gly Asp Ser Tyr Met Asn

1 5 10 15

<210> 22

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide"

<400> 22

Ala Ala Ser Asp Leu Glu Ser

1 5

<210> 23

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide"

<400> 23

Gln Gln Ser His Glu Asp Pro Phe Thr

1 5

<210> 24

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic

peptide"

<400> 24

Ser Tyr Trp Met His

1 5

<210> 25

<211> 17

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic

peptide"

<400> 25

Glu Ile Ile Pro Ile Phe Gly His Thr Asn Tyr Asn Glu Lys Phe Lys

1 5 10 15

Ser

<210> 26

<211> 14

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic

peptide"

<400> 26

Gly Gly Tyr Tyr Tyr Tyr Pro Arg Gln Gly Phe Leu Asp Tyr

1 5 10

<210> 27

<211> 123

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source
<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
polypeptide"
<400> 27

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

50 55 60
Lys Ser Arg Phe Thr Ile Ser Leu Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
65 70 75 80
Leu Gln Met Gly Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95
Ala Arg Gly Gly Tyr Tyr Tyr Tyr Pro Arg Gln Gly Phe Leu Asp Tyr
100 105 110
Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 28
<211> 111
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220><221> source
<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
polypeptide"
<400> 28

Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Asp Ser Leu Ala Val Ser Leu Gly
1 5 10 15
Glu Arg Ala Thr Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gln Ser Val Asp Tyr Ser

20 25 30

Gly Asp Ser Tyr Met Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro

35 40 45

Lys Leu Leu Ile Tyr Ala Ala Ser Asp Leu Glu Ser Gly Ile Pro Ala

50 55 60

Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser

65 70 75 80

Ser Leu Glu Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser His

85 90 95

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

100 105 110

<210> 29

<211> 452

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic polypeptide"

<400> 29

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

1 5 10 15

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

20 25 30

Trp Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val

35 40 45

Gly Glu Ile Ile Pro Ile Phe Gly His Thr Asn Tyr Asn Glu Lys Phe

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

Ala Arg Gly Gly Tyr Tyr Tyr Tyr Pro Arg Gln Gly Phe Leu Asp Tyr

100 105 110

Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly
115 120 125
Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly
130 135 140
Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val
145 150 155 160
Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe
165 170 175

Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val
180 185 190
Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val
195 200 205
Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Pro Lys
210 215 220
Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu
225 230 235 240

Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr
245 250 255
Leu Tyr Ile Thr Arg Glu Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val
260 265 270
Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val
275 280 285
Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser
290 295 300

Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu
305 310 315 320
Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala
325 330 335
Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro
340 345 350

Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln
355 360 365

Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala
370 375 380
Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr
385 390 395 400
Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu
405 410 415
Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser
420 425 430

Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Cys
435 440 445
Leu Ser Pro Gly
450
<210> 30
<211> 218
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220><221> source
<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
polypeptide"
<400> 30
Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Asp Ser Leu Ala Val Ser Leu Gly
1 5 10 15
Glu Arg Ala Thr Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gln Ser Val Asp Tyr Ser

20 25 30
Gly Asp Ser Tyr Met Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro
35 40 45
Lys Leu Leu Ile Tyr Ala Ala Ser Asp Leu Glu Ser Gly Ile Pro Ala
50 55 60
Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser
65 70 75 80

Ser Leu Glu Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser His

85 90 95

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

100 105 110

Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln

115 120 125

Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr

130 135 140

Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser

145 150 155 160

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

165 170 175

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

180 185 190

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

195 200 205

Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys

210 215

<210> 31

<211> 16

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide"

<400> 31

Arg Ser Ser Arg Ser Leu Leu His Ser Asp Gly Phe Thr Tyr Leu Tyr

1 5 10 15

<210> 32

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide"

<400> 32

Gln Thr Ser Asn Leu Ala Ser

1 5

<210> 33

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide"

<400> 33

Ala Gln Asn Leu Glu Leu Pro Asn Thr

1 5

<210> 34

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide"

<400> 34

Asn Tyr Tyr Ile His

1 5

<210> 35

<211> 17

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide"

<400> 35

Trp Ile Tyr Pro Gly Asn Val Tyr Ile Gln Tyr Asn Glu Lys Phe Lys
1 5 10 15
Gly

<210> 36

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide"

<400> 36

Asp Gly Pro Trp Phe Ala Tyr
1 5

<210> 37

<211> 116

<212

> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic polypeptide"

<400> 37

Gln 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 Asn Tyr
20 25 30
Tyr Ile His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Arg Leu Glu Tyr Ile
35 40 45

Gly Trp Ile Tyr Pro Gly Asn Val Tyr Ile Gln Tyr Asn Glu Lys Phe
50 55 60
Lys Gly Arg Ala Thr Leu Thr Ala 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 Asp Gly Pro Trp Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val
100 105 110

Thr Val Ser Ser
115

<210> 38
<211> 112
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220><221> source
<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic polypeptide"
<400> 38
Asp Ile Val Leu Thr Gln Thr Pro Leu Ser Leu Ser Val Thr Pro Gly
1 5 10 15
Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Arg Ser Leu Leu His Ser
20 25 30
Asp Gly Phe Thr Tyr Leu Tyr Trp Phe Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser

35 40 45
Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Gln Thr Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro
50 55 60
Asp Arg Phe Ser Ser Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile
65 70 75 80
Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Ala Gln Asn
85 90 95
Leu Glu Leu Pro Asn Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys

100 105 110
<210> 39
<211> 445
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic polypeptide"

<400> 39

Gln 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 Asn Tyr
20 25 30

Tyr Ile His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Arg Leu Glu Tyr Ile
35 40 45

Gly Trp Ile Tyr Pro Gly Asn Val Tyr Ile Gln Tyr Asn Glu Lys Phe
50 55 60

Lys Gly Arg Ala Thr Leu Thr Ala 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 Asp Gly Pro Trp Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val
100 105 110

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

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

Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly
145 150 155 160

Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser
165 170 175

Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu
180 185 190

Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr
195 200 205

Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr
210 215 220

Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe

225 230 235 240

Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro

245 250 255

Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val

260 265 270

Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr

275 280 285

Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val

290 295 300

Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys

305 310 315 320

Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser

325 330 335

Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro

340 345 350

Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val

355 360 365

Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly

370 375 380

Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp

385 390 395 400

Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp

405 410 415

Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His

420 425 430

Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly

435 440 445

<210> 40

<211> 219

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic polypeptide"

<400> 40

Asp Ile Val Leu Thr Gln Thr Pro Leu Ser Leu Ser Val Thr Pro Gly
1 5 10 15

Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Arg Ser Leu Leu His Ser
20 25 30

Asp Gly Phe Thr Tyr Leu Tyr Trp Phe Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser
35 40 45

Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Gln Thr Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro
50 55 60

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

Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Ala Gln Asn
85 90 95

Leu Glu Leu Pro Asn Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu 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 Lys 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> 41

<211> 15

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide"

<400> 41

Lys Ala Ser Gln Ser Val Ser Phe Ala Gly Thr Ser Leu Met His

1 5 10 15

<210> 42

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide"

<400> 42

Arg Ala Ser Asn Leu Glu Ala

1 5

<210> 43

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide"

<400> 43

Gln Gln Ser Arg Glu Tyr Pro Tyr Thr

1 5

<210> 44

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide"

<400> 44

Gly Tyr Phe Met Asn
1 5

<210> 45

<211> 17

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide"

<400> 45

Arg Ile His Pro Tyr Asp Gly Asp Thr Phe Tyr Asn Gln Lys Phe Gln
1 5 10 15

Gly

<210> 46

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide"

<400> 46

Tyr Asp Gly Ser Arg Ala Met Asp Tyr
1 5

<210> 47

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide"

<400> 47

Gly Tyr Thr Phe Thr Gly Tyr Phe Met Asn
1 5 10

<210> 48

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide"

<400> 48

Arg Ile His Pro Tyr Asp Gly Asp Thr Phe
1 5 10

<210> 49

<211> 118

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic polypeptide"

<400> 49

Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Val Lys Pro Gly Ala
1 5 10 15

Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Gly Tyr
20 25 30

Phe Met Asn Trp Val Lys Gln Ser Pro Gly Gln Ser Leu Glu Trp Ile
35 40 45

Gly Arg Ile His Pro Tyr Asp Gly Asp Thr Phe Tyr Asn Gln Lys Phe
50 55 60

Gln Gly Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Lys Ser Ser Asn Thr Ala His
65 70 75 80
Met Glu Leu Leu Ser Leu Thr Ser Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95
Thr Arg Tyr Asp Gly Ser Arg Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
100 105 110

Thr Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 50
<211> 112
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220><221> source
<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic polypeptide"
<400> 50
Asp Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Leu Ser Leu Ala Val Ser Leu Gly
1 5 10 15
Gln Pro Ala Ile Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gln Ser Val Ser Phe Ala
20 25 30
Gly Thr Ser Leu Met His Trp Tyr His Gln Lys Pro Gly Gln Gln Pro

35 40 45
Arg Leu Leu Ile Tyr Arg Ala Ser Asn Leu Glu Ala Gly Val Pro Asp
50 55 60
Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Lys Thr Asp Phe Thr Leu Asn Ile Ser
65 70 75 80
Pro Val Glu Ala Glu Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Arg
85 90 95
Glu Tyr Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg

100 105 110
<210> 51
<211> 112

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic polypeptide"

<400> 51

Asp Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Leu Ser Leu Ala Val Ser Leu Gly
1 5 10 15

Gln Pro Ala Ile Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gln Ser Val Ser Phe Ala
20 25 30

Gly Thr Ser Leu Met His Trp Tyr His Gln Lys Pro Gly Gln Gln Pro
35 40 45

Arg Leu Leu Ile Tyr Arg Ala Ser Asn Leu Glu Ala Gly Val Pro Asp
50 55 60

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

Pro Val Glu Ala Glu Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Arg
85 90 95

Glu Tyr Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg
100 105 110

<210> 52

<211> 448

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic polypeptide"

<400> 52

Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Val Lys Pro Gly Ala
1 5 10 15

Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Gly Tyr
20 25 30

Phe Met Asn Trp Val Lys Gln Ser Pro Gly Gln Ser Leu Glu Trp Ile

35 40 45

Gly Arg Ile His Pro Tyr Asp Gly Asp Thr Phe Tyr Asn Gln Lys Phe

50 55 60

Gln Gly Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Lys Ser Ser Asn Thr Ala His

65 70 75 80

Met Glu Leu Leu Ser Leu Thr Ser Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys

85 90 95

Thr Arg Tyr Asp Gly Ser Arg Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr

100 105 110

Thr Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro

115 120 125

Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly

130 135 140

Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn

145 150 155 160

Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln

165 170 175

Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser

180 185 190

Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser

195 200 205

Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr

210 215 220

His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser

225 230 235 240

Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg

245 250 255

Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro

260 265 270

Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala

275 280 285

Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val

290 295 300

Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr

305 310 315 320

Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr

325 330 335

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

340 345 350

Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys

355 360 365

Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser

370 375 380

Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp

385 390 395 400

Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser

405 410 415

Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala

420 425 430

Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys

435 440 445

<210> 53

<211> 218

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic polypeptide"

<400> 53

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

1 5 10 15

Gln Pro Ala Ile Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gln Ser Val Ser Phe Ala

20 25 30

Gly Thr Ser Leu Met His Trp Tyr His Gln Lys Pro Gly Gln Gln Pro

35 40 45

Arg Leu Leu Ile Tyr Arg Ala Ser Asn Leu Glu Ala Gly Val Pro Asp

50 55 60

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

65 70 75 80

Pro Val Glu Ala Glu Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Arg

85 90 95

Glu Tyr Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg

100 105 110

Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln

115 120 125

Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr

130 135 140

Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser

145 150 155 160

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

165 170 175

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

180 185 190

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

195 200 205

Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys

210 215

<210> 54

<211> 218

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic polypeptide"

<400> 54

Asp Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Leu Ser Leu Ala Val Ser Leu Gly
1 5 10 15

Gln Pro Ala Ile Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gln Ser Val Ser Phe Ala
20 25 30

Gly Thr Ser Leu Met His Trp Tyr His Gln Lys Pro Gly Gln Gln Pro
35 40 45

Arg Leu Leu Ile Tyr Arg Ala Ser Asn Leu Glu Ala Gly Val Pro Asp
50 55 60

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

Pro Val Glu Ala Glu Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Arg
85 90 95

Glu Tyr Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg
100 105 110

Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln
115 120 125

Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr
130 135 140

Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser
145 150 155 160

Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr
165 170 175

Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys
180 185 190

His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro
195 200 205

Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
210 215

<210> 55

<211> 4

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic

peptide"

<400

> 55

Ala Leu Ala Leu

1

<210> 56

<211> 4

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic

peptide"

<220><221> MOD_RES

<222> (1)..(1)

<223> Beta-Ala

<400> 56

Xaa Leu Ala Leu

1

<210> 57

<211> 4

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic

peptide"

<400> 57

Gly Phe Leu Gly

1