

(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)(11) 공개번호 10-2024-0042598
(43) 공개일자 2024년04월02일

- (51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 47/68 (2017.01) **A61K 45/06** (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01) **C07K 16/28** (2006.01)
- (52) CPC특허분류
A61K 47/6803 (2023.08)
A61K 45/06 (2013.01)
- (21) 출원번호 10-2024-7000100
(22) 출원일자(국제) 2022년06월02일
심사청구일자 없음
- (85) 번역문제출일자 2022년01월02일
(86) 국제출원번호 PCT/IB2022/055168
(87) 국제공개번호 WO 2022/254377
국제공개일자 2022년12월08일
- (30) 우선권주장
63/202,272 2021년06월03일 미국(US)
63/282,588 2021년11월23일 미국(US)

- (71) 출원인
오름테라퓨틱 주식회사
대전광역시 유성구 문지로 281-25, 2층(문지동)
브리스톨-마이어스 스텝 컴퍼니
미국, 뉴저지 08543-4000, 프린스턴, 루트 206 앤드 프로빈스 라인 로드
- (72) 발명자
피쉬킨, 나탄
미국 02142 메사추세츠 캄브릿지 이스트 켄달 스트리트 650 입센 이노베이션 센터/바이오랩스 오름 테라퓨틱스
박, 피터 유.
미국 02142 메사추세츠 캄브릿지 이스트 켄달 스트리트 650 입센 이노베이션 센터/바이오랩스 오름 테라퓨틱스
바이, 첸
미국 02142 메사추세츠 캄브릿지 이스트 켄달 스트리트 650 입센 이노베이션 센터/바이오랩스 오름 테라퓨틱스
- (74) 대리인
양영준, 이귀동

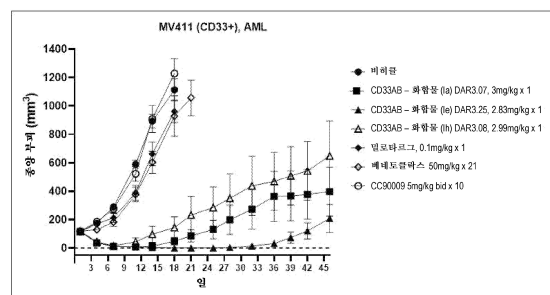
전체 청구항 수 : 총 61 항

(54) 발명의 명칭 신규분해제-항-CD33 항체 접합체

(57) 요약

본 개시내용은 항-CD33 항체에 접합된 신규분해제를 제공한다. 접합체를 포함하는 조성물이 또한 제공된다. 화합물 및 조성물은 질환 또는 상태, 예를 들어 암의 치료를 필요로 하는 대상체에서 질환 또는 상태, 예를 들어 암을 치료하는 데 유용하다.

대표도



(52) CPC특허분류

A61K 47/6849 (2017.08)

A61K 47/6867 (2017.08)

A61P 35/00 (2018.01)

C07K 16/2803 (2013.01)

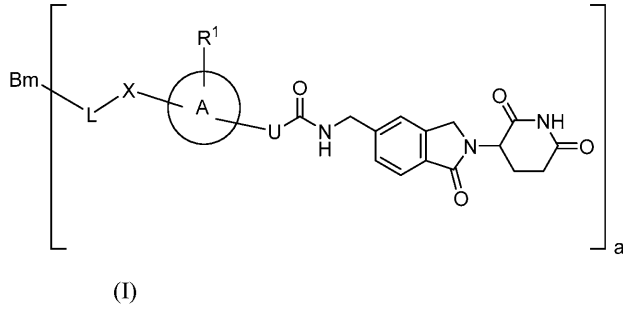
C07K 2317/56 (2013.01)

명세서

청구범위

청구항 1

하기 화학식 (I)의 접합체 또는 그의 제약상 허용되는 염:



여기서:

a는 1 내지 10의 정수이고;

A는 페닐 또는 C₄-C₁₀시클로알킬 고리이고;

U는 NH 및 CF₂로부터 선택되고;

R¹은 독립적으로 수소 및 할로로부터 선택되고;

X는 -NR²-, =C(CH₃)-, -Q-(CH₂)_n-, 및 -Q(CH₂)_mQ'(CH₂)_n-로부터 선택되고; 여기서

Q 및 Q'는 각각 독립적으로 O, S 또는 N(R²)_v이고;

v는 1 또는 2이고;

각각의 R²는 독립적으로 수소 또는 C₁-C₆-알킬이고;

n은 1 내지 6의 정수이고;

m은 2 내지 6의 정수이고;

여기서 각각의 기의 좌측은 L에 부착되고, 우측은 A에 부착되고;

단, X가 NH 또는 -Q-(CH₂)_n-인 경우, R¹은 할로이고;

L은 절단가능한 링커 또는 비-절단가능한 링커이고;

Bm은 서열식별번호: 1에 제시된 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역 (VH) 상보성 결정 영역 (CDR) 1 (VH-CDR1), 서열식별번호: 2에 제시된 아미노산 서열을 포함하는 VH-CDR2, 서열식별번호: 3에 제시된 아미노산 서열을 포함하는 VH-CDR3, 서열식별번호: 5에 제시된 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역 (VL) CDR1 (VL-CDR1), 서열식별번호: 6에 제시된 아미노산 서열을 포함하는 VL-CDR2, 및 서열식별번호: 7에 제시된 아미노산 서열을 포함하는 VL-CDR3을 포함하는 항-CD33 항체 또는 그의 항원-결합 부분이다.

청구항 2

제1항에 있어서, 항-CD33 항체 또는 그의 항원-결합 부분이 서열식별번호: 4에 제시된 아미노산 서열을 포함하는 VH 및 서열식별번호: 8에 제시된 아미노산 서열을 포함하는 VL을 포함하는 것인 접합체.

청구항 3

제1항 또는 제2항에 있어서, 항-CD33 항체 또는 그의 항원-결합 부분이 불변 영역을 포함하고, 여기서 불변 영역은 캡투주맙과 상이한 적어도 1개의 아미노산을 포함하는 것인 접합체.

청구항 4

제1항 내지 제3항 중 어느 한 항에 있어서, 항-CD33 항체 또는 그의 항원-결합 부분이 IgG1 항체 또는 그의 항원-결합 부분인 접합체.

청구항 5

제1항 내지 제4항 중 어느 한 항에 있어서, 항-CD33 항체 또는 그의 항원-결합 부분이 불변 영역에 상응하는 아미노산 297에 알라닌을 포함하는 것인 접합체.

청구항 6

제1항 내지 제5항 중 어느 한 항에 있어서, 항-CD33 항체가 서열식별번호: 9에 제시된 바와 같은 중쇄 및 서열식별번호: 10에 제시된 바와 같은 경쇄를 포함하는 것인 접합체.

청구항 7

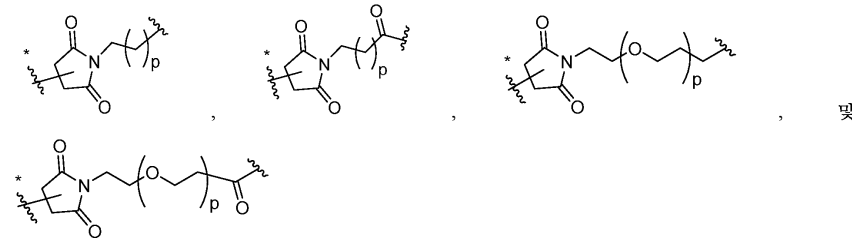
제1항 내지 제6항 중 어느 한 항에 있어서, a가 2 내지 8의 정수인 접합체 또는 그의 제약상 허용되는 염.

청구항 8

제1항 내지 제7항 중 어느 한 항에 있어서, L이 비-절단가능한 링커인 접합체 또는 그의 제약상 허용되는 염.

청구항 9

제8항에 있어서, L이 하기로 이루어진 군으로부터 선택된 것인 접합체 또는 그의 제약상 허용되는 염:



여기서:

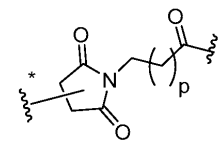
p는 1 내지 10의 정수이고;

~은 X에 대한 부착 지점이고;

~*은 항-CD33 항체 또는 그의 항원-결합 부분에 대한 부착 지점이다.

청구항 10

제9항에 있어서, L이 하기인 접합체 또는 그의 제약상 허용되는 염:



청구항 11

제9항 또는 제10항에 있어서, p 가 5인 집합체 또는 그의 제약상 허용되는 염.

청구항 12

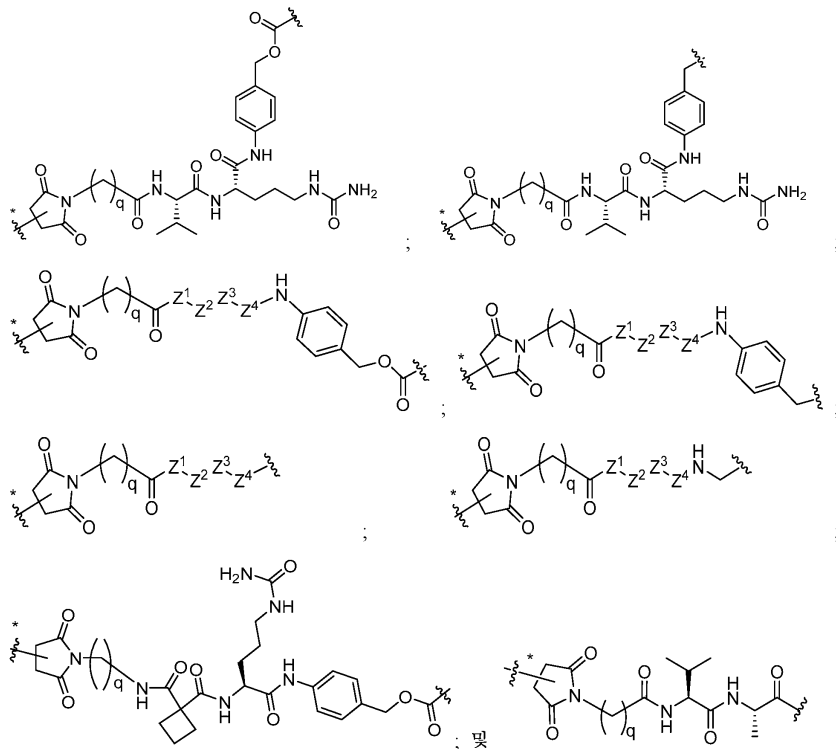
제1항 내지 제7항 중 어느 한 항에 있어서, L이 절단가능한 링커인 접합체 또는 그의 제약상 허용되는 염.

청구항 13

제12항에 있어서, 절단가능한 링커가 프로테아제에 의해 절단가능한 것인 접합체 또는 그의 제약상 허용되는 염.

청구항 14

제12항 또는 제13항에 있어서, L이 하기로 이루어진 군으로부터 선택된 것인 접합체 또는 그의 제약상 허용되는 염:



여기서:

q 는 2 내지 10의 정수이고;

Z^1 , Z^2 , Z^3 , 및 Z^4 는 각각 독립적으로 부재하거나 또는 L- 또는 D-배위의 자연-발생 아미노산 잔기이며, 단, Z^1 , Z^2 , Z^3 , 및 Z^4 중 적어도 2개는 아미노산 잔기이고;

¹¹은 X에 대한 부착 지점이고;

* 은 항-CD33 항체 또는 그의 항원-결합 부분에 대한 부착 지점이다.

청구항 15

제14항에 있어서, Z^1 , Z^2 , Z^3 및 Z^4 가 독립적으로 부재하거나 또는 L-발린, D-발린, L-시트룰린, D-시트룰린, L-알라닌, D-알라닌, L-글루타민, D-글루타민, L-글루탐산, D-글루탐산, L-아스파르트산, D-아스파르트산, L-아스파라긴, D-아스파라긴, L-페닐알라닌, D-페닐알라닌, L-리신, D-리신 및 글리신으로 이루어진 군으로부터 선택되며; 단, Z^1 , Z^2 , Z^3 및 Z^4 중 적어도 2개가 아미노산 잔기인 집합체 또는 그의 제약상 허용되는 염.

청구항 16

제15항에 있어서,

Z^1 이 부재하거나 또는 글리신이고;

Z^2 가 부재하거나 또는 L-글루타민, D-글루타민, L-글루탐산, D-글루탐산, L-아스파르트산, D-아스파르트산, L-알라닌, D-알라닌 및 글리신으로 이루어진 군으로부터 선택되고;

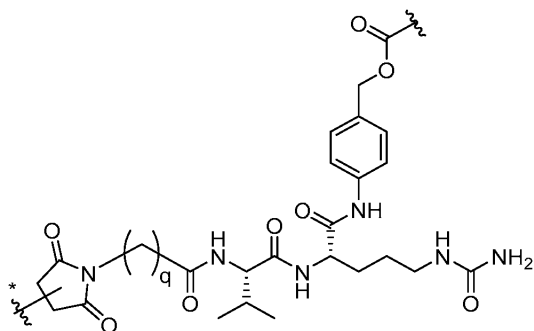
Z^3 이 L-발린, D-발린, L-알라닌, D-알라닌, L-페닐알라닌, D-페닐알라닌 및 글리신으로 이루어진 군으로부터 선택되고;

Z^4 가 L-알라닌, D-알라닌, L-시트룰린, D-시트룰린, L-아스파라긴, D-아스파라긴, L-리신, D-리신, L-페닐알라닌, D-페닐알라닌 및 글리신으로 이루어진 군으로부터 선택된 것인

접합체 또는 그의 제약상 허용되는 염.

청구항 17

제14항에 있어서, L이 하기인 접합체 또는 그의 제약상 허용되는 염:



청구항 18

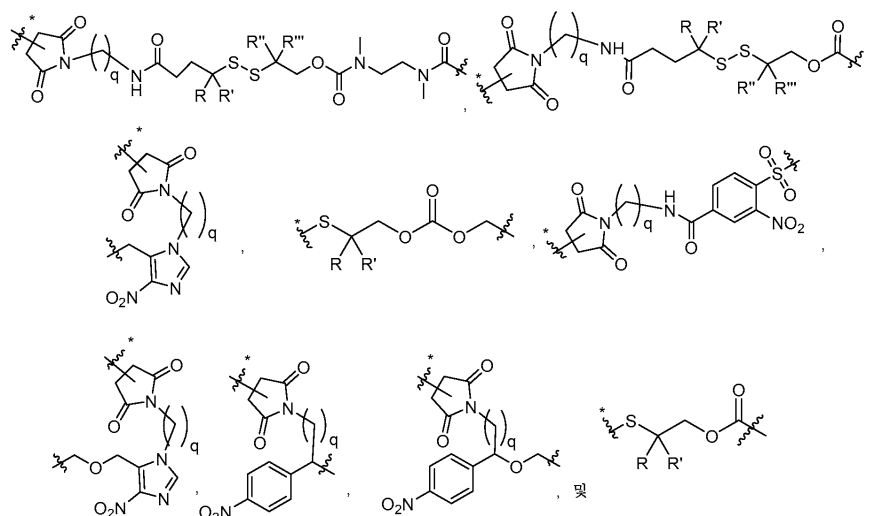
제17항에 있어서, q가 5인 접합체 또는 그의 제약상 허용되는 염.

청구항 19

제12항에 있어서, L이 생체환원성 링커인 접합체 또는 그의 제약상 허용되는 염.

청구항 20

제12항 또는 제19항에 있어서, L이 하기로 이루어진 군으로부터 선택된 것인 접합체:



여기서:

q 는 2 내지 10의 정수이고;

R, R', R" 및 R'''는 각각 독립적으로 수소, C₁-C₆알콕시C₁-C₆알킬, (C₁-C₆)₂NC₁-C₆알킬 및 C₁-C₆알킬로부터 선택되거나, 또는 2개의 같은자리 R 기는 이들이 부착되어 있는 탄소 원자와 함께 시클로부틸 또는 시클로프로필 고리를 형성할 수 있고;

^w은 X 에 대한 부착 지점이고;

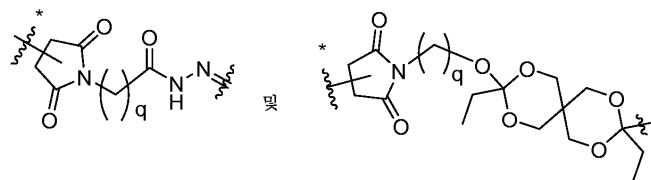
* 은 항-CD33 항체 또는 그의 항원-결합 부분에 대한 부착 지점이다.

청구항 21

제12항에 있어서, L이 산 절단가능한 링커인 접합체 또는 그의 제약상 허용되는 염.

청구항 22

제12항 또는 제21항에 있어서, L이 하기로 이루어진 군으로부터 선택된 것인 집합체 또는 그의 제약상 허용되는
염:



여기서:

q 는 2 내지 10의 정수이고;

^w은 X 에 대한 부착 지점이고;

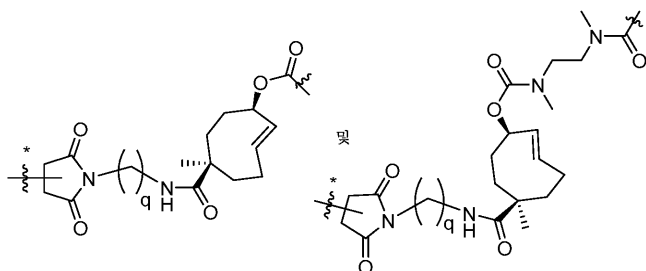
* 은 항-CD33 항체 또는 그의 항원-결합 부분에 대한 부착 지점이다.

청구항 23

제12항에 있어서, L이 클릭-투-릴리즈(click-to-release) 링커인 접합체 또는 그의 제약상 허용되는 염.

청구항 24

제12항 또는 제23항에 있어서, L이 하기로부터 선택된 것인 접합체 또는 그의 제약상 허용되는 염:



여기서:

q는 2 내지 10의 정수이고;

은 X에 대한 부착 지점이고;

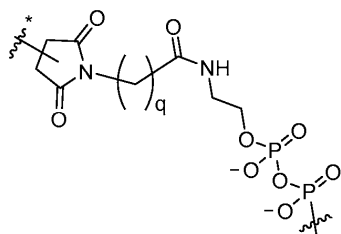
은 항-CD33 항체 또는 그의 항원-결합 부분에 대한 부착 지점이다.

청구항 25

제12항에 있어서, L이 피로포스파타제 절단가능한 링커인 접합체 또는 그의 제약상 허용되는 염.

청구항 26

제25항에 있어서, L이 하기인 접합체 또는 그의 제약상 허용되는 염:



여기서:

q는 2 내지 10의 정수이고;

은 X에 대한 부착 지점이고;

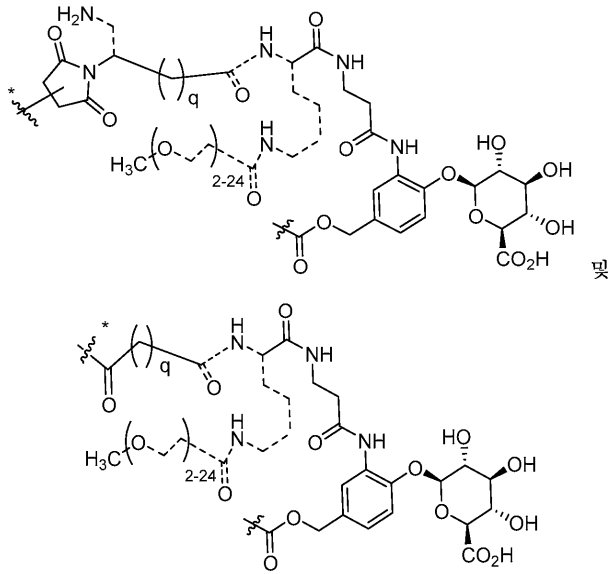
은 항-CD33 항체 또는 그의 항원-결합 부분에 대한 부착 지점이다.

청구항 27

제12항에 있어서, L이 베타-글루쿠로니다제 절단가능한 링커인 접합체 또는 그의 제약상 허용되는 염.

청구항 28

제12항 또는 제27항에 있어서, L이 하기로부터 선택된 것인 집합체 또는 그의 제약상 허용되는 염:



여기서:

q는 2 내지 10의 정수이고;

----는 부재하거나 또는 결합이고;

~은 X에 대한 부착 지점이고;

~*은 항-CD33 항체 또는 그의 항원-결합 부분에 대한 부착 지점이다.

청구항 29

제1항 내지 제28항 중 어느 한 항에 있어서,

A가 페닐이고;

U가 NH이고;

R¹이 할로이고;

X가 -N(R²)_v(CH₂)_mO(CH₂)_n-이고; 여기서

v는 1이고;

m 및 n은 2이고;

R²는 메틸인

집합체 또는 그의 제약상 허용되는 염.

청구항 30

제1항 내지 제28항 중 어느 한 항에 있어서,

A가 페닐이고;

U가 NH이고;

R^1 이 할로이고;

X가 $-N(R^2)_v(CH_2)_mO(CH_2)_n-$ 이고; 여기서

v는 2이고;

m 및 n은 2이고;

각각의 R^2 는 메틸인

집합체.

청구항 31

제1항 내지 제28항 중 어느 한 항에 있어서,

A가 페닐이고;

U가 NH이고;

R^1 이 할로이고;

X가 $-O(CH_2)_n-$ 이고; 여기서

n은 2인

집합체.

청구항 32

제1항 내지 제28항 중 어느 한 항에 있어서,

A가 페닐이고;

U가 NH이고;

R^1 이 할로이고;

X가 $-S(CH_2)_n-$ 이고; 여기서

n은 2인

집합체.

청구항 33

제1항 내지 제28항 중 어느 한 항에 있어서,

A가 페닐이고;

U가 NH이고;

R^1 이 수소이고;

X가 $--NR^2-$ 이고; 여기서

R^2 는 메틸인

집합체.

청구항 34

제1항 내지 제28항 중 어느 한 항에 있어서,

A가 페닐이고;

U가 NH이고;

R¹이 할로이고;

X가 $--NR^2-$ 이고; 여기서

R²는 수소인

접합체.

청구항 35

제1항 내지 제28항 중 어느 한 항에 있어서,

A가 페닐이고;

U가 NH이고;

R¹이 수소이고;

X가 $-C(CH_3)=$ 인

접합체.

청구항 36

제1항 내지 제28항 중 어느 한 항에 있어서,

A가 C₄-C₁₀시클로알킬 고리이고;

U가 NH이고;

R¹이 수소이고;

X가 $-N(R^2)(CH_2)_mO(CH_2)_n-$ 이고; 여기서

n은 1이고;

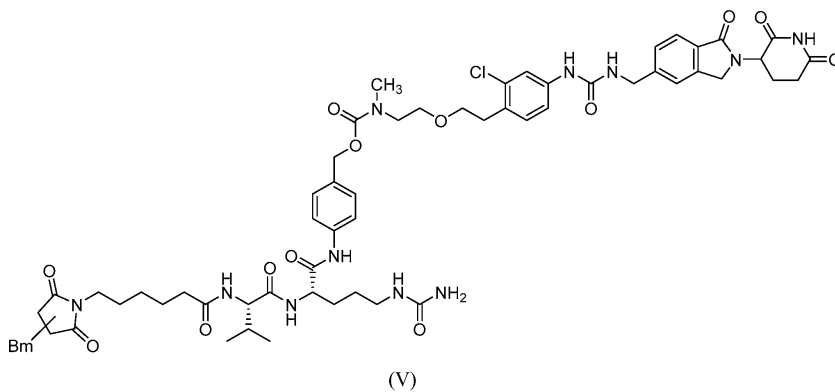
m은 2이고;

R²는 메틸인

접합체.

청구항 37

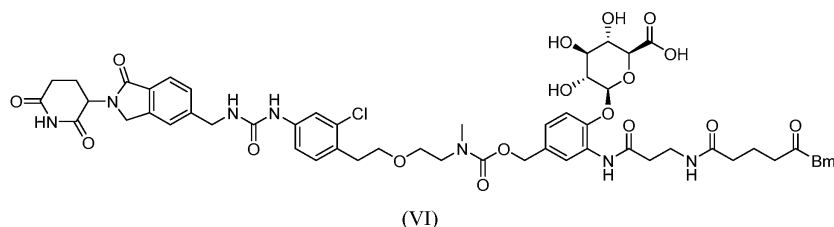
하기 화학식 (V)의 접합체 또는 그의 제약상 허용되는 염:



여기서 Bm은 서열식별번호: 1에 제시된 아미노산 서열을 포함하는 VH-CDR1, 서열식별번호: 2에 제시된 아미노산 서열을 포함하는 VH-CDR2, 서열식별번호: 3에 제시된 아미노산 서열을 포함하는 VH-CDR3, 서열식별번호: 5에 제시된 아미노산 서열을 포함하는 VL-CDR1, 서열식별번호: 6에 제시된 아미노산 서열을 포함하는 VL-CDR2, 및 서열식별번호: 7에 제시된 아미노산 서열을 포함하는 VL-CDR3을 포함하는 항-CD33 항체 또는 그의 항원-결합 부분이다.

청구항 38

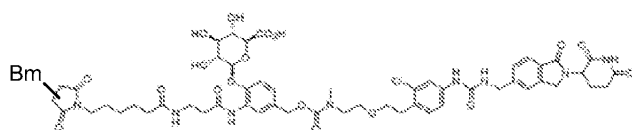
하기 화학식 (VI)의 접합체 또는 그의 제약상 허용되는 염:



여기서 Bm은 서열식별번호: 1에 제시된 아미노산 서열을 포함하는 VH-CDR1, 서열식별번호: 2에 제시된 아미노산 서열을 포함하는 VH-CDR2, 서열식별번호: 3에 제시된 아미노산 서열을 포함하는 VH-CDR3, 서열식별번호: 5에 제시된 아미노산 서열을 포함하는 VL-CDR1, 서열식별번호: 6에 제시된 아미노산 서열을 포함하는 VL-CDR2, 및 서열식별번호: 7에 제시된 아미노산 서열을 포함하는 VL-CDR3을 포함하는 항-CD33 항체 또는 그의 항원-결합 부분이다.

청구항 39

하기 화학식 (VII)의 접합체 또는 그의 제약상 허용되는 염:



여기서 Bm은 서열식별번호: 1에 제시된 아미노산 서열을 포함하는 VH-CDR1, 서열식별번호: 2에 제시된 아미노산 서열을 포함하는 VH-CDR2, 서열식별번호: 3에 제시된 아미노산 서열을 포함하는 VH-CDR3, 서열식별번호: 5에 제시된 아미노산 서열을 포함하는 VL-CDR1, 서열식별번호: 6에 제시된 아미노산 서열을 포함하는 VL-CDR2, 및 서열식별번호: 7에 제시된 아미노산 서열을 포함하는 VL-CDR3을 포함하는 항-CD33 항체 또는 그의 항원-결합 부분이다.

청구항 40

제37항 내지 제39항 중 어느 한 항에 있어서, 항-CD33 항체 또는 그의 항원-결합 부분이 (i) 서열식별번호: 4에 제시된 바와 같은 아미노산 서열을 포함하는 VH 및 서열식별번호: 8에 제시된 바와 같은 아미노산 서열을 포함하는 VL 또는 (ii) 서열식별번호: 9에 제시된 바와 같은 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 및 서열식별번호: 10에 제시된 바와 같은 아미노산 서열을 포함하는 경쇄를 포함하는 것인 접합체 또는 그의 제약상 허용되는 염.

청구항 41

제1항 내지 제40항 중 어느 한 항의 접합체 또는 화합물, 또는 그의 제약상 허용되는 염, 및 1종 이상의 제약상 허용되는 담체를 포함하는 제약 조성물.

청구항 42

암의 치료를 필요로 하는 대상체에게 제약상 허용되는 양의 제1항 내지 제41항 중 어느 한 항의 접합체 또는 조성물, 또는 그의 제약상 허용되는 염을 투여하는 것을 포함하는, 상기 대상체에서 암을 치료하는 방법.

청구항 43

제42항에 있어서, 암이 혈액학적/혈액암인 방법.

청구항 44

제42항에 있어서, 암이 다발성 골수종, 백혈병, 악성 림프종, 호지킨병 또는 만성 골수증식성 질환인 방법.

청구항 45

제42항에 있어서, 암이 급성 골수성 백혈병 또는 림프종인 방법.

청구항 46

제42항에 있어서, 암이 급성 골수성 백혈병인 방법.

청구항 47

제42항 내지 제46항 중 어느 한 항에 있어서, 암이 밀로타르그(Mylotarg)에 대해 저항성 또는 불응성인 방법.

청구항 48

골수이형성 증후군의 치료를 필요로 하는 대상체에게 제약상 허용되는 양의 제1항 내지 제41항 중 어느 한 항의 접합체 또는 조성물, 또는 그의 제약상 허용되는 염을 투여하는 것을 포함하는, 상기 대상체에서 골수이형성 증후군을 치료하는 방법.

청구항 49

제42항 내지 제48항 중 어느 한 항에 있어서, 제1항 내지 제40항 중 어느 한 항의 접합체 또는 그의 제약상 허용되는 염의 전에, 후에 또는 그와 동시에 제약상 허용되는 양의 추가의 작용제를 대상체에게 투여하는 것을 추가로 포함하는 방법.

청구항 50

제49항에 있어서, 추가의 작용제가 세포독성제 또는 면역 반응 조절제인 방법.

청구항 51

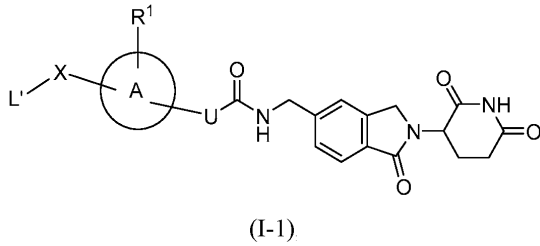
제50항에 있어서, 면역 반응 조절제가 체크포인트 억제제인 방법.

청구항 52

제51항에 있어서, 체크포인트 억제제가 PD-1 억제제, PD-L1 억제제, CTLA-4 억제제, TIM3 억제제 및/또는 LAG-3 억제제를 포함하는 것인 방법.

청구항 53

항-CD33 항체 또는 그의 항원-결합 부분을 화학식 (I-1)의 화합물 또는 그의 제약상 허용되는 염과 반응시키는 것을 포함하는, 제1항의 접합체 또는 그의 제약상 허용되는 염을 제조하는 방법:



여기서:

a는 1 내지 10의 정수이고;

A는 페닐 또는 C₄-C₁₀시클로알킬 고리이고;

R¹은 독립적으로 수소 및 할로로부터 선택되고;

U는 NH 및 CF₂로부터 선택되고;

X는 -N(R²)_v-, =C(CH₃)-, -Q-(CH₂)_n-, 및 -Q(CH₂)_mQ'(CH₂)_n-로부터 선택되고; 여기서

v는 1 또는 2이고;

Q 및 Q'는 각각 독립적으로 O, S, 또는 NR²이고;

각각의 R²는 독립적으로 수소 또는 C₁-C₆-알킬이고;

n은 1 내지 6의 정수이고;

m은 2 내지 6의 정수이고;

여기서 각각의 기의 좌측은 L'에 부착되고, 우측은 A에 부착되며;

단, X가 NH 또는 -Q-(CH₂)_n-인 경우, R¹은 할로이고;

L'는 항-CD33 항체 또는 그의 항원-결합 부분에 접합되는 절단가능한 또는 비-절단가능한 링커 전구체이고, 여기서 항-CD33 항체 또는 그의 항원-결합 부분은 서열식별번호: 1에 제시된 바와 같은 아미노산 서열을 포함하는 VH-CDR1, 서열식별번호: 2에 제시된 바와 같은 아미노산 서열을 포함하는 VH-CDR2, 서열식별번호: 3에 제시된 바와 같은 아미노산 서열을 포함하는 VH-CDR3, 서열식별번호: 5에 제시된 바와 같은 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역 (VL) CDR1, 서열식별번호: 6에 제시된 바와 같은 아미노산 서열을 포함하는 VL-CDR2, 및 서열식별번호: 7에 제시된 바와 같은 아미노산 서열을 포함하는 VL-CDR3을 포함한다.

청구항 54

제53항에 있어서, 항-CD33 항체 또는 그의 항원-결합 부분이 서열식별번호: 4에 제시된 바와 같은 아미노산 서열을 포함하는 VH 및 서열식별번호: 8에 제시된 바와 같은 아미노산 서열을 포함하는 VL을 포함하는 것인 방법.

청구항 55

제53항 또는 제54항에 있어서, 항-CD33 항체 또는 그의 항원-결합 부분이 불변 영역을 포함하고, 여기서 불변 영역은 겹투주맵과 상이한 적어도 1개의 아미노산을 포함하는 것인 방법.

청구항 56

제53항 내지 제55항 중 어느 한 항에 있어서, 항-CD33 항체 또는 그의 항원-결합 부분이 IgG1 항체 또는 그의 항원-결합 부분인 방법.

청구항 57

제53항 내지 제56항 중 어느 한 항에 있어서, 항-CD33 항체 또는 그의 항원-결합 부분이 불변 영역에 상응하는

아미노산 297에 알라닌을 포함하는 것인 방법.

청구항 58

제53항 또는 제57항에 있어서, 항-CD33 항체가 서열식별번호: 9에 제시된 바와 같은 중쇄 및 서열식별번호: 10에 제시된 바와 같은 경쇄를 포함하는 것인 방법.

청구항 59

제53항 내지 제58항 중 어느 한 항에 있어서, 화학식 (I-1)의 화합물과 반응시키기 전에 항-CD33 항체 또는 그의 항원-결합 부분을 환원시키는 것을 추가로 포함하는 방법.

청구항 60

제53항 내지 제59항 중 어느 한 항에 있어서, a가 2 내지 8의 정수인 방법.

청구항 61

제53항 내지 제60항 중 어느 한 항에 있어서, L'가 비-절단가능한 링커 전구체, 절단가능한 링커 전구체, 생환 원성 링커 전구체, 산 절단가능한 링커 전구체, 클릭-투-틸리즈 링커 전구체, 피로포스파타제 절단가능한 링커 전구체, 베타-글루쿠로니다제 절단가능한 링커 전구체, 또는 그의 임의의 조합인 방법.

발명의 설명

기술 분야

- [0001] 전자적으로 제출된 서열 목록에 대한 참조
- [0002] 본 출원과 함께 출원된 ASCII 텍스트 파일 (명칭: 4547_017PC02_Seqlisting_ST25; 크기: 42, 724 바이트; 및 생성일: 2022년 5월 31일)의 전자 제출된 서열 목록의 내용은 그 전문이 본원에 참조로 포함된다.
- [0003] 기술분야
- [0004] 본 개시내용은 항-CD33 항체 또는 그의 항원-결합 부분에 접합된 신규분해제 접합체를 제공한다. 접합체를 포함하는 조성물이 또한 제공된다. 접합체 및 조성물은 암의 치료를 필요로 하는 대상체에서 암을 치료하는 데 유용하다.

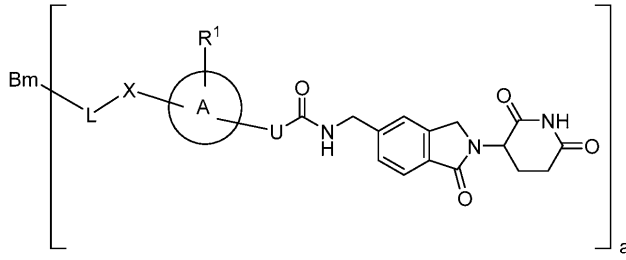
배경 기술

- [0005] 단백질 분해는 면역조정 이미드 약물의 유효성에 의해 치료 전략으로서 검증되어 있다. 이들 화합물은 세레블론 (CRBN)에 결합하고, CRL4^{CRBN} E3 유비퀴틴 리가제에 의해 매개되는 기질 단백질의 동원 및 유비퀴틴화를 촉진하는 능력을 갖는다. 면역조정 이미드는 리가제와 네오기질 사이의 단백질 상호작용을 재프로그래밍하는 소수성 패치로서 결합 계면을 채우는 "분자 글루"로서 작용하는 것으로 여겨진다.
- [0006] 암에 대한 신규 치료로서의 이들 화합물에 대한 열망에도 불구하고, 현재까지 이들은 혈액 악성종양 예컨대 다발성 골수종 및 골수이형성 증후군 (MDS)에서의 사용으로 제한되어 있다. 다른 종양단백질을 분해함으로써 기할 수 있는 화합물 (이들 중 다수는 '약물화불가능한' 것으로 간주됨)의 라이브러리를 확장시키는 것은 약물 개발의 활발한 영역이다. 따라서, 이들 대안적 종양단백질을 표적화하고 광범위한 암을 치료할 수 있는 신규 화합물에 대한 지속적인 필요가 존재한다.

발명의 내용

- [0007] 소분자 GSPT1 분해제를 사용한 급성 골수성 백혈병 (AML)을 갖는 환자의 치료는 임상 반응을 유도하는 것으로 밝혀졌지만, 중증 유해 사건 (AE)과 연관되어 있다. AML을 갖는 환자는 AML의 치료를 위한 CD33-표적화 ADC인 밀로타르그(Mylotarg)의 임상적 승인에 의해 지지되는 바와 같이, 빈번하게 암 세포 상에 높은 수준의 CD33을 갖는다. 본 발명은 GSPT1 분해 페이로드 분자를 CD33 표적화 항체와 조합하는 것이 GSPT1 분해제의 임상 효능 및 내약성 둘 다를 개선시킬 수 있다는 발견에 기초한다.

[0008] 제1 측면에서, 본 개시내용은 하기 화학식 (I)의 접합체 또는 그의 제약상 허용되는 염을 제공한다:



(I)

[0009]

[0010] 여기서:

[0011] a는 1 내지 10의 정수이고;

[0012] A는 페닐 또는 C₄-C₁₀시클로알킬 고리이고;

[0013] U는 NH 및 CF₂로부터 선택되고;

[0014] R¹은 독립적으로 수소 및 할로로부터 선택되고;

[0015] X는 -NR²-, =C(CH₃)-, -Q-(CH₂)_n-, 및 -Q(CH₂)_mQ'(CH₂)_n-로부터 선택되고; 여기서

[0016] Q 및 Q'는 각각 독립적으로 O, S 또는 N(R²)_v이고;

[0017] v는 1 또는 2이고;

[0018] 각각의 R²는 독립적으로 수소 또는 C₁-C₆-알킬이고;

[0019] n은 1 내지 6의 정수이고;

[0020] m은 2 내지 6의 정수이고;

[0021] 여기서 각각의 기의 좌측은 L에 부착되고, 우측은 A에 부착되며; 단, X가 NH 또는 -Q-(CH₂)_n-인 경우에, R¹은 할로이고;

[0022] L은 절단가능한 링커 또는 비-절단가능한 링커이고;

[0023] Bm은 항-CD33 항체 또는 그의 항원-결합 부분이다.

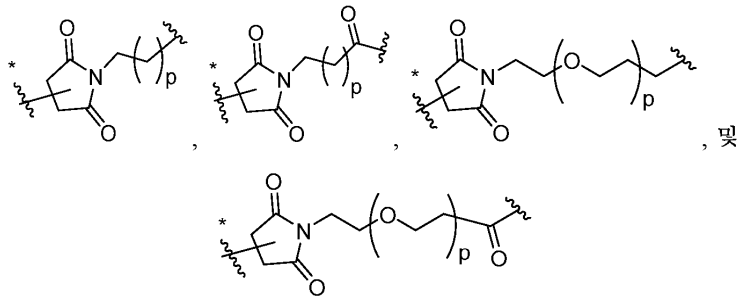
[0024] 일부 측면에서, 항-CD33 항체 또는 그의 항원-결합 부분은 서열식별번호: 1에 제시된 바와 같은 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역 (VH) 상보성 결정 영역 (CDR) 1 (VH-CDR1), 서열식별번호: 2에 제시된 바와 같은 아미노산을 포함하는 VH-CDR2, 서열식별번호: 3에 제시된 바와 같은 아미노산 서열을 포함하는 VH-CDR3, 서열식별번호: 5에 제시된 바와 같은 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역 (VL) CDR1 (VL-CDR1), 서열식별번호: 6에 제시된 바와 같은 아미노산 서열을 포함하는 VL-CDR2, 및 서열식별번호: 7에 제시된 바와 같은 아미노산 서열을 포함하는 VL-CDR3을 포함한다. 일부 측면에서, 항-CD33 항체 또는 그의 항원-결합 부분은 서열식별번호: 4에 제시된 아미노산 서열을 포함하는 VH 및 서열식별번호: 8에 제시된 아미노산 서열을 포함하는 VL을 포함한다. 일부 측면에서, 항-CD33 항체 또는 그의 항원-결합 부분은 겐투주맙과 상이한 적어도 1개의 아미노산을 포함하는 불변 영역을 포함한다. 일부 측면에서, 항-CD33 항체 또는 그의 항원-결합 부분은 IgG1 항체 또는 그의 항원-결합 부분이다. 일부 측면에서, 항-CD33 항체 또는 그의 항원-결합 부분은 불변 영역에 상응하는 아미노산 297에 알라닌을 포함한다. 일부 측면에서, 항-CD33 항체는 서열식별번호: 9에 제시된 바와 같은 중쇄 및 서열식별번호: 10에 제시된 바와 같은 경쇄를 포함한다.

[0025] 일부 측면에서, 항-CD33 항체 또는 그의 항원-결합 부분은 서열식별번호: 19에 제시된 바와 같은 아미노산 서열을 포함하는 VH-CDR1, 서열식별번호: 20에 제시된 바와 같은 아미노산을 포함하는 VH-CDR2, 서열식별번호: 21에 제시된 바와 같은 아미노산 서열을 포함하는 VH-CDR3, 서열식별번호: 22에 제시된 바와 같은 아미노산 서열을

포함하는 VL-CDR1, 서열식별번호: 23에 제시된 바와 같은 아미노산 서열을 포함하는 VL-CDR2, 및 서열식별번호: 24에 제시된 바와 같은 아미노산 서열을 포함하는 VL-CDR3을 포함한다. 일부 측면에서, 항-CD33 항체 또는 그의 항원-결합 부분은 서열식별번호: 27에 제시된 아미노산 서열을 포함하는 VH 및 서열식별번호: 28에 제시된 아미노산 서열을 포함하는 VL을 포함한다. 일부 측면에서, 항-CD33 항체 또는 그의 항원-결합 부분은 IgG1 항체 또는 그의 항원-결합 부분이다. 일부 측면에서, 항-CD33 항체는 서열식별번호: 25에 제시된 바와 같은 중쇄 및 서열식별번호: 26에 제시된 바와 같은 경쇄를 포함한다.

일부 측면에서, a는 2 내지 8의 정수이다.

일부 측면에서, L은 비-절단가능한 링커이다. 일부 측면에서, L은 하기로 이루어진 군으로부터 선택된다:



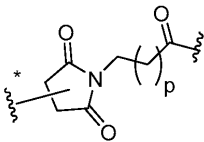
여기서:

p는 1 내지 10의 정수이고;

~*은 X에 대한 부착 지점이고;

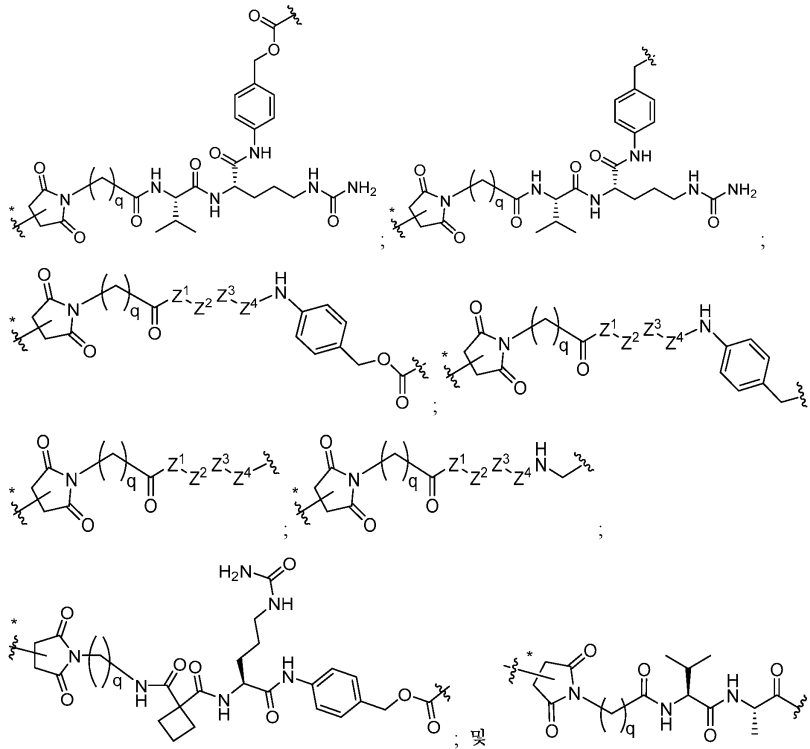
~*은 항-CD33 항체 또는 그의 항원-결합 부분에 대한 부착 지점이다.

일부 측면에서, L은 하기이다:



일부 측면에서, p는 5이다.

일부 측면에서, L은 절단가능한 링커이다. 일부 측면에서, 절단가능한 링커는 프로테아제에 의해 절단가능하다. 일부 측면에서, L은 하기로 이루어진 군으로부터 선택된다:



[0037]

[0038]

여기서:

[0039]

q 는 2 내지 10의 정수이고;

[0040]

Z^1 , Z^2 , Z^3 , 및 Z^4 는 각각 독립적으로 부재하거나 또는 L- 또는 D-배위의 자연-발생 아미노산 잔기이며, 단, Z^1 , Z^2 , Z^3 , 및 Z^4 중 적어도 2개는 아미노산 잔기이고;

[0041]

X 은 X 에 대한 부착 지점이고;

[0042]

X 은 항-CD33 항체 또는 그의 항원-결합 부분에 대한 부착 지점이다.

[0043]

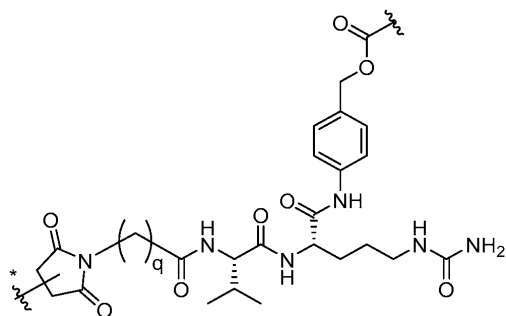
일부 측면에서, Z^1 , Z^2 , Z^3 , 및 Z^4 는 독립적으로 부재하거나 또는 L-발린, D-발린, L-시트룰린, D-시트룰린, L-알라닌, D-알라닌, L-글루타민, D-글루타민, L-글루탐산, D-글루탐산, L-아스파르트산, D-아스파르트산, L-아스파라긴, D-아스파라긴, L-페닐알라닌, D-페닐알라닌, L-리신, D-리신, 및 글리신으로 이루어진 군으로부터 선택되며; 단, Z^1 , Z^2 , Z^3 , 및 Z^4 중 적어도 2개는 아미노산 잔기이다.

[0044]

일부 측면에서, Z^1 은 부재하거나 또는 글리신이고; Z^2 는 부재하거나 또는 L-글루타민, D-글루타민, L-글루탐산, D-글루탐산, L-아스파르트산, D-아스파르트산, L-알라닌, D-알라닌 및 글리신으로 이루어진 군으로부터 선택되고; Z^3 은 L-발린, D-발린, L-알라닌, D-알라닌, L-페닐알라닌, D-페닐알라닌 및 글리신으로 이루어진 군으로부터 선택되고; Z^4 는 L-알라닌, D-알라닌, L-시트룰린, D-시트룰린, L-아스파라긴, D-아스파라긴, L-리신, D-리신, L-페닐알라닌, D-페닐알라닌 및 글리신으로 이루어진 군으로부터 선택된다.

[0045]

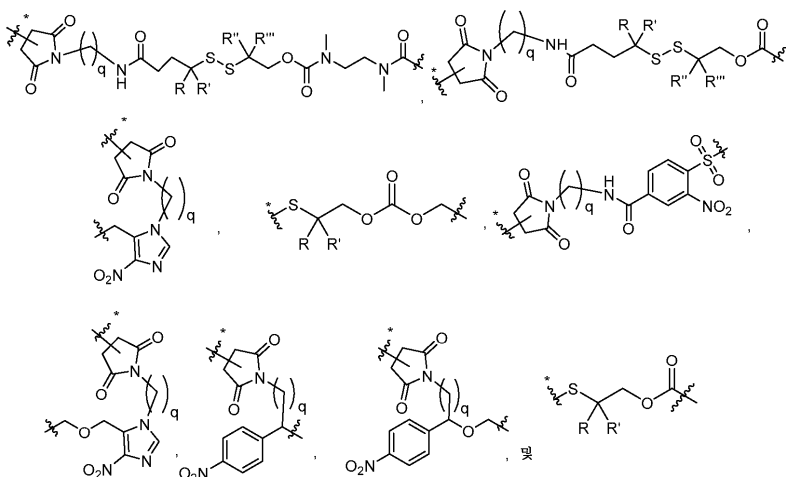
일부 측면에서, L은 하기이다:



[0046]

[0047] 일부 측면에서, q 는 5이다.

[0048] 일부 측면에서, L은 생체환원성 링커이다. 일부 측면에서, L은 하기로 이루어진 군으로부터 선택된다:



[0049]

[0050] 여기서:

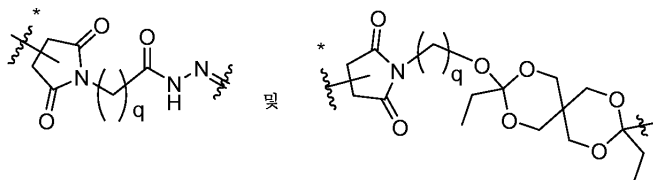
[0051] q는 2 내지 10의 정수이고;

[0052] R, R', R'' 및 R'''는 각각 독립적으로 수소, C₁-C₆알콕시C₁-C₆알킬, (C₁-C₆)₂NC₁-C₆알킬 및 C₁-C₆알킬로부터 선택되거나, 또는 2개의 같은자리 R 기는 이들이 부착되어 있는 탄소 원자와 함께 시클로부틸 또는 시클로프로필 고리를 형성할 수 있고;

[0053] $\tilde{z}$ 은 X에 대한 부착 지점이고;

[0054] ^{*}은 항-CD33 항체 또는 그의 항원-결합 부분에 대한 부착 지점이다.

[0055] 일부 측면에서, L은 산 절단가능한 링커이다. 일부 측면에서, L은 하기로 이루어진 군으로부터 선택된다:



[0056]

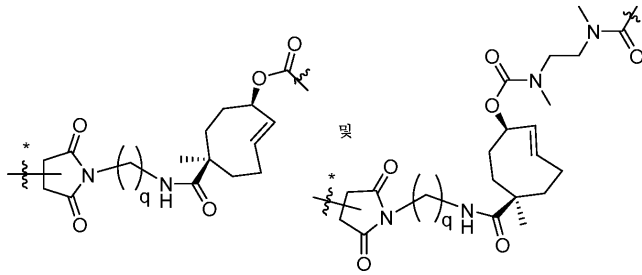
[0057] 여기서:

[0058] q 는 2 내지 10의 정수이고;

[0059] $\tilde{z}$ 은 X에 대한 부착 지점이고;

[0060] ^{*}은 항-CD33 항체 또는 그의 항원-결합 부분에 대한 부착 지점이다.

[0061] 일부 측면에서, L은 클릭-투-릴리즈(click-to-release) 링커이다. 일부 측면에서, L은 하기로부터 선택된다:



[0062]

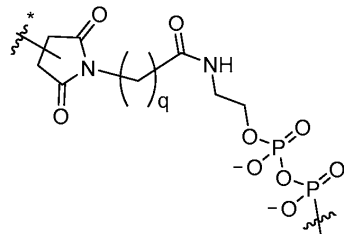
[0063] 여기서:

[0064] q는 2 내지 10의 정수이고;

[0065] $\sim$ 은 X에 대한 부착 지점이고;

[0066] $\sim^*$ 은 항-CD33 항체 또는 그의 항원-결합 부분에 대한 부착 지점이다.

[0067] 일부 측면에서, L은 피로포스파타제 절단가능한 링커이다. 일부 측면에서, L은 하기이다:



[0068]

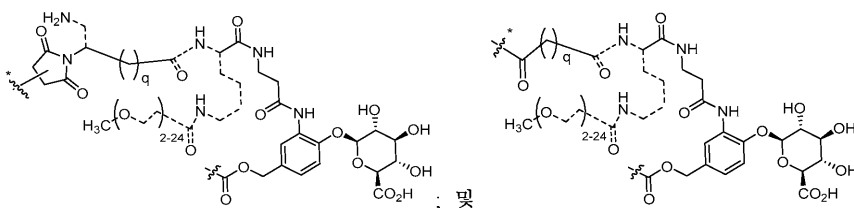
[0069] 여기서:

[0070] q는 2 내지 10의 정수이고;

[0071] $\sim$ 은 X에 대한 부착 지점이고;

[0072] $\sim^*$ 은 항-CD33 항체 또는 그의 항원-결합 부분에 대한 부착 지점이다.

[0073] 일부 측면에서, L은 베타-글루쿠로니다제 절단가능한 링커이다. 일부 측면에서, L은 하기로부터 선택된다:



[0074]

[0075] 여기서:

[0076] q는 2 내지 10의 정수이고;

[0077] ----는 부재하거나 또는 결합이고;

[0078] $\sim$ 은 X에 대한 부착 지점이고;

[0079] $\sim^*$ 은 항-CD33 항체 또는 그의 항원-결합 부분에 대한 부착 지점이다.

[0080] 특정 측면에서, 본 개시내용은

- [0081] A가 페닐이고;
- [0082] U가 NH이고;
- [0083] R^1 이 할로이고;
- [0084] X가 $-N(R^2)_v(CH_2)_mO(CH_2)_n-$ 이고; 여기서
- [0085] v는 1이고;
- [0086] m 및 n은 2이고;
- [0087] R^2 는 메틸인 화학식 (I)의 접합체를 제공한다.
- [0088] 특정 측면에서, 본 개시내용은
- [0089] A가 페닐이고;
- [0090] U가 NH이고;
- [0091] R^1 이 할로이고;
- [0092] X가 $-N(R^2)_v(CH_2)_mO(CH_2)_n-$ 이고; 여기서
- [0093] v는 2이고;
- [0094] m 및 n은 2이고;
- [0095] 각각의 R^2 는 메틸인 화학식 (I)의 접합체를 제공한다.
- [0096] 특정 측면에서, 본 개시내용은
- [0097] A가 페닐이고;
- [0098] U가 NH이고;
- [0099] R^1 이 할로이고;
- [0100] X가 $-O(CH_2)_n-$ 이고; 여기서
- [0101] n은 2인 화학식 (I)의 접합체를 제공한다.
- [0102] 특정 측면에서, 본 개시내용은
- [0103] A가 페닐이고;
- [0104] U가 NH이고;
- [0105] R^1 이 할로이고;
- [0106] X가 $-S(CH_2)_n-$ 이고; 여기서
- [0107] n은 2인 화학식 (I)의 접합체를 제공한다.
- [0108] 특정 측면에서, 본 개시내용은
- [0109] A가 페닐이고;
- [0110] U가 NH이고;
- [0111] R^1 이 수소이고;
- [0112] X가 $--NR^2-$ 이고; 여기서

[0113] R^2 는 메틸인 화학식 (I)의 접합체를 제공한다.

[0114] 특정 측면에서, 본 개시내용은

[0115] A가 페닐이고;

[0116] U가 NH이고;

[0117] R^1 이 할로이고;

[0118] X가 $--NR^2-$ 이고; 여기서

[0119] R^2 는 수소인 화학식 (I)의 접합체를 제공한다.

[0120] 특정 측면에서, 본 개시내용은

[0121] A가 페닐이고;

[0122] U가 NH이고;

[0123] R^1 이 수소이고;

[0124] X가 $-C(CH_3)=$ 인 화학식 (I)의 접합체를 제공한다.

[0125] 특정 측면에서, 본 개시내용은

[0126] A가 C_4-C_{10} 시클로알킬 고리이고;

[0127] U가 NH이고;

[0128] R^1 이 수소이고;

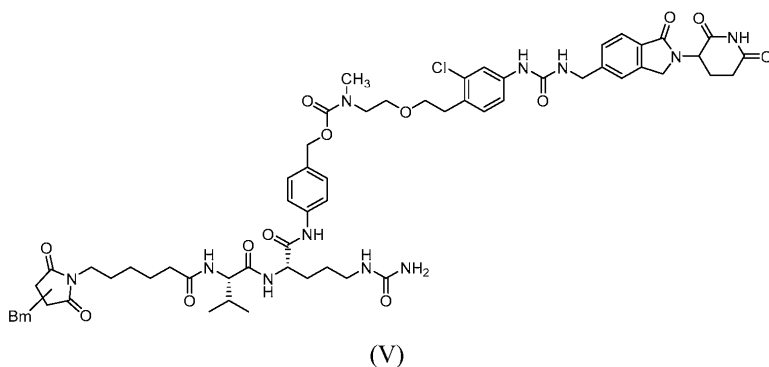
[0129] X가 $-N(R^2)(CH_2)_mO(CH_2)_n-$ 이고; 여기서

[0130] n은 1이고;

[0131] m은 2이고;

[0132] R^2 는 메틸인 화학식 (I)의 접합체를 제공한다.

[0133] 특정 측면에서, 본 개시내용은 화학식 (V)의 접합체 또는 그의 제약상 허용되는 염을 제공한다:

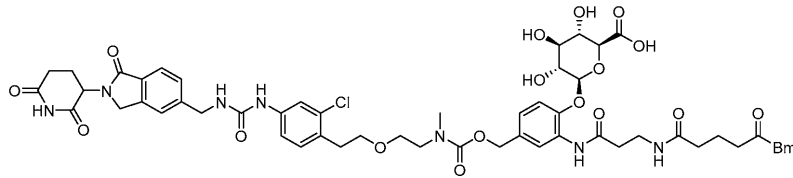


[0134]

[0135] 여기서 Bm은 항-CD33 항체 또는 그의 항원-결합 부분이다. 항-CD33 항체 또는 그의 항원-결합 부분은 예를 들어 (i) 서열식별번호: 1에 제시된 아미노산 서열을 포함하는 VH-CDR1, 서열식별번호: 2에 제시된 아미노산 서열을 포함하는 VH-CDR2, 서열식별번호: 3에 제시된 아미노산 서열을 포함하는 VH-CDR3, 서열식별번호: 5에 제시된 아미노산 서열을 포함하는 VL-CDR1, 서열식별번호: 6에 제시된 아미노산 서열을 포함하는 VL-CDR2, 및 서열식별번호: 7에 제시된 아미노산 서열을 포함하는 VL-CDR3, (ii) 서열식별번호: 4에 제시된 아미노산 서열을 포함하는 VH 및 서열식별번호: 8에 제시된 아미노산 서열을 포함하는 VL, (iii) 서열식별번호: 9에 제시된 중쇄, 및

서열식별번호: 10에 제시된 경쇄, (iv) 서열식별번호: 19에 제시된 아미노산 서열을 포함하는 VH-CDR1, 서열식별번호: 20에 제시된 아미노산 서열을 포함하는 VH-CDR2, 서열식별번호: 21에 제시된 아미노산 서열을 포함하는 VH-CDR3, 서열식별번호: 22에 제시된 아미노산 서열을 포함하는 VL-CDR1, 서열식별번호: 23에 제시된 아미노산 서열을 포함하는 VL-CDR2, 및 서열식별번호: 24에 제시된 아미노산 서열을 포함하는 VL-CDR3, (v) 서열식별번호: 27에 제시된 아미노산 서열을 포함하는 VH 및 서열식별번호: 28에 제시된 아미노산 서열을 포함하는 VL, 또는 (vi) 서열식별번호: 25에 제시된 중쇄, 및 서열식별번호: 26에 제시된 경쇄를 포함할 수 있다.

[0136] 특정 측면에서, 본 개시내용은 하기 화학식 (VI)의 접합체 또는 그의 제약상 허용되는 염을 제공한다:

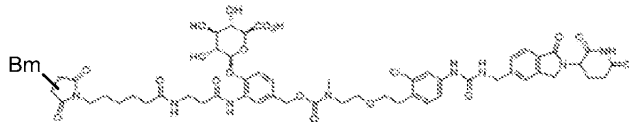


(VI)

[0137]

[0138] 여기서 Bm은 항-CD33 항체 또는 그의 항원-결합 부분이다. 항-CD33 항체 또는 그의 항원-결합 부분은 예를 들어 (i) 서열식별번호: 1에 제시된 아미노산 서열을 포함하는 VH-CDR1, 서열식별번호: 2에 제시된 아미노산 서열을 포함하는 VH-CDR2, 서열식별번호: 3에 제시된 아미노산 서열을 포함하는 VH-CDR3, 서열식별번호: 5에 제시된 아미노산 서열을 포함하는 VL-CDR1, 서열식별번호: 6에 제시된 아미노산 서열을 포함하는 VL-CDR2, 및 서열식별번호: 7에 제시된 아미노산 서열을 포함하는 VL-CDR3, (ii) 서열식별번호: 4에 제시된 아미노산 서열을 포함하는 VH 및 서열식별번호: 8에 제시된 아미노산 서열을 포함하는 VL, (iii) 서열식별번호: 9에 제시된 중쇄, 및 서열식별번호: 10에 제시된 경쇄, (iv) 서열식별번호: 19에 제시된 아미노산 서열을 포함하는 VH-CDR1, 서열식별번호: 20에 제시된 아미노산 서열을 포함하는 VH-CDR2, 서열식별번호: 21에 제시된 아미노산 서열을 포함하는 VH-CDR3, 서열식별번호: 22에 제시된 아미노산 서열을 포함하는 VL-CDR1, 서열식별번호: 23에 제시된 아미노산 서열을 포함하는 VL-CDR2, 및 서열식별번호: 24에 제시된 아미노산 서열을 포함하는 VL-CDR3, (v) 서열식별번호: 27에 제시된 아미노산 서열을 포함하는 VH 및 서열식별번호: 28에 제시된 아미노산 서열을 포함하는 VL, 또는 (vi) 서열식별번호: 25에 제시된 중쇄, 및 서열식별번호: 26에 제시된 경쇄를 포함할 수 있다.

[0139] 특정 측면에서, 본 개시내용은 하기 화학식 (VII)의 접합체 또는 그의 제약상 허용되는 염을 제공한다:



(VII)

[0140]

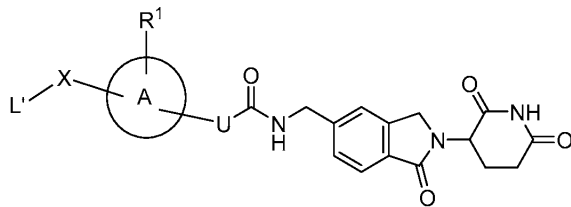
[0141] 여기서 Bm은 항-CD33 항체 또는 그의 항원-결합 부분이다. 항-CD33 항체 또는 그의 항원-결합 부분은 예를 들어 (i) 서열식별번호: 1에 제시된 아미노산 서열을 포함하는 VH-CDR1, 서열식별번호: 2에 제시된 아미노산 서열을 포함하는 VH-CDR2, 서열식별번호: 3에 제시된 아미노산 서열을 포함하는 VH-CDR3, 서열식별번호: 5에 제시된 아미노산 서열을 포함하는 VL-CDR1, 서열식별번호: 6에 제시된 아미노산 서열을 포함하는 VL-CDR2, 및 서열식별번호: 7에 제시된 아미노산 서열을 포함하는 VL-CDR3, (ii) 서열식별번호: 4에 제시된 아미노산 서열을 포함하는 VH 및 서열식별번호: 8에 제시된 아미노산 서열을 포함하는 VL, (iii) 서열식별번호: 9에 제시된 중쇄, 및 서열식별번호: 10에 제시된 경쇄, (iv) 서열식별번호: 19에 제시된 아미노산 서열을 포함하는 VH-CDR1, 서열식별번호: 20에 제시된 아미노산 서열을 포함하는 VH-CDR2, 서열식별번호: 21에 제시된 아미노산 서열을 포함하는 VH-CDR3, 서열식별번호: 22에 제시된 아미노산 서열을 포함하는 VL-CDR1, 서열식별번호: 23에 제시된 아미노산 서열을 포함하는 VL-CDR2, 및 서열식별번호: 24에 제시된 아미노산 서열을 포함하는 VL-CDR3, (v) 서열식별번호: 27에 제시된 아미노산 서열을 포함하는 VH 및 서열식별번호: 28에 제시된 아미노산 서열을 포함하는 VL, 또는 (vi) 서열식별번호: 25에 제시된 중쇄, 및 서열식별번호: 26에 제시된 경쇄를 포함할 수 있다.

[0142] 특정 측면에서, 본 개시내용은 본원에 제공된 접합체 또는 화합물, 또는 그의 제약상 허용되는 염, 및 1종 이상의 제약상 허용되는 담체를 포함하는 제약 조성물을 제공한다.

[0143] 특정 측면에서, 본 개시내용은 암 또는 골수이형성 증후군의 치료를 필요로 하는 대상체에게 제약상 허용되는 양의 상기 기재된 접합체 또는 조성물, 또는 그의 제약상 허용되는 염을 투여하는 것을 포함하는, 상기 대상체에서 암 또는 골수이형성 증후군을 치료하는 방법을 제공한다. 일부 측면에서, 암은 혈액학적/혈액암이다. 일부 측면에서, 암은 다발성 골수종, 백혈병, 악성 림프종, 호지킨병 또는 만성 골수증식성 질환이다. 일부 측면에서, 암은 급성 골수성 백혈병 또는 림프종이다. 일부 측면에서, 암은 급성 골수성 백혈병이다. 일부 측면에서, 암은 밀로타르그에 대해 저항성 또는 불응성이다.

[0144] 일부 측면에서, 방법은 대상체에게 제약상 허용되는 양의 추가의 작용제를 접합체 또는 그의 제약상 허용되는 염의 전에, 후에 또는 그와 동시에 투여하는 것을 추가로 포함한다. 일부 측면에서, 추가의 작용제는 세포독성제 또는 면역 반응 조절제이다. 일부 측면에서, 면역 반응 조절제는 체크포인트 억제제이다. 일부 측면에서, 체크포인트 억제제는 PD-1 억제제, PD-L1 억제제, CTLA-4 억제제, TIM3 억제제 및/또는 LAG-3 억제제를 포함한다.

[0145] 특정 측면에서, 본 개시내용은 항-CD33 항체 또는 그의 항원-결합 부분을 화학식 (I-1)의 화합물 또는 그의 제약상 허용되는 염과 반응시키는 것을 포함하는, 화학식 (I)의 접합체 또는 그의 제약상 허용되는 염을 제조하는 방법을 제공한다:



(I-1)

[0146]

여기서:

[0147]

a는 1 내지 10의 정수이고;

[0148]

A는 페닐 또는 C₄-C₁₀시클로알킬 고리이고;

[0149]

R¹은 독립적으로 수소 및 할로로부터 선택되고;

[0150]

U는 NH 및 CF₂로부터 선택되고;

[0151]

X는 -N(R²)_v-, =C(CH₃)-, -Q-(CH₂)_n-, 및 -Q(CH₂)_mQ'(CH₂)_n-로부터 선택되고; 여기서

[0152]

v는 1 또는 2이고;

[0153]

Q 및 Q'는 각각 독립적으로 O, S, 또는 NR²이고;

[0154]

각각의 R²는 독립적으로 수소 또는 C₁-C₆-알킬이고;

[0155]

n은 1 내지 6의 정수이고;

[0156]

m은 2 내지 6의 정수이고;

[0157]

여기서 각각의 기의 좌측은 L'에 부착되고, 우측은 A에 부착되며;

[0158]

단, X가 NH 또는 -Q-(CH₂)_n-인 경우, R¹은 할로이고;

[0159]

L'는 항-CD33 항체 또는 그의 항원-결합 부분에 접합되는 절단가능한 또는 비-절단가능한 링커 전구체이다. 일부 측면에서, 항-CD33 항체 또는 그의 항원-결합 부분은 서열식별번호: 1에 제시된 바와 같은 아미노산 서열을 포함하는 VH-CDR1, 서열식별번호: 2에 제시된 바와 같은 아미노산 서열을 포함하는 VH-CDR2, 서열식별번호: 3에

[0160]

제시된 바와 같은 아미노산 서열을 포함하는 VH-CDR3, 서열식별번호: 5에 제시된 바와 같은 아미노산 서열을 포함하는 VL-CDR1, 서열식별번호: 6에 제시된 바와 같은 아미노산 서열을 포함하는 VL-CDR2, 및 서열식별번호: 7에 제시된 바와 같은 아미노산 서열을 포함하는 VL-CDR3을 포함한다. 일부 측면에서, 항-CD33 항체 또는 그의 항원-결합 부분은 서열식별번호: 4에 제시된 바와 같은 중쇄 가변 영역 및 서열식별번호: 8에 제시된 바와 같은 경쇄 가변 영역을 포함한다. 일부 측면에서, 항-CD33 항체 또는 그의 항원-결합 부분은 겐투주맵과 상이한 적어도 1개의 아미노산을 포함하는 불변 영역을 포함한다. 일부 측면에서, 항-CD33 항체 또는 그의 항원-결합 부분은 IgG1 항체 또는 그의 항원-결합 부분이다. 일부 측면에서, 항-CD33 항체 또는 그의 항원-결합 부분은 불변 영역에 상응하는 아미노산 297에 알라닌을 포함한다. 일부 측면에서, 항-CD33 항체는 서열식별번호: 9에 제시된 바와 같은 중쇄 및 서열식별번호: 10에 제시된 바와 같은 경쇄를 포함한다. 일부 측면에서, 항-CD33 항체 또는 그의 항원-결합 부분은 서열식별번호: 19에 제시된 바와 같은 아미노산 서열을 포함하는 VH-CDR1, 서열식별번호: 20에 제시된 바와 같은 아미노산 서열을 포함하는 VH-CDR2, 서열식별번호: 21에 제시된 바와 같은 아미노산 서열을 포함하는 VH-CDR3, 서열식별번호: 22에 제시된 바와 같은 아미노산 서열을 포함하는 VL-CDR1, 서열식별번호: 23에 제시된 바와 같은 아미노산 서열을 포함하는 VL-CDR2, 및 서열식별번호: 24에 제시된 바와 같은 아미노산 서열을 포함하는 VL-CDR3을 포함한다. 일부 측면에서, 항-CD33 항체 또는 그의 항원-결합 부분은 서열식별번호: 27에 제시된 아미노산 서열을 포함하는 VH 및 서열식별번호: 28에 제시된 아미노산 서열을 포함하는 VL을 포함한다. 일부 측면에서, 항-CD33 항체 또는 그의 항원-결합 부분은 IgG1 항체 또는 그의 항원-결합 부분이다. 일부 측면에서, 항-CD33 항체는 서열식별번호: 25에 제시된 바와 같은 중쇄 및 서열식별번호: 26에 제시된 바와 같은 경쇄를 포함한다.

[0161] 일부 측면에서, 방법은 화학식 (I-1)의 화합물과 반응시키기 전에 항-CD33 항체 또는 그의 항원-결합 부분을 환원시키는 것을 추가로 포함한다.

[0162] 일부 측면에서, a는 2 내지 8의 정수이다. 일부 측면에서, L'는 비-절단가능한 링커 전구체, 절단가능한 링커 전구체, 생환원성 링커 전구체, 산 절단가능한 링커 전구체, 클릭-투-틸리즈 링커 전구체, 피로포스파타제 절단가능한 링커 전구체, 베타-글루쿠로니다제 절단가능한 링커 전구체, 또는 그의 임의의 조합이다.

도면의 간단한 설명

[0163] 도 1은 MV411 (CD33+) 종양에 대한 대표적인 신규분해제 접합체의 생체내 활성을 도시한다. X축은 투여 후 일을 나타낸다. Y 축은 비히클, 3 mg/kg CD33AB - 화합물 (Ia), 2.83 mg/kg CD33AB-화합물 (Ie), 2.99 mg/kg CD33AB-화합물 (Ih), 0.1 mg/kg 밀로타르그, 50 mg/kg 베네토클락스(Venetoclax), 및 5 mg/kg CC-90009를 투여한 후의 종양 부피 (mm³)를 나타낸다.

도 2는 CD-33 양성 및 CD33-음성 악성종양에서의 huMy9-6 (AB1) -화합물 (Ia)의 시험관내 활성을 도시한다.

도 3은 MV4-11 (CD33+) 종양에 대한 AB1 기반 접합체의 생체내 활성을 도시한다. X축은 투여 후 일을 나타낸다. Y 축은 비히클, AB1 - 화합물 (Ia), AB1-화합물 (Ii), AB1-화합물 (Id), AB1-화합물 (Ij), AB1-화합물 (Ie), AB1-화합물 (Ik), 밀로타르그, 겐투주맵-화합물 I(a) 및 CC-90009를 투여한 후의 종양 부피 (mm³)를 나타낸다.

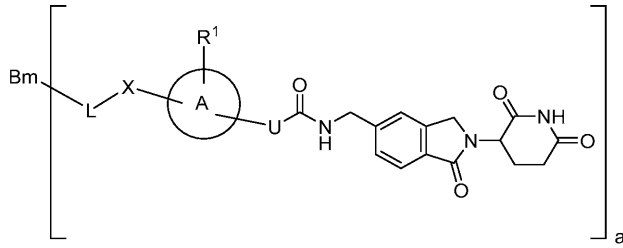
도 4는 겐투주맵 및 CD33AB 접합체의 안정성을 도시한다.

도 5는 MV4-11 (CD33+) 종양에 대한 겐투주맵 기반 접합체의 생체내 활성을 도시한다. X축은 투여 후 일을 나타낸다. Y 축은 비히클, 3 mg/kg 겐투주맵 - 화합물 (Ia), 5 mg/kg 겐투주맵 -화합물 (Ia), 3 mg/kg CD33AB-화합물 (Ia) 5 mg/kg CD33AB-화합물 (Ia), 3 mg/kg 겐투주맵 IgG1 LALA-화합물 (Ia), 5 mg/kg 겐투주맵 IgG1 LALA-화합물 (Ia), 5 mg/kg 겐투주맵-화합물 (Ie), 25 mg/kg 베네토클락스, 및 50 mg/kg 벤토클락스를 투여한 후의 종양 부피 (mm³)를 나타낸다.

도 6a 및 6b는 밀로타르그-비감수성 AML 세포 (AML-193 (도 6a) 및 카수미(Kasumi)-6 (도 6b))에 대한 AB1-화합물 (Ia) 접합체의 시험관내 활성을 도시한다. X 축은 농도를 나타내고, Y 축은 처리 후 세포주의 퍼센트 생존율을 나타낸다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0164] 본 개시내용은 하기 화학식 (I)의 접합체 또는 그의 제약상 허용되는 염에 관한 것이다:



(I)

[0165]

[0166] 여기서:

[0167] a는 1 내지 10의 정수이고;

[0168] A는 페닐 또는 C₄-C₁₀시클로알킬 고리이고;

[0169] R¹은 독립적으로 수소 및 할로로부터 선택되고;

[0170] U는 NH 및 CF₂로부터 선택되고;

[0171] X는 -N(R²)_v-, =C(CH₃)-, -Q-(CH₂)_n-, 및 -Q(CH₂)_mQ'(CH₂)_n-로부터 선택되고; 여기서

[0172] Q 및 Q'는 각각 독립적으로 O, S 또는 N(R²)_v이고;

[0173] v는 1 또는 2이고;

[0174] 각각의 R²는 독립적으로 수소 또는 C₁-C₆-알킬이고;

[0175] n은 1 내지 6의 정수이고;

[0176] m은 2 내지 6의 정수이고;

[0177] 여기서 각각의 기의 좌측은 L에 부착되고, 우측은 A에 부착되고;

[0178] 단, X가 NH 또는 -Q-(CH₂)_n-인 경우, R¹은 할로이고;

[0179] L은 절단가능한 링커 또는 비-절단가능한 링커이고;

[0180] Bm은 항-CD33 항체 또는 그의 항원-결합 부분, 예를 들어 항-CD33 항체 또는 그의 항원-결합 부분; 서열식별번호: 1에 제시된 바와 같은 아미노산 서열을 포함하는 VH-CDR1, 서열식별번호: 2에 제시된 바와 같은 아미노산 서열을 포함하는 VH-CDR2, 서열식별번호: 3에 제시된 바와 같은 아미노산 서열을 포함하는 VH-CDR3, 서열식별번호: 5에 제시된 바와 같은 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역 (VL) CDR1, 서열식별번호: 6에 제시된 바와 같은 아미노산 서열을 포함하는 VL-CDR2, 및 서열식별번호: 7에 제시된 바와 같은 아미노산 서열을 포함하는 VL-CDR3; 서열식별번호: 4에 제시된 바와 같은 아미노산 서열을 포함하는 VH 및 서열식별번호: 8에 제시된 바와 같은 아미노산 서열을 포함하는 VL을 포함하는 항-CD33 항체 또는 그의 항원-결합 부분; 또는 서열식별번호: 9에 제시된 바와 같은 중쇄 및 서열식별번호: 10에 제시된 바와 같은 경쇄를 포함하는 항-CD33 항체이다.

[0181] 본 개시내용은 또한 항-CD33 항체 또는 그의 항원-결합 부분에 융합된 상기 화합물, 화합물 또는 접합체를 포함하는 조성물, 또는 화합물 또는 접합체를 사용 또는 제조하는 방법을 제공한다.

[0182] I. 정의.

[0183] 본 설명을 보다 용이하게 이해할 수 있도록, 특정 용어를 먼저 정의한다. 추가의 정의가 상세한 설명 전반에 걸쳐 제시된다.

[0184] 단수 용어 형태의 대상은 그 대상 중 하나 이상을 지칭하며; 예를 들어, "뉴클레오타이드 서열"은 하나 이상의 뉴클레오타이드 서열을 나타내는 것으로 이해됨을 유념해야 한다. 따라서, 단수 용어, "하나 이상" 및 "적어도 하

나"는 본원에서 상호교환가능하게 사용될 수 있다. 또한, 청구범위는 임의의 임의적인 요소를 배제하도록 작성될 수 있음을 유념한다. 이와 같이, 이러한 기재는 청구범위 요소의 언급과 관련하여 "단독으로", "단지" 등과 같은 배타적 용어의 사용, 또는 부정적 제한의 사용에 대한 선행 기초로서 기능하도록 의도된다.

[0185] 또한, 본원에 사용된 "및/또는"은 2개의 명시된 특색 또는 성분 각각을 다른 것과 함께 또는 다른 것 없이 구체적으로 개시하는 것으로서 이해되어야 한다. 따라서, 본원에서 "A 및/또는 B"와 같은 어구에 사용된 용어 "및/또는"은 "A 및 B", "A 또는 B", "A" (단독), 및 "B" (단독)를 포함하는 것으로 의도된다. 마찬가지로, "A, B, 및/또는 C"와 같은 어구에 사용된 용어 "및/또는"은 각각의 하기 측면을 포괄하는 것으로 의도된다: A, B, 및 C; A, B, 또는 C; A 또는 C; A 또는 B; B 또는 C; A 및 C; A 및 B; B 및 C; A (단독); B (단독); 및 C (단독).

[0186] 측면이 용어 "포괄하는"과 함께 본원에 기재된 모든 경우에, "이루어진" 및/또는 "본질적으로 이루어진"의 용어로 기재된 다른 유사한 측면이 또한 제공되는 것으로 이해된다.

[0187] 달리 정의되지 않는 한, 본원에 사용된 모든 기술 과학 용어는 본 개시내용이 관련된 기술분야의 통상의 기술자에 의해 통상적으로 이해되는 바와 동일한 의미를 갖는다. 예를 들어, 문헌 [Concise Dictionary of Biomedicine and Molecular Biology, Juo, Pei-Show, 2nd ed., 2002, CRC Press; The Dictionary of Cell and Molecular Biology, 3rd ed., 1999, Academic Press; and the Oxford Dictionary Of Biochemistry And Molecular Biology, Revised, 2000, Oxford University Press]은 통상의 기술자에게 본 개시내용에 사용된 많은 용어의 일반 사전을 제공한다.

[0188] 단위, 접두어 및 기호는 시스템 앙테르나시오날 드 유니테(Systeme International de Unites) (SI) 허용 형태로 표시된다. 수치 범위는 범위를 정의하는 숫자를 포함한다. 값의 범위가 언급되는 경우에, 그 범위의 언급된 상한치와 하한치 사이의 각각의 중간 정수 값 및 그의 각각의 부분이 또한 이러한 값 사이의 각각의 하위범위와 함께 구체적으로 개시된 것으로 이해되어야 한다. 임의의 범위의 상한 및 하한은 독립적으로 범위에 포함되거나 또는 그로부터 배제될 수 있으며, 한계 중 어느 하나 또는 둘 다가 포함되지 않거나 또는 포함되는 각각의 범위가 또한 본 개시내용 내에 포괄된다. 따라서, 본원에 언급된 범위는 언급된 종점을 포함하여 범위 내의 모든 값에 대한 약칭인 것으로 이해된다. 예를 들어, 1 내지 10의 범위는 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 및 10으로 이루어진 군으로부터의 임의의 수, 수의 조합, 또는 하위-범위를 포함하는 것으로 이해된다.

[0189] 값이 명백하게 언급되는 경우에, 언급된 값과 거의 동일한 수량 또는 양인 값이 또한 본 개시내용의 범주 내에 있는 것으로 이해되어야 한다. 조합이 개시되는 경우에, 그 조합의 요소의 각각의 하위조합이 또한 구체적으로 개시되고, 본 개시내용의 범주 내에 있다. 반대로, 상이한 요소 또는 요소의 군이 개별적으로 개시된 경우, 그의 조합이 또한 개시된다. 본 개시내용의 임의의 요소가 복수의 대안을 갖는 것으로 개시된 경우에, 각각의 대안이 단독으로 또는 다른 대안과의 임의의 조합으로 배제되는 본 개시내용의 예가 또한 본원에 개시되고; 본 개시내용의 하나 초과 요소가 이러한 배제를 가질 수 있고, 이러한 배제를 갖는 요소의 모든 조합이 본원에 개시된다.

[0190] 본원에 사용된 용어 "DAR"은 각각의 항체에 연결된 신규분해제-링커 복합체의 평균 수인 접합체의 약물 항체 비를 지칭한다. 특정 측면에서, 본원에 기재된 접합체의 DAR은 1 내지 10이다. 일부 측면에서, 본원에 기재된 접합체의 DAR은 1 내지 8이다. 일부 측면에서, 본원에 기재된 접합체의 DAR은 1.0, 1.1, 1.2, 1.3, 1.4, 1.5, 1.6, 1.7, 1.8, 1.9, 2.0, 2.1, 2.2, 2.3, 2.4, 2.5, 2.6, 2.7, 2.8, 2.9, 3.0, 3.1, 3.2, 3.3, 3.4, 3.5, 3.6, 3.7, 3.8, 3.9, 4.0, 4.1, 4.2, 4.3, 4.4, 4.5, 4.6, 4.7, 4.8, 4.9, 5.0, 5.1, 5.2, 5.3, 5.4, 5.5, 5.6, 5.7, 5.8, 5.9, 6.0, 6.1, 6.2, 6.3, 6.4, 6.5, 6.6, 6.7, 6.8, 6.9, 7.0, 7.1, 7.2, 7.3, 7.4, 7.5, 7.6, 7.7, 7.8, 7.9, 8, 8.1, 8.2, 8.3, 8.4, 8.5, 8.6, 8.7, 8.8, 8.9, 9.0, 9.1, 9.2, 9.3, 9.4, 9.5, 9.6, 9.7, 9.8, 9.9, 또는 10이다.

[0191] 본원에 사용된 용어 "항체"는 또한 전장 이뮤노글로불린 분자 또는 전장 이뮤노글로불린 분자의 면역학적 활성 부분, 즉 관심 표적 또는 그의 일부의 항원에 면역특이적으로 결합하는 항원 결합 부위를 함유하는 분자를 지칭하며, 이러한 표적은 암 세포 또는 자가면역 질환과 연관된 자가면역 항체를 생산하는 세포를 포함하나 이에 제한되지는 않는다. 본원에 개시된 이뮤노글로불린은 이뮤노글로불린 분자의 임의의 유형 (예를 들어, IgG, IgE, IgM, IgD 및 IgA), 클래스 (예를 들어, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1 및 IgA2) 또는 하위클래스의 것일 수 있다. 이뮤노글로불린은 임의의 종으로부터 유래될 수 있다. 그러나, 한 측면에서, 이뮤노글로불린은 인간, 무린 또는 토끼 기원의 것이다.

[0192] 나노바디로도 공지된 용어 "단일 도메인 항체"는 약 12 kDa 내지 약 15kDa의 분자량을 갖는 단일 단량체 가변

항체 도메인으로 이루어진 항체 단편이다. 단일체 항체는 중쇄 가변 도메인 또는 경쇄를 기반으로 할 수 있다. 단일 도메인 항체의 예는 V_{HH} 단편 및 V_{NAR} 단편을 포함하나 이에 제한되지는 않는다.

[0193] "항체 단편"은 무손상 항체의 일부, 일반적으로 그의 항원 결합 또는 가변 영역을 포함한다. 항체 단편의 예는 Fab, Fab', $F(ab')_2$ 및 Fv 단편; 디아바디; 선형 항체; Fab 발현 라이브러리에 의해 생산된 단편, 항-이디오타 입 (항-Id) 항체, CDR (상보성 결정 영역), 및 암 세포 항원, 바이러스 항원 또는 미생물 항원에 면역특이적으로 결합하는 상기 중 임의의 것의 에피토프-결합 단편, 단일쇄 항체 분자; 및 항체 단편으로부터 형성된 다중특이적 항체를 포함한다.

[0194] "무손상 항체"는 항원-결합 가변 영역 뿐만 아니라 경쇄 불변 도메인 (CL) 및 중쇄 불변 도메인, CH1, CH2 및 CH3을 포함하는 것이다. 불변 도메인은 천연 서열 불변 도메인 (예를 들어, 인간 천연 서열 불변 도메인) 또는 그의 아미노산 서열 변이체일 수 있다.

[0195] 본원에 사용된 용어 "모노클로날 항체"는 실질적으로 동종인 항체 집단으로부터 수득된 항체를 지칭하며, 즉 집단을 구성하는 개별 항체는 미량으로 존재할 수 있는 가능한 자연 발생 돌연변이를 제외하고는 동일하다. 모노클로날 항체는 단일 항원 부위에 대해 고도로 특이적이다. 또한, 상이한 결정기 (에피토프)를 지향하는 상이한 항체를 포함하는 폴리클로날 항체 제제와 달리, 각각의 모노클로날 항체는 항원 상의 단일 결정기를 지향한다. 그의 특이성 이외에도, 모노클로날 항체는 다른 항체에 의해 오염되지 않고 합성될 수 있다는 점에서 유리하다. 수식어 "모노클로날"은 실질적으로 동종인 항체 집단으로부터 수득되는 바와 같은 항체의 특징을 나타내고, 임의의 특정한 방법에 의한 항체의 생산을 요구하는 것으로 해석되어서는 안된다. 예를 들어, 본 개시내용에 따라 사용될 모노클로날 항체는 하이브리도마 방법에 의해 제조될 수 있거나, 또는 재조합 DNA 방법에 의해 제조될 수 있다. "모노클로날 항체"는 또한 과거 항체 라이브러리로부터 단리될 수 있다.

[0196] 본원에서 모노클로날 항체는 구체적으로 중쇄 및/또는 경쇄의 일부가 특정한 종으로부터 유래되거나 특정한 항체 클래스 또는 하위클래스에 속하는 항체의 상응하는 서열과 동일하거나 상동성이고, 쇄(들)의 나머지는 또 다른 종으로부터 유래되거나 또 다른 항체 클래스 또는 하위클래스에 속하는 항체의 상응하는 서열과 동일하거나 상동성인 "키메라" 항체, 뿐만 아니라 목적하는 생물학적 활성을 나타내는 한 이러한 항체의 단편을 포함한다. 본원에서 관심 키메라 항체는 비-인간 영장류 (예를 들어, 구세계 원숭이, 유인원 등)로부터 유래된 가변 도메인 항원-결합 서열 및 인간 불변 영역 서열을 포함하는 "영장류화" 항체를 포함한다.

[0197] 모노클로날 항체 (MAb)를 생산하기 위해 다양한 방법이 사용되어 왔다. 단일 유형의 항체를 생산하는 클로닝된 세포주를 지칭하는 하이브리도마 기술은 마우스 (뮤린), 햄스터, 래트 및 인간을 비롯한 다양한 종의 세포를 사용한다. MAb를 제조하는 또 다른 방법은 재조합 DNA 기술을 비롯한 유전 공학을 사용한다. 이들 기술로부터 제조된 모노클로날 항체는 특히 키메라 항체 및 인간화 항체를 포함한다. 키메라 항체는 1종 초과 유형의 종으로부터의 DNA 코딩 영역을 조합한다. 예를 들어, 키메라 항체는 마우스로부터 가변 영역 및 인간으로부터 불변 영역이 유래될 수 있다. 인간화 항체는 비인간 부분을 함유하더라도 주로 인간으로부터 유래된다. 키메라 항체와 같이, 인간화 항체는 완전 인간 불변 영역을 함유할 수 있다. 그러나, 키메라 항체와 달리, 가변 영역은 인간으로부터 부분적으로 유래될 수 있다. 인간화 항체의 비인간 합성 부분은 종종 뮤린 항체 내의 CDR로부터 유래된다. 임의의 경우에, 이들 영역은 항체가 특이적 항원을 인지하고 이에 결합하게 하는 데 중요하다. 진단 및 단기 요법에 유용하지만, 뮤린 항체는 유해한 면역원성 반응의 위험을 증가시키지 않으면서 사람에게 장기간 투여될 수 없다. 인간 항-마우스 항체 (HAMA) 반응으로 불리는 이 반응은 인간 면역계가 뮤린 항체를 외래로 인지하고 이를 공격할 때 발생한다. HAMA 반응은 독성 쇼크 또는 심지어 사망을 유발할 수 있다.

[0198] 키메라 및 인간화 항체는 투여된 항체의 비인간 부분을 최소화함으로써 HAMA 반응의 가능성을 감소시킨다. 또한, 키메라 및 인간화 항체는 2차 인간 면역 반응, 예컨대 항체 의존성 세포독성 세포독성을 활성화시키는 추가의 이익을 가질 수 있다.

[0199] 무손상 항체는 항체의 Fc 영역 (천연 서열 Fc 영역 또는 아미노산 서열 변이체 Fc 영역)에 기인하는 생물학적 활성을 지칭하는 하나 이상의 "이펙터 기능"을 가질 수 있다. 항체 이펙터 기능의 예는 C1q 결합; 보체 의존성 세포독성; Fc 수용체 결합; 항체-의존성 세포-매개 세포독성 (ADCC); 식세포작용; 세포 표면 수용체 (예를 들어, B 세포 수용체; BCR)의 하향 조절 등을 포함한다.

[0200] 그의 중쇄의 불변 도메인의 아미노산 서열에 따라, 무손상 항체는 상이한 "클래스"로 지정될 수 있다. 5가지 주요 클래스의 무손상 항체: IgA, IgD, IgE, IgG 및 IgM이 존재하고, 이들 중 몇몇은 "하위클래스" (이소형), 예를 들어 IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA 및 IgA2로 추가로 나뉠 수 있다. 상이한 클래스의 항체에 상응하는

중쇄 불변 도메인은 각각 알파, 델타, 엡실론, 감마 및 뮤로 불린다. 상이한 클래스의 이뮤노글로불린의 서브 유닛 구조 및 3차원 형상은 널리 공지되어 있다.

[0201] 용어 "약"은 대략, 거의, 주위, 또는 영역 내를 의미하도록 본원에 사용된다. 용어 "약"이 수치 범위와 함께 사용되는 경우에, 이는 경계를 제시된 수치 값 초과 및 미만으로 확장함으로써 그 범위를 변경한다. 일반적으로, 용어 "약"은 예를 들어 10 퍼센트 위 또는 아래 (더 높거나 더 낮음)의 변동에 의해 언급된 값의 위 및 아래의 수치 값을 수식할 수 있다.

[0202] 용어 "투여", "투여하는" 및 그의 문법적 변형은 본 개시내용의 조성물, 예컨대 EV (예를 들어, 엑소솜)를 제약 상 허용되는 경로를 통해 대상체 내로 도입하는 것을 지칭한다. 조성물, 예컨대 본 개시내용의 EV (예를 들어, 엑소솜)의 대상체 내로의 도입은 종양내로, 경구로, 정맥으로, 비강내로, 비경구로 (정맥내로, 동맥내로, 근육내로, 복강내로, 또는 피하로), 직장으로, 림프관으로, 척수강내로, 안구주위로 또는 국소로를 포함한 임의의 적합한 경로에 의한 것이다. 투여는 자기-투여 및 또 다른 것에 의한 투여를 포함한다. 적합한 투여 경로는 조성물 또는 작용제가 그의 의도된 기능을 수행하도록 한다. 예를 들어, 적합한 경로가 정맥내인 경우에, 조성물은 조성물 또는 작용제를 대상체의 정맥 내로 도입함으로써 투여된다.

[0203] 본원에 사용된 용어 "항체"는 천연이든 또는 부분적으로 또는 완전히 합성적으로 생산되든 이뮤노글로불린 및 그의 단편을 포괄한다. 상기 용어는 또한 이뮤노글로불린 결합 도메인에 상동성인 결합 도메인을 갖는 임의의 단백질을 포함한다. "항체"는 항원에 특이적으로 결합하고 이를 인지하는 이뮤노글로불린 유전자 또는 그의 단편으로부터의 프레임워크 영역을 포함하는 폴리펩티드를 추가로 포함한다. 용어 항체의 사용은 전체 항체, 폴리클로날, 모노클로날 및 재조합 항체, 그의 단편을 포함하는 것으로 의도되고, 단일쇄 항체, 인간화 항체, 무린 항체, 키메라, 마우스-인간, 마우스-영장류, 영장류-인간 모노클로날 항체, 항-이디오타입 항체, 항체 단편, 예를 들어 scFv, (scFv)₂, Fab, Fab', 및 F(ab')₂, F(ab)₂, Fv, dAb, 및 Fd 단편, 디아바디, 및 항체-관련 폴리펩티드를 추가로 포함한다. 항체는 목적하는 생물학적 활성 또는 기능을 나타내는 한 이중특이적 항체 및 다중특이적 항체를 포함한다. 본 개시내용의 일부 측면에서, 생물학적 활성 분자는 항체 또는 그의 항원 결합 단편을 포함하는 분자이다.

[0204] 용어 "항체-약물 접합체" 및 "ADC"는 상호교환가능하게 사용되고, 치료제 (때때로 본원에서 작용제, 약물 또는 활성 제약 성분으로 지칭됨) 또는 작용제들에, 예를 들어, 공유결합으로 연결된 항체를 지칭한다. 본 개시내용의 일부 측면에서, 생물학적 활성 분자는 항체-약물 접합체이다.

[0205] 본원에 사용된 용어 "대략"은 1개 이상의 관심 값에 적용되는 바와 같이, 언급된 참조 값과 유사한 값을 지칭한다. 특정 측면에서, 용어 "대략"은 달리 언급되거나 문맥으로부터 달리 명백하지 않는 한, 언급된 참조 값의 어느 한 방향 (초과 또는 미만)으로 10%, 9%, 8%, 7%, 6%, 5%, 4%, 3%, 2%, 1% 또는 그 미만 내에 속하는 값의 범위를 지칭한다 (이러한 수가 가능한 값의 100%를 초과하는 경우는 제외함).

[0206] "보존적 아미노산 치환"은 아미노산 잔기가 유사한 측쇄를 갖는 아미노산 잔기로 대체된 것이다. 염기성 측쇄 (예를 들어, 리신, 아르기닌, 히스티딘), 산성 측쇄 (예를 들어, 아스파르트산, 글루탐산), 비하전 극성 측쇄 (예를 들어, 글리신, 아스파라긴, 글루타민, 세린, 트레오닌, 티로신, 시스테인), 비극성 측쇄 (예를 들어, 알라닌, 발린, 류신, 이소류신, 프롤린, 페닐알라닌, 메티오닌, 트립토판), 베타-분지형 측쇄 (예를 들어, 트레오닌, 발린, 이소류신) 및 방향족 측쇄 (예를 들어, 티로신, 페닐알라닌, 트립토판, 히스티딘)를 포함한, 유사한 측쇄를 갖는 아미노산 잔기의 패밀리가 관련 기술분야에 정의되어 있다. 따라서, 폴리펩티드 내의 아미노산이 동일한 측쇄 패밀리로부터의 또 다른 아미노산으로 교체되면, 치환은 보존적인 것으로 간주된다. 또 다른 측면에서, 아미노산의 스트링은 측쇄 패밀리 구성원의 순서 및/또는 조성이 상이한, 구조적으로 유사한 스트링으로 보존적으로 대체될 수 있다.

[0207] 본원에 사용된 용어 "보존된"은 비교되는 2개 이상의 서열의 동일한 위치에서 변경되지 않고 나타나는 것인, 폴리뉴클레오타이드 서열 또는 폴리펩티드 서열의 뉴클레오타이드 또는 아미노산 잔기 각각을 지칭한다. 비교적 보존된 뉴클레오타이드 또는 아미노산은 서열 내의 다른 곳에 나타나는 뉴클레오타이드 또는 아미노산보다 더 관련된 서열 사이에서 보존된 것이다.

[0208] 일부 측면에서, 2개 이상의 서열은 이들이 서로 100% 동일한 경우에 "완전히 보존된" 또는 "동일한" 것으로 언급된다. 일부 측면에서, 2개 이상의 서열은 이들이 서로 적어도 약 70% 동일한, 적어도 약 80% 동일한, 적어도 약 90% 동일한, 또는 적어도 약 95% 동일한 경우에 "고도로 보존된" 것으로 언급된다. 일부 측면에서, 2개 이상의 서열은 이들이 서로 적어도 약 30% 동일한, 적어도 약 40% 동일한, 적어도 약 50% 동일한, 적어도 약 60%

동일한, 적어도 약 70% 동일한, 적어도 약 80% 동일한, 적어도 약 90% 동일한, 또는 적어도 약 95% 동일한 경우에 "보존된" 것으로 언급된다. 서열의 보존은 폴리뉴클레오타이드 또는 폴리펩티드의 전체 길이에 대해 적용될 수 있거나 또는 그의 부분, 영역 또는 특색에 대해 적용될 수 있다.

- [0209] 본원에 사용된 용어 "연결하는" 및 "접합하는"은 상호교환가능하게 사용되고, 각각은 신규분해제 및 항-CD33 항체 또는 그의 항원-결합 부분을 포함하는 2개 이상의 모이어티의 공유 또는 비-공유 부착을 지칭한다. 일부 측면에서, 연결 또는 접합은 링커를 포함할 수 있다.
- [0210] 용어 "아미노산 서열 변이체"는 천연 서열 폴리펩티드와 어느 정도 상이한 아미노산 서열을 갖는 폴리펩티드를 지칭한다. 통상적으로, 아미노산 서열 변이체는 천연 항체의 적어도 1개의 수용체 결합 도메인 또는 천연 수용체의 적어도 1개의 리간드 결합 도메인과 적어도 약 70% 서열 동일성을 보유할 것이고, 전형적으로 이들은 이러한 수용체 또는 리간드 결합 도메인과의 서열에 대해 적어도 약 80%, 보다 전형적으로 적어도 약 90% 상동일 것이다. 아미노산 서열 변이체는 천연 아미노산 서열의 아미노산 서열 내의 특정 위치에 치환, 결실 및/또는 삽입을 보유한다. 아미노산은 통상적인 명칭, 1-문자 및 3-문자 코드에 의해 지정된다.
- [0211] "서열 동일성"은 서열을 정렬하고 필요한 경우에 갭을 도입하여 최대 퍼센트 서열 동일성을 달성한 후에 동일한 아미노산 서열 변이체 내의 잔기의 백분율로서 정의된다. 정렬을 위한 방법 및 컴퓨터 프로그램은 관련 기술분야에 널리 공지되어 있다. 한 이러한 컴퓨터 프로그램은 제네테크, 인크.(Genentech, Inc.)가 저작한 "얼라인 (Align) 2"이고, 이는 1991년 12월 10일에 미국 저작권청 (워싱턴 D.C. 20559)에 사용자 문서로 제출되었다.
- [0212] "보체 의존성 세포독성" 또는 "CDC"는 보체의 존재 하에 표적을 용해시키는 분자의 능력을 지칭한다. 보체 활성화 경로는 보체계의 제1 성분 (C1q)이 동족 항원과 복합체화된 분자 (예를 들어, 항체)에 결합함으로써 개시된다. 보체 활성화를 평가하기 위해, CDC 검정을 수행할 수 있다.
- [0213] 용어 "가변"은 가변 도메인의 특정 부분이 항체마다 서열에 있어서 광범위하게 상이하고, 각각의 특정한 항체의 그의 특정한 항원에 대한 결합 및 특이성에 사용된다는 사실을 지칭한다. 그러나, 가변성은 항체의 가변 도메인 전반에 걸쳐 고르게 분포되지 않는다. 이는 경쇄 및 중쇄 가변 도메인 둘 다에서 초가변 영역으로 불리는 3개의 절편에 집중되어 있다. 가변 도메인의 보다 고도로 보존된 부분은 프레임워크 영역 (FR)으로 불린다. 천연 중쇄 및 경쇄의 가변 도메인은 각각, 베타-시트 구조를 연결하고 일부 경우에는 베타-시트 구조의 일부를 형성하는 루프를 형성하는 3개의 초가변 영역에 의해 연결된, 주로 베�타-시트 형상을 취하는 4개의 FR을 포함한다. 각각의쇄 내의 초가변 영역은 FR에 의해 매우 근접하게 함께 유지되고, 다른 쇠로부터의 초가변 영역과 함께 항체의 항원-결합 부위의 형성에 기여한다. 불변 도메인은 항원에 대한 항체의 결합에 직접 관여하지는 않지만, 다양한 이펙터 기능, 예컨대 항체 의존성 세포성 세포독성 (ADCC)에서의 항체의 참여를 나타낸다.
- [0214] 본원에 사용된 용어 "초가변 영역"은 항원-결합을 담당하는 항체의 아미노산 잔기를 지칭한다. 초가변 영역은 일반적으로 "상보성 결정 영역" 또는 "CDR"로부터의 아미노산 잔기 (예를 들어, 경쇄 가변 도메인 내의 잔기 24-34 (L1), 50-56 (L2) 및 89-97 (L3) 및 중쇄 가변 도메인 내의 31-35 (H1), 50-65 (H2) 및 95-102 (H3); 상기 문헌 [Kabat et al.] 및/또는 "초가변 루프"로부터의 잔기 (예를 들어, 경쇄 가변 도메인 내의 잔기 26-32 (L1), 50-52 (L2) 및 91-96 (L3) 및 중쇄 가변 도메인 내의 26-32 (H1), 53-55 (H2) 및 96-101 (H3))를 포함한다. "프레임워크 영역" 또는 "FR" 잔기는 본원에 정의된 바와 같은 초가변 영역 잔기 이외의 가변 도메인 잔기이다.
- [0215] 항체의 파파인 소화는 각각 단일 항원-결합 부위를 갖는 "Fab" 단편으로 불리는 2개의 동일한 항원-결합 단편, 및 그의 명칭이 용이하게 결정화되는 그의 능력을 반영하는 것인 나머지 "Fc" 단편을 생성한다. 펩신 처리는 2개의 항원-결합 부위를 갖고 여전히 항원에 가교할 수 있는 F(ab')₂ 단편을 생성한다.
- [0216] "Fv"는 완전한 항원-인지 및 항원-결합 부위를 함유하는 최소 항체 단편이다. 이 영역은 단단하게 비-공유 결합된 1개의 중쇄 및 1개의 경쇄 가변 도메인의 이량체로 이루어진다. 이러한 구성에서 각각의 가변 도메인의 3개의 초가변 영역이 상호작용하여 VH-VL 이량체의 표면 상에 항원-결합 부위를 규정한다. 집합적으로, 6개의 초가변 영역은 항체에 항원-결합 특이성을 부여한다. 그러나, 심지어 단일 가변 도메인 (또는 항원에 특이적인 단지 3개의 초가변 영역을 포함하는 Fv의 절반)도 전체 결합 부위보다 더 낮은 친화도일지라도 항원을 인지하고 결합하는 능력을 갖는다.
- [0217] Fab 단편은 또한 경쇄의 불변 도메인 및 중쇄의 제1 불변 도메인 (CH1)을 함유한다. Fab' 단편은 중쇄 CH1 도메인의 카르복시 말단에 항체 힌지 영역으로부터의 1개 이상의 시스테인을 포함하는 소수의 잔기가 추가된다는 점에서 Fab 단편과 상이하다. Fab'-SH는 불변 도메인의 시스테인 잔기(들)가 적어도 1개의 유리 티올 기를 보

유하는 Fab'에 대한 본원의 명칭이다. F(ab')₂ 항체 단편은 원래 그들 사이에 힌지 시스테인을 갖는 Fab' 단편의 쌍으로서 생산되었다. 항체 단편의 다른 화학적 커플링이 또한 공지되어 있다.

- [0218] 임의의 척추동물 종으로부터의 항체의 "경쇄"는 그의 불변 도메인의 아미노산 서열을 기초로 하여 카파 (κ) 및 람다 (λ)로 불리는 2개의 명백하게 구분되는 유형 중 하나로 지정될 수 있다.
- [0219] "단일쇄 Fv" 또는 "scFv" 항체 단편은 단일 폴리펩티드 쇠에 존재하는 항체의 VH 및 VL 도메인을 포함한다. Fv 폴리펩티드는 scFv가 항원 결합을 위한 목적하는 구조를 형성할 수 있게 하는, VH 및 VL 도메인 사이의 폴리펩티드 링커를 추가로 포함할 수 있다.
- [0220] 용어 "디아바디"는 2개의 항원-결합 부위를 갖는 작은 항체 단편을 지칭하며, 단편은 동일한 폴리펩티드 쇠에서의 가변 경쇄 도메인 (VL)에 연결된 가변 중쇄 도메인 (VH) (VH-VL)을 포함한다. 동일한 쇠 상의 2개의 도메인 사이의 쌍형성을 허용하기에는 너무 짧은 링커를 사용함으로써, 도메인은 또 다른 쇠의 상보적 도메인과 쌍형성하여 2개의 항원-결합 부위를 생성하도록 강제된다.
- [0221] "단리된" 항체는 그의 천연 환경의 성분으로부터 확인 및 분리 및/또는 회수된 항체이다. 그의 천연 환경의 오염 성분은 항체에 대한 진단 또는 치료 용도를 방해할 수 있는 물질이고, 효소, 호르몬, 및 다른 단백질성 또는 비단백질성 용질을 포함할 수 있다. 특정 측면에서, 항체는 (1) 로우리(Lowry) 방법에 의해 결정시에 항체의 95 중량% 초과, 또는 99 중량% 초과로, (2) 기체 상 단백질 서열분석기를 사용하여 N-말단 또는 내부 아미노산 서열의 적어도 15개의 잔기를 얻기에 충분한 정도로, 또는 (3) 쿠마시 블루(Coomassie blue) 또는 은 염색을 사용하여 환원 또는 비환원 조건 하에 SDS-PAGE에 의한 동질성의 정도로 정제될 것이다. 단리된 항체는 재조합 세포 내의 계내 항체를 포함하는 데, 이는 항체의 천연 환경의 적어도 하나의 성분이 존재하지 않을 것이기 때문이다. 그러나, 통상적으로, 단리된 항체는 적어도 하나의 정제 단계에 의해 제조될 것이다.
- [0222] "암"은 체내에서 비정상 세포의 비제어된 성장을 특징으로 하는 다양한 질환의 광범위한 군을 지칭한다. 비조절된 세포 분열 및 성장은 이웃 조직을 침습하는 악성 종양의 형성을 유발하고, 또한 림프계 또는 혈류를 통해 신체의 원위 부분으로 전이될 수 있다. 본원에 사용된 "암"은 원발성, 전이성 및 재발성 암을 지칭한다.
- [0223] 본원에 사용된 용어 "면역 반응"은 외래 작용제에 대한 척추동물 내에서의 생물학적 반응을 지칭하며, 상기 반응은 이들 작용제 및 그에 의해 유발된 질환에 대해 유기체를 보호한다. 면역 반응은 면역계의 세포 (예를 들어, T 림프구, B 림프구, 자연 킬러 (NK) 세포, 대식세포, 호산구, 비만 세포, 수지상 세포 또는 호중구) 및 이들 세포 중 임의의 것 또는 간에 의해 생산된 가용성 거대분자 (항체, 시토카인 및 보체 포함)의 작용에 의해 매개되며, 이는 침입 병원체, 병원체로 감염된 세포 또는 조직, 암성 또는 다른 비정상 세포, 또는 자가면역 또는 병리학적 염증의 경우에 정상 인간 세포 또는 조직의 선택적 표적화, 그에 대한 결합, 그에 대한 손상, 그의 파괴 및/또는 척추동물 신체로부터의 그의 제거를 유발한다. 면역 반응은, 예를 들어 T 세포, 예를 들어 이펙터 T 세포 또는 Th 세포, 예컨대 CD4⁺ 또는 CD8⁺ T 세포의 활성화 또는 억제, 또는 Treg 세포의 억제를 포함한다. 본원에 사용된 용어 "T 세포" 및 "T 림프구"는 상호교환가능하고, 흥선에 의해 생산 또는 프로세싱된 임의의 림프구를 지칭한다. 일부 측면에서, T 세포는 CD4⁺ T 세포이다. 일부 측면에서, T 세포는 CD8⁺ T 세포이다. 일부 측면에서, T 세포는 NKT 세포이다.
- [0224] "대상체"는 임의의 인간 또는 비인간 동물을 포함한다. 용어 "비인간 동물"은 척추동물, 예컨대 비인간 영장류, 양, 개, 및 설치류, 예컨대 마우스, 래트 및 기니 피그를 포함하나 이에 제한되지는 않는다. 일부 측면에서, 대상체는 인간이다. 용어 "대상체" 및 "환자"는 본원에서 상호교환가능하게 사용된다.
- [0225] 용어 "치료 유효량" 또는 "치료 유효 투여량"은 목적하는 생물학적, 치료적 및/또는 예방적 결과를 제공하는 작용제 (예를 들어, 본원에 개시된 신규분해제 또는 신규분해제 접합체)의 양을 지칭한다. 상기 결과는 질환의 징후, 증상 또는 원인 중 하나 이상의 감소, 호전, 완화, 약화, 지연 및/또는 경감, 또는 생물학적 시스템의 임의의 다른 목적하는 변경일 수 있다. 고형 종양과 관련하여, 유효량은 종양 수축을 유발하고/거나 종양의 성장 속도를 감소시키거나 (예컨대 종양 성장을 억제함) 또는 다른 원치않는 세포 증식을 방지하거나 지연시키기에 충분한 양을 포함한다. 일부 측면에서, 유효량은 종양 발생을 지연시키기에 충분한 양이다. 일부 측면에서, 유효량은 종양 재발을 방지하거나 지연시키기에 충분한 양이다. 유효량은 1회 이상의 투여로 투여될 수 있다. 조성물의 유효량은, 예를 들어 (i) 암 세포의 수를 감소시킬 수 있고/거나; (ii) 종양 크기를 감소시킬 수 있고/거나; (iii) 말초 기관으로의 암 세포 침윤을 어느 정도까지 억제, 지연, 둔화시킬 수 있고, 이를 정지시킬 수 있고/거나; (iv) 종양 전이를 억제 (즉, 어느 정도까지 둔화시키고, 정지시킬 수 있음)할 수 있고/거나; (v) 종양 성장을 억제할 수 있고/거나; (vi) 종양의 발생 및/또는 재발을 방지 또는 지연시킬 수 있고/거나; (vii) 암

과 연관된 증상 중 1종 이상을 어느 정도까지 완화시킬 수 있다.

[0226] 일부 측면에서, "치료 유효량"은 암의 유의한 감소 또는 암, 예컨대 진행성 고형 종양의 진행 (퇴행)의 둔화에 영향을 미치는 것으로 임상적으로 입증된 신규분해제 또는 신규분해제 접합체의 양이다. 질환 퇴행을 촉진하는 치료제의 능력은 숙련된 진료의에게 공지된 다양한 방법을 사용하여, 예컨대 임상 시험 동안 인간 대상체에서, 인간에서의 효능을 예측하는 동물 모델 시스템에서, 또는 시험관내 검정에서 작용제의 활성을 검정함으로써 평가될 수 있다.

[0227] 본원에 사용된 용어 "표준 관리"는 의료 전문가에 의해 특정 유형의 질환에 대한 적절한 치료로서 수용되고 건강관리 전문가에 의해 널리 사용되는 치료를 지칭한다. 상기 용어는 하기 용어 중 임의의 것과 상호교환가능하게 사용될 수 있다: "최선의 의료행위", "표준 의료 관리" 및 "표준 요법".

[0228] 예로서, "항암제"는 대상체에서 암 퇴행을 촉진하거나 또는 추가의 종양 성장을 방지한다. 특정 측면에서, 약물의 치료 유효량은 암을 제거하는 시점까지 암 퇴행을 촉진한다.

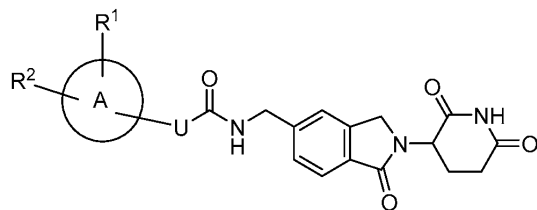
[0229] 치료와 관련하여 용어 "유효한" 및 "유효성"은 약리학적 유효성 및 생리학적 안전성 둘 다를 포함한다. 약리학적 유효성은 환자에서 암 퇴행을 촉진하는 약물의 능력을 지칭한다. 생리학적 안전성은 약물의 투여로부터 발생하는 세포, 기관 및/또는 유기체 수준에서의 독성, 또는 다른 유해 생리학적 효과 (유해 효과)의 수준을 지칭한다.

[0230] 본원에 사용된 용어 "면역 체크포인트 억제제"는 1종 이상의 체크포인트 단백질을 완전히 또는 부분적으로 감소시키거나, 억제하거나, 방해하거나 또는 조정하는 분자를 지칭한다. 체크포인트 단백질은 T-세포 활성화 또는 기능을 조절한다. 수많은 체크포인트 단백질, 예컨대 CTLA-4 및 그의 리간드 CD80 및 CD86; 및 PD-1과 그의 리간드 PD-L1 및 PD-L2가 공지되어 있다. [Pardoll, D.M., Nat Rev Cancer 12(4):252-64 (2012)]. 이들 단백질은 T-세포 반응의 공동-자극 또는 억제 상호작용을 담당한다. 면역 체크포인트 단백질은 자기-관용 및 생리학적 면역 반응의 지속기간 및 크기를 조절하고 유지한다. 면역 체크포인트 억제제는 항체를 포함하거나 또는 항체로부터 유래된다.

[0231] 용어 "치료하다" 또는 "치료"는 치유적 치료 및 예방적 또는 방지적 조치 둘 다를 지칭하며, 여기서 목적은 바람직하지 않은 생리학적 변화 또는 장애, 예컨대 암의 발생 또는 확산을 방지하거나 늦추는 (줄이는) 것이다. 본 개시내용의 목적을 위해, 유익한 또는 목적하는 임상 결과는 검출가능하든 검출불가능하든 증상의 완화, 질환 정도의 감소, 질환의 안정화된 (즉, 악화되지 않는) 상태, 질환 진행의 지연 또는 둔화, 질환 상태의 호전 또는 완화, 및 약화 (부분적이든 전체적이든)를 포함하나 이에 제한되지는 않는다. "치료"는 또한 치료를 받지 않은 경우에 예상되는 생존과 비교하여 생존을 연장시키는 것을 의미할 수 있다. 치료를 필요로 하는 대상체는 이미 상태 또는 장애를 갖는 대상체 뿐만 아니라 상태 또는 장애를 갖기 쉬운 대상체 또는 상태 또는 장애가 예방되어야 하는 대상체를 포함한다.

[0232] II. "신규분해제"

[0233] 본 개시내용은 하기 화학식 (II)의 신규분해제 또는 그의 제약상 허용되는 염을 제공한다:



(II)

[0234]

[0235] 여기서:

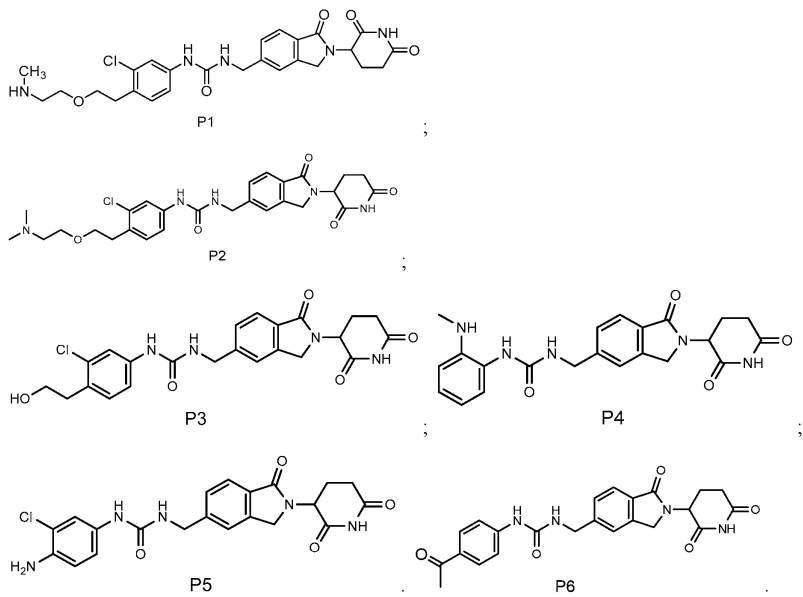
[0236] A는 페닐 또는 C₄-C₁₀시클로알킬 고리이고;

[0237] U는 NH 및 CF₂로부터 선택되고;

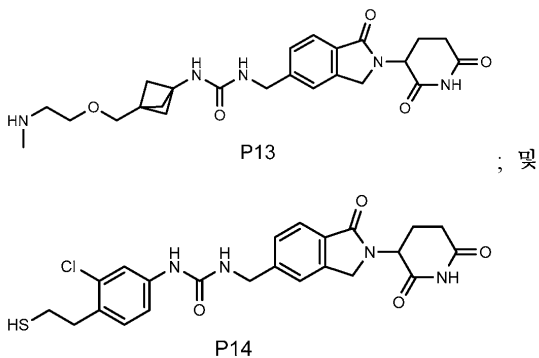
[0238] R¹은 독립적으로 수소 및 할로로부터 선택되고;

- [0239] R^2 는 $-C(O)R^3$, $-N(R^4)_2$, $-(CH_2)_nOH$, $-(CH_2)_nSH$, $-(CH_2)_nN(R^4)_2$, $-(CH_2)_nQ'(CH_2)_mOH$, $-(CH_2)_nQ'(CH_2)_mSH$, 및 $-(CH_2)_nQ'(CH_2)_mN(R^4)_2$ 로부터 선택되고; 여기서
- [0240] R^3 은 수소 또는 C_1 - C_6 알킬이고;
- [0241] 각각의 R^4 는 독립적으로 수소 또는 C_1 - C_6 -알킬이고;
- [0242] Q' 는 O, S, 또는 NR^4 이고;
- [0243] n 은 1 내지 6이고;
- [0244] m 은 2-5이며;
- [0245] 단, R^2 가 NH_2 , $-(CH_2)_nNH_2$ 또는 $-(CH_2)_nOH$ 인 경우, R^1 은 할로이다.
- [0246] 특정 측면에서, 본 개시내용은
- [0247] A가 페닐 고리 또는 C_4 - C_{10} 시클로알킬 고리이고;
- [0248] U가 NH이고;
- [0249] R^1 이 수소 및 할로로부터 선택되고;
- [0250] R^2 가 $-(CH_2)_nQ'(CH_2)_mN(R^4)_2$, $-(CH_2)_nOH$, $-(CH_2)_nSH$, $-N(R^4)_2$, 및 $-C(O)R^3$ 으로부터 선택되고; 여기서
- [0251] m 은 2이고;
- [0252] n 은 2이고;
- [0253] Q' 는 -O-이고;
- [0254] R^3 은 메틸이고;
- [0255] 각각의 R^4 는 독립적으로 수소 및 메틸로부터 선택되며;
- [0256] 단, R^2 가 NH_2 또는 $-(CH_2)_nOH$ 인 경우, R^1 은 할로인
- [0257] 화학식 (II)의 화합물 또는 그의 제약상 허용되는 염을 제공한다.
- [0258] 본원에 사용된 용어 " C_1 - C_6 알콕시"는 산소 원자를 통해 모 분자 모이어티에 부착된 C_1 - C_6 알킬 기를 지칭한다.
- [0259] 본원에 사용된 용어 " C_1 - C_6 알콕시 C_1 - C_6 알킬"은 C_1 - C_6 알킬 기를 통해 모 분자 모이어티에 부착된 C_1 - C_6 알콕시 기를 지칭한다.
- [0260] 본원에 사용된 용어 " C_1 - C_6 알킬"은 1 내지 6개의 탄소 원자를 함유하는 직쇄 또는 분지쇄 포화 탄화수소로부터 유도된 기를 지칭한다.
- [0261] 본원에 사용된 용어 " C_4 - C_{10} 시클로알킬"은 4 내지 10개의 탄소 원자 및 0개의 헤테로원자를 갖는 포화 모노시클릭, 탄화수소 고리계를 지칭한다. 시클로알킬 기의 대표적인 예는 시클로부틸, 시클로펜틸 및 시클로헥실을 포함하나 이에 제한되지는 않는다. 7 내지 10개의 원자를 함유하는 시클로알킬 기는 모노시클릭 또는 융합된, 스피로시클릭 또는 가교된 비시클릭 구조일 수 있다.
- [0262] 본원에 사용된 용어 "할로"는 F, Cl, Br 또는 I를 지칭한다.

[0263] 일부 측면에서, 화학식 (II)의 신규분해제는 하기로 이루어진 군으로부터 선택된 화합물이다:

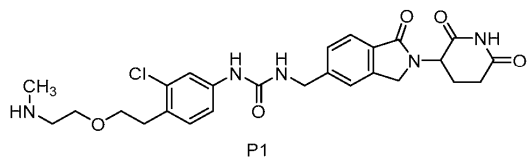


[0264]



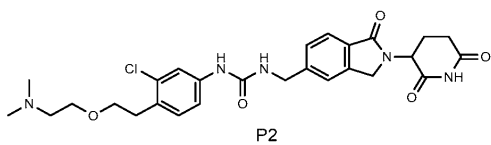
[0265]

[0266] 일부 측면에서, 화학식 (II)의 신규분해제는 하기이다:



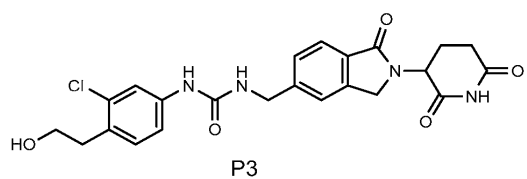
[0267]

[0268] 일부 측면에서, 화학식 (II)의 신규분해제는 하기이다:



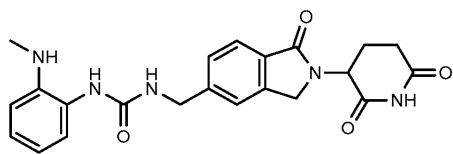
[0269]

[0270] 일부 측면에서, 화학식 (II)의 신규분해제는 하기이다:



[0271]

[0272] 일부 측면에서, 화학식 (II)의 신규분해제는 하기이다:

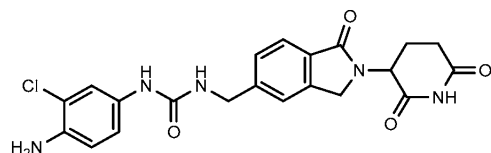


P4

[0273]

[0274]

일부 측면에서, 화학식 (II)의 신규분해제는 하기이다:

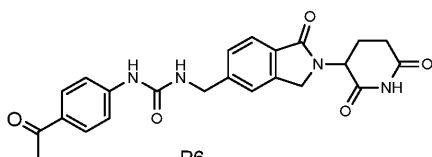


P5

[0275]

[0276]

일부 측면에서, 화학식 (II)의 신규분해제는 하기이다:

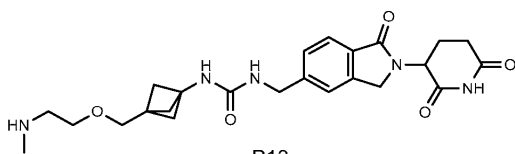


P6

[0277]

[0278]

일부 측면에서, 화학식 (II)의 신규분해제는 하기이다:

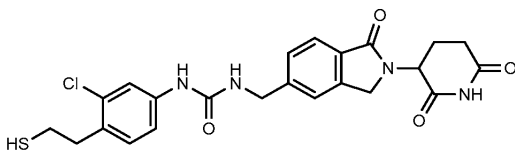


P13

[0279]

[0280]

일부 측면에서, 화학식 (II)의 신규분해제는 하기이다:



P14

[0281]

[0282]

일부 측면에서, 본 개시내용은 A가 페닐이고; U가 NH이고; R^1 이 할로이고; R^2 가 $-(CH_2)_nQ'(CH_2)_mN(R^4)_2$ 이고, 여기서 m 및 n은 2이고, Q'는 O이고, 하나의 R^4 는 수소이고, 다른 것은 메틸인 화학식 (II)의 신규분해제 또는 그의 제약상 허용되는 염을 제공한다.

[0283]

일부 측면에서, 본 개시내용은 A가 페닐이고; U가 NH이고; R^1 이 할로이고; R^2 가 $-(CH_2)_nQ'(CH_2)_mN(R^4)_2$ 이고, 여기서 m 및 n은 2이고, Q'는 O이고, 각각의 R^4 는 메틸인 화학식 (II)의 신규분해제를 제공한다.

[0284]

일부 측면에서, 본 개시내용은 A가 페닐이고; U가 NH이고; R^1 이 할로이고; R^2 가 $-(CH_2)_nOH$ 이고, 여기서 n이 2인 화학식 (II)의 신규분해제를 제공한다.

[0285]

일부 측면에서, 본 개시내용은 A가 페닐이고; U가 NH이고; R^1 이 할로이고; R^2 가 $-(CH_2)_nSH$ 이고, 여기서 n은 2인 화학식 (II)의 신규분해제를 제공한다.

[0286]

일부 측면에서, 본 개시내용은 A가 페닐이고; U가 NH이고; R^1 이 수소이고; R^2 가 $-N(R^4)_2$ 이고, 여기서 하나의 R^4 는 수소이고 다른 것은 메틸인 화학식 (II)의 신규분해제를 제공한다.

[0287] 일부 측면에서, 본 개시내용은 A가 페닐이고; U가 NH이고; R^1 이 할로이고; R^2 가 $-N(R^4)_2$ 이고, 여기서 각각의 R^4 는 수소인 화학식 (II)의 신규분해제를 제공한다. 일부 측면에서, 본 개시내용은 A가 페닐이고; R^1 이 수소이고; R^2 가 $-C(O)R^3$ 이고, 여기서 R^3 은 메틸인 화학식 (II)의 신규분해제를 제공한다.

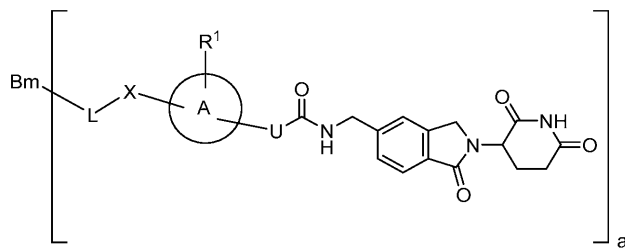
[0288] 일부 측면에서, 본 개시내용은 A가 C_4 - C_{10} 시클로알킬 고리이고; U가 NH이고; R^1 이 수소이고; R^2 가 $-(CH_2)_mQ'(CH_2)_nN(R^4)_2$ 이고, 여기서 m 및 n은 2이고, Q'는 O이고, 하나의 R^4 는 수소이고, 다른 것은 메틸인 화학식 (II)의 신규분해제를 제공한다.

[0289] 일부 측면에서, 신규분해제는 분해를 위해 단백질을 표적화할 수 있는 E3 유비퀴틴 리가제와 3원 복합체를 형성하는 분자이다.

[0290] III. 신규분해제 접합체

[0291] 본 개시내용은 본원에 개시된 1종 이상의 신규분해제 및 본원에 개시된 항-CD33 항체 또는 그의 항원-결합 부분의 접합체를 제공한다. 이들 접합체는 세레블론 (CRBN)에 결합하여, CRL4^{CRBN} E3 유비퀴틴 리가제에 의해 매개되는 기질 단백질의 동원 및 유비퀴틴화를 촉진함으로써 단백질을 분해할 수 있다. 이들 작용제는 리가제와 네오기질 사이의 단백질 상호작용을 재프로그래밍하는 소수성 패치로서 결합 계면을 채우는 "분자 글루"로서 작용한다.

[0292] 일부 측면에서, 본 개시내용은 하기 화학식 (I)의 화합물 그의 제약상 허용되는 염을 제공한다:



(I)

[0293]

[0294] 여기서:

[0295] a는 1 내지 10의 정수이고;

[0296] A는 페닐 또는 C_4 - C_{10} 시클로알킬 고리이고;

[0297] R^1 은 수소 및 할로로부터 선택되고;

[0298] U는 NH 및 CF_2 로부터 선택되고;

[0299] X는 $-NR^2$ -, $=C(CH_3)$ -, $-Q-(CH_2)_n$ -, 및 $-Q(CH_2)_mQ'(CH_2)_n$ -로부터 선택되고; 여기서

[0300] Q 및 Q'는 각각 독립적으로 O, S, 또는 NR^2 이고;

[0301] R^2 는 수소 또는 C_1 - C_6 알킬이고;

[0302] n은 1 내지 6의 정수이고;

[0303] m은 2 내지 6의 정수이고;

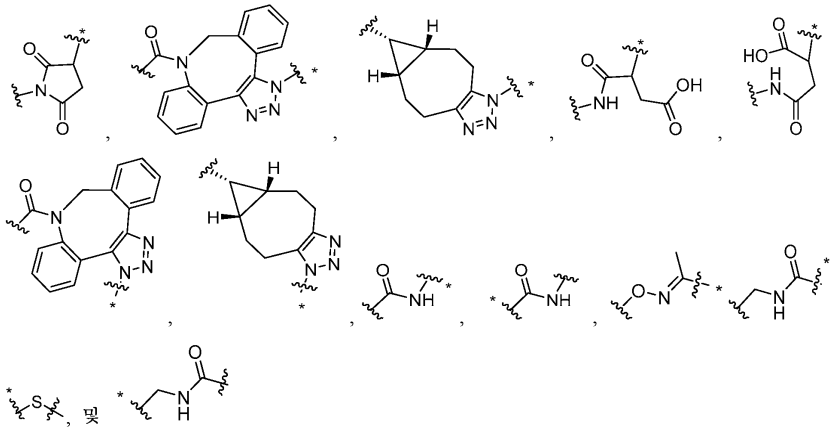
[0304] 여기서 각각의 기의 좌측은 L에 부착되고, 우측은 A에 부착되고;

[0305] 단, X가 NH 또는 $-Q-(CH_2)_n$ -인 경우, R^1 은 할로이고;

[0306] L은 절단가능한 링커 또는 비-절단가능한 링커이고;

- [0307] Bm은 본원에 개시된 항-CD33 항체 또는 그의 항원-결합 부분이다.
- [0308] 일부 측면에서, U는 NH이다.
- [0309] 일부 측면에서, 본원에 기재된 신규분해제 접합체는 종양 세포주에 대한 시험관내 항증식 활성을 갖는다. 일부 측면에서, 본원에 개시된 신규분해제 및 항-CD33 항체 또는 그의 항원-결합 부분을 포함하는 신규분해제 접합체는 신규분해제 단독 또는 본원에 개시된 항-CD33 항체 또는 그의 항원-결합 부분 단독보다 적어도 약 50%, 적어도 약 60%, 적어도 약 70%, 적어도 약 80%, 적어도 약 90%, 적어도 약 95%, 또는 적어도 약 100% 더 높은 시험관내 항증식 활성을 갖는다. 일부 측면에서, 본원에 개시된 신규분해제 및 항-CD33 항체 또는 그의 항원-결합 부분을 포함하는 신규분해제 접합체는 신규분해제 단독 또는 본원에 개시된 항-CD33 항체 또는 그의 항원-결합 부분 단독보다 적어도 약 2배, 적어도 약 3배, 적어도 약 4배, 적어도 약 5배, 적어도 약 6배, 적어도 약 7배, 적어도 약 8배, 적어도 약 9배, 적어도 약 10배 더 높은 시험관내 항증식 활성을 갖는다.
- [0310] 일부 측면에서, 본원에 기재된 신규분해제 접합체는 Daudi 림프종 세포주에 대한 시험관내 항증식 활성, 예를 들어 신규분해제 단독 또는 항-CD33 항체 또는 그의 항원-결합 부분 단독과 비교하여 Daudi 림프종 세포주에 대한 보다 높은 항증식 활성을 갖는다. 일부 측면에서 본원에 기재된 신규분해제 접합체는 HL-60 급성 골수성 백혈병 세포주에 대한 시험관내 항증식 활성, 예를 들어 신규분해제 단독 또는 항-CD33 항체 또는 그의 항원-결합 부분 단독과 비교하여 HL-60 급성 골수성 백혈병 세포주에 대한 보다 높은 항증식 활성을 갖는다. 일부 측면에서, 본원에 기재된 신규분해제 접합체는 라모스 비-호지킨 림프종 세포주에 대한 시험관내 항증식 활성, 예를 들어 신규분해제 단독 또는 항-CD33 항체 또는 그의 항원-결합 부분 단독과 비교하여 라모스 비-호지킨 림프종 세포주에 대한 보다 높은 항증식 활성을 갖는다. 일부 측면에서, 본원에 기재된 신규분해제 접합체는 인간 혈청의 존재 하에 그의 항증식 활성을 유지할 수 있다. 본원에 기재된 신규분해제 접합체는 암의 치료에 사용될 수 있다.
- [0311] 일부 측면에서, 항체 신규분해제 접합체 (AnDC)는 본원에 개시된 1종 이상의 신규분해제 및 본원에 개시된 항-CD33 항체 또는 그의 항원-결합 부분의 접합체이다.
- [0312] III.A. 링커
- [0313] 본 개시내용의 신규분해제는 링커를 통해 항-CD33 항체 또는 그의 항원-결합 부분에 연결될 수 있다. 본원에 사용된 용어 "링커"는 항-CD33 항체 또는 그의 항원-결합 부분 (Bm)을 화학식 (I)의 화합물 내의 기 X에 연결할 수 있는 임의의 화학적 모이어티를 지칭한다.
- [0314] 특정 측면에서, 링커는 이중이관능성 기를 함유할 수 있다. 본 개시내용에서, 용어 "이중이관능성 기"는 링커를 항-CD33 항체 또는 그의 항원-결합 부분에 연결하는 링커의 일부인 화학적 모이어티를 지칭한다. 이중이관능성 기는 화학적 모이어티의 어느 한 말단에 상이한 반응성 기를 갖는 것을 특징으로 한다. "Bm"에 대한 부착은 화학적 접합 또는 효소적 접합, 또는 둘 다의 조합을 통해 달성될 수 있다. 화학적 접합은 항-CD33 항체 또는 그의 항원-결합 부분의 표면 상의 접근가능한 아미노산 잔기와 이중이관능성 기 상의 반응 핸들의 제어된 반응을 수반한다. 화학적 접합의 예는 리신 아미드 커플링, 시스테인 커플링, 및 유전 공학에 의해 혼입된 비-천연 아미노산을 통한 커플링을 포함하나 이에 제한되지는 않으며, 여기서 목적하는 반응 핸들을 갖는 비-천연 아미노산 잔기는 "Bm" 상에 설치된다. 효소적 접합에서, 효소는 링커와 항-CD33 항체 또는 그의 항원-결합 부분 상의 접근가능한 아미노 잔기의 커플링을 매개한다. 효소적 접합의 예는 소르타제를 사용한 펩티드교환, 미생물 트랜스글루타미나제를 사용한 펩티드교환, 및 N-글리칸 조작을 포함하나 이에 제한되지는 않는다. 화학적 접합 및 효소적 접합이 또한 순차적으로 사용될 수 있다. 예를 들어, 효소적 접합은 또한 후속 화학적 접합에 이용될 고유한 반응 핸들을 "Bm" 상에 설치하는 데 사용될 수 있다.

[0315] 일부 측면에서, 이중이관능성 기는 하기로부터 선택된다:



[0316]

[0317] 여기서

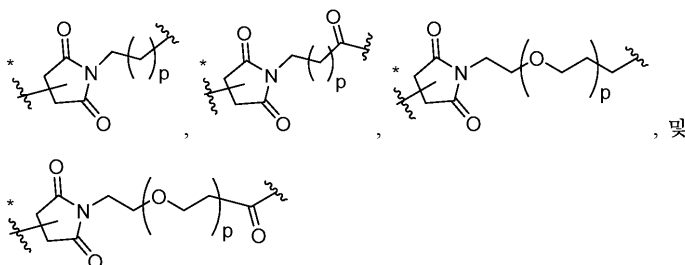
[0318] $\sim$ 은 링커의 나머지 부분에 대한 부착 지점이고;

[0319] $\sim^*$ 은 Bm에 대한 부착 지점이다.

[0320] 특정 측면에서, 링커 "L"은 비-절단가능하다. 본원에 사용된 용어 "비-절단가능한 링커"는 항-CD33 항체 또는 그의 항원-결합 부분을 신규분해제에 안정한 공유 방식으로 연결시킬 수 있는 임의의 화학적 모이어티이고, "절단가능한 링커"로서 본원에 정의된 카테고리에는 포함되지 않는다. 따라서, 비-절단가능한 링커는 산-유도된 절단, 광-유도된 절단, 생체환원성 절단, 펩티다제-유도된 절단, 에스테라제-유도된 절단, 및 디설피드 결합 절단에 대해 실질적으로 저항성이다. "절단에 대해 실질적으로 저항성"인 것은 항체 신규분해제 접합체 집단의 적어도 80%, 바람직하게는 적어도 85%, 보다 바람직하게는 적어도 90%, 보다 더 바람직하게는 적어도 95%, 및 가장 바람직하게는 적어도 99%에서 링커 내의 또는 링커에 인접한 화학 결합이, 산, 광불안정성 절단제, 생체 환원제, 펩티다제, 에스테라제, 또는 절단가능한 링커 내의 화학 결합 (예를 들어, 디설피드 결합)을 절단하는 화학적 또는 생리학적 화합물 중 임의의 것으로 처리한지 수시간 내지 수일 이내 동안 상기 언급된 작용제에 의해 비-절단 가능하게 유지되는 것을 의미한다. 특정 측면에서 링커는 신규분해제 및/또는 항-CD33 항체 또는 그의 항원-결합 부분이 활성을 유지할 수 있는 조건에서 산-유도된 절단, 광-유도된 절단, 생체환원적 절단, 효소적 절단 등에 대해 감수성이 없다. 비-절단가능한 링커로부터 생성된 ADC 이화대사물은 항체로부터의 잔류 아미노산을 함유한다. 이들 이화대사물은 이들이 전달되는 표적 세포에서 독특하고 예상외의 특성을 발휘할 수 있다.

[0321] 관련 기술분야의 통상의 기술자는 비-절단가능한 링커를 절단가능한 링커와 용이하게 구별할 것이다.

[0322] 비-절단가능한 링커의 예는 SMCC (숙신이미드 4-(N-말레이미도메틸)시클로헥산-1-카복실레이트) 링커, 숙신이미드 티오에테르 링커, 및 하기와 같은 링커이다:



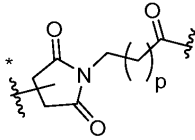
[0323] ; 여기서

[0324] p는 1 내지 10의 정수이고;

[0325] $\sim$ 은 X에 대한 부착 지점이고;

[0326] $\sim^*$ 은 항-CD33 항체 또는 그의 항원-결합 부분에 대한 부착 지점이다.

[0327] 일부 측면에서, 링커는 하기이다:



[0328]

[0329] 일부 측면에서, p는 5이다.

[0330] 특정 측면에서, 링커는 절단가능할 수 있다. 일부 측면에서, 링커는 신규분해제 및/또는 항-CD33 항체 또는 그의 항원-결합 부분이 활성을 유지할 수 있는 조건에서 산-유도된 절단, 광-유도된 절단, 생체환원성 절단, 효소적 절단 등에 감수성일 수 있다.

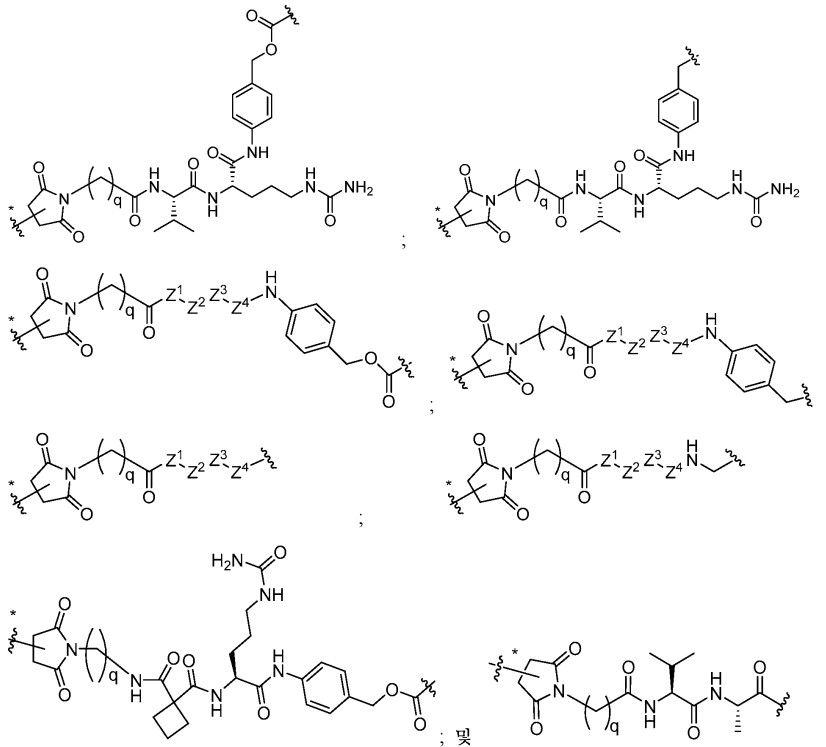
[0331] 일부 측면에서, 절단가능한 링커는 효소적으로 절단될 수 있다. 일부 측면에서, 절단가능한 링커는 프로테아제, 펩티다제, 에스테라제, 베타-글루로니다제, 글리코시다제, 포스포디에스테라제, 포스파타제, 피로포스파타제 또는 리파제에 의해 절단될 수 있다.

[0332] 일부 측면에서, 절단가능한 링커는 프로테아제에 의해 절단될 수 있다. 프로테아제의 예는 카텝신 B, VAGP 테트라펩티드 등을 포함하나 이에 제한되지는 않는다.

[0333] 특정 측면에서, 절단가능한 링커는 펩티드를 함유한다. 일부 측면에서, 펩티드는 링커의 절단 부위이고, 이에 의해 세포내 프로테아제, 예컨대 리소솜 효소에 대한 노출 시 약물의 방출을 용이하게 한다. 펩티드는 특정한 효소, 예를 들어 중앙-연관 프로테아제, 카텝신 B, C 및 D, 또는 플라스민 프로테아제에 의한 효소적 절단을 위해 설계 및 최적화될 수 있다. 2개의 아미노산을 갖는 펩티드의 예는 알라닌-알라닌 (ala-ala), 발린-알라닌 (val-ala), 발린-시트룰린 (vc 또는 val-cit), 알라닌-페닐알라닌 (af 또는 ala-phe); 페닐알라닌-리신 (fk 또는 phe-lys); 페닐알라닌-호몰리신 (phe-호몰리신); 및 N-메틸-발린-시트룰린 (Me-val-cit)을 포함하나 이에 제한되지는 않는다. 3개의 아미노산을 갖는 펩티드의 예는 글리신-발린-시트룰린 (gly-val-cit), 아스파르트산-발린-시트룰린 (asp-val-cit), 알라닌-알라닌-아스파라긴 (ala-ala-asn), 알라닌-페닐알라닌-리신 (ala-phe-lys), 글리신-글리신-페닐알라닌 (gly-gly-phe), 및 글리신-글리신-글리신 (gly-gly-gly)을 포함하나 이에 제한되지는 않는다. 4개의 아미노산을 갖는 펩티드의 예는 글리신-글리신-발린-시트룰린 (gly-gly-val-cit) 및 글리신-글리신-페닐알라닌-글리신 (gly-gly-phe-gly)을 포함하나 이에 제한되지는 않는다. 상기 아미노산 조합은 또한 역순으로 존재할 수 있다 (즉, cit-val).

[0334] 본 개시내용의 펩티드는 아미노산 잔기의 L- 또는 D- 이성질체를 포함할 수 있다. 용어 "자연 발생 아미노산"은 Ala, Asp, Asx, Cit, Cys, Glu, Phe, Glx, Gly, His, Ile, Lys, Leu, Met, Asn, Pro, Gln, Arg, Ser, Thr, Val, Trp, 및 Tyr을 지칭한다. "D-"는 자연 발생 ("L-") 아미노산에서의 배위와는 대조적으로 "D" (우선성) 배위를 갖는 아미노산을 나타낸다. 본원에 기재된 아미노산은 상업적으로 구입하거나 (시그마 케미칼 캄파니 (Sigma Chemical Co.), 어드밴스드 켐테크(Advanced Chemtech)), 또는 관련 기술분야에 공지된 방법을 사용하여 합성할 수 있다.

[0335] 특정 측면에서, 링커 ("L")는 하기로부터 선택된 프로테아제 절단가능한 링커이다:



[0336]

[0337] 여기서:

[0338] q는 2 내지 10의 정수이고;

[0339] Z^1 , Z^2 , Z^3 , 및 Z^4 는 각각 독립적으로 부재하거나 또는 L- 또는 D-배위의 자연-발생 아미노산 잔기이며, 단, Z^1 , Z^2 , Z^3 , 및 Z^4 중 적어도 2개는 아미노산 잔기이고;

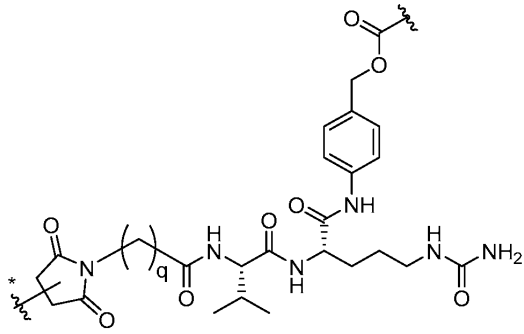
[0340] *은 X에 대한 부착 지점이고;

[0341] *은 항-CD33 항체 또는 그의 항원-결합 부분에 대한 부착 지점이다.

[0342] 특정 측면에서, Z^1 , Z^2 , Z^3 , 및 Z^4 는 독립적으로 부재하거나 또는 L-발린, D-발린, L-시트룰린, D-시트룰린, L-알라닌, D-알라닌, L-글루타민, D-글루타민, L-글루탐산, D-글루탐산, L-아스파르트산, D-아스파르트산, L-아스파라긴, D-아스파라긴, L-페닐알라닌, D-페닐알라닌, L-리신, D-리신, 및 글리신으로 이루어진 군으로부터 선택되며; 단, Z^1 , Z^2 , Z^3 , 및 Z^4 중 적어도 2개는 아미노산 잔기이다.

[0343] 일부 측면에서, Z^1 은 부재하거나 또는 글리신이고; Z^2 는 부재하거나 또는 L-글루타민, D-글루타민, L-글루탐산, D-글루탐산, L-아스파르트산, D-아스파르트산, L-알라닌, D-알라닌 및 글리신으로부터 선택되고; Z^3 은 L-발린, D-발린, L-알라닌, D-알라닌, L-페닐알라닌, D-페닐알라닌 및 글리신으로부터 선택되고; Z^4 는 L-알라닌, D-알라닌, L-시트룰린, D-시트룰린, L-아스파라긴, D-아스파라긴, L-리신, D-리신, L-페닐알라닌, D-페닐알라닌 및 글리신으로부터 선택된다.

[0344] 일부 측면에서, L은 하기이다:



[0345]

[0346]

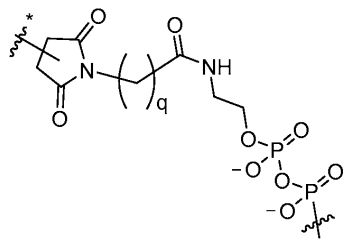
[0347]

[0348]

일부 측면에서, q 는 5이다.

특정 측면에서, L은 피로포스파타제 절단가능한 링커이다.

일부 측면에서, L은 하기인 피로포스파타제 절단가능한 링커이다:



[0349]

[0350]

여기서:

[0351]

q 는 2 내지 10의 정수이고;

[0352]

^w은 X 에 대한 부착 지점이고;

[0353]

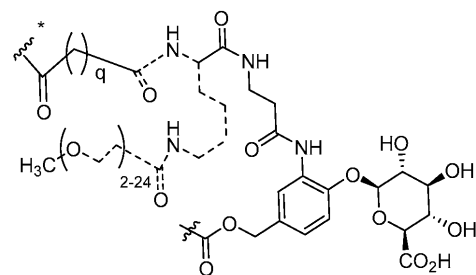
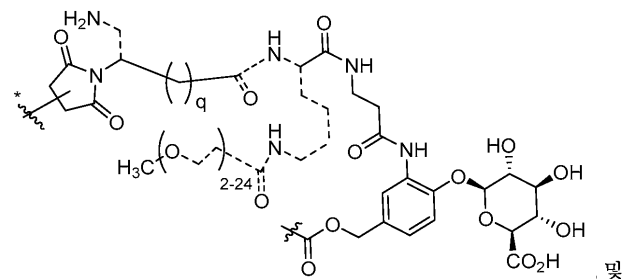
* 은 항-CD33 항체 또는 그의 항원-결합 부분에 대한 부착 지점이다.

[0354]

특정 측면에서, L은 베타-글루코로니다제 절단가능한 링커이다.

[0355]

일부 측면에서, L은 하기로부터 선택된 베타-글루코로니다제 절단가능한 링커이다:



[0356]

[0357]

여기서:

[0358]

q 는 2 내지 10의 정수이고;

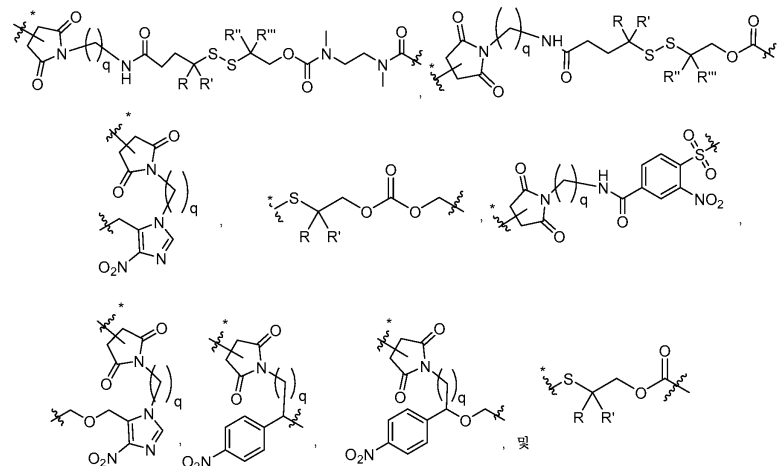
[0359] ---는 부재하거나 또는 결합이고;

[0360] 은 X에 대한 부착 지점이고;

[0361] 은 항-CD33 항체 또는 그의 항원-결합 부분에 대한 부착 지점이다.

[0362] 일부 측면에서, 링커는 생체환원성이다. 생체환원성 링커는 세포내 구획 대 혈장에서의 환원 전위의 차이를 이용한다. 종양 세포의 세포질에 존재하는 환원 글루타티온은 정상 세포의 세포질에 존재하는 것보다 최대 1000 배 더 높고, 종양 세포는 또한 세포 구획에서의 환원에 기여할 수 있는 효소를 함유한다. 링커는 전신 순환 동안 접합체를 무손상으로 유지하고, 높은 세포내 농도의 글루타티온에 의해 선택적으로 절단되어, 비-독성 전구 약물로부터 종양 부위에서 활성 약물을 방출한다.

[0363] 일부 측면에서, L은 하기로부터 선택된 생체환원성 링커이다:



[0364]

[0365] 여기서:

[0366] q는 2 내지 10의 정수이고;

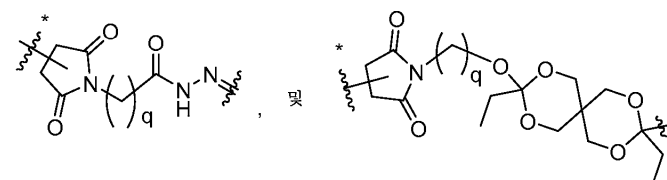
[0367] R, R', R'' 및 R'''는 각각 독립적으로 수소, C₁-C₆알콕시C₁-C₆알킬, (C₁-C₆)₂NC₁-C₆알킬 및 C₁-C₆알킬로부터 선택되거나, 또는 2개의 같은자리 R 기는 이들이 부착되어 있는 탄소 원자와 함께 시클로부틸 또는 시클로프로필 고리를 형성할 수 있고;

[0368] 은 X에 대한 부착 지점이고;

[0369] 은 항-CD33 항체 또는 그의 항원-결합 부분에 대한 부착 지점이다.

[0370] 특정 측면에서, 링커는 산 절단가능하다. 산-절단가능한 링커는 혈액 순환의 중성 pH에서 안정하게 유지되지만, 세포 구획의 산성 환경에서 가수분해를 겪고 세포독성 약물을 방출하도록 특이적으로 설계된다.

[0371] 일부 측면에서, L은 하기로부터 선택된 산 절단가능한 링커이다:



[0372]

[0373] 여기서:

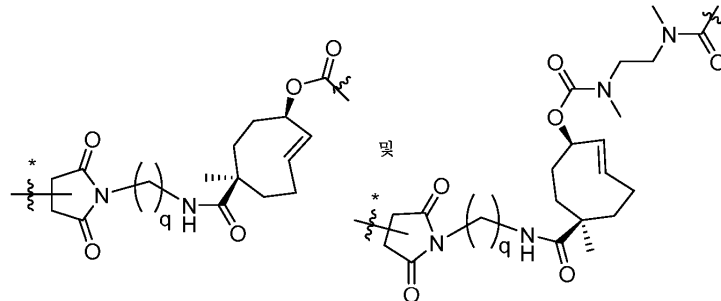
[0374] q는 2 내지 10의 정수이고;

[0375] 은 X에 대한 부착 지점이고;

[0376]  은 항-CD33 항체 또는 그의 항원-결합 부분에 대한 부착 지점이다.

[0377] 특정 측면에서, L은, L이 클릭-투-릴리즈 링커이고, 여기서 신규분해제의 방출은 테트라진 또는 관련 화합물에 의해 화학적으로 촉발되는 것이다.

[0378] 일부 측면에서, L은 하기로부터 선택된 클릭-투-릴리즈 링커이다:



[0379]

[0380] 여기서:

[0381] q는 2 내지 10의 정수이고;

[0382]  은 X에 대한 부착 지점이고;

[0383]  은 항-CD33 항체 또는 그의 항원-결합 부분에 대한 부착 지점이다.

[0384] III.B. 항-CD33 항체

[0385] 본 개시내용은 항-CD33 항체 또는 그의 항원-결합 부분에 접합된 신규분해제를 제공한다.

[0386] CD33은 골수성 및 림프성 세포 둘 다에서 발현되는 막형단 수용체이다. 이는 시알산에 결합하고, 따라서 시알산-결합 이뮤노글로불린-유형 렉틴 (SIGLEC) 패밀리의 구성원이다. CD33은 세포-세포 상호작용을 매개하고 면역 세포를 휴지 상태로 유지하는 데 역할을 한다. 결합 시, 단백질의 시토플 부분 상에 존재하는 CD33의 면역 수용체 티로신-기반 억제 모티프 (ITIM)는 인산화되고, SHP 포스파타제와 같은 Src 상동성 2 (SH2) 도메인-함유 단백질에 대한 도킹 부위로서 작용한다. 이는 세포에서 식세포작용을 억제하는 캐스케이드를 생성할 수 있다. 구조적으로, CD33의 세포외 부분은 2개의 이뮤노글로불린 도메인을 함유하고, 세포내 부분은 ITIM을 함유한다. CD33의 동의어는 시알산 결합 Ig-유사 렉틴 3, SIGLEC3, SIGLEC-3, gp67 및 p67을 포함하나 이에 제한되지는 않는다.

[0387] 인간 CD33 및 공지된 이소형에 대한 정규 아미노산 서열을 표 1에 기재한다 (유니프롯(UniProt)KB - P20138; 서열식별번호: 13-18).

[0388] 표 1. 인간 CD33 아미노산 서열

정규 CD33	MPLLLLLLPLWAGALAMPNFWLQVQESVTVQEGLCVLVPCTFFHPIPYDYKNSPVHGYWFRE GAIISRDSPPVATNKLDQEVQEEETQGRFRLGDPNRNCSLSIVDARRRDNGSYFFRMRGSGTK YSYKSPQLSVHVVDLTHRPKILIPGTLEPGHSKNLTCSVSWACEQGTPIIFSWLSAAPTSLGPR RTTHSSVLIITPRPQDHGNTLTCQVKFAGAGVTTERTIQLNVTVYVQNPPTTGIFPGDGSQKQE TRAGVVHGAIGGAGVTALLALCLCLIFFIVKTHRRKAARTAVGRNDTHPTTGSASPKHQKSK LHGPTETSSCSGAAPTVMDEELHYASLNFHGMNPSKDTSTEYSEVRTQ (서열식별번호: 13)
CD33 인간 이소형 2	MPLLLLLLPLWADLTHRPKILIPGTLEPGHSKNLTCSVSWACEQGTPIIFSWLSAAPTSLGPR TTHSSVLIITPRPQDHGNTLTCQVKFAGAGVTTERTIQLNVTVYVQNPPTTGIFPGDGSQKQE RAGVVHGAIGGAGVTALLALCLCLIFFIVKTHRRKAARTAVGRNDTHPTTGSASPKHQKSKL HGPTETSSCSGAAPTVMDEELHYASLNFHGMNPSKDTSTEYSEVRTQ (서열식별번호: 14)
CD33 인간 이소형 3	MPLLLLLLPLWAGALAMPNFWLQVQESVTVQEGLCVLVPCTFFHPIPYDYKNSPVHGYWFRE GAIISRDSPPVATNKLDQEVQEEETQGRFRLGDPNRNCSLSIVDARRRDNGSYFFRMRGSGTK YSYKSPQLSVHVVDLTHRPKILIPGTLEPGHSKNLTCSVSWACEQGTPIIFSWLSAAPTSLGPR RTTHSSVLIITPRPQDHGNTLTCQVKFAGAGVTTERTIQLNVTVYVQNPPTTGIFPGDGSQKQE TRAGVVHGAIGGAGVTALLALCLCLIFFIVKTHRRKAARTAVGRNDTHPTTGSASPVVR(서열 식별번호: 15)
CD33 인간 이소형 x1	MDLGEAATRARPAVISPGVNSCAQKSTSEWKDFRHGVRMSQMALKEALEAASSDMPLLLLLLPL LWAGALAMPNFWLQVQESVTVQEGLCVLVPCTFFHPIPYDYKNSPVHGYWFREGAIISRDS VATNKLDQEVQEEETQGRFRLGDPNRNCSLSIVDARRRDNGSYFFRMRGSGTKSYKSPQLS VHVVDLTHRPKILIPGTLEPGHSKNLTCSVSWACEQGTPIIFSWLSAAPTSLGPRRTTHSSVLI ITPRPQDHGNTLTCQVKFAGAGVTTERTIQLNVTVYVQNPPTTGIFPGDGSQKQETRAGVVHGA IGGAGVTALLALCLCLIFFIVKTHRRKAARTAVGRNDTHPTTGSASPKHQKSKLHGPTETSS CSGAAPTVMDEELHYASLNFHGMNPSKDTSTEYSEVRTQ (서열식별번호: 16)
CD33 인간 이소형 x2	MDLGEAATRARPAVISPGVNSCAQKSTSEWKDFRHGVRMSQMALKEALEAASSDMPLLLLLLPL LWAGALAMPNFWLQVQESVTVQEGLCVLVPCTFFHPIPYDYKNSPVHGYWFREGAIISRDS VATNKLDQEVQEEETQGRFRLGDPNRNCSLSIVDARRRDNGSYFFRMRGSGTKSYKSPQLS VHVVDLTHRPKILIPGTLEPGHSKNLTCSVSWACEQGTPIIFSWLSAAPTSLGPRRTTHSSVLI ITPRPQDHGNTLTCQVKFAGAGVTTERTIQLNVTVYVQNPPTTGIFPGDGSQKQETRAGVVHGA IGGAGVTALLALCLCLIFFIVKTHRRKAARTAVGRNDTHPTTGSASPKHQKSKLHGPTETSS ASLNFHGMNPSKDTSTEYSEVRTQ(서열식별번호: 17)
CD33 인간 이소형 x4	MDLGEAATRARPAVISPGVNSCAQKSTSEWKDFRHGVRMSQMALKEALEAASSDMPLLLLLLPL LWADLTHRPKILIPGTLEPGHSKNLTCSVSWACEQGTPIIFSWLSAAPTSLGPRRTTHSSVLI ITPRPQDHGNTLTCQVKFAGAGVTTERTIQLNVTVYVQNPPTTGIFPGDGSQKQETRAGVVHGA IGGAGVTALLALCLCLIFFIVKTHRRKAARTAVGRNDTHPTTGSASPKHQKSKLHGPTETSS SGAAPTVMDEELHYASLNFHGMNPSKDTSTEYSEVRTQ (서열식별번호: 18)

[0389]

[0390]

CD33은 급성 골수성 백혈병 (AML) 사례의 대략 90%에서 발현되고, 치료 항체의 표적으로서의 유용성이 입증되었다. AML 모세포 상에서의 높은 CD33 발현은 대략 30년 전에 보고되었다. CD33은 AML을 나타내는 환자의 85-90%의 모세포 뿐만 아니라 정상 골수성 전구세포 및 골수구 상에서 검출되었다. CD33은 조혈 세포에 제한되지만, 정상 조혈 줄기 세포에는 부재하여, AML 요법을 위한 이상적인 표적이 된다.

[0391]

본 개시내용의 접합체를 위한 항-CD33 항체는 CD33에 특이적으로 결합할 수 있다. 일부 측면에서, 본원에 기재된 항-CD33 항체는 인간 CD33에 높은 친화도로, 예를 들어 10^{-6} M 이하, 10^{-7} M 이하, 10^{-8} M 이하, 10^{-9} M 이하, 10^{-10} M 이하, 10^{-11} M 이하, 10^{-12} M 이하, 10^{-12} M 내지 10^{-7} M, 10^{-11} M 내지 10^{-7} M, 10^{-10} M 내지 10^{-7} M, 또는 10^{-9} M 내지 10^{-7} M의 K_D 로 결합한다.

[0392]

일부 측면에서, 항-CD33 항체는 중쇄 및 경쇄를 포함하며, 여기서 중쇄는 중쇄 가변 영역 (VH)을 포함하고, 경쇄는 경쇄 가변 영역 (VL)을 포함하고; 여기서 VH는 VH 상보성 결정 영역 (CDR) 1 (VH-CDR1), VH-CDR2, 및 VH-CDR3을 포함하고, VL은 VL-CDR1, VL-CDR2, 및 VL-CDR3을 포함하고; 여기서 VH-CDR3은 서열식별번호: 3에 대해 적어도 약 90%, 적어도 약 95%, 적어도 약 96%, 적어도 약 97%, 적어도 약 98%, 또는 적어도 약 99% 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함한다. 일부 측면에서, 항-CD33 항체는 서열식별번호: 2의 아미노산 서열에 대해 적어도 약 90%, 적어도 약 95%, 적어도 약 96%, 적어도 약 97%, 적어도 약 98%, 또는 적어도 약 99% 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하는 VH-CDR2를 포함한다. 일부 측면에서, 항-CD33 항체는 서열식별번호: 1의 아미노산 서열에 대해 적어도 약 90%, 적어도 약 95%, 적어도 약 96%, 적어도 약 97%, 적어도 약 98%, 또는 적어도 약 99% 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하는 VH-CDR1을 포함한다. 일부 측면에서, 항-CD33 항체는 서열식별번호: 5의 아미노산 서열에 대해 적어도 약 90%, 적어도 약 95%, 적어도 약 96%, 적어도 약 97%, 적어도 약 98%, 또는 적어도 약 99% 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하는 VL-CDR1을 포함한다. 일부 측면에서, 항-CD33 항체는 서열식별번호: 6의 아미노산 서열에 대해 적어도 약 90%, 적어도 약 95%, 적어도 약 96%, 적어도 약 97%, 적어도 약 98%, 또는 적어도 약 99% 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하는 VL-CDR2를 포함한다. 일부 측면에서, 항-CD33 항체는 서열식별번호: 7의 아미노산 서열에 대해 적어도 약 90%, 적어도 약 95%, 적어도 약 96%, 적어도 약 97%, 적어도 약 98%, 또는 적어도 약 99% 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하는 VL-CDR3을 포함한다. 일부 측면에서, CDR은 하기 표 2에 기재된 서열을 포함한다.

[0393] 표 2. CD33AB 및 겐투주맵 CDR 서열 및 가변 영역 서열

VH-CDR1 (서열식별번호: 1)	DSNIH
VH-CDR2 (서열식별번호: 2)	YIYPYNGGTDYNQKFKN
VH-CDR3 (서열식별번호: 3)	GNPWLAY
VH (서열식별번호: 4)	EVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGYTITDSNIHWVRQAPGQSLEWIGYIYPYNGGTDYNQKFKNRATLTVDNPTNTAYMELSSLRSEDTAFYYCVNGNPWLAYWGQGTLVTVSS
VL-CDR1 (서열식별번호: 5)	RASESLDNYGIRFLT
VL-CDR2 (서열식별번호: 6)	AASNQSGS
VL-CDR3 (서열식별번호: 7)	QQTKEVPWS
VL (서열식별번호: 8)	DIQLTQSPSTLSASVGDRVTITCRASESLDNYGIRFLTWFQKPGKAPKLLMYAASNQSGSGVPSRFSGSGSGTEFTLTISLQPDDEFATYYCQQTKEVPWSFGQGTKVEVK

[0394]

[0395]

일부 측면에서, 항-CD33 항체 중쇄 가변 영역은 서열식별번호: 4의 아미노산 서열에 대해 적어도 약 80%, 적어도 약 85%, 적어도 약 90%, 적어도 약 95%, 적어도 약 96%, 적어도 약 97%, 적어도 약 98%, 또는 적어도 약 99% 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함한다. 일부 측면에서, 항-CD33 항체 경쇄 가변 영역은 서열식별번호: 8의 아미노산 서열에 대해 적어도 약 80%, 적어도 약 85%, 적어도 약 90%, 적어도 약 95%, 적어도 약 96%, 적어도 약 97%, 적어도 약 98%, 또는 적어도 약 99% 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함한다.

[0396]

일부 측면에서, 항-CD33 항체는 서열식별번호: 4의 아미노산 서열에 대해 적어도 약 80%, 적어도 약 85%, 적어도 약 90%, 적어도 약 95%, 적어도 약 96%, 적어도 약 97%, 적어도 약 98%, 또는 적어도 약 99% 서열 동일성을 갖는 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역, 및 서열식별번호: 8의 아미노산 서열에 대해 적어도 약 80%, 적어도 약 85%, 적어도 약 90%, 적어도 약 95%, 적어도 약 96%, 적어도 약 97%, 적어도 약 98%, 또는 적어도 약 99% 서열 동일성을 갖는 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역을 포함한다.

[0397]

일부 측면에서, 항-CD33 항체 중쇄는 서열식별번호: 9 또는 서열식별번호: 11에 대해 적어도 약 80%, 적어도 약 85%, 적어도 약 90%, 적어도 약 95%, 적어도 약 96%, 적어도 약 97%, 적어도 약 98%, 또는 적어도 약 99% 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함한다. 일부 측면에서, 항-CD33 항체는 서열식별번호: 10 또는 서열식별번호: 12에 대해 적어도 약 80%, 적어도 약 85%, 적어도 약 90%, 적어도 약 95%, 적어도 약 96%, 적어도 약 97%, 적어도 약 98%, 또는 적어도 약 99% 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하는 경쇄를 포함한다.

[0398] 표 3. 항-CD33 항체 아미노산 서열.

CD33AB 중쇄 (서열식별번호: 9)	EVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGYTITDSNIHWVRQAPGQSLLEWIGYIYPYNGGTDYNNQKFKNRATLTVDNPTNTAYMELSSLRSEDTAFYYCVNGNPWLAYWGQGTLLTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVDSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYASTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFPYSPDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLSPGK
CD33AB 경쇄 (서열식별번호: 10)	DIQLTQSPSTLSASVGDRTITCRASESLDNYGIRFLTWFAQKPGKAPKLLMYAASNQSGSGVPFRFSGSGSGTEFTLTISSLQPDFFATYYCQQTKEVPWWSFGQGTKEVEKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
겔투주맵 중쇄 (서열식별번호: 11)	EVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGYTITDSNIHWVRQAPGQSLLEWIGYIYPYNGGTDYNNQKFKNRATLTVDNPTNTAYMELSSLRSEDTAFYYCVNGNPWLAYWGQGTLLTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEISKYGPCCPAPAEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYSPDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLSLGK
겔투주맵 경쇄 서열식별번호: 12)	DIQLTQSPSTLSASVGDRTITCRASESLDNYGIRFLTWFAQKPGKAPKLLMYAASNQSGSGVPFRFSGSGSGTEFTLTISSLQPDFFATYYCQQTKEVPWWSFGQGTKEVEKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

[0399]

[0400]

일부 측면에서, 항-CD33 항체는 서열식별번호: 9에 대해 적어도 약 80%, 적어도 약 85%, 적어도 약 90%, 적어도 약 95%, 적어도 약 96%, 적어도 약 97%, 적어도 약 98%, 또는 적어도 약 99% 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 및 서열식별번호: 10에 대해 적어도 약 80%, 적어도 약 85%, 적어도 약 90%, 적어도 약 95%, 적어도 약 96%, 적어도 약 97%, 적어도 약 98%, 또는 적어도 약 99% 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하는 경쇄를 포함한다.

[0401]

일부 측면에서, 항-CD33 항체는 서열식별번호: 11에 대해 적어도 약 80%, 적어도 약 85%, 적어도 약 90%, 적어도 약 95%, 적어도 약 96%, 적어도 약 97%, 적어도 약 98%, 또는 적어도 약 99% 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 및 서열식별번호: 12에 대해 적어도 약 80%, 적어도 약 85%, 적어도 약 90%, 적어도 약 95%, 적어도 약 96%, 적어도 약 97%, 적어도 약 98%, 또는 적어도 약 99% 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하는 경쇄를 포함한다.

[0402]

일부 측면에서, 항-CD33 항체는 미국 특허 번호 5,585,089, US 5,693,762에 개시되어 있으며, 이들 각각은 명백하게 본원에 참조로 포함된다.

[0403]

일부 측면에서, 항-CD33 항체는 중쇄 및 경쇄를 포함하며, 여기서 중쇄는 중쇄 가변 영역 (VH)을 포함하고, 경쇄는 경쇄 가변 영역 (VL)을 포함하고; 여기서 VH는 VH 상보성 결정 영역 (CDR) 1 (VH-CDR1), VH-CDR2 및 VH-CDR3을 포함하고, VL은 VL-CDR1, VL-CDR2 및 VL-CDR3을 포함하고; 여기서 VH-CDR3은 서열식별번호: 21에 대해 적어도 약 90%, 적어도 약 95%, 적어도 약 96%, 적어도 약 97%, 적어도 약 98% 또는 적어도 약 99% 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함한다. 일부 측면에서, 항-CD33 항체는 서열식별번호: 20의 아미노산 서열에 대해 적어도 약 90%, 적어도 약 95%, 적어도 약 96%, 적어도 약 97%, 적어도 약 98%, 또는 적어도 약 99% 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하는 VH-CDR2를 포함한다. 일부 측면에서, 항-CD33 항체는 서열식별번호: 19의 아미노산 서열에 대해 적어도 약 90%, 적어도 약 95%, 적어도 약 96%, 적어도 약 97%, 적어도 약 98%, 또는 적어도 약 99% 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하는 VH-CDR1을 포함한다. 일부 측면에서, 항-CD33 항체는 서열식별번호: 22의 아미노산 서열에 대해 적어도 약 90%, 적어도 약 95%, 적어도 약 96%, 적어도 약 97%, 적어도 약 98%, 또는 적어도 약 99% 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하는 VL-CDR1을 포함한다. 일부 측면에서, 항-CD33 항체는 서열식별번호: 23의 아미노산 서열에 대해 적어도 약 90%, 적어도 약 95%, 적어도 약 96%, 적어도 약 97%, 적어도 약 98%, 또는 적어도 약 99% 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하는 VL-CDR2를 포함한다. 일부 측면에서, 항-CD33 항체는 서열식별번호: 24의 아미노산 서열에 대해 적어도 약 90%, 적어도 약 95%, 적어도 약 96%, 적어도 약 97%, 적어도 약 98%, 또는 적어도 약 99% 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하는 VL-CDR3을 포함한다. 일부 측면에서, CDR은 하기 표 4에 기재된 서열을 포함한다.

[0404] 표 4. huMy9-6 및 AB1 CDR 서열 및 가변 영역 서열

VH-CDR1 (서열식별번호: 19)	SYIIH
VH-CDR2 (서열식별번호: 20)	VIYPGNDDISYNQKFQG
VH-CDR3 (서열식별번호: 21)	EVRLRYFDV
VH (서열식별번호: 27)	QVQLQQPGAIEVVKPGASVKMSCKASGYTFTSYIIHWIKQTPGQGLEWVGVIYPGNDDISYNQKFQKATLTADKSSTAYMQLSSLTSEDSAVYYCAREVRLRYFDVWGQGTITVTVSS
VL-CDR1 (서열식별번호: 22)	KSSQSVFFSSSQKNYLA
VL-CDR2 (서열식별번호: 23)	WASTRES
VL-CDR3 (서열식별번호: 24)	HQYLSSRT
VL (서열식별번호: 28)	EIVLTQSPGSLAVSPGERVTMSCKSSQSVFFSSSQKNYLAWYQQIPGQS PRLLIYWASTRESGVPDRFTGSGSGTDFLTISVQPEDLAIIYCHQYLS SRTFGQGTKLEIK

[0405]

[0406]

일부 측면에서, 항-CD33 항체 중쇄 가변 영역은 서열식별번호: 27의 아미노산 서열에 대해 적어도 약 80%, 적어도 약 85%, 적어도 약 90%, 적어도 약 95%, 적어도 약 96%, 적어도 약 97%, 적어도 약 98%, 또는 적어도 약 99% 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함한다. 일부 측면에서, 항-CD33 항체 경쇄 가변 영역은 서열식별번호: 28의 아미노산 서열에 대해 적어도 약 80%, 적어도 약 85%, 적어도 약 90%, 적어도 약 95%, 적어도 약 96%, 적어도 약 97%, 적어도 약 98%, 또는 적어도 약 99% 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함한다.

[0407]

일부 측면에서, 항-CD33 항체는 서열식별번호: 27의 아미노산 서열에 대해 적어도 약 80%, 적어도 약 85%, 적어도 약 90%, 적어도 약 95%, 적어도 약 96%, 적어도 약 97%, 적어도 약 98%, 또는 적어도 약 99% 서열 동일성을 갖는 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역, 및 서열식별번호: 28의 아미노산 서열에 대해 적어도 약 80%, 적어도 약 85%, 적어도 약 90%, 적어도 약 95%, 적어도 약 96%, 적어도 약 97%, 적어도 약 98%, 또는 적어도 약 99% 서열 동일성을 갖는 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역을 포함한다.

[0408]

일부 측면에서, 항-CD33 항체 중쇄는 서열식별번호: 25에 대해 적어도 약 80%, 적어도 약 85%, 적어도 약 90%, 적어도 약 95%, 적어도 약 96%, 적어도 약 97%, 적어도 약 98%, 또는 적어도 약 99% 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함한다. 일부 측면에서, 항-CD33 항체는 26에 대해 적어도 약 80%, 적어도 약 85%, 적어도 약 90%, 적어도 약 95%, 적어도 약 96%, 적어도 약 97%, 적어도 약 98%, 또는 적어도 약 99% 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하는 경쇄를 포함한다.

[0409]

표 5. huMy9-6-IgG4-S228P ("AB1") 항-CD33 항체 아미노산 서열.

중쇄 (서열식별번호: 25)	QVQLQQPGAIEVVKPGASVKMSCKASGYTFTSYIIHWIKQTPGQGLEWVGVIYPGNDDISYNQKFQKATLTADKSSTAYMQLSSLTSEDSAVYYCAREVRLRYFDVWGQGTITVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGKTYTCNVDPKPSN TKVDKRVERSKYGPCCPAPAEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHAEALHNHYTQKSLSLGLK
경쇄 (서열식별번호: 26)	EIVLTQSPGSLAVSPGERVTMSCKSSQSVFFSSSQKNYLAWYQQIPGQSPRLLIYWASTRESGVPDRFTGSGSGTDFLTISVQPEDLAIIYCHQYLSRTFGQGT KLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSSTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVT KSFNRGEC

[0410]

[0411]

일부 측면에서, 항-CD33 항체는 서열식별번호: 25에 대해 적어도 약 80%, 적어도 약 85%, 적어도 약 90%, 적어도 약 95%, 적어도 약 96%, 적어도 약 97%, 적어도 약 98%, 또는 적어도 약 99% 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함한다.

도 약 95%, 적어도 약 96%, 적어도 약 97%, 적어도 약 98%, 또는 적어도 약 99% 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 및 서열식별번호: 26에 대해 적어도 약 80%, 적어도 약 85%, 적어도 약 90%, 적어도 약 95%, 적어도 약 96%, 적어도 약 97%, 적어도 약 98%, 또는 적어도 약 99% 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하는 경쇄를 포함한다. 용어 "CD33AB"는 서열식별번호: 25에 제시된 바와 같은 중쇄 및 서열식별번호: 26에 제시된 바와 같은 경쇄를 포함한다.

[0412] 항-CD33 항체는 변형된, 즉 공유 부착이 항체가 그의 항원 결합 면역특이성을 보유하도록 하는 한 임의의 유형의 분자의 공유 부착에 의해 변형된 유사체 및 유도체를 포함한다. 예를 들어, 그러나 비제한적으로, 항체의 유도체 및 유사체는, 예를 들어 글리코실화, 아세틸화, PEG화, 인산화, 아마이드화, 공지된 보호기/차단기에 의한 유도체화, 단백질분해적 절단, 세포 항체 단위 또는 다른 단백질에 대한 연결 등에 의해 추가로 변형된 것을 포함한다. 임의의 수많은 화학적 변형은 특이적 화학적 절단, 아세틸화, 포르밀화, 튜니카마이신의 존재 하의 대사 합성 등을 포함하나 이에 제한되지는 않는 공지된 기술에 의해 수행될 수 있다. 추가로, 유사체 또는 유도체는 1개 이상의 비천연 아미노산을 함유할 수 있다.

[0413] 신규분해제 접합체 내의 항-CD33 항체는 Fc 수용체와 상호작용하는 아미노산 잔기에 변형 (예를 들어, 치환, 결실 또는 부가)을 갖는 항체를 포함할 수 있다. 특히, 항체는 항-Fc 도메인과 FcRn 수용체 사이의 상호작용에 관여하는 것으로 확인된 아미노산 잔기에서의 변형을 갖는 항체를 포함한다. 암 세포 항원에 대해 면역특이적인 항체는, 예를 들어 제넨테크 (캘리포니아주 샌프란시스코)로부터 상업적으로 입수할 수 있거나, 또는 관련 기술분야의 통상의 기술자에게 공지된 임의의 방법, 예컨대 예를 들어 화학적 합성 또는 재조합 발현 기술에 의해 생산할 수 있다. 암 세포 항원에 대해 면역특이적인 항체를 코딩하는 뉴클레오티드 서열은, 예를 들어 진뱅크(GenBank) 데이터베이스 또는 그와 유사한 데이터베이스, 문헌 공개로부터, 또는 상용 클로닝 및 서열분석에 의해 획득될 수 있다.

[0414] 특정 측면에서, 신규분해제 접합체의 항체는 모노클로날 항체, 예를 들어 무린 모노클로날 항체, 키메라 항체, 또는 인간화 항체일 수 있다. 일부 측면에서, 항체는 항체 단편, 예를 들어 Fab 단편일 수 있다.

[0415] IV. 조성물 및 사용 방법

[0416] 본원에 기재된 접합체 및/또는 화합물은 제약상 또는 제약상 허용되는 염의 형태일 수 있다. 일부 측면에서, 이러한 염은 무기 또는 유기 산 또는 염기로부터 유래된다.

[0417] 적합한 산 부가염의 예는 아세트레이트, 아디페이트, 알기네이트, 아스파르테이트, 벤조에이트, 벤젠 술포네이트, 비술페이트, 부티레이트, 시트레이트, 캄포레이트, 캄포르 술포네이트, 시클로헥탄프로피오네이트, 디글루코네이트, 도데실술페이트, 에탄술포네이트, 푸마레이트, 루코헵타노에이트, 글리세로포스페이트, 헤미술페이트, 헵타노에이트, 헥사노에이트, 히드로클로라이드, 히드로브로마이드, 히드로아이오다이드, 2-히드록시에탄술포네이트, 락테이트, 말레에이트, 메탄술포네이트, 2-나프탈렌술포네이트, 니코티네이트, 옥살레이트, 과모에이트, 펙티네이트, 퍼술페이트, 3-페닐-프로피오네이트, 피크레이트, 피발레이트, 프로피오네이트, 숙시네이트, 타르트레이트, 티오시아네이트, 토실레이트 및 운데카노에이트를 포함한다.

[0418] 적합한 염기 부가염의 예는 암모늄 염; 알칼리 금속 염, 예컨대 나트륨 및 칼륨 염; 알칼리 토금속 염, 예컨대 칼슘 및 마그네슘 염; 유기 염기와 염, 예컨대 디시클로헥실아민 염, N-메틸-D-글루카민; 및 아미노산, 예컨대 아르기닌, 리신과의 염 등을 포함한다.

[0419] 예를 들어, 베르게(Berge)는 하기 FDA-승인된 상업적으로 상업적으로 입수가 가능한 염을 열거한다: 음이온 아세트레이트, 베실레이트 (벤젠술포네이트), 벤조에이트, 비카르보네이트, 비타르트레이트, 브로마이드, 칼슘 에데테이트 (에틸렌디아민테트라아세트레이트), 캄실레이트 (캄포르술포네이트), 카르보네이트, 클로라이드, 시트레이트, 디히드로클로라이드, 에데테이트 (에틸렌디아민테트라아세트레이트), 에디실레이트 (1,2-에탄디술포네이트), 에스톨레이트 (라우릴 술페이트), 에실레이트 (에탄술포네이트), 푸마레이트, 글루셉테이트 (글루코헵토네이트), 글루코네이트, 글루타메이트, 글리콜릴아르사닐레이트 (글리콜아미도페닐아르소네이트), 헥실레조르시네이트, 히드라바민 (N,N'-디(테히드로아비에틸)에틸렌디아민), 히드로브로마이드, 히드로클로라이드, 히드록시나프토에이트, 아이오다이드, 이세티오네이트 (2-히드록시에탄술포네이트), 락테이트, 락토비오네이트, 말레이트, 말레에이트, 만델레이트, 메실레이트 (메탄술포네이트), 메틸브로마이드, 메틸니트레이트, 메틸술페이트, 뮤케이트, 나프실레이트 (2-나프탈렌술포네이트), 니트레이트, 과모에이트 (엠보네이트), 판토테네이트, 포스페이트/디포스페이트, 폴리갈락투로네이트, 살리실레이트, 스테아레이트, 서브아세테이트, 숙시네이트, 술페이트, 탄네이트, 타르트레이트, 테오클레이트 (8-클로로테오필리네이트) 및 트리에티오다이드; 유기 양이온 벤자틴

(N,N'-디벤질에틸렌디아민), 클로로프로카인, 콜린, 디에탄올아민, 에틸렌디아민, 메글루민 (N-메틸글루카민) 및 프로카인; 및 금속성 양이온 알루미늄, 칼슘, 리튬, 마그네슘, 칼륨, 나트륨 및 아연.

[0420] 베르제는 추가로 하기 비-FDA-승인된 (미국 외) 상업적으로 상업적으로 입수가 가능한 염을 열거한다: 음이온 아디페이트, 알기네이트, 아미노살리실레이트, 안히드로메틸렌시트레이트, 아레콜린, 아스파르테이트, 비스페이트, 부틸브로마이드, 캄포레이트, 디글루코네이트, 디히드로브로마이드, 디숙시네이트, 글리세로포스페이트, 헤미셀페이트, 히드로플루오라이드, 히드로아이오다이드, 메틸렌비스(살리실레이트), 나파디실레이트 (1,5-나프탈렌디술포네이트), 옥살레이트, 펙티네이트, 퍼슬페이트, 페닐에틸바르비투레이트, 피크레이트, 프로피오네이트, 티오시아네이트, 토실레이트 및 운테카노에이트; 유기 양이온 베네타민 (N-벤질페네틸아민), 클레미졸 (1-p-클로로벤질-2-피롤리딘-1'-일메틸벤즈이미다졸), 디에틸아민, 피페라진 및 트로메타민 (트리스(히드록시메틸)아미노메탄); 및 금속성 양이온 바륨 및 비스무트.

[0421] 본원에 기재된 신규분해제 접합체를 포함하는 제약 조성물은 또한 투여 방식에 따라 상이할 수 있는 적합한 담체, 부형제 및 보조제를 포함할 수 있다.

[0422] 일부 측면에서, 제약 조성물은 적합한 비경구 투여 형태로서 제제화될 수 있다. 상기 제제는 관련 기술분야에 공지된 다양한 방법에 의해 제조될 수 있다. 제약 조성물은 혈류 내로, 근육 내로, 또는 기관 내로 직접 투여될 수 있다. 비경구 투여에 적합한 수단은 정맥내, 동맥내, 복강내, 척수강내, 뇌실내, 요도내, 흉골내, 두개내, 근육내 및 피하를 포함한다. 비경구 투여에 적합한 장치는 바늘 시린지, 바늘-무함유 시린지 및 주입 기구를 포함한다.

[0423] 비경구 조성물은 전형적으로 부형제, 예컨대 염, 탄수화물 및 완충제를 함유할 수 있는 수용액이다. 그러나, 조성물은 또한 멸균 비-수용액으로 또는 멸균 발열원-무함유 물과 같은 적합한 비히클과 함께 사용되는 건조 형태로서 제제화될 수 있다.

[0424] 멸균 조건 하에, 예를 들어 동결건조에 의한 비경구 조성물의 제조는 관련 기술분야의 통상의 기술자에게 널리 공지된 표준 기술을 사용하여 용이하게 달성될 수 있다.

[0425] 비경구 투여용 조성물은 즉시 및/또는 변형 방출되도록 제제화될 수 있다. 변형 방출 제제는 지연-, 지속-, 펄스-, 제어-, 표적화, 및 프로그래밍 방출을 포함한다. 따라서, 조성물은 활성제의 변형 방출을 제공하는 이식된 데포로서 투여하기 위한 고체, 반고체 또는 요변성 액체로서 제제화될 수 있다.

[0426] 비경구 제제는 비경구 투여 형태에 사용되는 다른 적합한 제약상 허용되는 부형제, 예컨대 비제한적으로 보존제와 혼합될 수 있다.

[0427] 또 다른 측면에서, 제약 조성물은 적합한 경구 투여 형태, 예컨대 정제, 캡슐, 분말, 펠릿, 현탁액, 용액, 에멀전 등으로서 제제화될 수 있다. 다른 적합한 담체, 예컨대 봉해제, 희석제, 킬레이트화제, 결합제, 활택제, 윤활제, 충전제, 별킹제, 부착방지제 등이 존재할 수 있다.

[0428] 경구 투여 제제는 또한 다른 적합한 제약 부형제, 예컨대 감미제, 비히클/습윤제, 착색제, 향미제, 보존제, 점도 증진제/증점제 등을 함유할 수 있다.

[0429] 본원에 기재된 신규분해제 또는 신규분해제 접합체는 다양한 암을 치료하는 데 사용될 수 있다. 본 개시내용의 특정 접합체는 효능 발현, 약동학 (예를 들어, 흡수, 분포, 대사, 배출), 용해도 (예를 들어, 수용해도), 다른 의약과의 상호작용 (예를 들어, 약물-대사 효소 억제 작용), 안전성 (예를 들어, 급성 독성, 만성 독성, 유전적 독성, 생식 독성, 심장독성, 발암성, 중추 독성) 및/또는 안정성 (예를 들어, 화학적 안정성, 효소에 대한 안정성)의 관점에서 우월할 수 있고, 의약으로서 유용할 수 있다.

[0430] 본 개시내용의 신규분해제 또는 신규분해제 접합체는 의약, 예컨대 질환, 예를 들어 하기 암:

[0431] -예를 들어, 결장직장암 (예를 들어, 결장직장암, 직장암, 항문암, 가족성 결장직장암, 유전성 비폴립증 결장직장암, 위장 기질 종양), 폐암 (예를 들어, 비소세포 폐암, 소세포 폐암, 악성 중피종), 중피종, 췌장암 (예를 들어, 췌장관 암종, 췌장 내분비 종양), 인두암, 후두암, 식도암, 위(stomach/gastric)암 (예를 들어, 유두상 선암종, 점액성 선암종, 선편평상피 암종), 십이지장암, 소장암, 유방암 (예를 들어, 침습성 관 암종, 비-침습성 관 암종, 염증성 유방암), 난소암 (예를 들어, 난소 상피암, 생식선외 배세포 종양, 난소 배세포 종양, 난소 저-악성 잠재적 종양), 고환 종양, 전립선암 (예를 들어, 호르몬-의존성 전립선암, 비-호르몬 의존성 전립선암, 거세-저항성 전립선암), 간암 (예를 들어, 간세포성암, 원발성 간암, 간외 담관암), 갑상선암 (예를 들어, 수질성 갑상선 암종), 신암 (예를 들어, 신세포암 (예를 들어, 투명 세포 신세포암), 신우 및 요관의 이행 세포암),

자궁암 (예를 들어, 자궁경부암, 자궁체암, 자궁 육종), 임신성 용모막암종, 뇌 종양 (예를 들어, 수모세포종, 신경교종, 송과체 성상세포 종양, 모양세포 성상세포종, 미만성 성상세포종, 역형성 성상세포종, 뇌하수체 선종), 망막모세포종, 피부암 (예를 들어, 기저세포종, 악성 흑색종), 육종 (예를 들어, 횡문근육종, 평활근육종, 연부 조직 육종, 방주 세포 육종), 악성 골 종양, 방광암, 혈액학적/혈액암 (예를 들어, 다발성 골수종, 백혈병 (예를 들어, 급성 골수성 백혈병), 악성 림프종, 호지킨병, 만성 골수증식성 질환), 원인불명 원발성 암의 예방 또는 치료를 위한 작용제; 암 성장 억제제; 암 전이 억제제; 아포토시스 촉진제; 전암성 병변의 치료를 위한 작용제 (예를 들어, 골수이형성 증후군) 등으로서 사용될 수 있다.

[0432] 특정 측면에서, 본 개시내용의 신규분해제 또는 신규분해제 접합체는 유방암, 위암, 난소암, 자궁암, 폐암, 췌장암, 간암, 림프종 또는 혈액암을 위한 의약으로서 사용될 수 있다.

[0433] 또한, 본 개시내용의 신규분해제 또는 신규분해제 접합체는 비-약물 요법과 동시에 사용될 수 있다. 정확하게는, 접합체는 비-약물 요법, 예컨대 (1) 수술, (2) 안지오텐신 II 등을 사용하는 고혈압 화학요법, (3) 유전자 요법, (4) 열요법, (5) 동결요법, (6) 레이저 소작 및 (7) 방사선요법과 조합될 수 있다.

[0434] 예를 들어, 상기 언급된 수술 등 전 또는 후에 본 개시내용의 신규분해제 또는 신규분해제 접합체를 사용함으로써, 저항성의 출현의 예방, 무진행 생존의 연장, 무질환 생존의 연장, 암 전이 또는 재발의 억제, 삶의 연장 등과 같은 효과가 제공될 수 있다.

[0435] 또한, 본 개시내용의 신규분해제 또는 신규분해제 접합체를 사용한 치료를 지지 요법과 조합하는 것이 가능하다: (i) 다양한 감염성 질환과의 합병증을 위한 항생제 (예를 들어, β -락탐 유형, 예컨대 판스포린 등, 마크롤리드 유형, 예컨대 클라리트로마이신 등)의 투여, (ii) 영양실조의 개선을 위한 고칼로리 수혈, 아미노산 제제 또는 일반적 비타민 제제의 투여, (iii) 통증 완화를 위한 모르핀의 투여, (iv) 부작용, 예컨대 오심, 구토, 식욕부진, 설사, 백혈구감소증, 혈소판감소증, 감소된 헤모글로빈 농도, 탈모, 간병증, 신장병증, DIC, 열 등의 개선을 위한 제약 작용제의 투여 및 (v) 암의 다중 약물 내성을 억제하기 위한 제약 작용제의 투여 등.

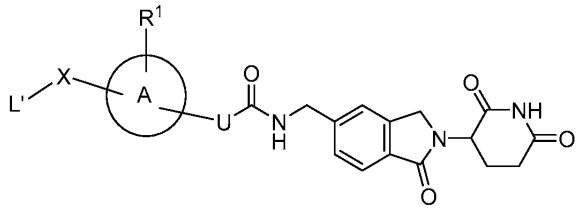
[0436] 일부 측면에서, 본 개시내용의 신규분해제 또는 신규분해제 접합체는 표준 관리 요법, 예를 들어 1종 이상의 치료제 (예를 들어, 항암제 및/또는 면역조절제)와 조합하여 사용될 수 있다. 따라서, 특정 측면에서, 본원에 개시된 종양을 치료하는 방법은 본 개시내용의 신규분해제 또는 신규분해제 접합체를 1종 이상의 추가의 치료제와 조합하여 투여하는 것을 포함한다. 일부 측면에서, 본 개시내용의 신규분해제 또는 신규분해제 접합체는 면역 경로의 다중 요소가 표적화될 수 있도록 1종 이상의 항암제와 조합하여 사용될 수 있다. 일부 측면에서, 항암제는 면역 체크포인트 억제제를 포함한다 (즉, 특정한 면역 체크포인트 경로를 통한 신호전달을 차단함). 본 방법에 사용될 수 있는 면역 체크포인트 억제제의 비제한적 예는 CTLA-4 길항제 (예를 들어, 항-CTLA-4 항체), PD-1 길항제 (예를 들어, 항-PD-1 항체, 항-PD-L1 항체), TIM-3 길항제 (예를 들어, 항-TIM-3 항체), 또는 그의 조합을 포함한다. 조합 치료의 포괄적이고 비제한적 목록은 본 출원의 조합 치료 섹션에 상세히 개시되어 있다.

[0437] 일부 측면에서, 본 개시내용의 신규분해제 또는 신규분해제 접합체는 추가의 치료제의 투여 전 또는 후에 대상체에게 투여된다. 다른 측면에서, 본 개시내용의 신규분해제 또는 신규분해제 접합체는 추가의 치료제와 공동으로 대상체에게 투여된다. 특정 측면에서, 본 개시내용의 신규분해제 또는 신규분해제 접합체 및 추가의 치료제는 제약상 허용되는 담체 중의 단일 조성물로서 공동으로 투여될 수 있다. 다른 측면에서, 본 개시내용의 신규분해제 또는 신규분해제 접합체 및 추가의 치료제는 별개의 조성물로서 공동으로 투여된다.

[0438] 일부 측면에서, 본 개시내용의 신규분해제 또는 신규분해제 접합체로 치료될 수 있는 대상체는 비인간 동물, 예컨대 래트 또는 마우스이다. 일부 측면에서, 치료될 수 있는 대상체는 인간이다.

[0439] V. 신규분해제 및 조성물의 제조 방법

[0440] 본 개시내용은 항-CD33 항체 또는 그의 항원-결합 부분을 화학식 (I-1)의 화합물 또는 그의 제약상 허용되는 염과 반응시키는 것을 포함하는, 신규분해제 접합체를 제조하는 방법을 제공한다:



(I-1)

여기서:

A는 페닐 또는 C₄-C₁₀시클로알킬 고리이고;

R¹은 독립적으로 수소 및 할로로부터 선택되고;

U는 NH 및 CF₂로부터 선택되고;

X는 -NR²-, =C(CH₃)-, -Q-(CH₂)_n-, 및 -Q(CH₂)_mQ'(CH₂)_n-로부터 선택되고; 여기서

Q 및 Q'는 각각 독립적으로 O, S, 또는 NR²이고;

R²는 수소 또는 C₁-C₆알킬이고;

n은 1 내지 6의 정수이고;

m은 2 내지 6의 정수이고;

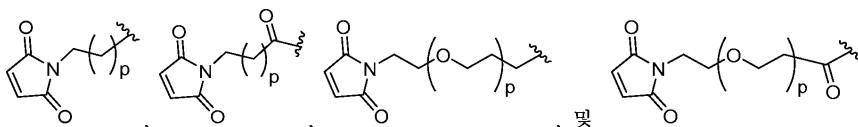
여기서 각각의 기의 좌측은 L'에 부착되고, 우측은 A에 부착되며;

단, X가 NH 또는 -Q-(CH₂)_n-인 경우, R¹은 할로이고;

L'는 항-CD33 항체 또는 그의 항원-결합 부분에 접합되는 절단가능한 또는 비-절단가능한 링커 전구체이다.

본원에 기재된 바와 같이, 링커 전구체는 항-CD33 항체 또는 그의 항원-결합 부분에 연결되는 이중이관능성 기를 함유한다.

일부 측면에서, L'는 비-절단가능한 링커 전구체이다. 일부 측면에서, L'는 하기로 이루어진 군으로부터 선택된다:

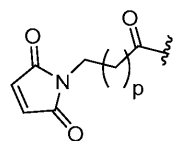


여기서:

p는 1 내지 10의 정수이고;

~은 X에 대한 부착 지점이다.

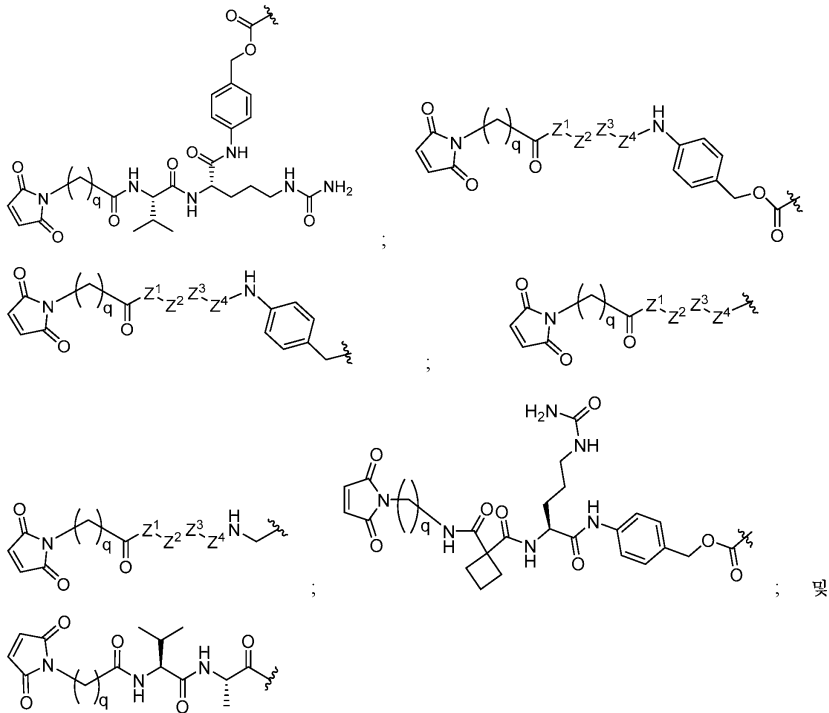
일부 측면에서, L'는 하기이다:



일부 측면에서, p는 5이다.

[0463] 특정 측면에서, L'는 절단가능한 링커 전구체이다.

[0464] 일부 측면에서, 링커 전구체는 프로테아제에 의해 절단가능하다. 일부 측면에서, 링커 전구체는 하기로 이루어진 군으로부터 선택된다:



[0465]

[0466] 여기서:

[0467] q는 2 내지 10의 정수이고;

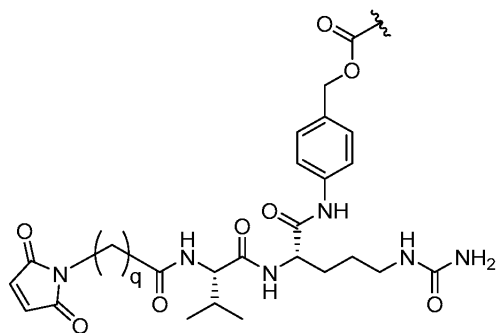
[0468] Z^1 , Z^2 , Z^3 , 및 Z^4 는 각각 독립적으로 부재하거나 또는 L- 또는 D-배위의 자연-발생 아미노산 잔기이며, 단, Z^1 , Z^2 , Z^3 , 및 Z^4 중 적어도 2개는 아미노산 잔기이고;

[0469] X 은 X에 대한 부착 지점이다.

[0470] 일부 측면에서, Z^1 , Z^2 , Z^3 , 및 Z^4 는 부재하거나 또는 L-발린, D-발린, L-시트룰린, D-시트룰린, L-알라닌, D-알라닌, L-글루타민, D-글루타민, L-글루탐산, D-글루탐산, L-아스파르트산, D-아스파르트산, L-아스파라긴, D-아스파라긴, L-페닐알라닌, D-페닐알라닌, L-리신, D-리신, 및 글리신으로 이루어진 군으로부터 독립적으로 선택되며, 단, Z^1 , Z^2 , Z^3 , 및 Z^4 중 적어도 2개는 아미노산 잔기이다.

[0471] 일부 측면에서, Z^1 은 부재하거나 또는 글리신이고; Z^2 는 부재하거나 또는 L-글루타민, D-글루타민, L-글루탐산, D-글루탐산, L-아스파르트산, D-아스파르트산, L-알라닌, D-알라닌 및 글리신으로 이루어진 군으로부터 선택되고; Z^3 은 L-발린, D-발린, L-알라닌, D-알라닌, L-페닐알라닌, D-페닐알라닌 및 글리신으로 이루어진 군으로부터 선택되고; Z^4 는 L-알라닌, D-알라닌, L-시트룰린, D-시트룰린, L-아스파라긴, D-아스파라긴, L-리신, D-리신, L-페닐알라닌, D-페닐알라닌 및 글리신으로 이루어진 군으로부터 선택된다.

[0472] 일부 측면에서, L'는 하기이다:



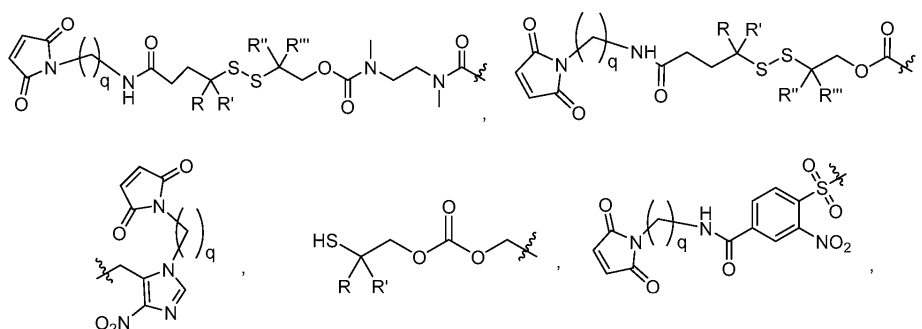
[0473]

[0474]

일부 측면에서, q는 5이다.

[0475]

일부 측면에서, L'는 생체환원성 링커 전구체이다. 일부 측면에서, 생체환원성 링커 전구체는 하기로 이루어진 군으로부터 선택된다:



[0476]

[0477]

여기서:

[0478]

q는 2 내지 10의 정수이고;

[0479]

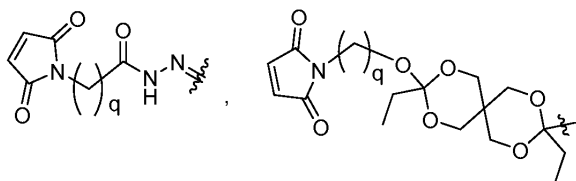
R, R', R'' 및 R'''는 각각 독립적으로 수소, C₁-C₆알콕시C₁-C₆알킬, (C₁-C₆)₂NC₁-C₆알킬 및 C₁-C₆알킬로부터 선택되거나, 또는 2개의 같은자리 R 기는 이들이 부착되어 있는 탄소 원자와 함께 시클로부틸 또는 시클로프로필 고리를 형성할 수 있고;

[0480]

은 X에 대한 부착 지점이다.

[0481]

특정 측면에서, L'는 산 절단가능한 링커 전구체이다. 일부 측면에서, L'는 하기로 이루어진 군으로부터 선택된다:



[0482]

[0483]

여기서:

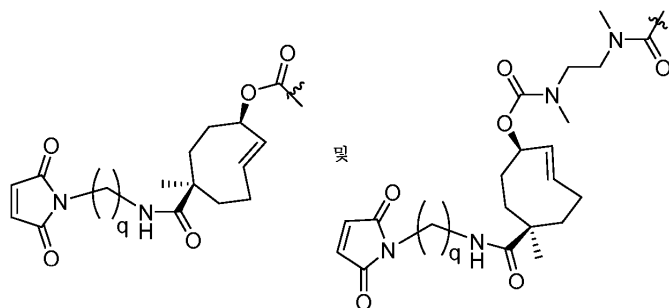
[0484]

q는 2 내지 10의 정수이고;

[0485]

은 X에 대한 부착 지점이다.

[0486] 특정 측면에서, L'는 클릭-투-릴리즈 링커 전구체이다. 일부 측면에서, L'는 하기로부터 선택된다:



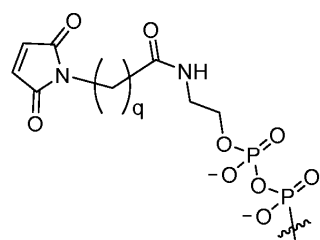
[0487]

[0488] 여기서:

[0489] q는 2 내지 10의 정수이고;

[0490] $\sim$ 은 X에 대한 부착 지점이다.

[0491] 특정 측면에서, L'는 피로포스파타제 절단가능한 링커 전구체이다. 일부 측면에서, L'는 하기이다:



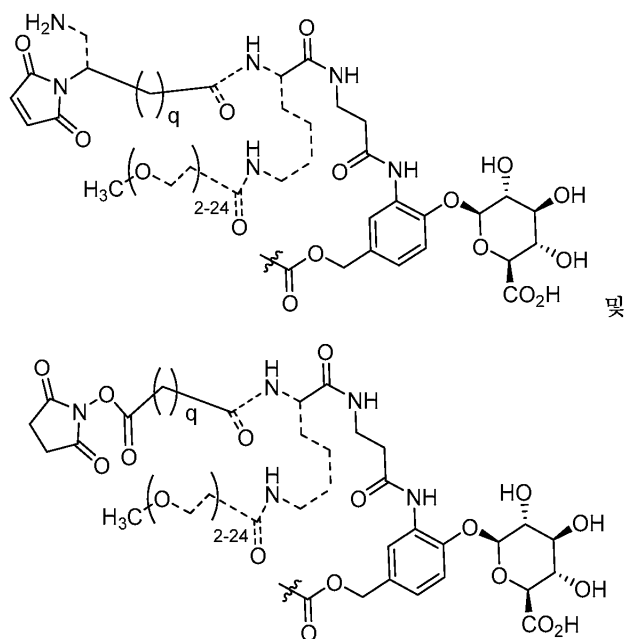
[0492]

[0493] 여기서:

[0494] q는 2 내지 10의 정수이고;

[0495] $\sim$ 은 X에 대한 부착 지점이다.

[0496] 특정 측면에서, L'는 베타-글루코로니다제 절단가능한 링커 전구체이다. 일부 측면에서, L'는 하기로부터 선택된다:



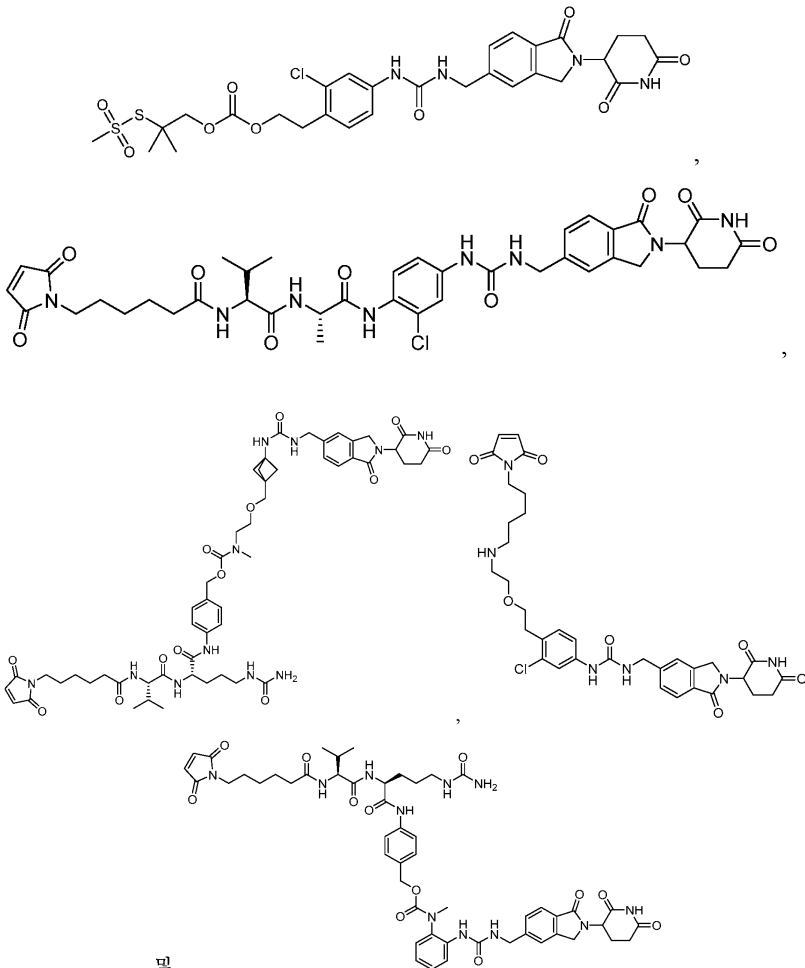
[0497]

[0498] 여기서:

- [0499] q는 2 내지 10의 정수이고;
 [0500] ----는 부재하거나 또는 결합이고;

[0501] 은 X에 대한 부착 지점이다.

[0502] 일부 측면에서, 화학식 (I-1)의 화합물은 하기로부터 선택된다:



[0503]

[0504]

[0505] 일부 측면에서, 항-CD33 항체 또는 그의 항원-결합 부분은 화학식 (I-1)의 화합물과 반응하기 전에 사전-처리된다. 특정 측면에서, 화학식 (I-1)의 화합물은 항-CD33 항체 또는 그의 항원-결합 부분과 반응한다. 측면에서, 항-CD33 항체 또는 그의 항원-결합 부분은 화학식 (I-1)의 화합물과의 반응 전에 쇠간 디설피드를 환원시키도록 전처리될 수 있다.

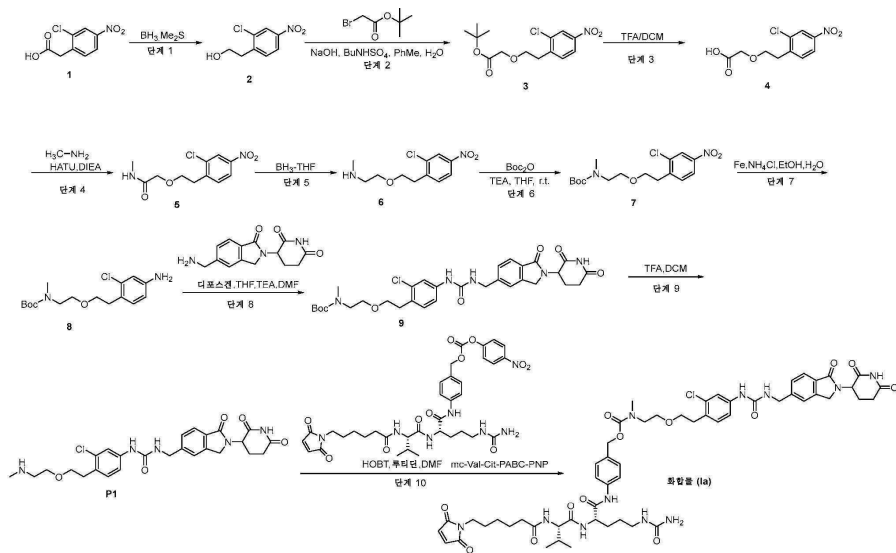
[0506] 실시예

[0507] 일반적 합성 방법 및 중간체

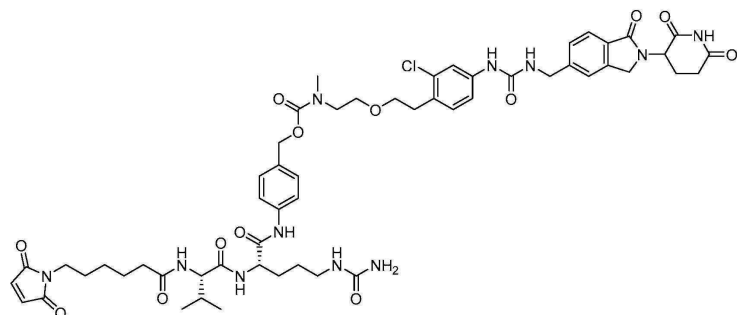
[0508] 본 개시내용의 화합물은 본 개시내용 및 관련 기술분야의 지식에 비추어, 및/또는 하기 제시된 반응식 및 합성 실시예를 참조하여 관련 기술분야의 통상의 기술자에 의해 제조될 수 있다. 예시적인 합성 경로는 하기 반응식 및 실시예에 제시된다. 하기 반응식 및 실시예에 나타난 가변기 (예를 들어 "R" 기)는 본 출원의 다른 곳에 나타난 것들로부터 독립적으로 해석되어야 하는 것으로 이해되어야 한다. 관련 기술분야의 통상의 기술자는 하기 제시된 반응식 및 실시예가 본원에 기재된 화합물의 제조를 예시하는 방법을 용이하게 이해할 것이다.

[0509] 반응식에 사용된 약어는 일반적으로 관련 기술분야에 사용된 관례를 따른다. 명세서 및 실시예에 사용된 화학적 약어는 하기와 같이 정의된다: "THF"는 테트라히드로푸란; "DMF"는 N,N-디메틸포름아미드; "Me"는 메틸; "Bu"는 부틸; "FA"는 포름산; "PE"는 석유 에테르; "MeOH"는 메탄올; "EtOH"는 에탄올; "DCM"은 디클로르메탄; "BOC" 또는 "Boc"; "TFA"는 트리플루오로아세트산; "DMSO"는 디메틸설폭시드; "EtOAc"는 에틸 아세테이트; "OAc"는 아세테이트; "dppf"는 1,1'-비스(디페닐포스피노)페로센; "dba"는 디벤질리덴아세톤; "CDI"는 1,1'-카

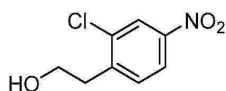
트브닐디이미다졸; "TBAF"는 테트라부틸암모늄 플루오라이드; "TBSCl"은 tert-부틸디메틸실릴 클로라이드; "Et₂O"는 디에틸 에테르; "ACN"은 아세토니트릴; "h"는 시간; "min"은 분; "rt"는 실온 또는 체류 시간 (문맥이 지시할 것임); "aq."는 수성; "sat."는 포화; "min"은 분; "HOBt"는 1-히드록시벤조트리아졸 수화물; "HATU"는 1-[비스(디메틸아미노)메틸렌]-1H-1,2,3-트리아졸로[4,5-b]피리딘 3-옥시드 헥사플루오로포스페이트 또는 N-[(디메틸아미노)-1H-1,2,3-트리아졸로-[4,5-b]피리딘-1-일메틸렌]-N-메틸메탄아미늄 헥사플루오로포스페이트 N-옥시드; "DIEA" 및 "iPrNEt₂"는 디이소프로필에틸아민; "Et₃N" 및 "TEA"는 트리에틸 아민.



반응식 1: 화합물 (Ia)의 제조

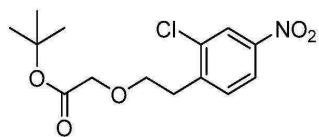


실시예 1: 화합물 (Ia)의 합성



단계 1: 화합물 2의 합성

THF (75.00 mL) 중 2-클로로-4-니트로페닐)아세트산 (화합물 1, 5.00 g, 23.19 mmol, 1.00 당량)의 교반 용액에 질소 분위기 하에 0℃에서 BH₃-Me₂S (THF 중 10M) (5.80 mL, 58.0 mmol, 2.50 당량)를 적가하였다. 생성된 혼합물을 질소 분위기 하에 70℃에서 2시간 동안 교반하였다. 혼합물을 실온으로 냉각시켰다. 생성된 혼합물을 감압 하에 농축시켰다. 잔류물을 실리카 겔 칼럼 크로마토그래피 (PE:EtOAc = 1:1)에 의해 정제하여 2-(2-클로로-4-니트로페닐)에탄올 (3 g, 64%)을 황색 고체로서 수득하였다. ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 8.26 (d, J = 4.0 Hz, 1H), 8.10-8.05 (m, 1H), 7.50 (d, J = 8.0 Hz, 1H), 3.99-3.91 (m, 2H), 3.16-3.09 (m, 2H).



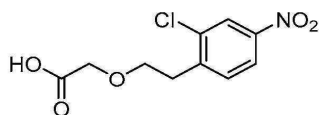
[0517]

[0518]

단계 2: 화합물 3의 합성

[0519]

톨루엔 (150.00 mL) 중 2-(2-클로로-4-니트로페닐)에탄올 (화합물 2, 5.00 g, 24.800 mmol, 1.00 당량) 및 tert-부틸 2-브로모아세테이트 (29.0 mL, 148.28 mmol, 8.00 당량)의 교반 용액에 Bu₄NHSO₄ (6.74 g, 19.84 mmol, 0.80 당량)를 첨가하였다. 상기 혼합물에 NaOH (H₂O 중 5M) (500.00 mL)를 0℃에서 40분에 걸쳐 적가하였다. 생성된 혼합물을 25℃에서 추가로 2시간 동안 교반하였다. 생성된 혼합물을 EtOAc (3 x 500 mL)로 추출하였다. 합한 유기 층을 염수 (400 mL)로 세척하고, 무수 Na₂SO₄ 상에서 건조시켰다. 여과한 후, 여과물을 감압 하에 농축시켰다. 잔류물을 실리카 겔 칼럼 크로마토그래피 (PE:EtOAc = 4:1)에 의해 정제하여 tert-부틸 2-[2-(2-클로로-4-니트로페닐)에톡시]아세테이트 (8 g, 65%)를 황색 오일로서 수득하였다. ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 8.23 (d, J = 4.0 Hz, 1H), 8.10-8.04 (m, 1H), 7.60 (d, J = 8.0 Hz, 1H), 4.09 (s, 2H), 3.83-3.80 (m, 2H), 3.17-3.14(m, 2H), 1.45(s, 9H).



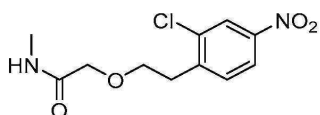
[0520]

[0521]

단계 3: 화합물 4의 합성

[0522]

DCM (80.00 mL) 중 tert-부틸 2-[2-(2-클로로-4-니트로페닐)에톡시]아세테이트 (화합물 3, 8.00 g, 16.14 mmol, 1.00 당량, 63.7%)의 교반 용액에 TFA (16.00 mL)를 실온에서 적가하였다. 생성된 혼합물을 실온에서 1시간 동안 교반하였다. 생성된 혼합물을 진공 하에 농축시켰다. 생성된 혼합물을 물 (500 mL)로 희석하였다. 혼합물을 EtOAc (3 x 500 mL)로 추출하였다. 합한 유기 층을 염수 (200 mL)로 세척하고, 무수 Na₂SO₄ 상에서 건조시켰다. 여과한 후, 여과물을 감압 하에 농축시켰다. 이에 따라 [2-(2-클로로-4-니트로페닐)에톡시]아세트산 (6.5 g, 조 물질)을 황색 오일로서 수득하였다. LCMS (ESI): 517 (2M-H)-



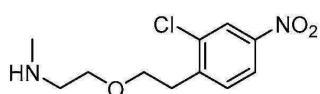
[0523]

[0524]

단계 4: 화합물 5의 합성

[0525]

DMF (65.00 mL) 중 [2-(2-클로로-4-니트로페닐)에톡시]아세트산 (화합물 4, 6.30 g, 21.84 mmol, 1.00 당량, 90%) 및 HATU (12.46 g, 32.76 mmol, 1.50 당량)의 교반 용액에 CH₃NH₂.HCl (1.77 g, 26.21 mmol, 1.20 당량) 및 DIEA (15.20 g, 117.8 mmol, 4.00 당량)를 실온에서 적가하였다. 생성된 혼합물을 실온에서 2시간 동안 교반하였다. 생성된 혼합물을 물로 희석하였다. 생성된 혼합물을 EtOAc (2 x 100 mL)로 추출하였다. 합한 유기 층을 염수 (50 mL)로 세척하고, 무수 Na₂SO₄ 상에서 건조시켰다. 여과한 후, 여과물을 감압 하에 농축시켰다. 잔류물을 실리카 겔 칼럼 크로마토그래피 (DCM:MeOH = 10:1)에 의해 정제하여 2-[2-(2-클로로-4-니트로페닐)에톡시]-N-메틸아세트아미드 (10 g, 순도:50%, 수율:84%)를 황색 오일로서 수득하였다. LCMS (ESI): 273.28 (M+H)⁺



[0526]

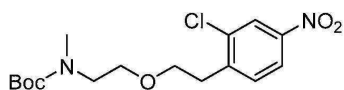
[0527]

단계 5: 화합물 6의 합성

[0528]

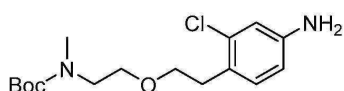
THF (35.00 mL) 중 2-[2-(2-클로로-4-니트로페닐)에톡시]-N-메틸아세트아미드 (화합물 5, 3.3 g, 12.10 mmol, 1.00 당량)의 교반 용액에 질소 분위기 하에 실온에서 BH₃-THF (THF 중 1M) (12.10 mL, 12.10 mmol, 1.00

당량)를 적가하였다. 생성된 혼합물을 질소 분위기 하에 70℃에서 2시간 동안 교반하였다. 반응물을 MeOH로 켄칭하였다. 잔류물을 1N HCl을 사용하여 pH 6으로 산성화시켰다. 생성된 혼합물을 EtOAc (20 mL)로 추출하였다. 수성 상을 포화 NaHCO₃ (포화, 수성)를 사용하여 pH 8로 염기성화시켰다. 생성된 혼합물을 EtOAc (3 x 100 mL)로 추출하고, 염수 (50 mL)로 세척하고, 무수 Na₂SO₄ 상에서 건조시켰다. 여과한 후, 여과물을 감압 하에 농축시켰다. 이에 따라 [2-[2-(2-클로로-4-니트로페닐)에톡시]에틸](메틸)아민 (2.5 g, 80%)을 황색 오일로서 수득하였다. LCMS (ESI): 259.26 (M+H)⁺



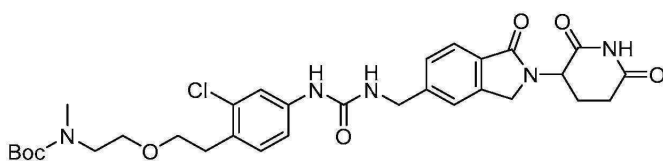
단계 6. 화합물 7의 합성

THF (40 mL) 중 [2-[2-(2-클로로-4-니트로페닐)에톡시]에틸](메틸)아민 (화합물 6, 2.50 g, 9.69 mmol, 1.00 당량) 및 Boc₂O (2.53 g, 11.6 mmol, 1.20 당량)의 교반 용액에 TEA (1.17 g, 11.6 mmol, 1.20 당량)를 25℃에서 적가하였다. 혼합물을 25℃에서 2시간 동안 교반하였다. 생성된 혼합물을 진공 하에 농축시켰다. 잔류물을 실리카 겔 칼럼 크로마토그래피 (DCM:MeOH = 5:1)에 의해 정제하여 tert-부틸 N-[2-[2-(2-클로로-4-니트로페닐)에톡시]에틸]-N-메틸카르바메이트 (1.70 g, 50%)를 황색 오일로서 수득하였다. LCMS (ESI): 359.36 (M+H)⁺



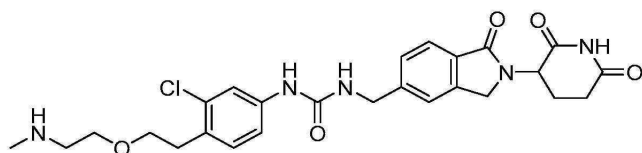
단계 7: 화합물 8의 합성

EtOH (85 mL) 및 H₂O (17 mL) 중 tert-부틸 N-[2-[2-(2-클로로-4-니트로페닐)에톡시]에틸]-N-메틸카르바메이트 (화합물 7, 1.70 g, 4.74 mmol, 1.00 당량) 및 NH₄Cl (750 mg, 14.2 mmol, 3.00 당량)의 교반 용액에 25℃에서 Fe (1.3g, 23.7 mmol, 5.00 당량)를 첨가하였다. 혼합물을 80℃에서 2시간 동안 교반하였다. 혼합물을 실온으로 냉각시켰다. 생성된 혼합물을 여과하고, 필터 케이크를 EtOH (3 x 50 mL)로 세척하였다. 여과물을 감압 하에 농축시켰다. 잔류물을 실리카 겔 칼럼 크로마토그래피 (PE:EtOAc = 4:1)에 의해 정제하여 tert-부틸 N-[2-[2-(4-아미노-2-클로로페닐)에톡시]에틸]-N-메틸카르바메이트 (900 mg, 58%)를 황색 오일로서 수득하였다. LCMS (ESI): 329.33 (M+H)⁺



단계 8: 화합물 9의 합성

THF (10 mL) 중 tert-부틸 N-[2-[2-(4-아미노-2-클로로페닐)에톡시]에틸]-N-메틸카르바메이트 (화합물 8, 500 mg, 1.52 mmol, 1.00 당량)의 교반 용액에 디포스겐 (601 mg, 3.04 mmol, 2.00 당량)을 25℃에서 적가하였다. 혼합물을 25℃에서 1시간 동안 교반하였다. 생성된 혼합물을 진공 하에 농축시키고, DMF (5 mL) 중에 재용해시켰다. DMF (20 mL) 중 3-[5-(아미노메틸)-1-옥소-3H-이소인돌-2-일]피페리딘-2,6-디온 (INT1, 하기 기재된 바와 같이 제조됨, 499 mg, 1.82 mmol, 1.20 당량) 및 TEA (1.56 g, 15.45 mmol, 10.00 당량)의 교반 혼합물에 상기 언급된 용액을 25℃에서 적가하였다. 혼합물을 25℃에서 1시간 동안 교반하였다. 생성된 혼합물을 빙수 40 mL로 희석하였다. 생성된 혼합물을 EtOAc (3 x 40 mL)로 추출하였다. 합한 유기 층을 염수 (5x40 mL)로 세척하고, 무수 Na₂SO₄ 상에서 건조시켰다. 여과한 후, 여과물을 감압 하에 농축시켰다. 잔류물을 실리카 겔 칼럼 크로마토그래피 (DCM: MeOH = 10:1)에 의해 정제하여 tert-부틸 (2-(2-클로로-4-(3-((2-(2,6-디옥소피페리딘-3-일)-1-옥소이소인돌린-5-일)메틸)우레이도)페네톡시)에틸)(메틸)카르바메이트 (670 mg, 70%)를 백색 고체로서 수득하였다. LCMS: (ESI): 628.63 (M+H)⁺



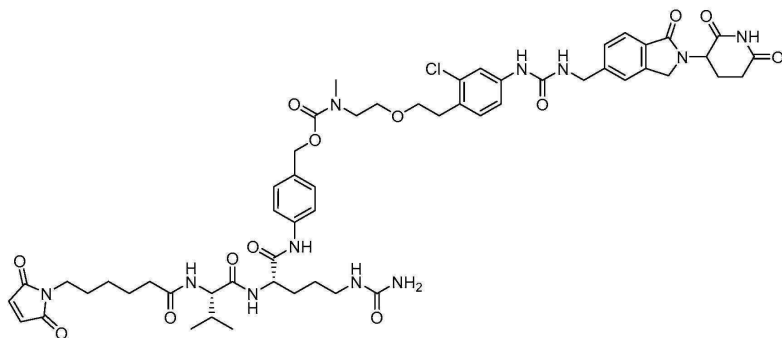
[0538]

[0539]

단계 9: 신규분해제 P1의 합성

[0540]

DCM (10 mL) 중 tert-부틸 N-[2-(2-[2-클로로-4-([2-(2,6-디옥소피페리딘-3-일)-1-옥소-3H-이소인돌-5-일]메틸)카르바모일)아미노]페닐]에톡시)에틸]-N-메틸카르바메이트 (화합물 9, 670 mg, 1.07 mmol, 1 당량)의 교반 용액에 TFA (2.5 mL)를 0°C에서 적가하였다. 혼합물을 25°C에서 1시간 동안 교반하였다. 생성된 혼합물을 진공 하에 농축시켰다. 조 생성물을 정제용 HPLC에 의해 하기 조건: 칼럼, 선파이어(SunFire) C18 OBD 정제용 칼럼, 100 μ m, 19x250 mm; 이동상, 물 (0.05% TFA) 및 ACN (30분 내에 5% 상 B에서 60%까지); 검출기, UV 220nm 을 사용하여 정제하였다. 수집된 분획을 동결건조시켜 1-(3-클로로-4-[2-[2-(메틸아미노)에톡시]에틸]페닐)-3-[[2-(2,6-디옥소피페리딘-3-일)-1-옥소-3H-이소인돌-5-일]메틸]우레아 (500 mg, 89%)를 백색 고체로서 수득하였다. LCMS (ESI): 528.53 (M+H)⁺. ¹H NMR (400 MHz, 메탄올-d₄) δ 7.77 (d, J = 8.0 Hz, 1H), 7.57-7.53 (m, 2H), 7.49 (d, J = 8.0 Hz, 1H), 7.21 (d, J = 4.0 Hz, 2H), 5.19-5.1 (m, 1H), 4.55-4.41 (m, 4H), 3.75-3.67 (m, 4H), 3.21-3.15 (m, 2H), 3.03-3.96 (m, 2H), 2.96-2.84 (m, 1H), 2.83-2.73 (m, 2H), 2.69 (s, 3H), 2.55-2.42 (m, 1H), 2.21-2.12 (m, 1H).



[0541]

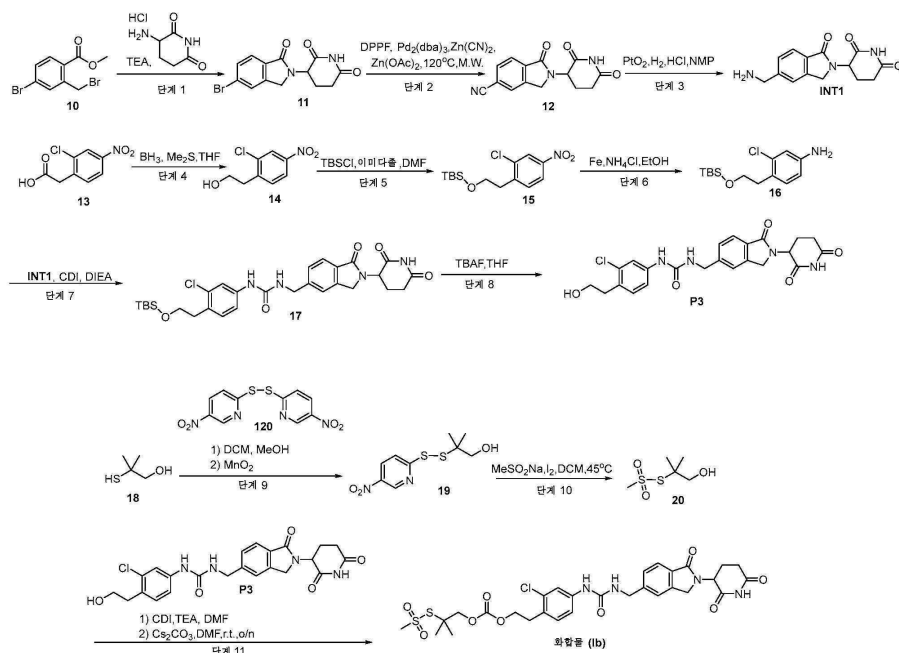
[0542]

단계 10: 화합물 (1a)의 합성

[0543]

DMF (10 mL) 중 1-(3-클로로-4-[2-[2-(메틸아미노)에톡시]에틸]페닐)-3-[[2-(2,6-디옥소피페리딘-3-일)-1-옥소-3H-이소인돌-5-일]메틸]우레아 (신규분해제 P1, 200 mg, 0.38 mmol, 1.00 당량) 및 루티딘 (81 mg, 0.76 mmol, 2.00 당량)의 교반 혼합물에 HOBt (26 mg, 0.19 mmol, 0.50 당량) 및 [4-[(2S)-5-(카르바모일아미노)-2-[(2S)-2-[6-(2,5-디옥소피롤-1-일)헥산아미도]-3-메틸부탄아미도]펜탄아미도]페닐]메틸 4-니트로페닐 카르보네이트 (279 mg, 0.38 mmol, 1.00 당량)를 실온에서 조금씩 첨가하였다. 반응 혼합물을 질소 분위기 하에 40°C에서 12시간 동안 교반하였다. 반응물을 실온으로 냉각시킨 후, 반응물을 물 (30 mL)로 켄칭하였다. 생성된 혼합물을 DCM (3 x 30 mL)으로 추출하였다. 합한 유기 층을 물 (2 x 30 mL), 염수 (30 mL)로 세척하고, Na₂SO₄ 상에서 건조시켰다. 여과한 후, 여과물을 진공 하에 농축 건조시켰다. 잔류물을 역상 칼럼 (C18, 이동상 A: 물 중 0.1% FA, B: ACN)에 의해 정제하였다. 수집된 분획을 진공 하에 농축 건조시켰다. 조 생성물 (60 mg)을 정제용 HPLC에 의해 하기 조건 (칼럼: 엑스셀렉트 CSH OBD 칼럼 30x150mm 5 μ m, n; 이동상 A: 물(0.1%FA), 이동상 B: ACN; 유량: 60 mL/분; 구배: 7분 내에 33 B에서 50 B; 220 nm; RT: 5.27분)을 사용하여 정제하였다. 수집된 분획을 동결건조시켜 [4-[(2S)-5-(카르바모일아미노)-2-[(2S)-2-[6-(2,5-디옥소피롤-1-일)헥산아미도]-3-메틸부탄아미도]펜탄아미도]페닐]메틸 N-[2-(2-[2-클로로-4-([2-(2,6-디옥소피페리딘-3-일)-1-옥소-3H-이소인돌-5-일]메틸)카르바모일)아미노]페닐]에톡시)에틸]-N-메틸카르바메이트 (23.8 mg, 5%)를 백색 고체로서 수득하였다. LCMS (ESI): 1126.11 (M+H)⁺. ¹H NMR (400 MHz, DMSO-d₆) δ 10.99(s, 1H), 10.00(s, 1H), 8.88(s, 1H), 8.12-8.08(m, 1H), 7.85-7.81(m, 2H), 7.70-7.67(m, 2H), 7.60-7.58(m, 1H), 7.51(s, 1H), 7.47-7.44(m, 1H), 7.28-7.25(m, 2H), 7.18-7.12(m, 2H), 7.00(s, 2H), 6.90(br s, 1H), 5.97-5.95(m, 1H), 5.42(s, 2H), 5.12-5.05(m, 1H), 4.98(s, 2H), 4.42-4.32(m, 4H), 4.18-4.15(m, 1H), 3.56-3.40(m, 4H), 3.37-3.36(m, 3H), 3.05-2.90(m, 3H), 2.89-2.85(m, 5H), 2.72-2.55(m, 2H), 2.40-2.33(m, 2H), 2.25-2.15(m, 2H), 2.00-1.87(m, 2H),

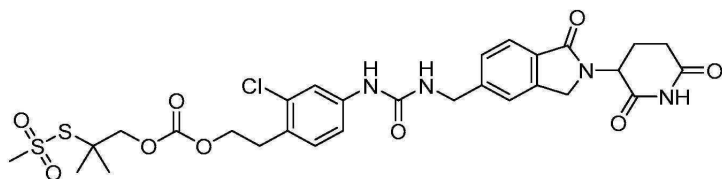
1.74-1.57(m, 2H), 1.50-1.42(m, 5H), 1.22-1.10(m, 3H), 0.85-0.80(m, 6H).



[0544]

[0545]

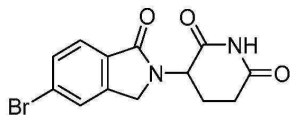
반응식 2: 화합물 (Ib)의 제조



[0546]

[0547]

실시예 2: 화합물 (Ib)의 합성



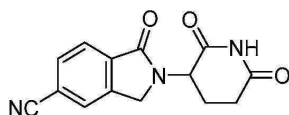
[0548]

[0549]

단계 1: 화합물 11의 합성

[0550]

DMF (80 mL) 중 메틸 4-브로모-2-(브로모메틸)벤조에이트 (화합물 10, 20.0 g, 64.8 mmol, 1.00 당량) 및 3-아미노피페리딘-2,6-디온 히드록로라이드 (10.64 g, 83.0 mmol, 1.28 당량)의 교반 혼합물에 질소 분위기 하에 25°C에서 TEA (22.4mL, 162.2 mmol, 2.50 당량)를 적가하였다. 혼합물을 25°C에서 16시간 동안 교반하였다. 이에 이어서 25°C에서 H₂O (60 mL), AcOH (23 mL) 및 Et₂O (60 mL)를 순차적으로 첨가하였다. 혼합물을 25°C에서 2시간 동안 교반하였다. 침전된 고체를 여과에 의해 수집하고, Et₂O (60 mL)로 세척하였다. 3-(5-브로모-1-옥소-3H-이소인돌-2-일)피페리딘-2,6-디온 (9.0 g, 42%)을 담청색 고체로서 수득하였다. LCMS (ESI): 323.32 (M+H)⁺



[0551]

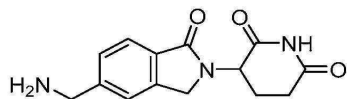
[0552]

단계 2: 화합물 12의 합성

[0553]

DMF (8 mL) 중 3-(5-브로모-1-옥소-3H-이소인돌-2-일)피페리딘-2,6-디온 (화합물 11, 1.00 g, 3.09 mmol, 1.00 당량) 및 dppf (51 mg, 0.093 mmol, 0.03 당량)의 교반 혼합물에 질소 분위기 하에 25°C에서 Zn(OAc)₂ (170 mg, 0.928 mmol, 0.30 당량), Zn(CN)₂ (545 mg, 4.64 mmol, 1.50 당량) 및 Pd₂(dba)₃ (28 mg, 0.031 mmol,

0.01 당량)를 첨가하였다. 최종 반응 혼합물을 마이크로웨이브 방사선으로 120℃에서 2시간 동안 조사하였다. 혼합물을 실온으로 냉각시키고, 여과하였다. 필터 케이크를 MeOH (3x30 mL)로 세척하였다. 여과물을 감압 하에 농축시켰다. 잔류물을 플래쉬 크로마토그래피 (실리카 겔, 80 g, DCM: MeOH=10:1)로 처리하여 목적 생성물 2-(2,6-디옥소피페리딘-3-일)-1-옥소-3H-이소인돌-5-카르보니트릴 (400 mg, 47%)을 갈색 고체로서 수득하였다. LCMS (ESI): 270 (M+H)⁺

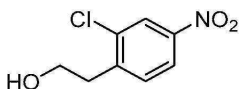


[0554]

단계 3: INT1의 합성

[0555]

MeOH (25 mL) 중 2-(2,6-디옥소피페리딘-3-일)-1-옥소-3H-이소인돌-5-카르보니트릴 (화합물 12, 3.0 g, 11.14 mmol, 1.00 당량) 및 HCl (12M) (3.6 mL)의 교반 혼합물에 25℃에서 PtO₂ (1.25 g, 5.5 mmol, 0.49 당량)를 첨가하였다. 혼합물을 수소 풍선을 사용하여 수소 분위기 하에 실온에서 16시간 동안 수소화시켰다. 생성된 혼합물을 여과하고, 필터 케이크를 MeOH (2 x 30 mL)로 세척하였다. 여과물을 감압 하에 농축시켰다. 생성된 고체를 DCM: MeOH (3:1) (3x30 mL)로 세척하고, 건조시켰다. 3-[5-(아미노메틸)-1-옥소-3H-이소인돌-2-일]피페리딘-2,6-디온 (2.5 g, 80%)을 회색 고체로서 수득하였다. LCMS (ESI): 274 (M+H)⁺. ¹H NMR (400 MHz, DMSO-d₆) δ 11.02 (s, 1H), 8.15 (s, 1H), 7.98 (d, J=8.4 Hz, 1H), 7.89(d, J=8.4 Hz, 1H), 5.16-5.11 (m, 1H), 4.52 (d, J=17.2Hz, 1H), 4.40 (d, J=17.2Hz, 1H), 2.96-2.90 (m, 1H), 2.60-2.54 (m, 1H), 2.43-2.34 (m, 1H), 2.06-1.96 (m, 1H)

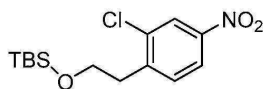


[0557]

단계 4: 화합물 14의 합성

[0558]

THF (75 mL) 중 (2-클로로-4-니트로페닐)아세트산 (화합물 13, 5.00 g, 22.50 mmol, 1.00 당량)의 교반 용액에 질소 분위기 하에 0℃에서 BH₃-Me₂S (THF 중 10M) (5.60 mL, 56 mmol, 2.50 당량)를 적가하였다. 혼합물을 70℃에서 2시간 동안 교반하였다. 생성된 혼합물을 진공 하에 농축시켰다. 잔류물을 실리카 겔 칼럼 상에 적용하고, PE / EtOAc (5:1)로 용리시켜 2-(2-클로로-4-니트로페닐)에탄올 (4.44 g, 88%)을 황색 고체로서 수득하였다. ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 8.26 (d, J = 4.0 Hz, 1H), 8.10-8.05 (m, 1H), 7.50 (d, J = 8.0 Hz, 1H), 3.99-3.91 (m, 2H), 3.16-3.09 (m, 2H)

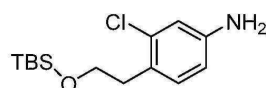


[0560]

단계 5: 화합물 15의 합성

[0561]

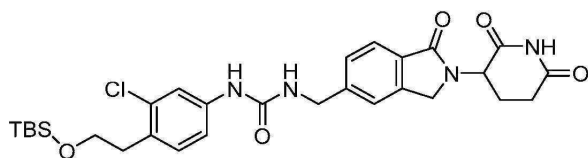
DMF (50.00 mL) 중 2-(2-클로로-4-니트로페닐)에탄올 (화합물 14, 4.44 g, 22.02 mmol, 1.00 당량) 및 이미다졸 (4.50g, 66.06 mmol, 3.00 당량)의 교반 혼합물에 25℃에서 TBSCl (6.97 g, 46.25 mmol, 2.10 당량)을 첨가하였다. 혼합물을 25℃에서 16시간 동안 교반하였다. 생성된 혼합물을 물 (100 mL)로 희석하였다. 생성된 혼합물을 EtOAc (3 x 100mL)로 추출하였다. 합한 유기 층을 염수 (3x100 mL)로 세척하고, 무수 Na₂SO₄ 상에서 건조시켰다. 여과한 후, 여과물을 감압 하에 농축시켰다. 잔류물을 실리카 겔 칼럼 상에 적용하고, PE/ EtOAc (10:1)로 용리시켜 tert-부틸[2-(2-클로로-4-니트로페닐)에톡시]디메틸실란 (6.6 g, 90%)을 무색 오일로서 수득하였다. ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 8.24(s, 1H), 8.06-8.04 (m, 1H), 7.46 (d, J = 8.4 Hz, 1H), 3.89-3.86 (m, 2H), 3.06-0.04 (m, 2H), 0.85(s, 9H), 0.04(s, 6H).



[0563]

[0564] 단계 6: 화합물 16의 합성

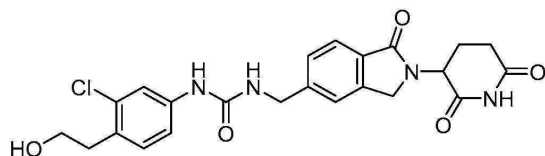
[0565] EtOH (110 mL) / 물 (55 mL) 중 tert-부틸[2-(2-클로로-4-니트로페닐)에톡시]디메틸실란 (화합물 15, 5.70 g, 18.05 mmol, 1.00 당량) 및 Fe (10.08 g, 180.45 mmol, 10.00 당량)의 혼합물에 NH₄Cl (9.65 g, 180.45 mmol, 10 당량)을 첨가하였다. 혼합물을 80℃에서 2시간 동안 교반하였다. 혼합물을 실온으로 냉각시켰다. 생성된 혼합물을 여과하고, 필터 케이크를 EtOH (3x50 mL)로 세척하였다. 여과물을 감압 하에 농축시켰다. 잔류물을 물 (100 mL)로 희석하고, EtOAc (50 mLx3)로 추출하였다. 합한 유기 층을 무수 황산나트륨 상에서 건조시키고, 진공 하에 증발 건조시켜 4-[2-[(tert-부틸디메틸실릴)옥시]에틸]-3-클로로아닐린(5.2 g, 조 물질)을 연갈색 오일로서 수득하였다. LCMS (ESI): 286.29 (M+H)⁺



[0566]

[0567] 단계 7: 화합물 17의 합성

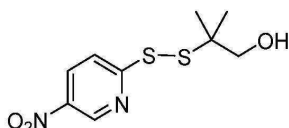
[0568] DMF (3 mL) 중 4-[2-[(tert-부틸디메틸실릴)옥시]에틸]-3-클로로아닐린 (화합물 16, 200.00 mg, 0.70 mmol, 1.00 당량) 및 TEA (141 mg, 1.40 mmol, 2.00 당량)의 용액에 DMF (1 mL) 중 CDI (113 mg, 0.70 mmol, 1.00 당량)를 질소 하에 0℃에서 적가하였다. 생성된 혼합물을 25℃에서 1시간 동안 교반하였다. 이어서 상기 용액 및 TEA (141 mg, 1.40 mmol)를 DMF (2 mL) 중 3-[5-(아미노메틸)-1-옥소-3H-이소인돌-2-일]피페리딘-2,6-디온 (INT1, 192 mg, 0.70 mmol, 1.00 당량)의 용액에 적가하였다. 동일한 반응을 2회 반복하였다. 생성된 혼합물을 25℃에서 1시간 동안 교반하였다. 반응물을 물 (20 mL)로 희석하고, EtOAc (20 mL x3)로 추출하였다. 합한 유기 층을 물, 염수로 세척하고, 무수 황산나트륨 상에서 건조시키고, 진공 하에 증발 건조시켰다. 잔류물을 실리카 겔 칼럼 (DCM:MeOH=10:1)에 의해 정제하여 1-(4-[2-[(tert-부틸디메틸실릴)옥시]에틸]-3-클로로페닐)-3-[[2-(2,6-디옥소피페리딘-3-일)-1-옥소-3H-이소인돌-5-일]메틸]우레아 (170 mg, 21%)를 백색 고체로서 수득하였다. LCMS (ESI): 585.59 (M+H)⁺



[0569]

[0570] 단계 8: 신규분해제 P3의 합성

[0571] THF (2.00 mL) 중 1-(4-[2-[(tert-부틸디메틸실릴)옥시]에틸]-3-클로로페닐)-3-[[2-(2,6-디옥소피페리딘-3-일)-1-옥소-3H-이소인돌-5-일]메틸]우레아 (화합물 17, 170.00 mg, 0.29 mmol, 1.00 당량)의 용액에 0℃에서 TBAF(THF 중 1 N, 0.58 mL, 0.58 mmol, 2.00 당량)를 첨가하였다. 생성된 혼합물을 25℃에서 8시간 동안 교반하였다. 반응물을 정제용- TLC (DCM:MeOH=10:1)에 의해 정제하여 조 1-(3-클로로-4-(2-히드록시에틸)페닐)-3-((2-(2,6-디옥소피페리딘-3-일)-1-옥소이소인돌-5-일)메틸)우레아 147 mg을 백색 고체로서 수득하였다. LCMS (ESI): 471.47 (M+H)⁺

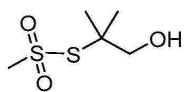


[0572]

[0573] 단계 9: 화합물 19의 합성

[0574] 2-메틸-2-술폰닐프로판-1-올 (화합물 18, 1.4 g, 13.2 mmol, 1.00 당량) 및 5-니트로-2-[(5-니트로피리딘-2-일)디술폰닐]피리딘 (화합물 120, 2.05 g, 6.67 mmol, 0.50 당량)을 디클로로메탄 (3.50 mL) 및 MeOH (3.50 mL)의 용매의 혼합물에 첨가하였다. 생성된 혼합물을 15℃에서 교반하였다. 이어서 이산화황가니즈 (2.29 g, 26.2 mmol, 2 당량)를 조금씩 첨가하였다. 생성된 혼합물을 15℃에서 15분 동안 교반하였다. LCMS 추적은 반응이 완결되었음을 나타내었다. 반응물을 증발 건조시키고, 잔류물을 역 플래쉬

크로마토그래피에 의해 하기 조건: 칼럼, C18 실리카 겔; 이동상, 물 중 ACN (0.1% NH_4HCO_3), 30분 내 10%에서 100% 구배; 검출기, UV 254 nm을 사용하여 정제하였다. 수집된 분획을 진공 하에 농축 건조시켜 2-메틸-2-[(5-니트로피리딘-2-일)디술폰닐]프로판-1-올 (2.2 g, 58%)을 황색 고체로서 수득하였다. LCMS (ESI): 261 ($\text{M}+\text{H}$)⁺.



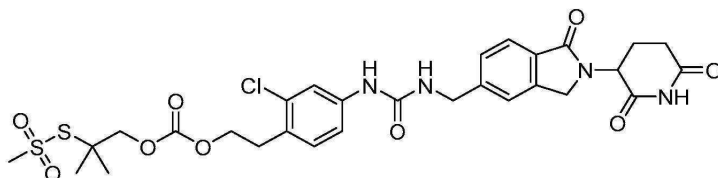
[0575]

[0576]

단계 10: 화합물 20의 합성

[0577]

무수 DCM (30 mL) 중 2-메틸-2-[(5-니트로피리딘-2-일)디술폰닐]프로판-1-올 (화합물 20, 1.0 g, 3.84 mmol, 1.00 당량)의 용액에 MeSO_2Na (1.57 g, 15.4 mmol, 4.00 당량) 및 아이오딘 (1.95 g, 7.68 mmol, 2.00 당량)을 조금씩 첨가하였다. 반응 혼합물을 45°C에서 24시간 동안 교반하였다. 혼합물을 농축시키고, 잔류물을 실리카 겔 상에서 칼럼 크로마토그래피 (TLC: PE:EA=3:1, R_f = 0.60; 석유 에테르 중 0-35% EtOAc)에 의해 정제하여 2-(메탄술폰닐술폰닐)-2-메틸프로판-1-올 (80 mg, 10%)을 황색 오일로서 수득하였다. ^1H NMR (400 MHz, CD_3Cl): δ 3.50(s, 2H), 3.33(s, 3H), 2.16(br s, 1H), 1.47(s, 6H).



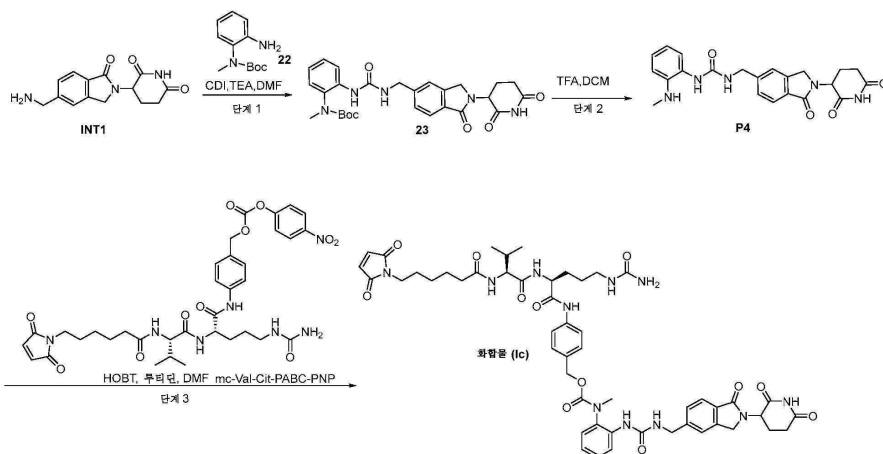
[0578]

[0579]

단계 11: 화합물 (Ib)의 합성

[0580]

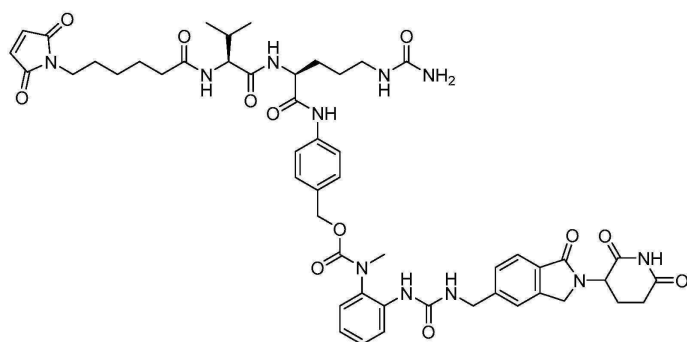
DMF (4 mL) 중 1-[3-클로로-4-(2-히드록시에틸)페닐]-3-[[2-(2,6-디옥소피페리딘-3-일)-1-옥소-3H-이소인돌-5-일]메틸]우레아 (신규분해제 P3, 200.00 mg, 0.42 mmol, 1.00 당량) 및 TEA (129 mg, 1.26 mmol, 3.00 당량)의 용액에 DMF (1 mL) 중 CDI (138 mg, 0.84 mmol, 2.00 당량)의 용액을 첨가하였다. 반응 혼합물을 실온에서 2시간 동안 교반하였다. 반응물을 물 (50 mL)로 희석하고, EtOAc (20 mLx3)로 추출하였다. 합한 유기 층을 물 (20 mLx3), 염수 (20 mL)로 세척하고, 황산나트륨 상에서 건조시키고, 진공 하에 증발 건조시켜 조 생성물 (2-[2-클로로-4-[[[2-(2,6-디옥소피페리딘-3-일)-1-옥소-3H-이소인돌-5-일]메틸]카르바모일]아미노]페닐]에틸 이 미다졸-1-카복실레이트, 200 mg)을 연황색 고체로서 수득하였다. DMF (8 mL) 중 조 생성물 (100.00 mg, 0.18 mmol, 1.00 당량) 및 Cs_2CO_3 (115 mg, 0.35 mmol, 2.00 당량)의 용액에 DMF (2 mL) 중 2-(메탄술폰닐술폰닐)-2-메틸프로판-1-올 (화합물 20, 59 mg, 0.32 mmol, 1.80 당량)을 실온에서 적가하였다. 반응물을 15°C에서 22시간 동안 교반하였다. 반응물을 EtOAc (50 mL) 및 빙냉수 (100 mL)로 희석하였다. 유기 층을 분리하였다. 수상을 EtOAc (30 mLx3)로 추출하였다. 합한 유기 층을 염수 (30 mLx3)로 세척하고, 무수 황산나트륨 상에서 건조시키고, 진공 하에 증발 건조시켜 조 생성물 (150 mg)을 황색 고체로서 수득하였다. 조 생성물을 정제용 HPLC (칼럼: 엑스셀렉트(Xselect) CSH OBD 칼럼 30x150mm 5 μm ; 이동상 A:물 (0.1%FA), 이동상 B:ACN; 유량:60 mL/분; 구배:7분 내에 38 B에서 58 B; 220 nm; RT1:5.12분)에 의해 정제하였다. 수집된 분획을 동결건조시켜 1-[3-클로로-4-[2-[[[2-(메탄술폰닐술폰닐)-2-메틸프로판-1-올]카르보닐]-옥시]에틸]페닐]-3-[[2-(2,6-디옥소피페리딘-3-일)-1-옥소-3H-이소인돌-5-일]메틸]우레아 (15.7 mg, 11%)를 백색 고체로서 수득하였다. LCMS (ESI): 681.68 ($\text{M}+\text{H}$)⁺. ^1H NMR (400 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ 10.99 (s, 1H), 8.86 (s, 1H), 7.70 (d, J = 2.4 Hz, 1H), 7.51 (s, 1H), 7.44 (d, J = 8.0 Hz, 1H), 7.24-7.17 (m, 1H), 6.87-6.84 (m, 1H), 5.76 (s, 2H), 5.13-5.11 (m, 1H), 4.42-4.40 (m, 2H), 4.32-4.28 (m, 4H), 3.54 (s, 3H), 3.00-2.87 (m, 3H), 2.62-2.58 (m, 1H), 2.44-2.34 (m, 1H), 2.01-1.95 (m, 1H), 1.45 (s, 6H).



[0581]

[0582]

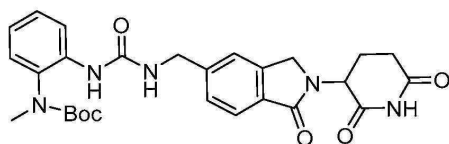
반응식 3: 화합물 (Ic)의 제조



[0583]

[0584]

실시예 3: 화합물 (Ic)의 합성



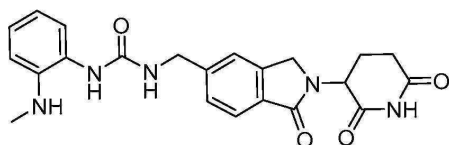
[0585]

[0586]

단계 1: 화합물 23의 합성

[0587]

DMF (20 mL) 중 tert-부틸 (2-아미노페닐)(메틸)카르바메이트 (화합물 22, 300 mg, 1.35 mmol, 1.00 당량)의 교반 용액에 질소 분위기 하에 0℃에서 CDI (218 mg, 1.35 mmol, 1.00 당량) 및 TEA (68 mg, 1.35 mmol, 1.00 당량)를 적가하였다. 혼합물을 0℃에서 2시간 동안 교반하였다. 상기 혼합물에 3-[5-(아미노메틸)-1-옥소-3H-이소인돌-2-일]피페리딘-2,6-디온 (INT1, 368 mg, 1.35 mmol, 1.00 당량)을 조금씩 첨가하였다. 생성된 혼합물을 75℃에서 밤새 교반하였다. 이어서 반응 혼합물을 실온으로 냉각시켰다. 생성된 혼합물을 물 (30 mL)로 켄칭하고, DCM (3 x 30 mL)으로 추출하였다. 합한 유기 층을 염수 (30 mL)로 세척하고, 무수 Na₂SO₄ 상에서 건조시키고, 여과하고, 감압 하에 농축시켰다. 잔류물을 실리카 겔 칼럼 크로마토그래피 (DCM/MeOH =10:1)에 의해 정제하여 tert-부틸 N-[2-([(2-(2,6-디옥소피페리딘-3-일)-1-옥소-3H-이소인돌-5-일]메틸)카르바모일)아미노]페닐]-N-메틸카르바메이트 (300 mg, 42%)를 백색 고체로서 수득하였다. LCMS (ESI): 522 (M+H)⁺



[0588]

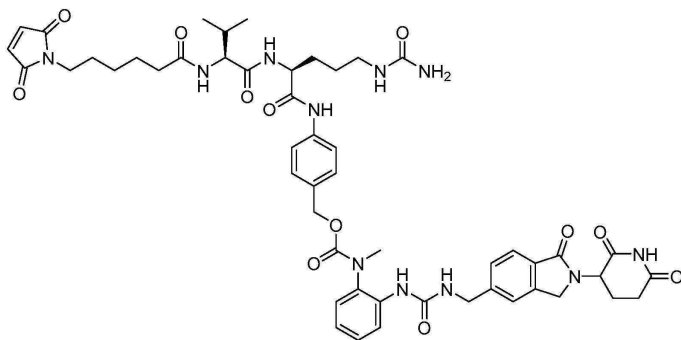
[0589]

단계 2. 신규분해제 P4의 합성

[0590]

DCM (20 mL) 중 tert-부틸 N-[2-([(2-(2,6-디옥소피페리딘-3-일)-1-옥소-3H-이소인돌-5-일]메틸)카르바모일)

아미노]페닐]-N-메틸카르바메이트 (화합물 23, 300 mg, 1.00 당량)의 교반 용액에 0℃에서 TFA (5 mL)를 첨가하였다. 혼합물을 0℃에서 2시간 동안 교반하였다. 생성된 혼합물을 진공 하에 농축시켰다. 조 생성물을 역상에 의해 하기 조건 (C18, 이동상 A: 물 (0.1% FA), 이동상 B: ACN; 유량:60 mL/분)을 사용하여 정제하였다. 수집된 분획을 진공 하에 농축시켜 3-[[2-(2,6-디옥소피페리딘-3-일)-1-옥소-3H-이소인돌-5-일]메틸]-1-[2-(메틸아미노)페닐]우레아 (210 mg, 87%)를 백색 고체로서 수득하였다. LCMS (ESI): 422 (M+H)⁺. ¹H NMR (300 MHz, DMSO-d₆) δ 10.99(s, 1H), 7.69 (d, J = 7.8 Hz, 1H), 7.60(s, 1H), 7.53(s, 1H), 7.45 (d, J = 8.4 Hz, 1H), 7.26-7.24(m, 1H), 6.99-6.93(m, 1H), 6.76-6.72(m, 1H), 6.60-6.55(m, 2H), 5.14-5.08(m, 1H), 5.00-4.85(br s, 1H), 4.48-4.28(m, 4H), 2.92-2.82(m, 1H), 2.70(s, 3H), 2.62-2.57(m, 1H), 2.49-2.41(m, 1H), 2.02-1.95(m, 1H).



[0591]

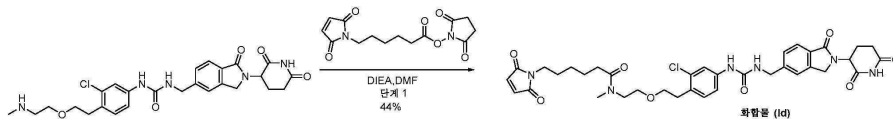
[0592] 단계 3. 화합물 (Ic)의 합성

[0593]

DMF (3.00 mL) 중 3-[[2-(2,6-디옥소피페리딘-3-일)-1-옥소-3H-이소인돌-5-일]메틸]-1-[2-(메틸아미노)페닐]우레아 (P4, 150.00 mg, 0.36 mmol, 1.00 당량), 2,6-루티딘 (76 mg, 0.71 mmol, 2.00 당량) 및 HOBt (96 mg, 0.71 mmol, 2.00 당량)의 교반 혼합물에 질소 분위기 하에 실온에서 [4-[(2S)-5-(카르바모일아미노)-2-[(2S)-2-[6-(2,5-디옥소피롤-1-일)헥산아미도]-3-메틸부탄아미도]펜탄아미도]페닐]메틸 4-니트로페닐 카르보네이트 (394 mg, 0.53 mmol, 1.50 당량)를 첨가하였다. 반응 혼합물을 역 플래쉬 크로마토그래피에 의해 하기 조건: 칼럼, C18 실리카 겔; 이동상, 이동상 A: 물 (0.1%FA), 이동상 B: ACN을 사용하여 정제하여 조 생성물 (60 mg)을 백색 고체로서 수득하였다. 조 생성물 (60 mg)을 정제용 HPLC에 의해 하기 조건 (칼럼: 엑스셀렉트 CSH OBD 칼럼 30x150mm 5um, n; 이동상 A:물 (0.1% FA), 이동상 B:ACN; 유량:60 mL/분; 구배: 7분 내에 24 B에서 44 B; 220 nm; RT1:6.33; RT2:)을 사용하여 정제하였다. 수집된 분획을 동결건조시켜 [4-[(2S)-5-(카르바모일아미노)-2-[(2S)-2-[6-(2,5-디옥소피롤-1-일)헥산아미도]-3-메틸부탄아미도]펜탄아미도]페닐]메틸 N-[2-[[2-(2,6-디옥소피페리딘-3-일)-1-옥소-3H-이소인돌-5-일]메틸]카르바모일]아미노]페닐]-N-메틸카르바메이트 (18.1mg, 5%)를 백색 고체로서 수득하였다. LCMS (ESI): 1020 (M+H)⁺. ¹H NMR (400 MHz, DMSO-d₆) δ 10.99 (s, 1H), 9.96(s, 1H), 8.19-8.06 (m, 3H), 7.79 (d, J = 8.8 Hz, 1H), 7.70 (d, J = 8.0 Hz, 1H), 7.53-7.41 (m, 5H), 7.20-7.05 (m, 4H), 7.00(s, 2H), 6.95-6.90(m, 1H), 5.95(br s, 1H), 5.41(s, 2H), 5.18-4.89(m, 3H), 4.44-4.20(m, 5H), 4.19-4.17(m, 1H), 3.09(s, 3H), 3.07-2.85(m, 3H), 2.22-2.02(m, 2H), 2.00-1.85(m, 2H), 1.71-1.25(m, 10H), 1.20-1.12(m, 3H), 0.84-0.80(m, 6H)

[0594]

반응식 4는 화합물 (Id)를 신규분해제 P1로부터 제조하는 방법을 나타낸다.



[0595]

[0596] 반응식 4: 화합물 (Id)의 제조

[0597]

화합물 (Id)의 합성

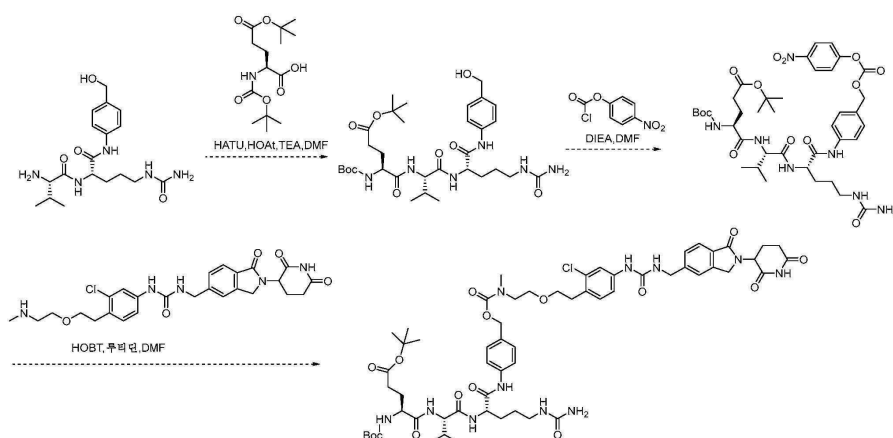
[0598]

DMF (2.00 mL) 중 1-(3-클로로-4-[2-[2-(메틸아미노)에톡시]에틸]페닐)-3-[[2-(2,6-디옥소피페리딘-3-일)-1-옥소-3H-이소인돌-5-일]메틸]우레아 (P1, 40.00 mg, 0.076 mmol, 1.00 당량) 및 2,5-디옥소피롤리딘-1-일 6-(2,5-디옥소피롤-1-일)헥사노에이트 (25.00 mg, 0.081 mmol, 1.07 당량)의 교반 혼합물에 DIEA (20.00 mg,

0.16 mmol, 2.04 당량)를 실온에서 적가하였다. 생성된 혼합물을 질소 분위기 하에 실온에서 3시간 동안 교반하였다. 생성된 혼합물을 물 (30 mL)로 킨칭하고, DCM (3 x 30 mL)으로 추출하였다. 합한 유기 층을 물 (30 mL), 염수 (30 mL)로 세척하고, Na₂SO₄ 상에서 건조시켰다. 여과한 후, 여과물을 진공 하에 농축 건조시켰다. 잔류물을 하기 조건에 의해 정제하였다: 칼럼: 선파이어 C18 OBD 정제용 칼럼, 100 μ m, 19 mm x 250 mm; 이동상 A: 물 (0.05% TFA), 이동상 B: ACN; 유량: 25 mL/분; 구배: 8.5분 내 25 B에서 55 B; 220 nm; RT: 8분; 수집된 분획을 동결건조시켜 N-[2-(2-[2-클로로-4-([2-(2,6-디옥소피페리딘-3-일)-1-옥소-3H-이소인돌-5-일]메틸)-카르바모일)아미노]페닐]에톡시)에틸]-6-(2,5-디옥소피롤-1-일)-N-메틸핵산아미드 (화합물 (Id), 24 mg, 43%)를 백색 고체로서 수득하였다. LCMS: (ES, m/s): 721, 723 (M+H)⁺; ¹H NMR (400 MHz, DMSO-d₆) δ 10.99 (s, 1H), 8.78 (s, 1H), 7.70-7.66 (m, 2H), 7.51 (s, 1H), 7.41 (d, J = 9.6 Hz, 1H), 7.18-7.16 (m, 2H), 7.00 (d, J = 5.6 Hz, 2H), 6.85-6.80 (m, 1H), 5.12-5.05 (m, 1H), 4.42-4.33 (m, 5H), 3.39-3.36 (m, 3H), 2.91-2.76 (m, 7H), 2.68-2.52 (m, 1H), 2.48-2.35 (m, 1H), 2.33-2.20 (m, 3H), 2.05-1.95 (m, 1H), 1.48-1.44 (m, 5H), 1.28-1.12 (m, 3H).

[0599]

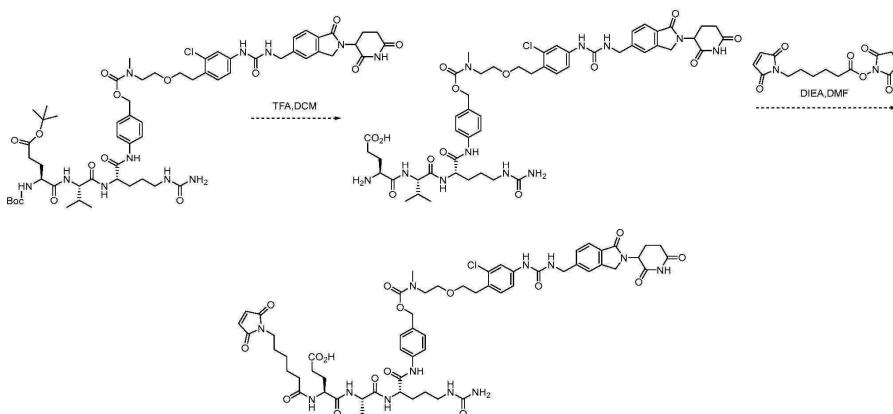
반응식 5A 및 5B는 대안적 트리펩티드 링커를 갖는 신규분해제 P1의 복합체를 제조하는 방법을 보여준다.



[0600]

[0601]

반응식 5A: 신규분해제 P1-트리펩티드 링커 복합체의 합성

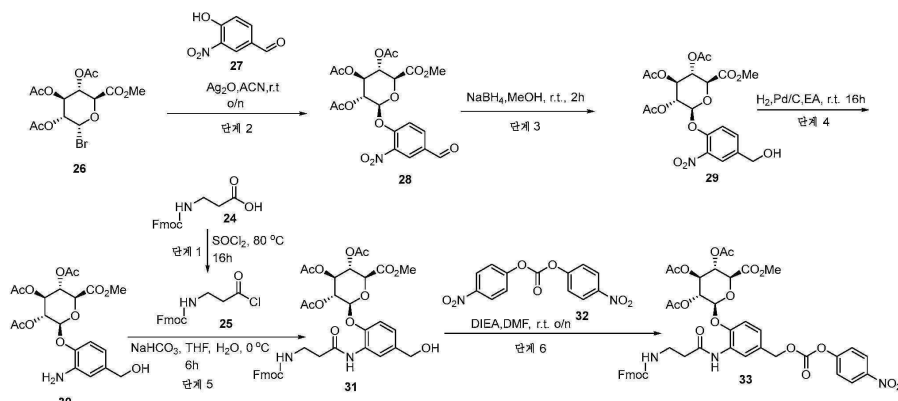


[0602]

[0603]

반응식 5B: 신규분해제 P1-트리펩티드 링커 복합체의 합성 (계속됨)

[0604] 반응식 6A 및 6B는 β -글루쿠로니드 링커와 신규분해제 P1의 복합체를 제조하는 방법을 나타낸다.



[0605]

[0606] 반응식 6A: 신규분해제 P1- β -글루쿠로니드 링커 복합체의 합성

[0607] 단계 1. 화합물 25의 합성

[0608] SOCl_2 (25 mL) 중 3-[[(9H-플루오렌-9-일메톡시) 카르보닐] 아미노]-프로판산 (화합물 24, 5.00 g, 16.06 mmol, 1.00 당량)의 교반 혼합물에 실온에서 첨가하였다. 생성된 혼합물을 80 °C에서 16시간 동안 교반하였다. 목적 생성물을 LCMS (MeOH를 갖는 유도체 MS=326)에 의해 검출할 수 있었다. LCMS는 반응이 완결되었음을 나타내었다. 생성된 혼합물을 진공 하에 농축시켜 9H-플루오렌-9-일메틸 N-(3-클로로-3-옥소프로필)카르바메이트 (화합물 25, 7.5 g, 조 물질)를 황색 오일로서 수득하였다. 조 생성물을 후속 단계에 직접 추가 정제 없이 사용하였다. $^1\text{H-NMR}$ 분석은 이것이 목적 생성물 (MeOH를 갖는 유도체)임을 나타내었다. $^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, CDCl_3) δ 7.81-7.77 (m, 2H), 7.63-7.59 (m, 2H), 7.46-7.40 (m, 2H), 7.40-7.31 (m, 2H), 5.33 (s, 1H), 4.42 (d, J=3.0 Hz, 2H), 4.24 (t, J=6.0 Hz, 1H), 3.74-3.67 (m, 3H), 3.50 (d, J=3.0 Hz, 2H), 2.59 (t, J=6.0 Hz, 2H).

[0609] 단계 2. 화합물 28의 합성

[0610] ACN (100 mL, 190.24 mmol, 75.00 당량) 중 4-포르밀-2-니트로페놀 (화합물 27, 4.21 g, 25.19 mmol, 1.00 당량) 및 Ag_2O (7.00 g, 30.20 mmol, 1.20 당량)의 교반 용액에 N_2 분위기 하에 실온에서 화합물 26 (10.00 g, 25.17 mmol, 1.00 당량)을 조금씩 첨가하였다. 생성된 혼합물을 N_2 분위기 하에 실온에서 밤새 교반하였다. LCMS는 반응이 완결되었음을 나타내었다. 생성된 혼합물을 여과하고, 필터 케이크를 DCM (50 mLx3)으로 세척하였다. 여과물을 감압 하에 농축시켰다. 잔류물을 실리카 겔 칼럼 크로마토그래피에 의해 PE/EA (PE:EA=1:2)로 용리시키면서 정제하여 메틸 (2S,3S,4S,5R,6S)-3,4,5-트리스(아세틸옥시)-6-(4-포르밀-2-니트로페녹시)옥산-2-카르복실레이트 (화합물 28, 10.5 g, 86%)를 백색 고체로서 수득하였다. $^1\text{H-NMR}$ 분석은 이것이 목적 생성물임을 나타내었다. LCMS(ES, m/z):484 $[\text{M}+1]^+$. $^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, CDCl_3) δ 10.00 (s, 1H), 8.34 (s, 1H), 8.13-8.09 (m, 1H), 7.52 (d, J=3.0 Hz, 1H), 5.47-5.29 (m, 4H), 4.37-4.35 (m, 1H), 3.75-3.73 (m, 3H), 2.17-2.06 (m, 9H).

[0611] 단계 3. 화합물 29의 합성

[0612] MeOH (50 mL) 중 메틸 (2S,3S,4S,5R,6S)-3,4,5-트리스(아세틸옥시)-6-(4-포르밀-2-니트로페녹시)옥산-2-카르복실레이트 (화합물 28, 6.00 g, 12.41 mmol, 1.00 당량)의 교반 용액에 N_2 분위기 하에 실온에서 NaBH_4 (0.47 g, 12.42 mmol, 1.00 당량)를 조금씩 첨가하였다. 생성된 혼합물을 N_2 분위기 하에 실온에서 2시간 동안 교반하였다. LCMS는 반응이 완결되었음을 나타내었다. 반응물을 실온에서 물로 킨칭하였다. 생성물을 Na_2SO_4 에 의해 건조시켰다. 생성된 혼합물을 여과하고, 필터 케이크를 DCM으로 세척하였다. 생성된 혼합물을 진공 하에 농축시켜 메틸 (2S,3S,4S,5R,6S)-3,4,5-트리스(아세틸옥시)-6-[4-(히드록시메틸)-2-니트로페녹시]옥산-2-카르복실레이트 (화합물 29, 5.5 g, 91%)를 고체로서 수득하였다. LCMS(ES, m/z):486 $[\text{M}+1]^+$.

[0613] 단계 4. 화합물 30의 합성

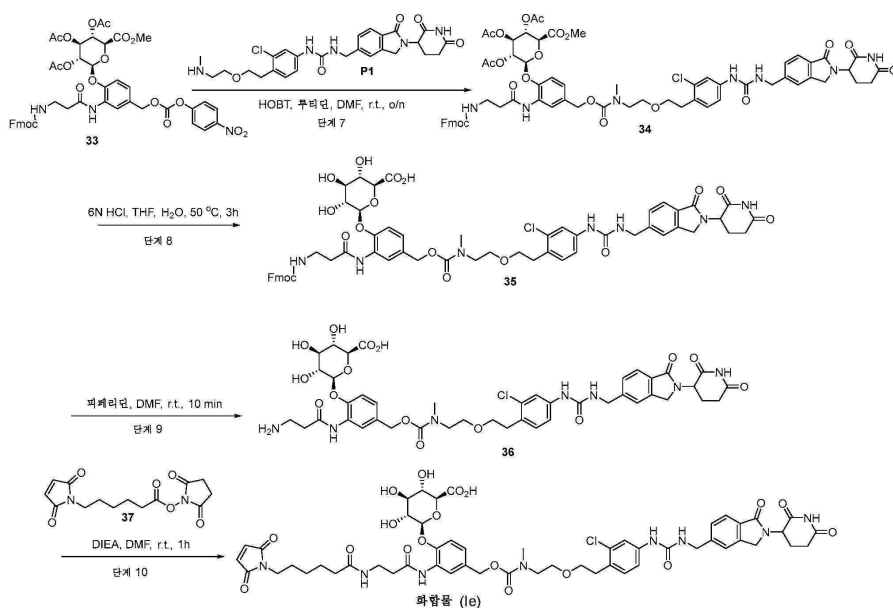
[0614] EA (60 mL) 중 메틸 (2S,3S,4S,5R,6S)-3,4,5-트리스(아세틸옥시)-6-[4-(히드록시메틸)-2-니트로페녹시]옥산-2-카르복실레이트 (화합물 29, 5.50 g, 11.33 mmol, 1.00 당량)의 교반 혼합물에 실온에서 Pd/C (1.10 g, 10%)를 조금씩 첨가하였다. 생성된 혼합물을 H₂ 분위기 하에 실온에서 16시간 동안 교반하였다. LCMS는 반응이 완결되었음을 나타내었다. 생성된 혼합물을 여과하고, 필터 케이크를 DCM 및 MeOH로 세척하고, 여과물을 진공 하에 농축시켜 메틸 (2S,3S,4S,5R,6S)-3,4,5-트리스(아세틸옥시)-6-[2-아미노-4-(히드록시메틸)페녹시]옥산-2-카르복실레이트 (화합물 30, 4.0 g, 77%)를 고체로서 수득하였다. 조 생성물을 후속 단계에 직접 추가 정제 없이 사용하였다. LCMS(ES, m/z):456[M+H]⁺.

[0615] 단계 5. 화합물 31의 합성

[0616] THF (10 mL) 중 메틸 (2S,3S,4S,5R,6S)-3,4,5-트리스(아세틸옥시)-6-[2-아미노-4-(히드록시메틸)페녹시]옥산-2-카르복실레이트 (화합물 30, 1.00 g, 2.19 mmol, 1.00 당량) 및 NaHCO₃ (0.20 g, 2.40 mmol, 1.1 당량)의 교반 용액에 N₂ 분위기 하에 0℃에서 화합물 25 (0.87 g, 2.62 mmol, 1.20 당량)를 조금씩 첨가하였다. 생성된 혼합물을 N₂ 분위기 하에 0℃에서 6시간 동안 교반하였다. LCMS는 반응이 완결되었음을 나타내었다. 반응물을 실온에서 물로 킨칭하였다. 생성된 혼합물을 DCM으로 추출하였다. 합한 유기 층을 감압 하에 농축시켰다. 잔류물을 실리카 겔 칼럼 크로마토그래피에 의해 PE/EA(EA=100%)로 용리시키면서 정제하여 메틸 (2S,3S,4S,5R,6S)-3,4,5-트리스(아세틸옥시)-6-[2-(3-[[[(9H-플루오렌-9-일메톡시)카르보닐]아미노]-프로판아미도)-4-(히드록시메틸)페녹시]옥산-2-카르복실레이트 (화합물 31, 1.1 g, 66%)를 담황색 고체로서 수득하였다. LCMS(ES, m/z):749 [M+H]⁺.

[0617] 단계 6. 합성 화합물 33

[0618] DMF (15 mL) 중 메틸 (2S,3S,4S,5R,6S)-3,4,5-트리스(아세틸옥시)-6-[2-(3-[[[(9H-플루오렌-9-일메톡시)카르보닐]아미노]-프로판아미도)-4-(히드록시메틸)페녹시]옥산-2-카르복실레이트 (화합물 31, 1.50 g, 2.00 mmol, 1.00 당량) 및 비스(4-니트로페닐) 카르보네이트 (화합물 32, 0.68 g, 2.24 mmol, 1.12 당량)의 교반 혼합물에 N₂ 분위기 하에 0℃에서 DIEA (0.52 g, 4.01 mmol, 2.00 당량)를 조금씩 첨가하였다. 생성된 혼합물을 질소 분위기 하에 실온에서 밤새 교반하였다. LCMS는 반응이 완결되었음을 나타내었다. 반응 혼합물을 역 플래쉬 크로마토그래피에 의해 하기 조건: 칼럼, C18 실리카 겔; 이동상, 물 중 ACN (0.1% FA), 40분 내 10%에서 90% 구배; 검출기, UV 254 nm를 사용하여 정제하였다. 수집된 분획을 진공 하에 농축 건조시켜 메틸 (2S,3S,4S,5R,6S)-3,4,5-트리스(아세틸옥시)-6-[2-(3-[[[(9H-플루오렌-9-일메톡시)카르보닐]아미노]-프로판아미도)-4-[[[4-니트로페녹시]카르보닐]옥시]메틸]페녹시]옥산-2-카르복실레이트 (화합물 33, 1.4 g, 48%)를 황색 고체로서 수득하였다. LCMS(ES, m/z):914 [M+H]⁺.



[0619] 반응식 6B: 신규분해제 P1-β-글루쿠로니드 링커 복합체의 합성

[0620]

[0621] 단계 7. 합성 화합물 34

[0622] DMF (10 mL) 중 메틸 (2S,3S,4S,5R,6S)-3,4,5-트리스(아세틸옥시)-6-[2-(3-[[[9H-플루오렌-9-일메톡시]카르보닐]아미노]프로판아미도)-4-[[[4-니트로페녹시카르보닐]옥시]메틸]페녹시]옥산-2-카르복실레이트 (화합물 33, 1.00 g, 1.09 mmol, 1.00 당량) 및 1-(3-클로로-4-[2-[2-(메틸아미노)에톡시]에틸]페닐)-3-[[2-(2,6-디옥소피페리딘-3-일)-1-옥소-3H-이소인돌-5-일]메틸]우레아 (신규분해제 P1, 0.58 g, 1.09 mmol, 1.00 당량)의 교반 혼합물에 N₂ 분위기 하에 실온에서 HOBt (1.18 g, 8.72 mmol, 8.00 당량) 및 2,4-디메틸피리딘 (1.07 g, 8.72 mmol, 8.00 당량)을 조금씩 첨가하였다. 생성된 혼합물을 N₂ 분위기 하에 실온에서 16시간 동안 교반하였다. LCMS는 반응이 완결되었음을 나타내었다. 생성된 혼합물을 추가 정제에 사용하였다. 잔류물을 역 플래쉬 크로마토그래피에 의해 하기 조건: 칼럼, C18 실리카 겔; 이동상, 물 중 ACN (0.1% FA), 40분 내 10%에서 80% 구배; 검출기, UV 254 nm를 사용하여 정제하였다. 수집된 분획을 진공 하에 농축시켜 메틸 (2S,3S,4S,5R,6S)-3,4,5-트리스(아세틸옥시)-6-[4-[[[2-(2-[2-클로로-4-[[[2-(2,6-디옥소피페리딘-3-일)-1-옥소-3H-이소인돌-5-일]메틸]카르바모일]아미노]페닐]에톡시)에틸](메틸)카르바모일]옥시)메틸]-2-(3-[[[9H-플루오렌-9-일메톡시]카르보닐]아미노]프로판아미도)페녹시]옥산-2-카르복실레이트 (화합물 34, 800 mg, 56%)를 고체로서 수득하였다. LCMS(ES, m/z):1302[M+H]⁺.

[0623] 단계 8. 화합물 35의 합성

[0624] THF (80 mL) 중 메틸 (2S,3S,4S,5R,6S)-3,4,5-트리스(아세틸옥시)-6-[4-[[[2-(2-[2-클로로-4-[[[2-(2,6-디옥소피페리딘-3-일)-1-옥소-3H-이소인돌-5-일]메틸]카르바모일]아미노]페닐]에톡시)에틸](메틸)카르바모일]옥시)메틸]-2-(3-[[[9H-플루오렌-9-일메톡시]카르보닐]아미노]프로판아미도)페녹시]옥산-2-카르복실레이트 (화합물 34, 800.00 mg, 0.61 mmol, 1.00 당량)의 교반 혼합물에 N₂ 분위기 하에 실온에서 HCl (6N, 80 mL)을 조금씩 첨가하였다. 생성된 혼합물을 질소 분위기 하에 50℃에서 3시간 동안 교반하였다. LCMS는 반응이 완결되었음을 나타내었다. 생성된 혼합물을 진공 하에 농축시켰다. 잔류물을 역 플래쉬 크로마토그래피에 의해 하기 조건: 칼럼, C18 실리카 겔; 이동상, 물 중 ACN (0.1% FA), 40분 내 0%에서 80% 구배; 검출기, UV 254 nm를 사용하여 정제하였다. 수집된 분획을 동결건조시켜 (2S,3S,4S,5R,6S)-6-[4-[[[2-(2-[2-클로로-4-[[[2-(2,6-디옥소피페리딘-3-일)-1-옥소-3H-이소인돌-5-일]메틸]카르바모일]아미노]페닐]에톡시)에틸](메틸)카르바모일]옥시)메틸]-2-(3-[[[9H-플루오렌-9-일메톡시]카르보닐]아미노]프로판아미도)페녹시]-3,4,5-트리히드록시옥산-2-카르복실산 (화합물 35, 230 mg, 32%)을 백색 고체로서 수득하였다. LCMS(ES, m/z):1162[M+H]⁺.

[0625] 단계 9. 화합물 36의 합성

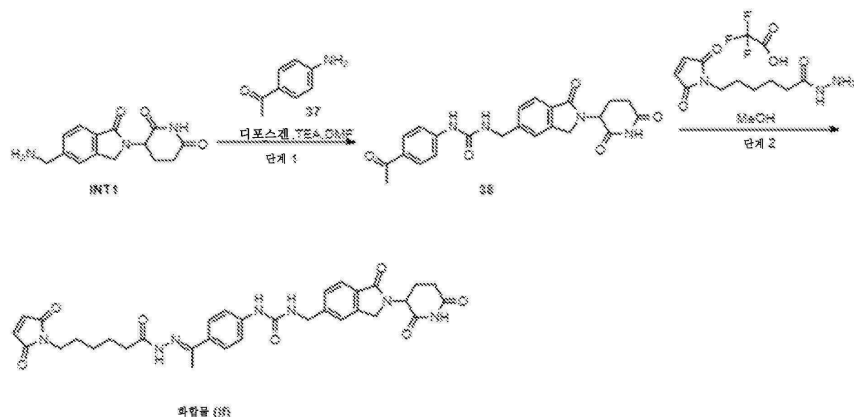
[0626] DMF (2 mL) 중 (2S,3S,4S,5R,6S)-6-[4-[[[2-(2-[2-클로로-4-[[[2-(2,6-디옥소피페리딘-3-일)-1-옥소-3H-이소인돌-5-일]메틸]카르바모일]아미노]페닐]에톡시)에틸](메틸)카르바모일]옥시)메틸]-2-(3-[[[9H-플루오렌-9-일메톡시]카르보닐]아미노]프로판아미도)페녹시]-3,4,5-트리히드록시옥산-2-카르복실산 (화합물 35, 230 mg, 0.2 mmol, 1.00 당량)의 교반 용액에 질소 분위기 하에 실온에서 피페리딘 (0.4 mL)을 조금씩 첨가하였다. 생성된 혼합물을 질소 분위기 하에 실온에서 10분 동안 교반하였다. LCMS는 반응이 완결되었음을 나타내었다. 생성된 혼합물을 정제용 HPLC에 의해 하기 조건 (칼럼: 엑스셀렉트 CSH 정제용 C18 OBD 칼럼, 19x250 mm, 5um; 이동상 A: 물 (0.05% TFA), 이동상 B: ACN; 유량: 25 mL/분; 구배: 7분 내 20 B에서 40 B; 220 nm; RT 1:5.78분)을 사용하여 직접 추가로 정제하여 (2S,3S,4S,5R,6S)-6-[2-(3-아미노프로판아미도)-4-[[[2-(2-[2-클로로-4-[[[2-(2,6-디옥소피페리딘-3-일)-1-옥소-3H-이소인돌-5-일]메틸]카르바모일]아미노]페닐]에톡시)에틸](메틸)카르바모일]옥시)메틸]페녹시]-3,4,5-트리히드록시옥산-2-카르복실산 (화합물 36, 35 mg, 18%)을 백색 고체로서 수득하였다. LCMS(ES, m/z): 940[M+H]⁺.

[0627] 단계 10. 화합물 (Ie)의 합성

[0628] DMF (3 mL) 중 (2S,3S,4S,5R,6S)-6-[2-(3-아미노프로판아미도)-4-[[[2-(2-[2-클로로-4-[[[2-(2,6-디옥소피페리딘-3-일)-1-옥소-3H-이소인돌-5-일]메틸]카르바모일]아미노]페닐]에톡시)에틸](메틸)카르바모일]옥시)메틸]페녹시]-3,4,5-트리히드록시옥산-2-카르복실산 (화합물 36, 30 mg, 0.03 mmol, 1.00 당량)의 교반 용액에 질소 분위기 하에 실온에서 DIEA (13 mg, 0.10 mmol, 3.00 당량) 및 화합물 37 (30 mg, 0.10 mmol, 3.00 당량)을 조금씩 첨가하였다. 생성된 혼합물을 질소 분위기 하에 실온에서 1시간 동안 교반하였다. LCMS는 반응이 완결되었음을 나타내었다. 생성된 혼합물을 정제용 HPLC에 의해 하기 조건 (칼럼: 엑스셀렉트 CSH OBD 칼럼 30 x 150mm 5um, 이동상 A:물 (0.1% FA), 이동상 B:ACN; 유량:60 mL/분; 구배:10분 내에 21 B에서 36 B; 220

nm; RT 1:11.15분)을 사용하여 정제하였다. 수집된 분획을 동결건조시켜 (2S,3S,4S,5R,6S)-6-[4-[[[2-(2-[2-클로로-4-[[[2-(2,6-디옥소피페리딘-3-일)-1-옥소-3H-이소인돌-5-일]메틸]카르바모일)아미노]페닐]에톡시]에틸]-(메틸)카르바모일]옥시]메틸]-2-[3-[6-(2,5-디옥소피롤-1-일)헥산아미도]프로판아미도]페녹시]-3,4,5-트리히드록시옥산-2-카르복실산 (화합물 (Ie), 10.5 mg, 28%)을 백색 고체로서 수득하였다. LCMS(ES, m/z):1133[M+H]⁺. ¹H-NMR (300 MHz, DMSO-d₆) δ 10.9 (s, 1H), 9.13 (s, 1H), 8.16 (s, 1H), 7.92-7.68 (m, 4H), 7.52 (s, 1H), 7.44 (d, J=3.0 Hz, 1H), 7.18-6.99 (m, 7H), 5.76 (s, 1H), 5.20-5.10 (m, 2H), 4.98 (br s, 2H), 4.76-4.74 (m, 1H), 4.42-4.33 (m, 4H), 3.65 (br s, 1H), 3.58-3.54 (m, 5H), 3.35 (d, J=6 Hz, 2H), 2.90-2.83 (m, 7H), 2.57-2.55 (m, 3H), 2.45-2.30 (m, 1H), 2.02-1.98 (m, 4H), 1.48-1.42 (m, 5H), 1.40-1.20 (m, 3H).

[0629] 반응식 7은 히드라진 링커와 신규분해제 P6의 복합체를 제조하는 방법을 나타낸다.



[0630]

[0631] 반응식 7: 신규분해제 P6-히드라존 링커 복합체의 합성

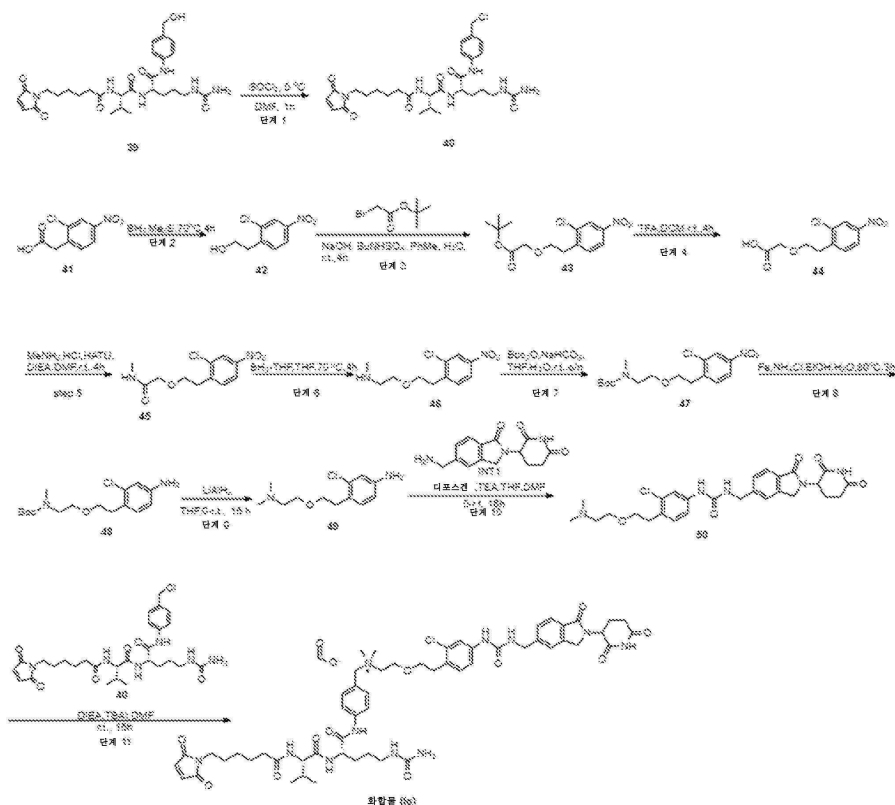
[0632] 단계 1. 화합물 38의 합성

[0633] THF (2.00 mL) 중 4-아미노아세트페논 (화합물 37, 100 mg, 0.73 mmol, 1.00 당량)의 교반 용액에 디포스겐 (0.40 mL)을 실온에서 적가하였다. 생성된 혼합물을 0℃에서 30분 동안 교반하였다. 생성된 혼합물을 진공 하에 농축시켰다. 생성된 고체를 DMF (1.50 mL) 중에 재용해시켰다. 교반 용액에 DMF (3.00 mL) 중 3-[5-(아미노메틸)-1-옥소-3H-이소인돌-2-일]피페리딘-2,6-디온 (INT1, 200 mg, 0.73 mmol, 1.00 당량) 및 TEA (0.50 mL)를 실온에서 적가하였다. 생성된 혼합물을 0℃에서 1시간 동안 교반하였다. LCMS는 반응이 완결되었음을 나타내었다. 혼합물에 물 (5 mL)을 첨가하고, CH₂Cl₂ (3x10 mL)로 추출하였다. 유기 층을 진공 하에 농축시켰다. 잔류물을 역 플래쉬 크로마토그래피에 의해 하기 조건: 칼럼, C18 실리카 겔; 이동상, 물 중 ACN (0.05% TFA), 35분 내 10%에서 50% 구배; 검출기, UV 254 nm을 사용하여 정제하였다. 수집 분획을 농축 건조시켜 1-(4-아세틸페닐)-3-[[2-(2,6-디옥소피페리딘-3-일)-1-옥소-3H-이소인돌-5-일]메틸]우레아 (화합물 38, 80 mg, 25%)를 담황색 고체로서 수득하였다. LCMS:(ES.m/z):435[M+1]⁺.

[0634] 단계 2. 화합물 (If)의 합성

[0635] 메탄올 (5.00 mL) 중 1-(4-아세틸페닐)-3-[[2-(2,6-디옥소피페리딘-3-일)-1-옥소-3H-이소인돌-5-일]메틸]우레아 (화합물 38, 80.00 mg, 0.18 mmol, 1.00 당량) 및 6-(2,5-디옥소피롤-1-일)헥산히드라지드; 트리플루오로아세트산 (75 mg, 1.20 당량)의 혼합물을 50℃에서 밤새 교반하였다. 혼합물을 실온으로 냉각시켰다. LCMS는 반응이 완결되었음을 나타내었다. 침전된 고체를 여과에 의해 수집하고, MeOH (2x5 mL)로 세척하였다. 조 고체를 역 플래쉬 크로마토그래피에 의해 하기 조건: C18 칼럼; 이동상, 물 중 ACN (0.1%FA), 30분 내 10%에서 50% 구배; 검출기, UV 254 nm을 사용하여 정제하였다. 수집된 분획을 DCM (3x5 mL)으로 추출하고, 진공 하에 농축시켰다. 이에 따라 3-[[2-(2,6-디옥소피페리딘-3-일)-1-옥소-3H-이소인돌-5-일]메틸]-1-[4-[(1E)-1-[[6-(2,5-디옥소피롤-1-일)헥산아미도]이미노]에틸]페닐]우레아 (화합물 (If), 4.4 mg, 3.7%)를 회백색 고체로서 수득하였다. LCMS:(ES.m/z): 642[M+1]⁺. ¹H NMR (400 MHz, DMSO-d₆) δ 10.99 (s, 1H), 10.26-10.15 (m, 1H), 8.82 (s, 1H), 7.69-7.62(m, 3H), 7.52-7.43 (m, 4H), 7.01-6.99 (m, 2H), 5.13-5.09 (m, 1H), 4.42-4.33 (m, 4H), 2.98-2.82 (m, 1H), 2.62-2.58 (m, 2H), 2.20-2.12 (m, 2H), 1.58-1.51 (m, 6H), 1.26-1.09 (m, 6H)

[0636] 반응식 8은 4급 아민 링커를 갖는 신규분해제 P2의 복합체를 제조하는 방법을 나타낸다.



[0637]

[0638] 반응식 8: 신규분해제 P2-4급 아민 링커 복합체의 합성

[0639] 단계 1. 화합물 40의 합성

[0640] DMF (2 mL) 중 N-[(1S)-1-[[[(1S)-4-(카르바모일아미노)-1-[[4-(히드록시메틸)페닐]카르바모일]부틸]카르바모일]-2-메틸프로필]-6-(2,5-디옥소피롤-1-일)헥산아미드 (화합물 39, 100 mg, 0.18 mmol, 1.00 당량)의 교반 용액에 DCM (2 mL) 중 SOCl₂ (20 mg, 0.18 mmol, 1 당량)를 N₂ 하에 0℃에서 적가하였다. 생성된 혼합물을 0℃에서 1시간 동안 교반하였다. LCMS는 반응이 완결되었음을 나타내었다. 반응 혼합물을 빙냉수 (20 mL)로 희석하고, DCM (10 mL*3)으로 추출하고, 합한 유기 층을 물 (10 mL), 염수 (10 mL)로 세척하고, 무수 황산나트륨 상에서 건조시키고, 진공 하에 농축 건조시켜 생성물 N-[(1S)-1-[[[(1S)-4-(카르바모일아미노)-1-[[4-(클로로메틸)페닐]카르바모일]부틸]카르바모일]-2-메틸프로필]-6-(2,5-디옥소피롤-1-일)헥산아미드 (화합물 40, 80 mg, 53%)를 백색 고체로서 수득하였다. LCMS(ES, m/z): 591.593 [M+H]⁺

[0641] 단계 2. 화합물 42의 합성

[0642] THF (130 mL) 중 (2-클로로-4-니트로페닐)아세트산 (화합물 41, 8.60 g, 39.9 mmol, 1.00 당량)의 교반 혼합물에 BH₃-Me₂S (10.00 mL, 105.4 mmol, 2.64 당량)를 0℃에서 적가하였다. 생성된 혼합물을 질소 분위기 하에 70℃에서 4시간 동안 교반하였다. TLC (PE:EA=1:2)는 반응이 완결되었음을 나타내었다. 혼합물을 실온으로 냉각되도록 하였다. 생성된 혼합물을 진공 하에 농축시켰다. 잔류물을 실리카 겔 칼럼 크로마토그래피에 의해 PE/EtOAc (1:1)로 용리시키면서 정제하여 2-(2-클로로-4-니트로페닐)에탄올 (화합물 42, 7.7 g, 96%)을 황색 고체로서 수득하였다. ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 8.27 (d, J = 4.0 Hz, 1H), 8.11-8.07 (m, 1H), 7.53 (d, J = 8.0 Hz, 1H), 3.99 (t, J = 8.0 Hz, 2H), 3.15 (t, J = 8.0 Hz, 2H).

[0643] 단계 3. 화합물 43의 합성

[0644] 톨루엔 (70 mL) 중 2-(2-클로로-4-니트로페닐)에탄올 (화합물 42, 7.70 g, 38.2 mmol, 1.00 당량) 및 tert-부틸 2-브로모아세테이트 (57.74 g, 296.0 mmol, 7.75 당량)의 교반 혼합물에 Bu₄NHSO₄ (10.37 g, 30.6 mmol,

0.80 당량)를 0℃에서 여러 부분으로 첨가하였다. 상기 혼합물에 H₂O (90 mL) 중 NaOH (15.00 g, 375.0 mmol, 9.82 당량)를 0℃에서 30시간에 걸쳐 적가하였다. 생성된 혼합물을 실온에서 추가로 4시간 동안 교반하였다. TLC (PE:EA=3:1)는 반응이 완결되었음을 나타내었다. 생성된 혼합물을 EtOAc (3 x 200 mL)로 추출하였다. 합한 유기 층을 염수 (200 mL)로 세척하고, 무수 Na₂SO₄ 상에서 건조시켰다. 여과한 후, 여과물을 감압 하에 농축시켰다. 잔류물을 실리카 겔 칼럼 크로마토그래피에 의해 PE/EtOAc (5:1)로 용리시키면서 정제하여 tert-부틸 2-[2-(2-클로로-4-니트로페닐)에톡시]아세테이트 (화합물 43, 12.2g, 91%)를 황색 오일로서 수득하였다. ¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ 8.20 (d, J = 4.0 Hz, 1H), 8.07-8.03 (m, 1H), 7.61 (d, J = 8.1 Hz, 1H), 4.11 (s, 2H), 3.83 (t, J = 8.1 Hz, 2H), 3.16(t, J = 8.1 Hz, 2H), 1.45(s, 9H).

[0645] 단계 4. 화합물 44의 합성

[0646] DCM (120 mL) 중 tert-부틸 2-[2-(2-클로로-4-니트로페닐)에톡시]아세테이트 (화합물 43, 12.20 g, 38.6 mmol, 1.00 당량)의 교반 혼합물에 TFA (20 mL)를 0℃에서 적가하였다. 생성된 혼합물을 실온에서 4시간 동안 교반하였다. LCMS는 반응이 완결되었음을 나타내었다. 생성된 혼합물을 감압 하에 농축시켰다. 이에 따라 [2-(2-클로로-4-니트로페닐)에톡시]아세트산 (화합물 44, 8.4g, 83%)을 황색 고체로서 수득하였다. LCMS: (ES, m/s): 517 (2M-H)⁻ ¹H NMR (400 MHz, DMSO-d₆) δ 12.64(s, 1H), 8.20 (d, J = 4.0 Hz, 1H), 8.11-8.08 (m, 1H), 7.72 (d, J = 8.0 Hz, 1H), 4.06 (s, 2H), 3.74 (t, J = 8.0 Hz, 2H), 3.06(t, J = 8.0 Hz, 2H).

[0647] 단계 5. 화합물 45의 합성

[0648] DMF (80 mL) 중 [2-(2-클로로-4-니트로페닐)에톡시]아세트산 (화합물 44, 8.40 g, 32.35 mmol, 1.00 당량) 및 HATU (19.19 g, 50.47 mmol, 1.56 당량)의 교반 혼합물에 질소 분위기 하에 0℃에서 CH₃NH₂.HCl (2.69 g, 39.79 mmol, 1.23 당량) 및 DIEA (17.31 g, 133.93 mmol, 4.14 당량)를 첨가하였다. 생성된 혼합물을 질소 분위기 하에 실온에서 4시간 동안 교반하였다. LCMS는 반응이 완결되었음을 나타내었다. 반응물을 물/얼음으로 켄칭하였다. 생성된 혼합물을 DCM (3 x 50 mL)으로 추출하였다. 합한 유기 층을 염수 (50 mL)로 세척하고, 무수 Na₂SO₄ 상에서 건조시켰다. 여과한 후, 여과물을 감압 하에 농축시켰다. 잔류물을 실리카 겔 칼럼 크로마토그래피에 의해 (DCM: MeOH = 10:1)로 용리시키면서 정제하여 2-[2-(2-클로로-4-니트로페닐)에톡시]-N-메틸아세트아미드 (화합물 45, 7.2g, 81%)를 황색 오일로서 수득하였다. LCMS: (ES, m/s): 273,275 (M+H)⁺

[0649] 단계 6. 화합물 46의 합성

[0650] THF (70 mL) 중 2-[2-(2-클로로-4-니트로페닐)에톡시]-N-메틸아세트아미드 (화합물 45, 7.20 g, 26.40 mmol, 1.00 당량)의 교반 혼합물에 BH₃-THF (THF 중 10M, 52.0 mL, 520.0 mmol, 20 당량)를 실온에서 적가하였다. 생성된 혼합물을 70℃에서 4시간 동안 교반하였다. LCMS는 반응이 완결되었음을 나타내었다. 혼합물을 실온으로 냉각되도록 하였다. 반응물을 MeOH로 켄칭하였다. 잔류물을 1N HCl을 사용하여 pH 6으로 산성화시켰다. 생성된 혼합물을 EtOAc (20 mL)로 추출하였다. 수성 상을 포화 NaHCO₃ (포화, 수성)를 사용하여 pH 8로 염기성화시켰다. 생성된 혼합물을 EtOAc (3 x 100 mL)로 추출하고, 염수 (50 mL)로 세척하고, 무수 Na₂SO₄ 상에서 건조시켰다. 여과한 후, 여과물을 감압 하에 농축시켰다. 잔류물을 실리카 겔 칼럼 크로마토그래피에 의해 (DCM: MeOH = 8:1)로 용리시키면서 정제하여 [2-[2-(2-클로로-4-니트로페닐)에톡시]에틸](메틸)아민 (화합물 46, 5.4g, 79%)을 황색 고체로서 수득하였다. LCMS: (ES, m/s): 259,261 (M+H)⁺; ¹H NMR (400 MHz, DMSO-d₆) δ 8.26 (d, J = 4.0 Hz, 1H), 8.15-8.12 (m, 1H), 7.73 (d, J = 8.0 Hz, 1H), 3.72 (t, J = 8.0 Hz, 2H), 3.61(t, J = 8.0 Hz, 2H), 3.10 (t, J = 8.0 Hz, 2H), 2.87 (t, J = 8.0 Hz, 2H), 2.40 (s, 3H).

[0651] 단계 7. 화합물 47의 합성

[0652] THF (20.00 mL) 중 [2-[2-(2-클로로-4-니트로페닐)에톡시]에틸](메틸)아민 (화합물 46, 4.00 g, 15.46 mmol, 1.00 당량) 및 Boc₂O (3.80 g, 17.41 mmol, 1.13 당량)의 교반 혼합물에 H₂O (20.00 mL) 중 NaHCO₃ (4.00 g, 47.61 mmol, 3.08 당량)를 실온에서 적가하였다. 생성된 혼합물을 실온에서 밤새 교반하였다. LCMS는 반응이 완결되었음을 나타내었다. 생성된 혼합물을 EtOAc (3 x 20 mL)로 추출하였다. 합한 유기 층을 염수 (20 mL)로 세척하고, 무수 Na₂SO₄ 상에서 건조시켰다. 여과한 후, 여과물을 감압 하에 농축시켰다. 잔류물을 실리카 겔 칼럼 크로마토그래피에 의해 (DCM: MeOH = 12:1)로 용리시키면서 정제하여 tert-부틸 N-[2-[2-(2-클로로-4-니트

로페닐)에톡시]에틸]-N-메틸카르바메이트 (화합물 47, 4.8 g, 77%)를 황색 고체로서 수득하였다.

[0653] LCMS: (ES, m/s): 359,361(M+H)⁺; ¹H NMR (400 MHz, DMSO-d₆) δ 8.24 (d, J = 4.0 Hz, 1H), 8.13-8.10 (m, 1H), 7.67 (d, J = 8.0 Hz, 1H), 4.05-4.00(m, 1H), 3.69 (t, J = 8.0 Hz, 2H), 3.50(t, J = 8.0 Hz, 2H), 3.28 (t, J = 8.0 Hz, 2H), 3.07(t, J = 8.0 Hz, 2H), 2.75(s, 3H), 1.36(s, 9H).

[0654] 단계 8. 화합물 48의 합성

[0655] EtOH (112.00 mL) 중 tert-부틸 N-[2-[2-(2-클로로-4-니트로페닐)에톡시]에틸]-N-메틸카르바메이트 (화합물 47, 5.60 g, 15.6 mmol, 1.00 당량)의 교반 혼합물에 실온에서 H₂O (12.00 mL) 중 NH₄Cl (2.50 g, 46.74 mmol, 2.99 당량) 및 Fe (4.40 g, 78.79 mmol, 5.05 당량)를 첨가하였다. 생성된 혼합물을 80℃에서 3시간 동안 교반하였다. LCMS는 반응이 완결되었음을 나타내었다. 혼합물을 실온으로 냉각되도록 하였다. 생성된 혼합물을 감압 하에 농축시켰다. 생성된 혼합물을 DCM (3 x 30 mL)으로 추출하였다. 합한 유기 층을 염수 (30 mL)로 세척하고, 무수 Na₂SO₄ 상에서 건조시켰다. 여과한 후, 여과물을 감압 하에 농축시켰다. 잔류물을 실리카 겔 칼럼 크로마토그래피에 의해 (DCM: MeOH = 10:1)로 용리시키면서 정제하여 tert-부틸 N-[2-[2-(4-아미노-2-클로로페닐)에톡시]에틸]-N-메틸카르바메이트 (화합물 48, 4.2 g, 81%)를 황색 오일로서 수득하였다. LCMS: (ES, m/s): 329,331 (M+H)⁺; ¹H NMR (400 MHz, DMSO-d₆) δ 6.96 (d, J = 8.0 Hz, 1H), 6.59(d, J = 4.0 Hz, 1H), 6.46-6.43 (m, 1H), 5.18(br s, 2H), 3.50-3.45(m, 4H), 3.29-3.26(m, 2H), 2.75-2.71(m, 5H), 1.38(s, 9H).

[0656] 단계 9. 화합물 49의 합성

[0657] THF (3 mL) 중 tert-부틸 N-[2-[2-(4-아미노-2-클로로페닐)에톡시]에틸]-N-메틸카르바메이트 (화합물 48, 100 mg, 0.30 mmol, 1.00 당량)의 용액에 질소 분위기 하에 0℃에서 THF (2 mL) 중 LiAlH₄ (92 mg, 2.43 mmol, 8.00 당량)를 첨가하였다. 생성된 혼합물을 실온에서 16시간 동안 교반하였다. 5개의 반응을 병렬로 수행하였다. LCMS는 반응이 완결되었음을 나타내었다. 이어서 반응물을 1N NaOH (10 mL)로 켄칭하고, 여과하고, 진공 하에 농축 건조시킨 다음, 잔류물을 역 플래쉬 크로마토그래피에 의해 하기 조건을 사용하여 정제하였다: 칼럼, C18 실리카 겔; 이동상, 물 중 ACN (0.1%FA), 30분 내 0%에서 60% 구배; 검출기, UV 254 nm. 수집된 분획을 농축 건조시켜 3-클로로-4-[2-[2-(디메틸아미노)에톡시]에틸]아닐린, 49 (180 mg, 44%)를 황색 오일로서 수득하였다. LCMS(ES, m/z): 243,245 [M+H]⁺

[0658] 단계 10. 화합물 50의 합성

[0659] THF (9 mL) 중 3-클로로-4-[2-[2-(디메틸아미노)에톡시]에틸]아닐린 (화합물 49, 140 mg, 0.58 mmol, 1.00 당량)의 용액에 질소 분위기 하에 0℃에서 디포스젠 (137 mg, 0.69 mmol, 1.20 당량)을 첨가하였다. 생성된 혼합물을 0℃에서 1시간 동안 교반하였다. 이어서 반응 용액을 진공 하에 농축 건조시켰다. 잔류물을 DMF (2 mL) 중에 재용해시킨 다음, DMF (4 mL) 중 3-[5-(아미노메틸)-1-옥소-3H-이소인돌-2-일]피페리딘-2,6-디온 (158 mg, 0.58 mmol, 1.00 당량) 및 TEA (117 mg, 1.15 mmol, 2.00 당량)의 용액에 질소 분위기 하에 첨가하였다. 생성된 혼합물을 실온에서 16시간 동안 교반하였다. LCMS는 반응이 완결되었음을 나타내었다. 반응 혼합물을 메탄올로 희석하고, 생성된 용액을 역 플래쉬 크로마토그래피에 의해 하기 조건: 칼럼, C18 실리카 겔; 이동상, 물 중 ACN (0.1%FA), 30분 내 0%에서 50% 구배; 검출기, UV 254 nm를 사용하여 정제하여 생성물 100 mg을 무색 고체로서 수득하였다. 조 생성물을 정제용 HPLC에 의해 하기 조건: 칼럼: 엑스브리지 쉘드 RP18 OBD 칼럼, 19x250mm, 10um; 이동상 A: 물 (0.1%FA), 이동상 B: ACN; 유량: 25 mL/분; 구배: 7분 내 14%에서 32%; 220 nm; RT1: 5.25분을 사용하여 정제하였다. 수집된 분획을 동결건조시켜 1-(3-클로로-4-[2-[2-(디메틸아미노)에톡시]에틸]페닐)-3-[[2-(2,6-디옥소피페리딘-3-일)-1-옥소-3H-이소인돌-5-일]메틸]우레아 (화합물 50, 60 mg, 18%)를 무색 고체로서 수득하였다. LCMS(ES, m/z): 542,544 [M+H]⁺

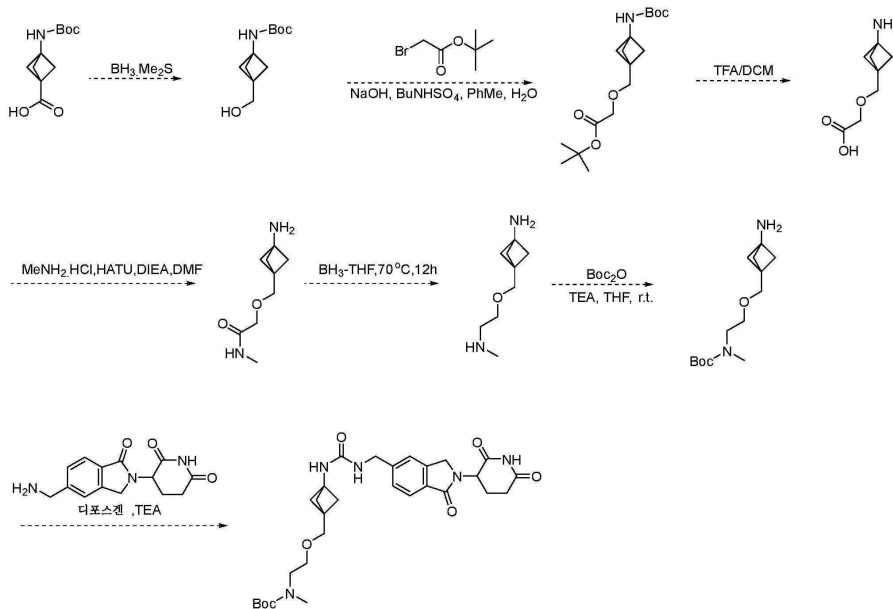
[0660] 단계 11. 화합물 (Ig)의 합성

[0661] DMF (1 mL) 중 N-[(1S)-1-[[[(1S)-4-(카르바모일아미노)-1-[[4-(클로로메틸)페닐]-카르바모일]부틸]카르바모일]-2-메틸프로필]-6-(2,5-디옥소피롤-1-일)헥산아미드 (화합물 40, 66 mg, 0.11 mmol, 1.00 당량), 1-(3-클로로-4-[2-[2-(디메틸아미노)에톡시]에틸]페닐)-3-[[2-(2,6-디옥소피페리딘-3-일)-1-옥소-3H-이소인돌-5-일]메틸]우레아 (화합물 50, 60 mg, 0.11 mmol, 1.00 당량) 및 DIEA (29 mg, 0.22 mmol, 2.00 당량)의 용액에 공기 중 실온에서 TBAI (4 mg, 0.01 mmol, 0.10 당량)를 첨가하였다. 생성된 혼합물을 실온에서 16시간 동안 교반하였다. LCMS 추적은 반응이 완결되었음을 나타내었다. 생성된 혼합물을 역상 칼럼 크로마토그래피에 의해 하기

조건: 칼럼, C18 실리카 겔; 이동상, 물(0.05%TFA) 중 ACN, 40분 내 5%에서 45% 구배; 검출기, UV 254 nm을 사용하여 정제하여 조 생성물 90 mg을 황색 오일로서 수득하였다. 이어서 조 생성물을 하기 조건: 칼럼: 엑스셀렉트 CSH OBD 칼럼 30*150mm 5um, n; 이동상 A: 물(0.1%TFA), 이동상 B: ACN; 유량:60 mL/분; 구배: 7분 내 15 B에서 35 B; 220 nm; RT1:6.00분에 의해 재정제하여 ([4-[(2S)-5-(카르바모일아미노)-2-[(2S)-2-[6-(2,5-디옥소피롤-1-일)핵산아미도]-3-메틸부탄아미도]펜탄아미도]페닐]메틸][2-(2-[2-클로로-4-[[[2-(2,6-디옥소피리딘-3-일)-1-옥소-3H-이소인돌-5-일]메틸]카르바모일)아미노]페닐]에톡시)에틸]디메틸아자늄, 화합물 (Ig)(19 mg, 14.8%)을 백색 고체로서 수득하였다. LCMS(ES, m/z): 1096 [M-FA]⁺, 549 [1/2(M-FA)]⁺; ¹H NMR (400 MHz, CD₃OD) δ 8.48 (s, 1H), 7.77-7.72 (m, 3H), 7.55 - 7.47 (m, 3H), 7.37-7.35 (d, J = 8.4 Hz, 2H), 7.18 - 7.14 (m, 2H), 6.77 (s, 2H), 5.17-5.13 (q, J = 8, 4Hz, 1H), 4.51 - 4.46 (m, 5H), 4.35 (s, 2H), 4.12 (d, J = 8.0 Hz, 1H), 3.90 (s, 2H), 3.79 (t, J = 5.6 Hz, 2H), 3.45 (t, J = 7.2 Hz, 4H), 3.22-3.15 (m, 1H), 3.11-3.05 (m, 1H), 3.00 (t, J = 6.0 Hz, 2H), 2.92 (s, 6H), 2.89 - 2.84 (m, 1H), 2.81 - 2.73 (m, 1H), 2.54-2.43 (m, 1H), 2.27 (t, J = 7.2 Hz, 2H), 2.21 - 2.12 (m, 1H), 2.10 - 2.02 (m, 1H), 1.95 - 1.82 (m, 1H), 1.78-1.69 (m, 1H), 1.64-1.59 (m, 7H), 1.32-1.25 (m, 2H), 0.98-0.96 (m, 6H).

[0662]

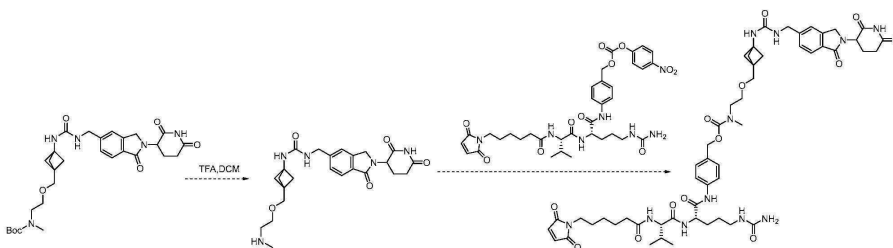
반응식 9A 및 9B는 펩티드-함유 링커와 신규분해제 P13의 복합체를 제조하는 방법을 나타낸다.



[0663]

[0664]

반응식 9A: 신규분해제 P13-펩티드 링커 복합체의 합성

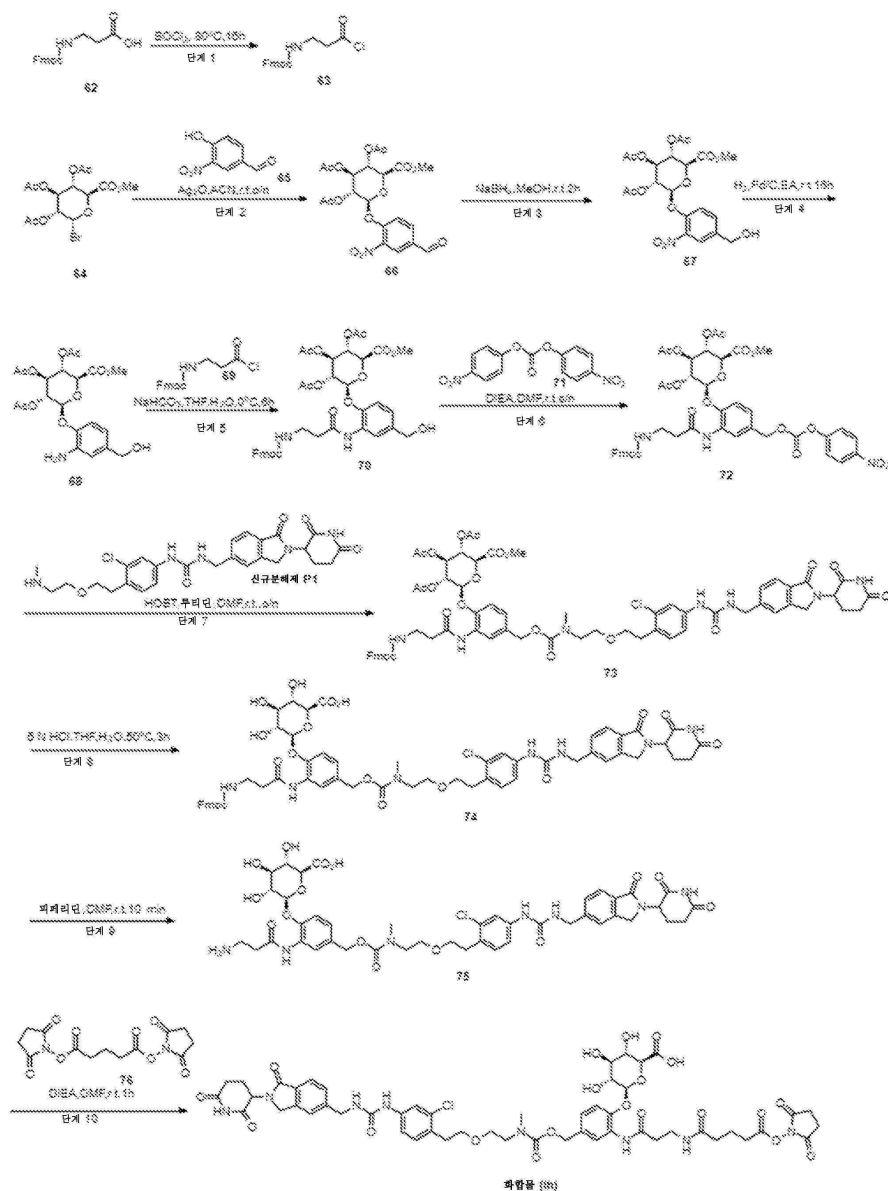


[0665]

[0666]

반응식 9B: 신규분해제 P13-펩티드 링커 복합체의 합성

[0667] 반응식 10은 화학식 (Ih)의 화합물의 합성을 나타낸다.



[0668]

[0669] 반응식 10: 신규분해제 P1- β -글루쿠로니드 링커 복합체 (화합물 (Ih))의 합성

[0670] 단계 1. 화합물 63의 합성

[0671] 3-[[9H-플루오렌-9-일메톡시]카르보닐]아미노]프로판산 (화합물 62, 5.00 g, 16.06 mmol, 1.00 당량)의 교반 혼합물에 SOCl_2 (25 mL)를 실온에서 첨가하였다. 생성된 혼합물을 80°C 에서 16시간 동안 교반하였다. 목적 생성물을 LCMS (MeOH를 갖는 유도체 MS=326)에 의해 검출할 수 있었다. LCMS는 반응이 완결되었음을 나타내었다. 생성된 혼합물을 진공 하에 농축시켜 9H-플루오렌-9-일메틸 N-(3-클로로-3-옥소프로필)카르바메이트 (화합물 63, 7.5 g, 조 물질)를 황색 오일로서 수득하였다. 조 생성물을 직접 후속 단계에 추가 정제 없이 사용하였다. ^1H NMR 분석은 이것이 목적 생성물 (MeOH를 갖는 유도체)임을 나타내었다. ^1H -NMR (300 MHz, CDCl_3) δ 7.81-7.77 (m, 2H), 7.63-7.59 (m, 2H), 7.46-7.40 (m, 2H), 7.40-7.31 (m, 2H), 5.33 (s, 1H), 4.42 (d, $J=3.0$ Hz, 2H), 4.24 (t, $J=6.0$ Hz, 1H), 3.74-3.67 (m, 3H), 3.50 (d, $J=3.0$ Hz, 2H), 2.59 (t, $J=6.0$ Hz, 2H).

[0672] 단계 2. 화합물 66의 합성

[0673] ACN (100 mL, 190.24 mmol, 75.00 당량) 중 4-포르밀-2-니트로페놀 (화합물 65, 4.21 g, 25.19 mmol, 1.00 당량) 및 Ag_2O (7.00 g, 30.20 mmol, 1.20 당량)의 교반 용액에 N_2 분위기 하에 실온에서 메틸 (2S,3S,4S,5R,6R)-3,4,5-트리스(아세틸옥시)-6-브로모옥산-2-카르복실레이트 (화합물 64, 10.00 g, 25.17 mmol, 1.00 당량)를 조

금씩 첨가하였다. 생성된 혼합물을 N₂ 분위기 하에 실온에서 밤새 교반하였다. LCMS는 반응이 완결되었음을 나타내었다. 생성된 혼합물을 여과하고, 필터 케이크를 DCM (50 mL x 3)으로 세척하였다. 여과물을 감압 하에 농축시켰다. 잔류물을 실리카 겔 칼럼 크로마토그래피에 의해 PE/EA(PE:EA=1:2)로 용리시키면서 정제하여 메틸 (2S,3S,4S,5R,6S)-3,4,5-트리스(아세틸옥시)-6-(4-포르밀-2-니트로페녹시)옥산-2-카르복실레이트 (화합물 66, 10.5 g, 86%)를 백색 고체로서 수득하였다. ¹H-NMR 분석은 이것이 목적 생성물임을 나타내었다. LCMS(ES, m/z):484 [M+1]⁺. ¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃) δ 10.00 (s, 1H), 8.34 (s, 1H), 8.13-8.09 (m, 1H), 7.52 (d, J=3.0 Hz, 1H), 5.47-5.29 (m, 4H), 4.37-4.35 (m, 1H), 3.75-3.73 (m, 3H), 2.17-2.06 (m, 9H).

[0674] 단계 3. 화합물 67의 합성

[0675] MeOH (50 mL) 중 메틸 (2S,3S,4S,5R,6S)-3,4,5-트리스(아세틸옥시)-6-(4-포르밀-2-니트로페녹시)옥산-2-카르복실레이트 (화합물 66, 6.00 g, 12.41 mmol, 1.00 당량)의 교반 용액에 N₂ 분위기 하에 실온에서 NaBH₄ (0.47 g, 12.42 mmol, 1.00 당량)를 조금씩 첨가하였다. 생성된 혼합물을 N₂ 분위기 하에 실온에서 2시간 동안 교반하였다. LCMS는 반응이 완결되었음을 나타내었다. 반응물을 실온에서 물로 켄칭하였다. 생성물을 Na₂SO₄에 의해 건조시켰다. 생성된 혼합물을 여과하고, 필터 케이크를 DCM으로 세척하였다. 생성된 혼합물을 진공 하에 농축시켜 메틸 (2S,3S,4S,5R,6S)-3,4,5-트리스(아세틸옥시)-6-[4-(히드록시메틸)-2-니트로페녹시]옥산-2-카르복실레이트 (화합물 67, 5.5 g, 91%)를 고체로서 수득하였다. LCMS(ES, m/z):486 [M+H]⁺.

[0676] 단계 4. 화합물 68의 합성

[0677] EA (60 mL) 중 메틸 (2S,3S,4S,5R,6S)-3,4,5-트리스(아세틸옥시)-6-[4-(히드록시메틸)-2-니트로페녹시]옥산-2-카르복실레이트 (화합물 67, 5.50 g, 11.33 mmol, 1.00 당량)의 교반 혼합물에 실온에서 Pd/C (1.10 g, 10%)를 조금씩 첨가하였다. 생성된 혼합물을 H₂ 분위기 하에 실온에서 16시간 동안 교반하였다. LCMS는 반응이 완결되었음을 나타내었다. 생성된 혼합물을 여과하고, 필터 케이크를 DCM 및 MeOH로 세척하고, 여과물을 진공 하에 농축시켜 메틸 (2S,3S,4S,5R,6S)-3,4,5-트리스(아세틸옥시)-6-[2-아미노-4-(히드록시메틸)페녹시]옥산-2-카르복실레이트 (화합물 68, 4.0 g, 77%)를 고체로서 수득하였다. 조 생성물을 후속 단계에 직접 추가 정제 없이 사용하였다. LCMS(ES, m/z):456[M+H]⁺.

[0678] 단계 5. 화합물 70의 합성

[0679] THF (10 mL) 중 메틸 (2S,3S,4S,5R,6S)-3,4,5-트리스(아세틸옥시)-6-[2-아미노-4-(히드록시메틸)페녹시]옥산-2-카르복실레이트 (화합물 68, 1.00 g, 2.19 mmol, 1.00 당량) 및 NaHCO₃ (0.20 g, 2.40 mmol, 1.1 당량)의 교반 용액에 N₂ 분위기 하에 0℃에서 9H-플루오렌-9-일메틸 N-(3-클로로-3-옥소프로필)카르바메이트 (화합물 69, 0.87 g, 2.62 mmol, 1.20 당량)를 조금씩 첨가하였다. 생성된 혼합물을 N₂ 분위기 하에 0℃에서 6시간 동안 교반하였다. LCMS는 반응이 완결되었음을 나타내었다. 반응물을 실온에서 물로 켄칭하였다. 생성된 혼합물을 DCM으로 추출하였다. 합한 유기 층을 감압 하에 농축시켰다. 잔류물을 실리카 겔 칼럼 크로마토그래피에 의해 PE/EA(EA=100%)로 용리시키면서 정제하여 메틸 (2S,3S,4S,5R,6S)-3,4,5-트리스(아세틸옥시)-6-[2-(3-[(9H-플루오렌-9-일메톡시)카르보닐]아미노]프로판아미도)-4-(히드록시메틸)페녹시]옥산-2-카르복실레이트 (화합물 70, 1.1 g, 66%)를 담황색 고체로서 수득하였다. LCMS(ES, m/z):749 [M+H]⁺.

[0680] 단계 6. 화합물 72의 합성

[0681] DMF (15 mL) 중 메틸 (2S,3S,4S,5R,6S)-3,4,5-트리스(아세틸옥시)-6-[2-(3-[(9H-플루오렌-9-일메톡시)카르보닐]아미노]프로판아미도)-4-(히드록시메틸)페녹시]옥산-2-카르복실레이트 (화합물 70, 1.50 g, 2.00 mmol, 1.00 당량) 및 비스(4-니트로페닐) 카르보네이트 (화합물 71, 0.68 g, 2.24 mmol, 1.12 당량)의 교반 혼합물에 N₂ 분위기 하에 0℃에서 DIEA (0.52 g, 4.01 mmol, 2.00 당량)를 조금씩 첨가하였다. 생성된 혼합물을 질소 분위기 하에 실온에서 밤새 교반하였다. LCMS는 반응이 완결되었음을 나타내었다. 반응 혼합물을 역 플래쉬 크로마토그래피에 의해 하기 조건: 칼럼, C18 실리카 겔; 이동상, 물 중 ACN (0.1% FA), 40분 내 10%에서 90% 구배; 검출기, UV 254 nm를 사용하여 정제하였다. 수집된 분획을 진공 하에 농축 건조시켜 메틸 (2S,3S,4S,5R,6S)-3,4,5-트리스(아세틸옥시)-6-[2-(3-[(9H-플루오렌-9-일메톡시)카르보닐]아미노]프로판아미도)-4-[(4-니트로페녹시)카르보닐]옥시]메틸]페녹시]옥산-2-카르복실레이트 (화합물 72, 1.4 g, 48%)를 황색 고체로서

수득하였다. LCMS(ES, m/z):914 [M+H]⁺.

[0682] 단계 7. 화합물 73의 합성

[0683] DMF (10 mL) 중 메틸 (2S,3S,4S,5R,6S)-3,4,5-트리스(아세틸옥시)-6-[2-(3-[(9H-플루오렌-9-일메톡시)카르보닐]아미노]프로판아미도)-4-[[4-(4-니트로페녹시카르보닐)옥시]메틸]페녹시]옥산-2-카르복실레이트 (화합물 72, 1.00 g, 1.09 mmol, 1.00 당량) 및 1-(3-클로로-4-[2-(2-(메틸아미노)에톡시)에틸]페닐)-3-[[2-(2,6-디옥소피페리딘-3-일)-1-옥소-3H-이소인돌-5-일]메틸]우레아 (신규분해제 P1, 0.58 g, 1.09 mmol, 1.00 당량)의 교반 혼합물에 N₂ 분위기 하에 실온에서 HOBt (1.18 g, 8.72 mmol, 8.00 당량) 및 2,4-디메틸피리딘 (1.07 g, 8.72 mmol, 8.00 당량)을 조금씩 첨가하였다. 생성된 혼합물을 N₂ 분위기 하에 실온에서 16시간 동안 교반하였다. LCMS는 반응이 완결되었음을 나타내었다. 생성된 혼합물을 추가 정제에 사용하였다. 잔류물을 역 플래쉬 크로마토그래피에 의해 하기 조건: 칼럼, C18 실리카 겔; 이동상, 물 중 ACN (0.1% FA), 40분 내 10%에서 80% 구배; 검출기, UV 254 nm를 사용하여 정제하였다. 수집된 분획을 진공 하에 농축시켜 메틸 (2S,3S,4S,5R,6S)-3,4,5-트리스(아세틸옥시)-6-[4-[[[2-(2-[2-클로로-4-[[[2-(2,6-디옥소피페리딘-3-일)-1-옥소-3H-이소인돌-5-일]메틸]카르바모일]아미노]페닐]에톡시)에틸](메틸)카르바모일]옥시)메틸]-2-(3-[(9H-플루오렌-9-일메톡시)카르보닐]아미노]프로판아미도)페녹시]옥산-2-카르복실레이트 (화합물 73 (800 mg, 56%)를 고체로서 수득하였다. LCMS(ES, m/z):1302[M+H]⁺.

[0684] 단계 8. 화합물 74의 합성

[0685] THF (80 mL) 중 메틸 (2S,3S,4S,5R,6S)-3,4,5-트리스(아세틸옥시)-6-[4-[[[2-(2-[2-클로로-4-[[[2-(2,6-디옥소피페리딘-3-일)-1-옥소-3H-이소인돌-5-일]메틸]카르바모일]아미노]페닐]에톡시)에틸](메틸)카르바모일]옥시)메틸]-2-(3-[(9H-플루오렌-9-일메톡시)카르보닐]아미노]프로판아미도)페녹시]옥산-2-카르복실레이트 (화합물 73 (800.00 mg, 0.61 mmol, 1.00 당량)의 교반 혼합물에 N₂ 분위기 하에 실온에서 HCl (6N, 80 mL)을 조금씩 첨가하였다. 생성된 혼합물을 질소 분위기 하에 50℃에서 3시간 동안 교반하였다. LCMS는 반응이 완결되었음을 나타내었다. 생성된 혼합물을 진공 하에 농축시켰다. 잔류물을 역 플래쉬 크로마토그래피에 의해 하기 조건: 칼럼, C18 실리카 겔; 이동상, 물 중 ACN (0.1% FA), 40분 내 0%에서 80% 구배; 검출기, UV 254 nm를 사용하여 정제하였다. 수집된 분획을 동결건조시켜 (2S,3S,4S,5R,6S)-6-[4-[[[2-(2-[2-클로로-4-[[[2-(2,6-디옥소피페리딘-3-일)-1-옥소-3H-이소인돌-5-일]메틸]카르바모일]아미노]페닐]에톡시)에틸](메틸)카르바모일]옥시)메틸]-2-(3-[(9H-플루오렌-9-일메톡시)카르보닐]아미노]프로판아미도)페녹시]-3,4,5-트리히드록시옥산-2-카르복실산 (화합물 74, 230 mg, 32%)을 백색 고체로서 수득하였다. LCMS(ES, m/z):1162[M+H]⁺.

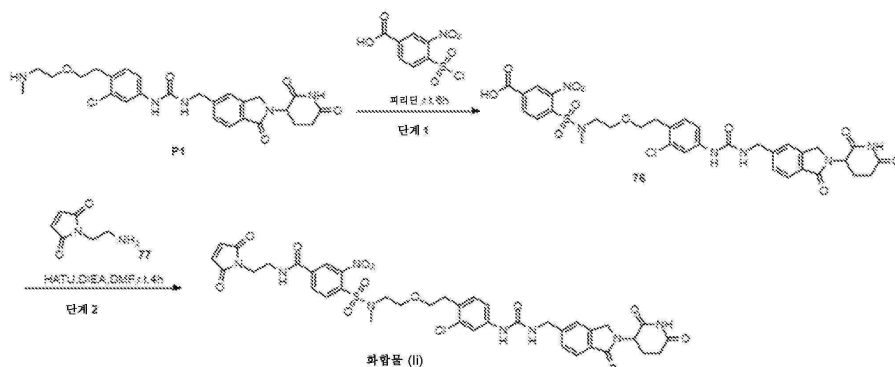
[0686] 단계 9. 화합물 75의 합성

[0687] DMF (2 mL) 중 (2S,3S,4S,5R,6S)-6-[4-[[[2-(2-[2-클로로-4-[[[2-(2,6-디옥소피페리딘-3-일)-1-옥소-3H-이소인돌-5-일]메틸]카르바모일]아미노]페닐]에톡시)에틸](메틸)카르바모일]옥시)메틸]-2-(3-[(9H-플루오렌-9-일메톡시)카르보닐]아미노]프로판아미도)페녹시]-3,4,5-트리히드록시옥산-2-카르복실산, 74 (230 mg, 0.2 mmol, 1.00 당량)의 교반 용액에 질소 분위기 하에 실온에서 피페리딘 (0.4 mL)을 조금씩 첨가하였다. 생성된 혼합물을 질소 분위기 하에 실온에서 10분 동안 교반하였다. LCMS는 반응이 완결되었음을 나타내었다. 생성된 혼합물을 직접 정제용 HPLC에 의해 하기 조건 (칼럼: 엑셀렉트 CSH 정제용 C18 OBD 칼럼, 19x250mm, 5μm; 이동상 A:물 (0.05%TFA), 이동상 B:ACN; 유량: 25 mL/분; 구배: 7분 내 20 B에서 40 B; 220 nm; RT1:5.78분)을 사용하여 추가로 정제하여 (2S,3S,4S,5R,6S)-6-[2-(3-아미노프로판아미도)-4-[[[2-(2-[2-클로로-4-[[[2-(2,6-디옥소피페리딘-3-일)-1-옥소-3H-이소인돌-5-일]메틸]카르바모일]아미노]페닐]에톡시)에틸](메틸)카르바모일]옥시)메틸]페녹시]-3,4,5-트리히드록시옥산-2-카르복실산 (화합물 75, 35 mg, 18%)을 백색 고체로서 수득하였다. LCMS(ES, m/z): 940[M+H]⁺.

[0688] 단계 10. 화합물 (Ih)의 합성

[0689] DMF (2.0 mL) 중 (2S,3S,4S,5R,6S)-6-[2-(3-아미노프로판아미도)-4-[[[2-(2-[2-클로로-4-[[[2-(2,6-디옥소피페리딘-3-일)-1-옥소-3H-이소인돌-5-일]메틸]카르바모일]아미노]페닐]에톡시)에틸](메틸)카르바모일]옥시)메틸]페녹시]-3,4,5-트리히드록시옥산-2-카르복실산 (화합물 75, 110 mg, 0.12 mmol, 1.00 당량) 및 비스(2,5-디옥소피롤리딘-1-일) 펜탄디오에이트 (화합물 76, 46 mg, 0.14 mmol, 1.2 당량)의 교반 용액에 질소 분위기 하에 실온에서 DIEA (30 mg, 0.23 mmol, 2.0 당량)를 조금씩 첨가하였다. 생성된 혼합물을 질소 분위기 하에 실온에

서 1시간 동안 교반하였다. LCMS는 반응이 완결되었음을 나타내었다. 반응 혼합물을 정제용 HPLC에 의해 하기 조건 (칼럼: 키네틱스(Kinetex) EVO 정제용 C18, 30*150, 5um; 이동상 A: 물(0.05%TFA), 이동상 B: ACN; 유량: 60 mL/분; 구배: 7분 내 21% B에서 41% B, 41% B; 파장: 254 nm; RT1(분): 5.8)을 사용하여 정제하였다. 수집된 분획을 동결건조시켜 (2S,3S,4S,5R,6S)-6-{4-[[[2-(2-{2-클로로-4-[[[2-(2,6-디옥소피페리딘-3-일)-1-옥소-3H-이소인돌-5-일]메틸}카르바모일)아미노]페닐]에톡시)에틸](메틸)카르바모일)옥시)메틸]-2-(3-{5-[(2,5-디옥소피롤리딘-1-일)옥시]-5-옥소펜탄아미도}프로판아미도)페녹시}-3,4,5-트리히드록시옥산-2-카르복실산 (화합물 (Ih), 48 mg, 34%)을 백색 고체로서 수득하였다. LCMS(ES, m/z): 1151 [M+H]⁺, 1173 [M+Na]⁺. ¹H-NMR(300MHz, DMSO-d₆): 12.80 (br s, 1H), 10.98 (s, 1H), 9.08 (s, 1H), 8.79 (s, 1H), 8.18 (s, 1H), 7.96 (s, 1H), 7.68-7.66 (m, 2H), 7.51 (s, 1H), 7.44 (d, J=8.1 Hz, 1H), 7.25-7.00 (m, 4H), 6.82-6.80 (m, 1H), 5.86 (s, 1H), 5.39-5.30 (m, 2H), 5.14-5.07 (m, 1H), 4.97 (s, 2H), 4.84 (d, J=7.2 Hz, 1H), 4.47-4.27 (m, 4H), 3.90 (d, J=9.6 Hz, 1H), 3.56-3.48 (m, 4H), 3.45-3.36 (m, 6H), 2.95-2.80 (m, 8H), 2.75-2.65 (m, 3H), 2.62-2.55 (m, 2H), 2.49-2.35 (m, 1H), 2.21-2.16 (m, 2H), 2.01-1.95 (m, 1H), 1.85-1.80 (m, 2H).



[0690]

[0691] 반응식 11: 신규분해제 P1-링커 복합체 (화합물 (Ii))의 합성

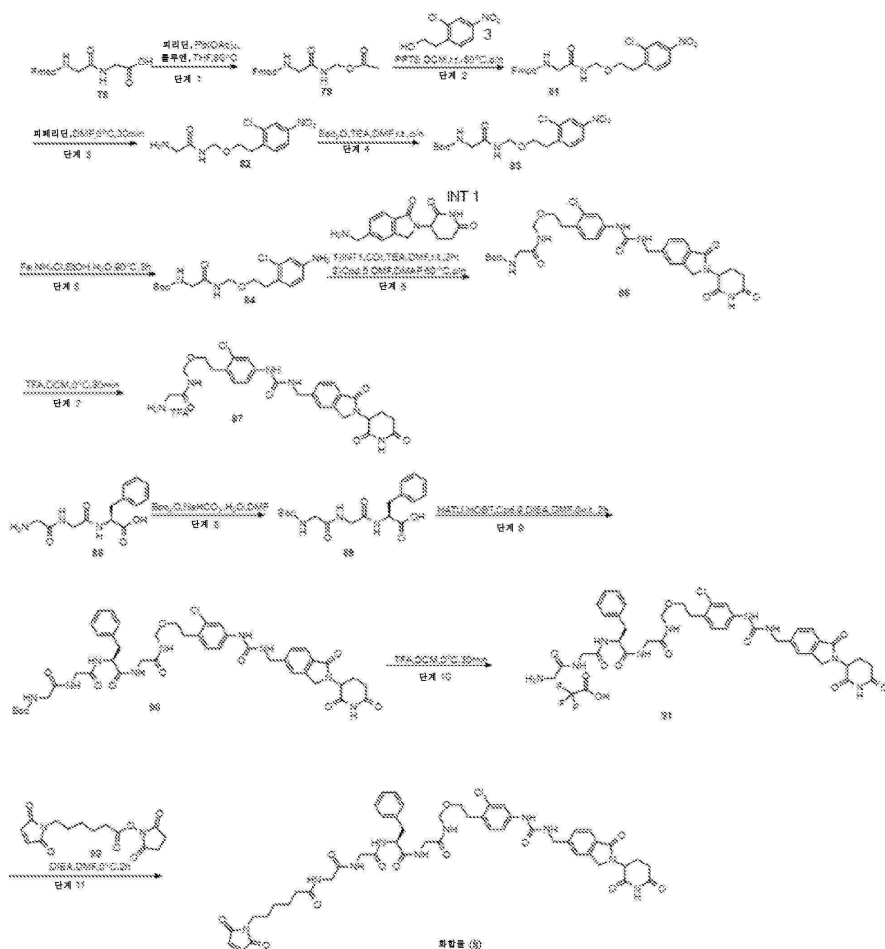
[0692] 단계 1. 화합물 76의 합성

[0693] DMF (8 mL) 중 1-(3-클로로-4-[2-[2-(메틸아미노)에톡시)에틸]페닐)-3-[[2-(2,6-디옥소피페리딘-3-일)-1-옥소-3H-이소인돌-5-일]메틸]우레아 (화합물 P1, 180 mg, 0.34 mmol, 1.00 당량)의 교반 용액에 질소 분위기 하에 0 °C에서 TEA (104 mg, 1.02 mmol, 3.0 당량) 및 4-(클로로술포닐)-3-니트로벤조산 (181 mg, 0.68 mmol, 2.00 당량)을 조금씩 첨가하였다. 생성된 혼합물을 질소 분위기 하에 0°C에서 4시간 동안 교반하였다. LCMS는 반응이 완결되었음을 나타내었다. 생성된 혼합물을 추가 정제에 사용하였다. 잔류물을 역 플래쉬 크로마토그래피에 의해 하기 조건: 칼럼, C18 실리카 겔; 이동상, 물 중 ACN (0.1% FA), 10분 내 10%에서 60% 구배; 검출기, UV 254 nm을 사용하여 정제하였다. 혼합물을 동결건조시켜 4-[[2-(2-[2-클로로-4-[[[2-(2,6-디옥소피페리딘-3-일)-1-옥소-3H-이소인돌-5-일]메틸]카르바모일)아미노]페닐]에톡시)에틸](메틸)술파모일]-3-니트로벤조산, (화합물 76, 70 mg, 27%)을 담황색 고체로서 수득하였다. LCMS(ES, m/z): 757 [M+1]⁺.

[0694] 단계 2 화합물 (Ii)의 합성

[0695] DMF (6 mL) 중 4-[[2-(2-[2-클로로-4-[[[2-(2,6-디옥소피페리딘-3-일)-1-옥소-3H-이소인돌-5-일]메틸]카르바모일)아미노]페닐]에톡시)에틸](메틸)술파모일]-3-니트로벤조산, (화합물 76, 60 mg, 0.08 mmol, 1.00 당량)의 교반 혼합물에 질소 분위기 하에 실온에서 HATU (45 mg, 0.12 mmol, 1.5 당량), 1-(2-아미노에틸)피롤-2,5-디온 히드록로라이드 (화합물 77, 17 mg, 0.10 mmol, 1.20 당량) 및 DIEA (31 mg, 0.24 mmol, 3.0 당량)를 조금씩 첨가하였다. 생성된 혼합물을 질소 분위기 하에 실온에서 4시간 동안 교반하였다. LCMS는 반응이 완결되었음을 나타내었다. 잔류물을 정제용 HPLC (칼럼: 엑스브리지 정제용 페닐 OBD 칼럼, 19x150mm 5um 13nm; 이동상 A: 물 (0.05%TFA), 이동상 B:ACN; 유량:25 mL/분; 구배: 10분 내에 25 B에서 43 B; 220 nm; RT1:11.97분)에 의해 정제하였다. 수집된 분획을 동결건조시켜 4-[[2-(2-[2-클로로-4-[[[2-(2,6-디옥소피페리딘-3-일)-1-옥소-3H-이소인돌-5-일]메틸]카르바모일)아미노]페닐]에톡시)에틸](메틸)술파모일)-N-[2-(2,5-디옥소피롤-1-일)에틸]-3-니트로벤즈아미드 (화합물 (Ii), 27 mg, 36%)를 백색 고체로서 수득하였다. LCMS(ES, m/z): 879,881 [M+H]. ¹H NMR (300 MHz, DMSO-d₆) δ 11.00 (s, 1H), 9.01 (t, J=6.0 Hz, 1H), 8.82 (s, 1H), 8.20 (s, 1H),

8.11 (s, 2H), 7.71-7.67 (m, 2H), 7.52 (s, 1H), 7.44 (d, J=3.0 Hz, 1H), 7.21-7.12 (m, 2H), 7.02 (s, 2H), 6.84 (t, J=6.0 Hz, 1H), 5.14-5.08 (m, 1H), 4.48-4.28 (m, 4H), 3.62-3.50(m, 6H), 3.40-3.28 (m, 2H), 2.95-2.85(m, 4H), 2.80-2.73 (m, 2H), 2.65-2.60 (s, 1H), 2.41-2.27 (m, 1H), 2.05-1.95 (m, 1H).



[0696]

[0697] 반응식 12: 신규분해제 P1 - GGFG 링커 복합체 (화합물 (Ij))의 합성

[0698] 단계 1. 화합물 79의 합성

[0699] THF (300 mL) 및 톨루엔 (100 mL) 중 (2-[[[(9H-플루오렌-9-일메톡시)카르보닐]아미노]-아세트아미도]아세트산 (화합물 78, 10.00 g, 28.22 mmol, 1.00 당량) 및 Pb(OAc)₄ (15.02 g, 33.86 mmol, 1.20 당량)의 교반 혼합물에 피리딘 (2.59 g, 32.74 mmol, 1.16 당량)을 질소 분위기 하에 실온에서 적가하였다. 생성된 혼합물을 질소 분위기 하에 80°C에서 밤새 교반하였다. LCMS는 반응이 완결되었음을 나타내었다. 혼합물을 실온으로 냉각되도록 하였다. 생성된 혼합물을 여과하고, 필터 케이크를 에틸 아세테이트 (20 mL)로 세척하였다. 여과물을 감압 하에 농축시켰다. 잔류물을 에틸 아세테이트 (20 mL) 중에 용해시키고, 물, 염수로 세척하고, 무수 Na₂SO₄ 상에서 건조시켰다. 여과한 후, 여과물을 감압 하에 농축시켰다. 잔류물을 실리카 겔 칼럼 크로마토그래피에 의해 PE/EtOAc (1:4)로 용리시키면서 정제하여 (2-[[[(9H-플루오렌-9-일메톡시)카르보닐]아미노]-아세트아미도]메틸 아세테이트 (화합물 79, 6.5g, 56%)를 백색 고체로서 수득하였다. LCMS (ESI, ms): 391[M+Na]⁺. ¹H NMR (300MHz, CDCl₃) δ 7.80(d, J=7.5Hz, 2H), 7.62(d, J=7.5Hz, 2H), 7.45(t, J =7.5Hz, 2H), 7.36(d, J =7.5Hz, 2H), 7.18(br s, 1H), 5.48(br s, 1H), 5.28(d, J =7.2Hz, 2H), 4.48(d, J =6.6Hz, 2H), 4.26(t, J =6.6Hz, 1H), 3.93(d, 5.4Hz, 2H), 2.08(s, 3H).

[0700] 단계 2. 화합물 81의 합성

[0701] DCM (40 mL) 중 (2-[[[(9H-플루오렌-9-일메톡시)카르보닐]아미노]-아세트아미도]메틸 아세테이트, 79 (2.00 g, 5.43 mmol, 1.00 당량) 및 2-(2-클로로-4-니트로페닐)에탄올 (화합물 3, 3.20 g, 15.85 mmol, 2.92 당량)의 교반 혼합물에 질소 분위기 하에 0°C에서 PPTS (400 mg, 1.59 mmol, 0.29 당량)를 적가하였다. 생성된 혼합물을

질소 분위기 하에 45℃에서 밤새 교반하였다. LCMS에 의해 40% 목적 생성물을 검출할 수 있었다. 혼합물을 실온으로 냉각되도록 하였다. 반응물을 물/얼음으로 켄칭하였다. 생성된 혼합물을 EtOEt (3 x 20 mL)로 추출하였다. 합한 유기 층을 염수 (30 mL)로 세척하고, 무수 Na₂SO₄ 상에서 건조시켰다. 여과한 후, 여과물을 감압 하에 농축시켰다. 잔류물을 실리카 겔 칼럼 크로마토그래피에 의해 PE/EtOAc (1:9)로 용리시키면서 정제하여 9H-플루오렌-9-일메틸 N-([2-(2-클로로-4-니트로페닐)에톡시]메틸)카르바모일)메틸)카르바메이트 (화합물 81, 1.7g, 55%)를 백색 고체로서 수득하였다. LCMS (ESI, ms): 510, 512[M+H]⁺. ¹H NMR (300MHz, DMSO-d₆): δ 8.58 (t, J=5.1Hz, 1H), 8.22 (dd, J =12, 2.4Hz, 1H), 7.89 (d, J =7.5Hz, 1H), 7.71-7.54 (m, 4H), 7.43-7.29 (m, 4H), 4.56 (d, J =6.9Hz, 2H), 4.30-4.16 (m, 3H), 3.70-3.61(m, 4H), 3.04 (t, J =6.3Hz, 2H).

[0702] 단계 3. 화합물 82의 합성

[0703] DMF(5.0 mL) 중 9H-플루오렌-9-일메틸 N-([2-(2-클로로-4-니트로페닐)에톡시]메틸)카르바모일)메틸)카르바메이트 (화합물 81, 1.60 g, 3.14 mmol, 1.00 당량)의 교반 혼합물에 질소 분위기 하에 실온에서 1시간 동안 교반하였다. LCMS는 반응이 완결되었음을 나타내었다. 반응 혼합물을 역 플래쉬 크로마토그래피에 의해 하기 조건: 칼럼, C18 실리카 겔; 이동상, 물 중 ACN (0.05%TFA), 40분 내 0%에서 50% 구배; 검출기, UV 254 nm를 사용하여 정제하였다. 이에 따라 2-아미노-N-([2-(2-클로로-4-니트로페닐)에톡시]메틸)아세트아미드 (화합물 82, 750 mg, 76%)를 황색 오일로서 수득하였다. LCMS (ESI, ms) 288[M+H]⁺, 329[M+H+ACN]⁺

[0704] 단계 4. 화합물 83의 합성

[0705] DMF (10.00 mL) 중 2-아미노-N-([2-(2-클로로-4-니트로페닐)에톡시]메틸)아세트아미드 (화합물 82, 750 mg, 2.61 mmol, 1.00 당량) 및 Boc₂O (580 mg, 2.66 mmol, 1.02 당량)의 교반 혼합물에 H₂O (10.00 mL) 중 NaHCO₃(477 mg, 5.68 mmol, 2.18 당량)를 0℃에서 적가하였다. 생성된 혼합물을 실온에서 3시간 동안 교반하였다. LCMS는 반응이 완결되었음을 나타내었다. 반응물을 물 (20 mL)의 첨가에 의해 켄칭하였다. 생성된 혼합물을 EtOEt (3 x 20mL)로 추출하였다. 합한 유기 층을 염수 (20 mL)로 세척하고, 무수 Na₂SO₄ 상에서 건조시켰다. 여과한 후, 여과물을 감압 하에 농축시켰다. 잔류물을 실리카 겔 칼럼 크로마토그래피에 의해 PE/EtOAc (1:2)로 용리시키면서 정제하여 tert-부틸 N-([2-(2-클로로-4-니트로페닐)에톡시]메틸)카르바모일)메틸)카르바메이트 (화합물 83, 650mg, 58%)를 황색 오일로서 수득하였다. LCMS (ESI, ms), 388[M+H]⁺, 332[M+H-56]⁺. ¹H NMR (400MHz, CDCl₃) δ 8.21(d, J=2.4Hz, 1H), 8.04(d, J=8.4Hz, 2H), 7.46(d, J =8.4Hz, 1H), 7.05(br s, 1H), 5.25(br s, 1H), 4.73(d, J =7.2Hz, 2H), 3.81-3.73(m, 4H), 3.34-3.32(m, 2H), 3.08(t, J =6.8Hz, 2H), 1.42(s, 9H).

[0706] 단계 5. 화합물 84의 합성

[0707] EtOH (9.00 mL) 중 tert-부틸 N-([2-(2-클로로-4-니트로페닐)에톡시]메틸)카르바모일)메틸)카르바메이트 (화합물 83, 650 mg, 1.68 mmol, 1.00 당량) 및 Fe(260 mg, 4.66 mmol, 2.78 당량)의 교반 혼합물에 H₂O (3.00 mL) 중 NH₄Cl (910 mg, 17.01 mmol, 10.1 당량)을 실온에서 적가하였다. 생성된 혼합물을 90℃에서 4시간 동안 교반하였다. LCMS는 반응이 완결되었음을 나타내었다. 혼합물을 실온으로 냉각되도록 하였다. 생성된 혼합물을 진공 하에 농축시켰다. 생성된 혼합물을 EtOAc (3 x 20mL)로 추출하였다. 합한 유기 층을 염수 (20 mL)로 세척하고, 무수 Na₂SO₄ 상에서 건조시켰다. 여과한 후, 여과물을 감압 하에 농축시켰다. 잔류물을 실리카 겔 칼럼 크로마토그래피에 의해 PE/EtOAc (1:1)로 용리시키면서 정제하여 tert-부틸 N-([2-(4-아미노-2-클로로페닐)에톡시]메틸)카르바모일)메틸)카르바메이트 (화합물 84, 500 mg, 83%)를 황색 고체로서 수득하였다. LCMS (ESI, ms): 358[M+H]⁺, 380[M+Na]⁺. ¹H NMR (300MHz, CDCl₃) δ 7.02-6.96(m, 2H), 6.68(d, J=2.4Hz, 1H), 6.52-6.49(m, 1H), 5.29(br s, 1H), 4.74(d, J =6.9Hz, 2H), 3.80-3.78(m, 2H), 3.69-3.63(m, 2H), 2.88(t, J =7.2Hz, 2H), 1.45(s, 9H).

[0708] 단계 6. 화합물 86의 합성

[0709] DMF(5.00 mL) 중 3-[5-(아미노메틸)-1-옥소-3H-이소인돌-2-일]피페리딘-2,6-디온 히드로클로라이드 (화합물 85, 398 mg, 1.28 mmol, 0.92 당량) 및 CDI(450 mg, 2.78 mmol, 1.99 당량)의 교반 혼합물에 0℃에서 TEA(300 mg,

2.96 mmol, 2.12 당량)를 첨가하였다. 생성된 혼합물을 실온에서 2시간 동안 교반하였다. 상기 혼합물에 tert-부틸 N-([[(2-(4-아미노-2-클로로페닐)에톡시)메틸]카르바모일)메틸]카르바메이트 (화합물 84, 500 mg, 1.40 mmol, 1.00 당량) 및 DMAP (550 mg, 4.50 mmol, 3.22 당량)를 조금씩 첨가하였다. 생성된 혼합물을 60℃에서 추가로 밤새 교반하였다. LCMS는 반응이 완결되었음을 나타내었다. 혼합물을 실온으로 냉각되도록 하였다. 반응 혼합물을 역 플래쉬 크로마토그래피에 의해 하기 조건: 칼럼, C18 실리카 겔; 이동상, 물 중 ACN (0.1% FA), 30분 내 0%에서 50% 구배; 검출기, UV 254 nm를 사용하여 정제하였다. 이에 따라 tert-부틸 N-([[(2-(2-클로로-4-([[(2-(2,6-디옥소피페리딘-3-일)-1-옥소-3H-이소인돌-5-일]메틸]카르바모일)아미노]페닐)에톡시)메틸]카르바모일)메틸]카르바메이트 (화합물 86, 550mg, 60%)를 담갈색 고체로서 수득하였다. LCMS (ESI, ms): 657[M+H]⁺, 601[M+H-56]⁺, 557[M+H-100]⁺.

[0710] 단계 7. 화합물 87의 합성

[0711] DCM (5.00 mL) 중 tert-부틸 N-([[(2-(2-클로로-4-([[(2-(2,6-디옥소피페리딘-3-일)-1-옥소-3H-이소인돌-5-일]메틸]카르바모일)아미노]페닐)에톡시)메틸]카르바모일)메틸]-카르바메이트 (화합물 86, 530 mg, 0.80 mmol, 1.00 당량)의 교반 혼합물에 0℃에서 TFA (1.00 mL)를 첨가하였다. 생성된 혼합물을 0℃에서 30분 동안 교반하였다. LCMS는 반응이 완결되었음을 나타내었다. 생성된 혼합물을 감압 하에 농축시켰다. 이에 따라 2-아미노-N-([[(2-(2-클로로-4-([[(2-(2,6-디옥소피페리딘-3-일)-1-옥소-3H-이소인돌-5-일]메틸]카르바모일)아미노]페닐)에톡시)메틸]아세트아미드; 트리플루오로아세트산 (화합물 87, (510 mg, 순도:64%, 수율: 60%)을 회백색 고체로서 수득하였다. LCMS (ESI, ms):557[M+H-TFA]⁺

[0712] 단계 8. 화합물 89의 합성

[0713] H₂O (40.00 mL) 중 (2S)-2-[2-(2-아미노아세트아미도)아세트아미도]-3-페닐프로판산 (화합물 88, 2.00 g, 7.16 mmol, 1.00 당량) 및 NaHCO₃ (1.80 g, 21.41 mmol, 3.00 당량)의 교반 혼합물에 DMF (40.00 mL) 중 Boc₂O (1.86 g, 8.52 mmol, 1.20 당량)를 0℃에서 적가하였다. 생성된 혼합물을 실온에서 밤새 교반하였다. LCMS는 반응이 완결되었음을 나타내었다. 반응물을 실온에서 물로 킨칭하였다. 생성된 혼합물을 EtOEt (3 x 50 mL)로 추출하였다. 합한 유기 층을 염수 (50 mL)로 세척하고, 무수 Na₂SO₄ 상에서 건조시켰다. 여과한 후, 여과물을 감압 하에 농축시켰다. 잔류물을 역 플래쉬 크로마토그래피에 의해 하기 조건: 칼럼, C18 실리카 겔; 이동상, ACN 물 (0.05% TFA), 5%에서 60% 구배 (30분); 검출기, UV 220 nm를 사용하여 정제하였다. 백색 반고체로서 (2S)-2-(2-[2-[(tert-부톡시카르보닐)아미노]아세트아미도]아세트아미도)-3-페닐프로판산 (화합물 89, 1.8 g, 60%)을 수득하였다. LCMS (ESI,ms):380[M+H]⁺,324[M+H-56]⁺. ¹H NMR:(300MHz, DMSO-d₆) δ 8.17(d, J=8.1Hz, 1H), 7.93(t, J =5.7Hz, 1H), 7.31-7.20(m, 5H), 7.00(t, J =6.0Hz, 1H), 4.46-4.39(m, 1H),3.78-3.67(m, 2H), 3.56(d, J =5.7Hz, 2H), 3.09-3.02(m, 1H), 2.92-2.73(m, 1H), 1.39(s, 9H).

[0714] 단계 9. 화합물 90

[0715] DMF (5.00 mL) 중 (2S)-2-(2-[2-[(tert-부톡시카르보닐)아미노]아세트아미도]-아세트아미도)-3-페닐프로판산 (화합물 89, 340 mg, 0.90 mmol, 1.00 당량) 및 HATU (340 mg, 0.90 mmol, 1.00 당량)의 교반 혼합물에 HOBT (102 mg, 0.75 mmol, 0.84 당량)를 0℃에서 여러 부분으로 첨가하였다. 생성된 혼합물을 0℃에서 30분 동안 교반하였다. 상기 혼합물에 2-아미노-N-([[(2-(2-클로로-4-([[(2-(2,6-디옥소피페리딘-3-일)-1-옥소-3H-이소인돌-5-일]메틸]카르바모일)아미노]페닐)에톡시)메틸]아세트아미드; 트리플루오로아세트산 (화합물 87, 511 mg, 순도: 64%, 0.48 mmol, 0.54 당량) 및 DIEA (340 mg, 2.63 mmol, 2.94 당량)를 0℃에서 첨가하였다. 생성된 혼합물을 실온에서 추가로 2시간 동안 교반하였다. LCMS는 반응이 완결되었음을 나타내었다. 반응 혼합물을 역 플래쉬 크로마토그래피에 의해 하기 조건: 칼럼, C18 실리카 겔; 이동상, 물 중 ACN (0.1% FA), 30분 내 0%에서 50% 구배; 검출기, UV 220 nm를 사용하여 정제하였다. 수집된 분획을 진공 하에 농축시켰다. 이에 따라 tert-부틸 N-([[(1S)-1-([[(2-(2-클로로-4-([[(2-(2,6-디옥소피페리딘-3-일)-1-옥소-3H-이소인돌-5-일]메틸]카르바모일)아미노]페닐)에톡시)메틸]카르바모일)메틸]카르바모일]-2-페닐에틸]카르바모일)메틸]카르바메이트 (화합물 90, 210 mg, 48%)를 회백색 고체로서 수득하였다. LCMS (ESI, ms):918[M+H]⁺, 818[M+H-100]⁺. ¹H NMR:(400MHz, DMSO-d₆): δ 10.97(s, 1H), 8.79(s, 1H), 8.50(t, J=6.4Hz, 1H), 8.31(t, J=4.4Hz, 1H), 8.15(d, J =9.6Hz, 1H), 7.910(t, J =8.0Hz, 1H), 7.68-7.64(m, 2H), 7.49(s, 1H), 7.43(d, J =9.6Hz,

1H), 7.24-7.12(m, 7H), 7.00-6.95(m, 1H), 6.84(t, J =6.4Hz, 1H), 5.13-5.06(m, 1H), 4.55-4.27(m, 7H), 3.72-3.60(m, 6H), 3.75-3.67(m, 3H), 3.59-3.49(m, 5H), 3.07-3.01(m, 1H), 2.94-2.73(m, 4H), 2.62-2.54(m, 1H), 2.40-2.31(m, 1H), 2.01-1.94(m, 1H), 2.00-1.91(m, 1H), 1.35(s, 9H).

[0716] 단계 10. 화합물 91의 합성

[0717] DCM (5.00 mL) 중 tert-부틸 N-[[[[(1S)-1-[[[2-(2-클로로-4-[[[2-(2,6-디옥소피페리딘-3-일)-1-옥소-3H-이소인돌-5-일]메틸]카르바모일]아미노]페닐]에톡시)-메틸]카르바모일]메틸]카르바모일]-2-페닐에틸]카르바모일]메틸]카르바모일]-메틸]카르바메이트 (화합물 90, 140 mg, 0.15 mmol, 1.00 당량)의 교반 혼합물에 TFA (1.00 mL)를 0℃에서 적가하였다. 생성된 혼합물을 0℃에서 30분 동안 교반하였다. LCMS는 반응이 완결되었음을 나타내었다. 생성된 혼합물을 감압 하에 농축시켰다. 이에 따라 (2S)-2-[2-(2-아미노아세트아미도)아세트아미도]-N-[[[2-(2-클로로-4-[[[2-(2,6-디옥소피페리딘-3-일)-1-옥소-3H-이소인돌-5-일]메틸]카르바모일]아미노]페닐]에톡시)메틸]-카르바모일]메틸]-3-페닐프로판아미드; 트리플루오로아세트산 (화합물 91, 140 mg, 79%)을 회백색 고체로서 수득하였다. LCMS (ESI, ms):818[M+H-TFA]⁺.

[0718] 단계 11. 화합물 (Ij)의 합성

[0719] DMF(2.00 mL) 중 (2S)-2-[2-(2-아미노아세트아미도)아세트아미도]-N-[[[2-(2-클로로-4-[[[2-(2,6-디옥소피페리딘-3-일)-1-옥소-3H-이소인돌-5-일]메틸]카르바모일]아미노]페닐]-에톡시)메틸]카르바모일]메틸]-3-페닐프로판아미드; 트리플루오로아세트산 (화합물 91, 140 mg, 0.15 mmol, 1.00 당량) 및 DIEA(70 mg, 0.54 mmol, 3.61 당량)의 교반 혼합물에 2,5-디옥소피롤리딘-1-일 6-(2,5-디옥소피롤-1-일)헥사노에이트 (화합물 92, 70 mg, 0.23 mmol, 1.50 당량)를 0℃에서 조금씩 첨가하였다. 생성된 혼합물을 실온에서 2시간 동안 교반하였다. LCMS는 반응이 완결되었음을 나타내었다. 반응 혼합물을 직접 하기 조건: 칼럼: 엑스셀렉트 CSH 정제용 C18 OBD 칼럼, 19x250mm,5um; 이동상 A:물(0.1%FA), 이동상 B:ACN; 유량:25 mL/분; 구배: 7분 내에 25 B에서 50 B; 254 nm; RT1:6.35분에 의해 정제하고; 수집된 분획을 동결건조시켜 조 생성물을 수득하였다. 조 생성물을 하기 조건에 의해 재정제하였다: 칼럼: 키네텍스 EVO C18 칼럼, 30x150,5um; 이동상 A:물(0.05%TFA), 이동상 B:ACN; 유량:60 mL/분; 구배: 7분 내 20 B에서 40 B, 220 nm; RT1:6.77분; 수집된 분획을 동결건조시켜 N-[[[[(1S)-1-[[[2-(2-클로로-4-[[[2-(2,6-디옥소피페리딘-3-일)-1-옥소-3H-이소인돌-5-일]메틸]카르바모일]아미노]페닐]에톡시)메틸]카르바모일]메틸]카르바모일]-2-페닐에틸]카르바모일]메틸]카르바모일]메틸]-6-(2,5-디옥소피롤-1-일)헥산아미드 (화합물 (Ik), 22.8 mg, 14%)를 회백색 고체로서 수득하였다. LCMS (ESI, ms):1011[M+H]⁺.
¹H NMR:(400MHz, DMSO-d₆): δ 10.95(s, 1H), 8.79(s, 1H), 8.51(t, J=8.4Hz, 1H), 8.29(t, J =8.0Hz, 1H), 8.12-8.01(m, 3H), 7.70-7.66(m, 2H), 7.44(s, 1H), 7.42(d, J =8.0Hz, 1H), 7.23-7.16(m, 7H), 6.99(s, 2H), 6.82(t, J=8.0Hz, 1H), 5.13-5.09(m, 1H), 4.55-4.28(m, 7H), 3.72-3.60(m, 6H), 3.55-3.51(m, 2H), 3.36-3.34(m, 2H), 3.05-3.00(m, 1H), 2.94-2.72(m, 4H), 2.62-2.54(m, 1H), 2.40-2.32(m, 1H), 2.12-2.05(m, 2H), 2.00-1.91(m, 1H), 1.50-1.38(m, 4H), 1.19-1.10(m, 2H)

- 83 -

용액에 질소 분위기 하에 $\text{BH}_3\text{-Me}_2\text{S}$ (28.00 mL, 295.23 mmol, 2.65 당량)를 적가하였다. 생성된 혼합물을 질소 분위기 하에 70℃에서 2시간 동안 교반하였다. TLC (PE: EtOAc = 3:1)는 반응이 완결되었음을 나타내었다. 실온으로 냉각시킨 후, 생성된 혼합물을 진공 하에 농축시켰다. 잔류물을 실리카 겔 칼럼 크로마토그래피에 의해 PE/ EtOAc (3:1)로 용리시키면서 정제하여 2-(2-클로로-4-니트로페닐)에탄올 (화합물 94, 18.00 g, 80%)을 담황색 고체로서 수득하였다. ^1H NMR (300 MHz, CDCl_3) δ 8.27 (s, 1H), 8.10-8.07 (m, 1 H), 7.52 (d, J = 3 Hz, 1H), 3.96 (t, J = 6 Hz, 2H), 3.13 (t, J = 6 Hz, 2H).

[0725] 단계 2. 화합물 95의 합성

[0726] DCM (100.00 mL) 중 2-(2-클로로-4-니트로페닐)에탄올 (화합물 94, 5.00 g, 24.80 mmol, 1.00 당량)의 교반 용액에 NBS (6.62 g, 1.50 당량) 및 PPh_3 (9.76 g, 37.21 mmol, 1.50 당량)를 N_2 하에 실온에서 조금씩 첨가하였다. 생성된 혼합물을 N_2 하에 실온에서 밤새 교반하였다. TLC (PE: EtOAc = 10:1)는 반응이 완결되었음을 나타내었다. 반응물을 진공 하에 농축 건조시켰다. 잔류물을 실리카 겔 칼럼 크로마토그래피에 의해 PE/ EtOAc (4:1)로 용리시키면서 정제하여 1-(2-브로모에틸)-2-클로로-4-니트로벤젠 (화합물 95, 5.10g, 72%)을 적색 오일로서 수득하였다. ^1H NMR (400 MHz, DMSO-d_6) δ 8.28 (d, J = 2.4 Hz, 1H), 8.18 (dd, J = 8.4, 2.4 Hz, 1H), 7.73 (d, J = 8.4 Hz, 1H), 3.79 4(t, J = 6.8 Hz, 2H), 3.38 (t, J = 6.8 Hz, 2H).

[0727] 단계 3. 화합물 96의 합성

[0728] DMF (50.00 mL) 중 1-(2-브로모에틸)-2-클로로-4-니트로벤젠 (화합물 95, 5.00 g, 18.90 mmol, 1.00 당량)의 용액에 질소 분위기 하에 실온에서 티오아세트산칼륨 (2.16 g, 18.90 mmol, 1.00 당량)을 첨가하였다. 생성된 혼합물을 실온에서 2시간 동안 교반하였다. TLC (PE: EtOAc= 10:1)는 반응이 완결되었음을 나타내었다. 반응물을 물 (600.00 mL)로 희석하고, EtOAc (2000 mLx3)로 추출하였다. 합한 유기 층을 물 (200.00 mL), 염수 (200.00 mL)로 세척하고, 무수 Na_2SO_4 상에서 건조시키고, 진공 하에 농축 건조시켜 1-[[2-(2-클로로-4-니트로페닐)에틸]술폰닐]에테논 (화합물 96, 4.50 g, 85%)을 적색 오일로서 수득하였다. ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ 8.24 (d, J = 2.4 Hz, 1H), 8.07 (dd, J = 8.4, 2.4 Hz, 1H), 7.45 (d, J = 8.4 Hz, 1H), 3.20 - 3.05 (m, 4H), 2.34 (s, 3H).

[0729] 단계 4. 화합물 97의 합성

[0730] MeOH (300.00 mL) 중 1-[[2-(2-클로로-4-니트로페닐)에틸]술폰닐]에테논 (화합물 96, 2.00 g, 7.70 mmol, 1.00 당량)의 교반 용액에 N_2 하에 0℃에서 MeONa (6.93 mL, 37.33 mmol, 5.00 당량, MeOH 중 30%)를 첨가하였다. 생성된 혼합물을 0℃에서 N_2 하에 1시간 동안 교반하였다. TLC (PE: EtOAc =10:1)는 반응이 완결되었음을 나타내었다. 반응물을 AcOH를 사용하여 pH 값 3-4로 켄칭하였다. 생성된 혼합물을 진공 하에 농축 건조시켰다. 잔류물을 DCM (50.00 mL)으로 희석하고, 여과하였다. 여과물을 정제용- TLC (PE: EtOAc = 10:1)에 의해 정제하여 2-(2-클로로-4-니트로페닐)에탄티올 (화합물 97, 1.35 g, 72%)을 담황색 오일로서 수득하였다. ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ 8.26 (d, J = 2.4 Hz, 1H), 8.09 (dd, J = 8.4, 2.4 Hz, 1H), 7.45 (d, J = 8.4 Hz, 1H), 3.14 (t, J = 8.0Hz, 2H), 2.85 (dt, J = 8.0, 7.2 Hz, 2H), 1.43 (t, J = 7.2 Hz, 1H).

[0731] 단계 5. 합성 화합물 99

[0732] DMF (200.00 mL) 중 (2S)-2-[[[(9H-플루오렌-9-일메톡시)카르보닐]아미노]프로판산 (화합물 98, 20.00 g, 64.24 mmol, 1.00 당량)의 교반 용액에 공기 분위기 하에 실온에서 TSTU (25.18 g, 83.52 mmol, 1.30 당량) 및 DIEA (16.60 g, 128.48 mmol, 2.00 당량)를 첨가하였다. 생성된 혼합물을 실온에서 1시간 동안 교반하였다. LCMS 는 반응이 완결되었음을 나타내었다. 반응물을 물 (200.00 mL)로 희석하고, EtOAc (100.00 mLx3)로 추출하였다. 합한 유기 층을 물 (100.00 mL), 염수 (100.00 mL)로 세척하고, 무수 Na_2SO_4 상에서 건조시키고, 진공 하에 농축 건조시켰다. 잔류물을 실리카 겔 칼럼 크로마토그래피에 의해 (PE: EtOAc =1:2)로 용리시키면서 정제하여 2,5-디옥소피롤리딘-1-일 (2S)-2-[[[(9H-플루오렌-9-일메톡시)카르보닐]아미노]프로판노에이트 (화합물 99, 25.00 g, 83%)를 백색 고체로서 수득하였다. LCMS(ES, m/z):431[M+Na]⁺.

[0733] 단계 6. 화합물 100의 합성

- [0734] 물 (50.00 mL) 중 D-알라닌 (1.09 g, 0.012 mmol, 1.00 당량) 및 NaHCO₃ (3.09 g, 0.04 mmol, 3.00 당량)의 용액에 DMF (50.00 mL) 중 2,5-디옥소피롤리딘-1-일 (2S)-2-[[(9H-플루오렌-9-일메톡시)카르보닐]아미노]프로파노에이트 (화합물 99, 5.00 g, 12.24 mmol, 1.00 당량)의 용액을 첨가하였다. 생성된 혼합물을 실온에서 2시간 동안 교반하였다. LCMS는 반응이 완결되었음을 나타내었다. 반응물을 2 N HCl을 사용하여 pH 값 2-3으로 조정하였다. 생성된 혼합물을 EtOAc (100.00 mLx3)로 추출하고, 합한 유기 층을 염수 (100.00 mLx3)로 세척하고, 무수 Na₂SO₄ 상에서 건조시키고, 진공 하에 농축 건조시켜 (2R)-2-[(2S)-2-[[(9H-플루오렌-9-일메톡시)카르보닐]아미노]프로판아미도]프로판산 (화합물 100, 4.00 g, 71%)을 백색 고체로서 수득하였다. LCMS(ES, m/z): 383 [M+H]⁺
- [0735] 단계 7. 화합물 101의 합성
- [0736] 물 (200.00 mL) 중 글리신 (3.68 g, 48.97 mmol, 1.00 당량) 및 NaHCO₃ (12.34 g, 146.89 mmol, 3.00 당량)의 용액에 DMF (200.00 mL) 중 2,5-디옥소피롤리딘-1-일 (2S)-2-[[(9H-플루오렌-9-일메톡시)카르보닐]아미노]프로파노에이트 (화합물 99, 20.00 g, 48.97 mmol, 1.00 당량)의 용액을 첨가하였다. 반응물을 실온에서 2시간 동안 교반하였다. LCMS는 반응이 완결되었음을 나타내었다. 반응물을 2 N HCl을 사용하여 pH 값 2-3으로 조정하였다. 생성된 혼합물을 EtOAc (500.00 mLx3)로 추출하고, 합한 유기 층을 염수 (500.00 mL)로 세척하고, 무수 Na₂SO₄ 상에서 건조시키고, 진공 하에 농축 건조시켜 [(2S)-2-[[(9H-플루오렌-9-일메톡시)카르보닐]아미노]프로판아미도]아세트산 (화합물 101, 15.00 g, 71%)을 백색 고체로서 수득하였다. LCMS(ES, m/z): 369 [M+H]⁺
- [0737] 단계 8. 화합물 102의 합성
- [0738] THF (300.00 mL)/톨루엔 (100.00 mL) 중 [(2S)-2-[[(9H-플루오렌-9-일메톡시)카르보닐]아미노]프로판아미도]-아세트산 (화합물 101, 5.00 g, 13.57 mmol, 1.00 당량), Pb(OAc)₄ (7.22 g, 16.28 mmol, 1.20 당량) 및 피리딘 (1.29 g, 16.31 mmol, 1.20 당량)의 용액을 N₂ 하에 80℃에서 16시간 동안 교반하였다. LCMS는 반응이 완결되었음을 나타내었다. 실온으로 냉각시킨 후, 반응물을 여과하였다. 필터 케이크를 THF (100.00 mL)로 세척하였다. 합한 유기 층을 진공 하에 농축 건조시켰다. 잔류물을 실리카 겔 칼럼 크로마토그래피에 의해 (PE: EtOAc=1:2)로 용리시키면서 정제하여 [(2S)-2-[[(9H-플루오렌-9-일메톡시)카르보닐]아미노]프로판아미도]메틸 아세테이트 (화합물 102, 2.50 g, 45%)를 백색 고체로서 수득하였다. LCMS(ES, m/z): 405 [M+Na]⁺. ¹H NMR (400 MHz, 클로로포름-d) δ 7.77 (t, J = 7.6 Hz, 2H), 7.58 (d, J = 7.6 Hz, 2H), 7.43 - 7.37 (m, 2H), 7.36 - 7.29 (m, 2H), 7.10 (s, 1H), 5.24 (d, J = 7.6 Hz, 2H), 4.51 - 4.35 (m, 2H), 4.23-4.09 (m, 2H), 2.04 (s, 3H), 1.39 (d, J = 6.8 Hz, 3H).
- [0739] 단계 9. 화합물 103의 합성
- [0740] DCM (120 mL) 중 [(2S)-2-[[(9H-플루오렌-9-일메톡시)카르보닐]아미노]-프로판아미도]메틸 아세테이트 (화합물 102, 2.25 g, 5.88 mmol, 1.00 당량) 및 2-(2-클로로-4-니트로페닐)에탄티올 (화합물 97, 1.28 g, 5.88 mmol, 1.00 당량)의 교반 용액에 TFA (0.27 mL, 2.37 mmol, 0.62 당량)를 N₂ 하에 실온에서 첨가하였다. 생성된 혼합물을 실온에서 16시간 동안 교반하였다. LCMS는 반응이 완결되었음을 나타내었다. 반응물을 진공 하에 농축 건조시켰다. 잔류물을 실리카 겔 칼럼 크로마토그래피에 의해 (PE: EtOAc=1:4)로 용리시키면서 정제하여 9H-플루오렌-9-일메틸 N-[(1S)-1-[[[2-(2-클로로-4-니트로페닐)에틸]술폰닐]메틸]카르바모일]에틸]카르바메이트 (화합물 103, 3.10 g, 90%)를 황색 고체로서 수득하였다. LCMS(ES, m/z): 540 [M+H]⁺
- [0741] 단계 10. 화합물 104의 합성
- [0742] DMF (155.00 mL) 중 9H-플루오렌-9-일메틸 N-[(1S)-1-[[[2-(2-클로로-4-니트로페닐)에틸]술폰닐]메틸]카르바모일]에틸]카르바메이트 (화합물 103, 3.10 g, 5.74 mmol, 1.00 당량)의 용액에 N₂ 하에 0℃에서 피페리딘 (31.00 mL)을 첨가하였다. 생성된 혼합물을 N₂ 하에 0℃에서 0.5시간 동안 교반하였다. LCMS는 반응이 완결되었음을 나타내었다. 반응물을 물 (600.00 mL)로 희석하였다. 생성된 혼합물을 EtOAc (200.00 mLx3)로 추출하였다. 합한 유기 층을 염수 (200.00 mL)로 세척하고, 무수 Na₂SO₄ 상에서 건조시키고, 진공 하에 농축 건조시켜 조 생성물 3.00 g를 수득하였다. 조 생성물을 실리카 겔 칼럼 크로마토그래피에 의해 (DCM: MeOH =3: 1)로 용리시키면서 재정제하여 (2S)-2-아미노-N-[[[2-(2-클로로-4-니트로페닐)에틸]술폰닐]메틸]프로판아미드, 104

(1.50 g, 78%)를 황색 오일로서 수득하였다. LCMS(ES, m/z): 318 [M+H]⁺.

[0743]

단계 11. 화합물 105의 합성

[0744]

DMF (75.00 mL) 중 (2S)-2-아미노-N-([2-(2-클로로-4-니트로페닐)에틸]술팜닐)메틸)-프로판아미드 (화합물 104, 1.50 g, 4.72 mmol, 1.00 당량)의 용액에 실온에서 H₂O (10.00 mL) 및 Boc₂O (1.03 g, 4.72 mmol, 1.00 당량) 중 NaHCO₃ (0.59 g, 7.08 mmol, 1.50 당량)의 용액을 첨가하였다. 반응물을 실온에서 1시간 동안 교반하였다. LCMS는 반응이 완결되었음을 나타내었다. 반응물을 물 (500.00 mL)로 희석하고, EtOAc (200.00 mLx3)로 추출하였다. 합한 유기 층을 염수 (200.00 mLx3)로 세척하고, 무수 Na₂SO₄ 상에서 건조시키고, 진공 하에 농축 건조시켜 tert-부틸 N-[(1S)-1-([2-(2-클로로-4-니트로페닐)에틸]술팜닐)메틸]카르바모일]에틸]카르바메이트 (화합물 105, 1.82 g, 83%)를 적색 오일로서 수득하였다. LCMS(ES, m/z): 418 [M+H]⁺, 318 [M+H-100]⁺.

[0745]

단계 12. 화합물 106의 합성

[0746]

EtOH (100.00 mL)/H₂O (50.00 mL) 중 tert-부틸 N-[(1S)-1-([2-(2-클로로-4-니트로페닐)에틸]술팜닐)-메틸]카르바모일]에틸]카르바메이트 (화합물 105, 1.82 g, 4.36 mmol, 1.00 당량), 철 분말 (2.43 g, 0.04 mmol, 10.00 당량) 및 NH₄Cl (2.33 g, 0.04 mmol, 10.00 당량)의 슬러리를 70°C에서 2시간 동안 교반하였다. LCMS는 반응이 완결되었음을 나타내었다. 반응물을 여과하였다. 여과물을 진공 하에 농축 건조시켰다. 잔류물을 DCM (50.00 mL)으로 용해시키고, 여과하였다. 여과물을 농축 건조시키고, 잔류물을 실리카 겔 칼럼 크로마토그래피에 의해 (DCM: MeOH = 13: 1)로 용리시키면서 정제하여 tert-부틸 N-[(1S)-1-([2-(4-아미노-2-클로로페닐)에틸]술팜닐)메틸]카르바모일]에틸]-카르바메이트 (화합물 106, 1.20 g, 68%)를 황색 오일로서 수득하였다. LCMS(ES, m/z): 388 [M+H]⁺.

[0747]

단계 13. 화합물 107

[0748]

0°C에서 DMF (5.00 mL) 중 3-[5-(아미노메틸)-1-옥소-3H-이소인돌-2-일]피페리딘-2,6-디온 (INT 1, 352 mg, 1.29 mmol, 1.00 당량)의 교반 용액에 CDI (209.00 mg, 1.29 mmol, 1 당량) 및 TEA (260 mg, 2.58 mmol, 2 당량)를 첨가하였다. 생성된 혼합물을 0°C에서 2시간 동안 교반하였다. 이어서 tert-부틸 N-[(1S)-1-([2-(4-아미노-2-클로로페닐)에틸]술팜닐)-메틸]-카르바모일]에틸]카르바메이트 (화합물 106, 500.00 mg, 1.29 mmol, 1.00 당량) 및 DMAP (472 mg, 3.87 mmol, 3.00 당량)를 첨가하였다. 생성된 혼합물을 60°C에서 24시간 동안 교반하였다. LCMS는 반응이 완결되었음을 나타내었다. 실온으로 냉각시킨 후, 반응 혼합물을 역 플래쉬 크로마토그래피에 의해 하기 조건: 칼럼, C18 실리카 겔; 이동상, 물 (0.1%FA) 중 ACN, 30분 내 0%에서 60% 구배; 검출기, UV 254 nm를 사용하여 정제하여 tert-부틸 N-[(1S)-1-([2-(2-클로로-4-([2-(2,6-디옥소피페리딘-3-일)-1-옥소-3H-이소인돌-5-일]메틸]카르바모일)아미노]페닐]에틸]술팜닐]메틸]카르바모일]에틸]카르바메이트 (화합물 107, 450.00 mg, 48%)를 황색 고체로서 수득하였다. LCMS(ES, m/z): 687 [M+H]⁺.

[0749]

단계 14. 화합물 108

[0750]

DCM (22.00 mL) 중 tert-부틸 N-[(1S)-1-([2-(2-클로로-4-([2-(2,6-디옥소피페리딘-3-일)-1-옥소-3H-이소인돌-5-일]메틸]카르바모일)아미노]페닐]에틸]술팜닐]-메틸]카르바모일]에틸]카르바메이트 (화합물 107, 440.00 mg, 0.64 mmol, 1.00 당량)의 교반 용액에 실온에서 TFA(2.20 mL)를 첨가하였다. 생성된 혼합물을 실온에서 0.5시간 동안 교반하였다. LCMS는 반응이 완결되었음을 나타내었다. 반응물을 진공 하에 농축 건조시켜 (2S)-2-아미노-N-([2-(2-클로로-4-([2-(2,6-디옥소피페리딘-3-일)-1-옥소-3H-이소인돌-5-일]메틸]카르바모일)아미노]페닐]에틸]술팜닐)-메틸]프로판아미드; 트리플루오로아세트산 (화합물 108, 400.00 mg, 조 물질)을 적색 오일로서 수득하였다. 잔류물을 후속 단계에 추가 정제 없이 사용하였다. LCMS(ES, m/z): 587 [M+H-TFA]⁺.

[0751]

단계 15. 화합물 109의 합성

[0752]

(2R)-2-[(2S)-2-[(9H-플루오렌-9-일메톡시)카르보닐]-아미노]프로판아미도]프로판산 (218 mg, 0.57 mmol, 1.00 당량), HOBt (77 mg, 0.57 mmol, 1.00 당량) 및 HATU (216 mg, 0.01 mmol, 1.00 당량)의 용액을 공기 중 실온에서 1시간 동안 교반한 다음, (2S)-2-아미노-N-([2-(2-클로로-4-([2-(2,6-디옥소피페리딘-3-일)-1-옥소-3H-이소인돌-5-일]메틸]카르바모일)아미노]페닐]에틸]술팜닐]메틸]프로판아미드; 트리플루오로아세트산 (화합물 108, 400 mg, 0.57 mmol, 1.00 당량) 및 DIEA (663 mg, 5.14 mmol, 9.00 당량)를 실온에서 첨가하였다. 반응물을 실온에서 2시간 동안 교반하였다. LCMS는 반응이 완결되었음을 나타내었다. 반응 혼합

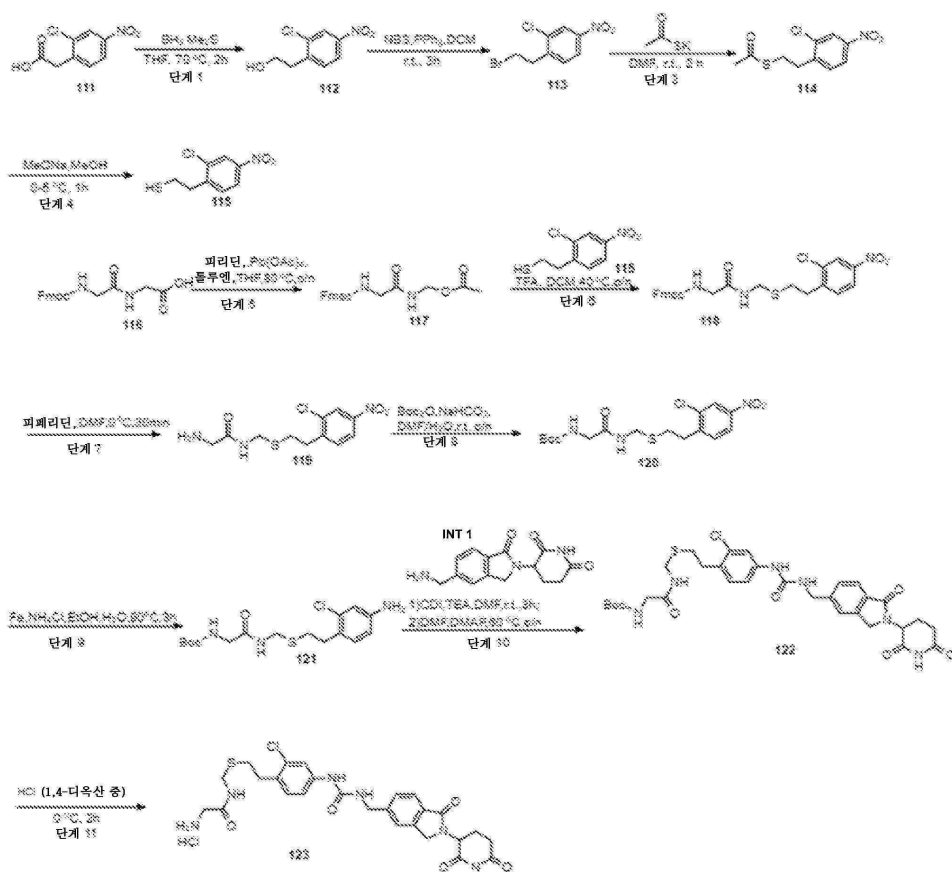
물을 역 플래쉬 크로마토그래피에 의해 하기 조건: 칼럼, C18 실리카 겔; 이동상, 물 중 ACN (0.05%TFA), 30분 내 0%에서 50% 구배; 검출기, UV 254 nm를 사용하여 정제하여 9H-플루오렌-9-일메틸 N-[(1S)-1-[(1R)-1-[(1S)-1-[(2-[2-클로로-4-[(2-(2,6-디옥소피페리딘-3-일)-1-옥소-3H-이소인돌-5-일]메틸]카르바모일)아미노]페닐]에틸]술폰닐]메틸]카르바모일]에틸]카르바모일]에틸]카르바메이트 (화합물 109, 480.00 mg, 75%)를 녹색 고체로서 수득하였다. LCMS(ES, m/z): 951 [M+H]⁺

[0753] 단계 16. 화합물 110

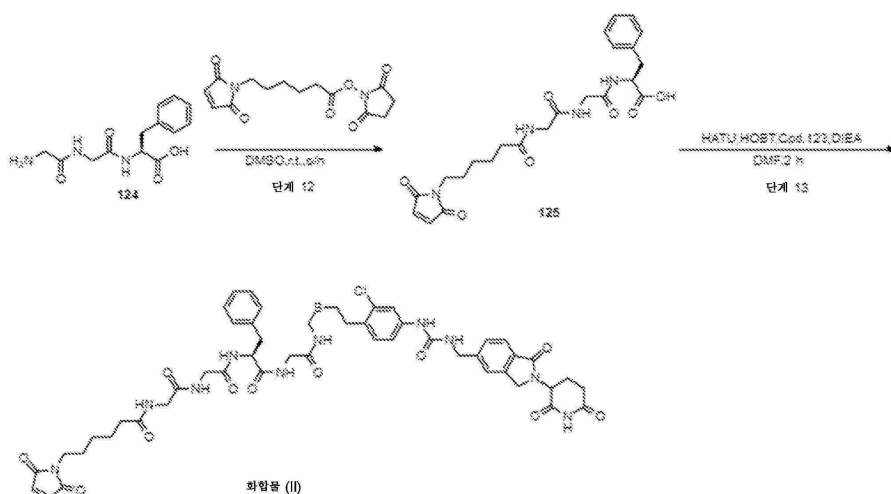
[0754] DMF(5.00 mL) 중 9H-플루오렌-9-일메틸 N-[(1S)-1-[(1R)-1-[(1S)-1-[(2-[2-클로로-4-[(2-(2,6-디옥소피페리딘-3-일)-1-옥소-3H-이소인돌-5-일]메틸]카르바모일)아미노]페닐]에틸]술폰닐]메틸]카르바모일]에틸]카르바메이트 (화합물 109, 110.00 mg)의 용액에 0℃에서 피페리딘 (1.00 mL)을 첨가하였다. 생성된 혼합물을 0℃에서 0.5시간 동안 교반하였다. LCMS는 반응이 완결되었음을 나타내었다. 반응 혼합물을 역 플래쉬 크로마토그래피에 의해 하기 조건: 칼럼, C18 실리카 겔; 이동상, 물 중 ACN (0.05%TFA), 40분 내 0%에서 60% 구배; 검출기, UV 254 nm를 사용하여 정제하여 (2S)-2-[(2R)-2-[(2S)-2-아미노프로판아미도]프로판아미도]-N-[(2-[2-클로로-4-[(2-(2,6-디옥소피페리딘-3-일)-1-옥소-3H-이소인돌-5-일]메틸]카르바모일)아미노]-페닐]에틸]술폰닐]메틸]프로펜아미드 (화합물 110, 80.00 mg, 60%)를 적색 고체로서 수득하였다. LCMS(ES, m/z): 729 [M+H]⁺. ¹H NMR (400 MHz, DMSO-d₆) δ 9.00 (br s, 1H), 8.53 (br s, 1H), 8.24 (d, J = 7.6 Hz, 1H), 8.10 (br s, 1H), 7.69 - 7.62 (m, 2H), 7.49 (s, 1H), 7.42 (d, J = 8.0 Hz, 1H), 7.26-7.13 (m, 3H), 7.00 (br s, 1H), 5.11-5.06 (m, 1H), 4.45 - 4.36 (m, 3H), 4.35 - 4.13 (m, 6H), 2.90-2.83 (m, 3H), 2.73-2.71 (m, 2H), 2.05-1.90 (m, 1H), 1.70-1.53 (m, 4H), 1.22-1.17(m, 6H), 1.14 - 1.05 (m, 3H).

[0755] 단계 17. 화합물 (Ik)의 합성

[0756] DMF (1.50 mL, 19.38 mmol, 224.36 당량) 중 (2S)-2-[(2R)-2-[(2S)-2-아미노프로판아미도]프로판아미도]-N-[(2-[2-클로로-4-[(2-(2,6-디옥소피페리딘-3-일)-1-옥소-3H-이소인돌-5-일]메틸]카르바모일)아미노]페닐]에틸]술폰닐]메틸]프로펜아미드 (화합물 110, 63.00 mg, 0.09 mmol, 1.00 당량) 및 2,5-디옥소피롤리딘-1-일 6-(2,5-디옥소피롤-1-일)헥사노에이트 (26 mg, 0.09 mmol, 1.00 당량)의 용액에 공기 중 실온에서 DIEA (22.33 mg, 0.17 mmol, 2.00 당량)를 첨가하였다. 반응물을 실온에서 1시간 동안 교반하였다. 반응 혼합물을 역 플래쉬 크로마토그래피에 의해 하기 조건: 칼럼: 키네틱스 EVO C18 칼럼, 30x150,5um; 이동상 A:물 (0.05%TFA), 이동상 B:ACN; 유량:60 mL/분; 구배: 7분 내에 23 B에서 43 B, 254 nm; RT1:6.58)을 사용하여 정제하였다. 수집된 분획을 동결건조시켜 N-[(1S)-1-[(1R)-1-[(1S)-1-[(2-[2-클로로-4-[(2-(2,6-디옥소피페리딘-3-일)-1-옥소-3H-이소인돌-5-일]메틸]카르바모일)아미노]페닐]에틸]술폰닐]메틸]카르바모일]에틸]카르바메이트 (화합물 (Ik), 16.10 mg, 20%)를 백색 고체로서 수득하였다. LCMS(ES, m/z): 922,924 [M+H]⁺. ¹H NMR (400 MHz, DMSO-d₆) δ 11.00 (s, 1H), 8.80 (s, 1H), 8.44-8.41 (m, 1H), 8.15 (d, J=7.2Hz, 1H), 8.03-8.00 (m, 2H), 7.7-7.65 (m, 2H), 7.51 (s, 1H), 7.44 (d, J=8.0Hz,1H), 7.22-7.14(m, 2H), 6.98 (s, 2H), 6.83-6.81 (m, 1H), 5.13-5.08 (m, 1H), 4.48-4.40 (m, 3H), 4.29-4.17 (m, 6H), 2.96-2.85 (m, 3H), 2.75-2.70 (m, 2H), 2.67-2.57 (m, 1H), 2.40-2.33 (m, 1H), 2.09-1.98 (m, 3H), 1.52-1.45 (m, 5H), 1.26-1.16 (m, 12H).



[0757]



[0758]

[0759] 반응식 14: 신규분해제 P14 - GGFG 링커 복합체 (화합물 (II))의 합성

[0760] 단계 1. 화합물 112의 합성

[0761] THF (50 mL) 중 (2-클로로-4-니트로페닐)아세트산 (화합물 111, 5.00 g, 23.19 mmol, 1.00 당량)의 교반 용액에 질소 분위기 하에 실온에서 BH₃-Me₂S (5.50 mL, 57.99 mmol, 2.50 당량)를 조금씩 첨가하였다. 생성된 혼합물을 질소 분위기 하에 70°C에서 2시간 동안 교반하였다. TLC (PE: EtOAc = 3:1)는 반응이 완결되었음을 나타내었다. 잔류물을 실리카 겔 칼럼 크로마토그래피에 의해 PE/EtOAc (2:1)로 용리시키면서 정제하여 2-(2-클로로-4-니트로페닐)에탄올 (화합물 112, 4.8g, 92%)을 담황색 고체로서 수득하였다. ¹H NMR (400 MHz, 클로로포름-d) δ 8.27 (d, J = 2.4 Hz, 1H), 8.10 (dd, J = 8.4, 2.4 Hz, 1H), 7.46 (s, 1H), 3.20 -3.09 (m, 4H).

[0762] 단계 2. 화합물 113의 합성

[0763] DCM (100 mL) 중 2-(2-클로로-4-니트로페닐)에탄올 (화합물 112, 4.80 g, 23.81 mmol, 1.00 당량)의 교반 용액

에 공기 분위기 하에 실온에서 NBS (6.36 g, 35.71 mmol, 1.50 당량) 및 PPh_3 (9.37 g, 35.72 mmol, 1.50 당량)를 조금씩 첨가하였다. 생성된 혼합물을 공기 분위기 하에 실온에서 밤새 교반하였다. TLC (PE: EtOAc = 10:1)는 반응이 완결되었음을 나타내었다. 반응물을 진공 하에 농축 건조시켰다. 잔류물을 실리카 겔 칼럼 크로마토그래피에 의해 PE/EtOAc (4:1)로 용리시키면서 정제하여 1-(2-브로모에틸)-2-클로로-4-니트로벤젠 (화합물 113, 3.9g, 57%)을 적색 오일로서 수득하였다. ^1H NMR (400 MHz, 클로로포름-d) δ 8.29 (d, J = 2.4 Hz, 1H), 8.13 (dd, J = 8.4, 2.4 Hz, 1H), 7.50 (d, J = 8.4 Hz, 1H), 3.67 (t, J = 7.2 Hz, 2H), 3.42 (t, J = 7.2 Hz, 2H).

[0764] 단계 3. 화합물 114의 합성

[0765] DMF (39 mL) 중 1-(2-브로모에틸)-2-클로로-4-니트로벤젠 (화합물 113, 3.90 g, 14.75 mmol, 1.00 당량)의 용액에 실온에서 티오아세트산칼륨 (1.68 g, 14.75 mmol, 1.00 당량)을 첨가하였다. 생성된 혼합물을 실온에서 2 시간 동안 교반하였다. TLC (PE: EtOAc = 10:1)는 반응이 완결되었음을 나타내었다. 반응물을 물 (600 mL)로 희석하였다. 생성된 혼합물을 EA (200 mL*3)로 추출하였다. 합한 유기 층을 물 (200 mL), 염수 (200 mL)로 세척하고, 무수 황산나트륨 상에서 건조시키고, 진공 하에 농축 건조시켜 1-[[2-(2-클로로-4-니트로페닐)에틸]술팜닐]에테논 (화합물 114, 3.7 g, 85%)을 적색 오일로서 수득하였다. ^1H NMR (400 MHz, 클로로포름-d) δ 8.27 (d, J = 2.4 Hz, 1H), 8.10 (dd, J = 8.4, 2.4 Hz, 1H), 7.46 (s, 1H), 3.21 -3.02 (m, 4H), 2.37 (s, 3H).

[0766] 단계 4. 화합물 115의 합성

[0767] MeOH (600 mL) 중 1-[[2-(2-클로로-4-니트로페닐)에틸]술팜닐]에테논 (화합물 114, 4.00 g, 15.40 mmol, 1.00 당량)의 교반 용액에 MeONa (14.31 mL, 77.00 mmol, 5.00 당량, 30%)를 0°C에서 N_2 하에 1시간 동안 첨가하였다. 반응 혼합물을 0°C에서 1시간 동안 교반하였다. TLC는 (PE:EA=10:1) 반응이 완결되었음을 나타내었다. 반응물을 AcOH로 켄칭하였다. 생성된 혼합물을 진공 하에 농축 건조시켰다. 잔류물을 DCM (100 mL)으로 희석하고, 여과하였다. 여과물을 실리카 겔 칼럼 크로마토그래피에 의해 (PE: EtOAc =10:1)로 용리시키면서 정제하여 2-(2-클로로-4-니트로페닐)에탄티올 (화합물 115, 3 g, 80%)을 황색 오일로서 수득하였다. ^1H NMR (400 MHz, 클로로포름-d) δ 8.28 (d, J = 2.4 Hz, 1H), 8.11 (dd, J = 8.4, 2.4 Hz, 1H), 7.48 (d, J = 8.4 Hz, 1H), 3.17 (t, J = 7.2 Hz, 2H), 2.87 (dt, J = 8.0, 7.2 Hz, 2H), 1.46 (t, J = 8.0Hz, 1H).

[0768] 단계 5. 화합물 117의 합성

[0769] THF (300 mL) 및 톨루엔 (100 mL) 중 (2-[[[9H-플루오렌-9-일메톡시]카르보닐]아미노]-아세트아미도)아세트산 (화합물 116, 10 g, 28.22 mmol, 1.00 당량) 및 $\text{Pb}(\text{OAc})_4$ (15 g, 33.86 mmol, 1.20 당량)의 교반 혼합물에 피리딘 (2.59 g, 32.74 mmol, 1.16 당량)을 질소 분위기 하에 실온에서 첨가하였다. 생성된 혼합물을 질소 분위기 하에 80°C에서 밤새 교반하였다. LCMS는 반응이 완결되었음을 나타내었다. 혼합물을 실온으로 냉각되도록 하였다. 생성된 혼합물을 여과하고, 필터 케이크를 EA (20 mL)로 세척하였다. 여과물을 진공 하에 농축시켰다. 잔류물을 EA (20 mL) 중에 용해시켰다. 생성된 혼합물을 물, 염수로 세척하고, 무수 Na_2SO_4 상에서 건조시켰다. 여과한 후, 여과물을 진공 하에 농축시켰다. 잔류물을 실리카 겔 칼럼 크로마토그래피에 의해 PE/EtOAc (1:4)로 용리시키면서 정제하여 (2-[[[9H-플루오렌-9-일메톡시]카르보닐]아미노]-아세트아미도)메틸 아세테이트 (화합물 117, 6.5g, 56%)를 백색 고체로서 수득하였다. ^1H NMR(300MHz, CDCl_3) δ 7.80(d, J=7.5Hz, 2H), 7.62(d, J=7.5Hz, 2H), 7.45(t, d=7.5Hz, 2H), 7.36(d, d=7.5Hz, 2H), 7.18(br s, 1H), 5.48(br s, 1H), 5.28(d, J=7.2Hz, 2H), 4.48(d, J=6.6Hz, 2H), 4.26(t, J=6.6Hz, 1H), 3.93(d, 5.4Hz, 2H), 2.08(s, 3H).
LCMS (ESI, ms): 391[M+Na] $^+$

[0770] 단계 6. 화합물 118의 합성

[0771] DCM (300 mL) 중 (2-[[[9H-플루오렌-9-일메톡시]카르보닐]아미노]-아세트아미도)메틸 아세테이트 (화합물 117, 3.00 g, 8.14 mmol, 1.00 당량) 및 2-(2-클로로-4-니트로페닐)에탄티올 (화합물 115, 1.77 g, 8.13 mmol, 1.00 당량)의 용액에 실온에서 TFA(0.56 g, 4.91 mmol, 0.60 당량)를 첨가하였다. 생성된 혼합물을 60°C에서 16 시간 동안 교반하였다. LCMS는 반응이 완결되었음을 나타내었다. 반응물을 진공 하에 농축 건조시켰다. 잔류물을 실리카 겔 칼럼 크로마토그래피에 의해 (PE: EtOAc =2:3)로 용리시키면서 정제하여 9H-플루오렌-9-일메틸 N-

[[([2-(2-클로로-4-니트로페닐)에틸]술파닐)메틸]카르바모일]-메틸]카르바메이트 (화합물 118, 3.7 g, 67%)를 회백색 고체로서 수득하였다. LCMS(ES, m/z): 526,528 [M+H]⁺

[0772] 단계 7. 화합물 119의 합성

[0773] DMF (40 mL) 중 9H-플루오렌-9-일메틸 N-[[([2-(2-클로로-4-니트로페닐)에틸]술파닐)메틸]카르바모일]메틸]카르바메이트 (화합물 118, 3.70 g, 7.03 mmol, 1.00 당량)의 용액에 0℃에서 피페리딘 (8 mL)을 첨가하였다. 생성된 혼합물을 0℃에서 0.5시간 동안 교반하였다. LCMS는 반응이 완결되었음을 나타내었다. 생성된 혼합물을 물 (400 mL)로 희석하고, EA (200 mLx 3)로 추출하였다. 합한 유기 층을 물 (200 mL), 염수 (200 mL)로 세척하고, 무수 황산나트륨 상에서 건조시키고, 진공 하에 농축 건조시켰다. 잔류물을 실리카 겔 칼럼 크로마토그래피에 의해 (DCM: MeOH = 10:1)로 용리시키면서 정제하여 2-아미노-N-([2-(2-클로로-4-니트로페닐)에틸]술파닐)-메틸]아세트아미드 (화합물 119, 1.01 g, 40%)를 황색 오일로서 수득하였다. LCMS(ES, m/z): 304,306 [M+H]⁺

[0774] 단계 8. 화합물 120의 합성

[0775] DMF (50 mL) 중 2-아미노-N-([2-(2-클로로-4-니트로페닐)에틸]술파닐)메틸]-아세트아미드 (화합물 119, 1.00 g, 3.29 mmol, 1.00 당량)의 용액에 실온에서 물(10 mL) 중 NaHCO₃(0.33 g, 3.92 mmol, 1.20 당량)의 용액, Boc₂O (0.72 g, 3.30 mmol, 1.00 당량)를 첨가하였다. 생성된 혼합물을 실온에서 1시간 동안 교반하였다. LCMS는 반응이 완결되었음을 나타내었다. 반응물을 물 (500 mL)로 희석하고, EtOAc (200 mL x3)로 추출하였다. 합한 유기 층을 염수 (200 mL)로 세척하고, 무수 Na₂SO₄ 상에서 건조시키고, 진공 하에 농축 건조시켰다. 잔류물을 실리카 겔 칼럼 크로마토그래피에 의해 (PE: EtOAc = 1:3)로 용리시키면서 정제하여 tert-부틸 N-[[([2-(2-클로로-4-니트로페닐)에틸]술파닐)메틸]카르바모일]메틸]카르바메이트 (화합물 120, 810 mg, 54%)를 백색 고체로서 수득하였다. LCMS(ES, m/z): 404,406 [M+H]⁺, 304,306 [M+H-100]⁺

[0776] 단계 9. 화합물 121의 합성

[0777] EtOH(40) 중 tert-부틸 N-[[([2-(2-클로로-4-니트로페닐)에틸]술파닐)-메틸]카르바모일]메틸]카르바메이트 (화합물 120, 800.00 mg, 1.98 mmol, 1.00 당량)의 용액에 실온에서 킬 분말 (1106 mg, 19.81 mmol, 10.00 당량) 및 물 (10 mL) 중 NH₄Cl (1059 mg, 19.81 mmol, 10.00 당량)의 용액을 첨가하였다. 생성된 혼합물을 70℃에서 2시간 동안 교반하였다. LCMS는 반응이 완결되었음을 나타내었다. 반응물을 여과하였다. 여과물을 진공 하에 농축 건조시켰다. 잔류물을 DCM (50.00 mL)으로 용해시키고, 여과하였다. 여과물을 실리카 겔 칼럼 크로마토그래피에 의해 (DCM: MeOH = 13: 1)로 용리시키면서 정제하여 tert-부틸 N-[[([2-(4-아미노-2-클로로페닐)에틸]술파닐)메틸]-카르바모일]메틸]카르바메이트 (화합물 121, 610 mg, 74%)를 황색 오일로서 수득하였다. LCMS(ES, m/z): 374,376 [M+H]⁺, 374,376 [M+H-100]⁺

[0778] 단계 10. 화합물 122의 합성

[0779] DMF(10 mL) 중 3-[5-(아미노메틸)-1-옥소-3H-이소인돌-2-일]피페리딘-2,6-디온 (INT 1, 219 mg, 0.80 mmol, 1.00 당량)의 용액에 공기 중 0℃에서 CDI (130 mg, 0.80 mmol, 1.00 당량) 및 TEA (81 mg, 0.80 mmol, 1.00 당량)를 첨가하였다. 생성된 혼합물을 실온에서 2시간 동안 교반하였다. 이어서 tert-부틸 N-[[([2-(4-아미노-2-클로로페닐)에틸]술파닐)-메틸]카르바모일]메틸]카르바메이트 (화합물 121, 300 mg, 0.80 mmol, 1.00 당량) 및 DMAP (294 mg, 2.41 mmol, 3.00 당량)를 공기 중 실온에서 첨가하였다. 생성된 혼합물을 60℃에서 48시간 동안 교반하였다. LCMS는 반응이 완결되었음을 나타내었다. 생성된 혼합물을 역 플래쉬 크로마토그래피에 의해 하기 조건: 칼럼, C18 실리카 겔; 이동상, 물(0.05%TFA) 중 ACN, 30분 내 0%에서 60% 구배; 검출기, UV 254 nm을 사용하여 정제하여 tert-부틸 N-[[([2-(2-클로로-4-[[[2-(2,6-디옥소피페리딘-3-일)-1-옥소-3H-이소인돌-5-일]메틸]-카르바모일]아미노]페닐)에틸]술파닐)메틸]카르바모일]메틸]카르바메이트 (화합물 122, 270 mg, 49%)를 황색 고체로서 수득하였다. LCMS(ES, m/z): 673,675 [M+H]⁺, 573,575 [M+H-100]⁺

[0780] 단계 11. 화합물-123의 합성

[0781] 1,4-디옥산 (12 mL) 중 tert-부틸 N-[[([2-(2-클로로-4-[[[2-(2,6-디옥소피페리딘-3-일)-1-옥소-3H-이소인돌-5-일]메틸]카르바모일]아미노]페닐)에틸]술파닐)메틸]카르바모일]메틸]카르바메이트 (화합물 122, 250 mg,

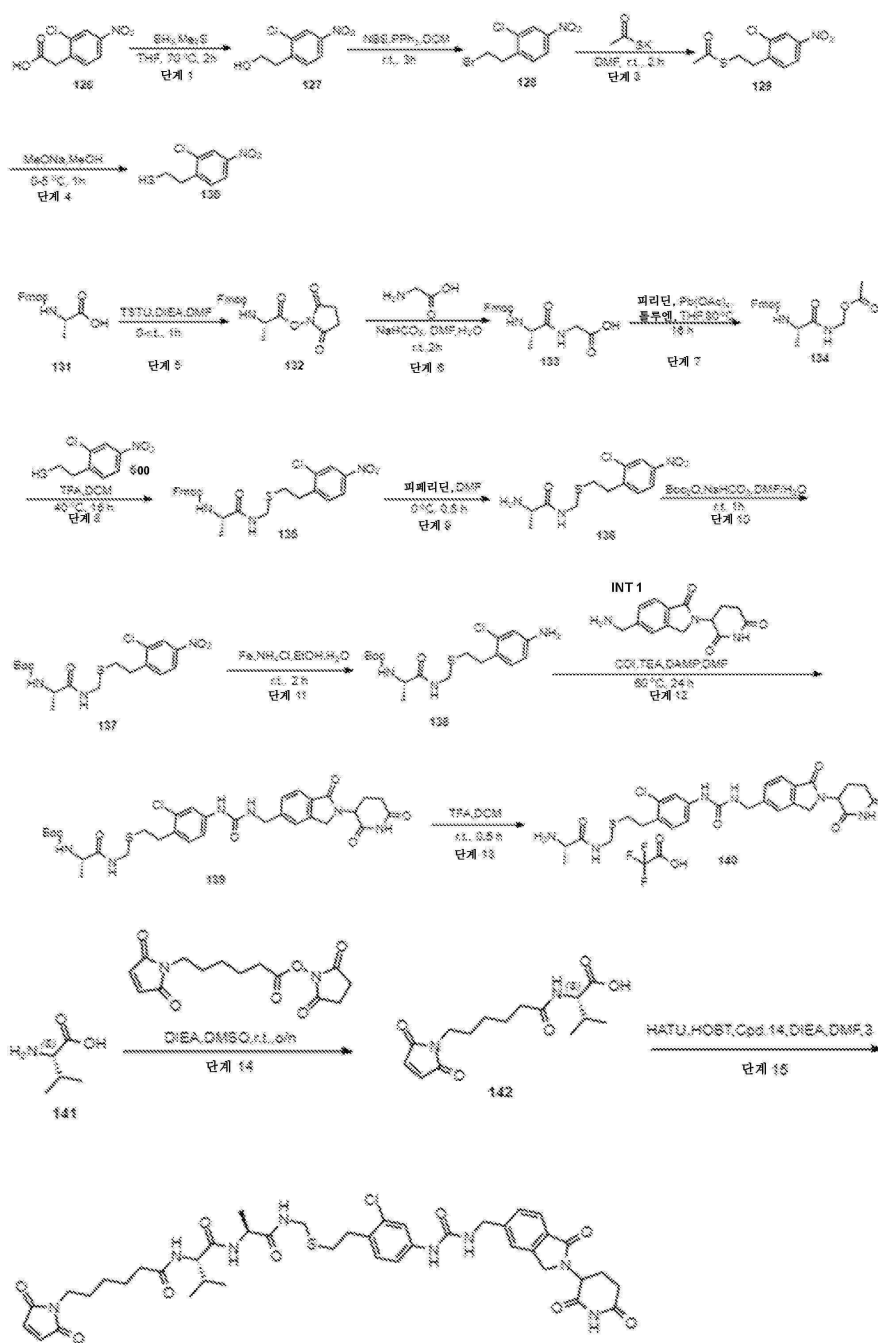
0.37 mmol)의 용액에 N_2 하에 0℃에서 HCl (1,4-디옥산 중 4N, 6 mL)을 첨가하였다. 반응물을 실온에서 2시간 동안 교반하였다. LCMS는 반응이 완결되었음을 나타내었다. 반응 혼합물을 진공 하에 농축 건조시켜 2-아미노-N-[(2-[2-클로로-4-([2-(2,6-디옥소피페리딘-3-일)-1-옥소-3H-이소인돌-5-일]메틸)카르바모일)아미노]페닐]에틸]술폰아미드 (화합물 123, 260 mg, 조 물질)를 갈색 고체로서 수득하였다. LCMS(ES, m/z): 573,575 $[M+H-Cl]^+$

[0782] 단계 12. 화합물-125의 합성

[0783] DMSO (5.00 mL) 중 (2S)-2-[2-(2-아미노아세트아미도)아세트아미도]-3-페닐프로판산 (화합물 124, 500 mg, 1.79 mmol, 1.00 당량) 및 2,5-디옥소피롤리딘-1-일 6-(2,5-디옥소피롤-1-일)헥사노에이트 (552 mg, 1.79 mmol, 1.00 당량)의 용액을 공기 중에서 실온에서 16시간 동안 교반하였다. LCMS는 반응이 완결되었음을 나타내었다. 반응 혼합물을 역 플래쉬 크로마토그래피에 의해 하기 조건: 칼럼, C18 실리카 겔; 이동상, 물 중 ACN (0.1%FA), 30분 내 0%에서 60% 구배; 검출기, UV 220 nm를 사용하여 정제하여 (2S)-2-(2-[2-[6-(2,5-디옥소피롤-1-일)헥산아미도]아세트아미도]아세트아미도)-3-페닐프로판산 (화합물 125, 760 mg, 83%)을 백색 고체로서 수득하였다. LCMS(ES, m/z): 473 $[M+H]^+$

[0784] 단계 13. 화합물 (II)의 합성

[0785] DMF(5.00 mL) 중 (2S)-2-(2-[2-[6-(2,5-디옥소피롤-1-일)헥산아미도]아세트아미도]-아세트아미도)-3-페닐프로판산 (화합물 125, 175 mg, 0.37 mmol, 1.00 당량)의 용액에 공기 중 실온에서 HATU (141 mg, 0.37 mmol, 1.00 당량) 및 HOBt (50 mg, 0.37 mmol, 1.00 당량)를 첨가하였다. 생성된 혼합물을 실온에서 1시간 동안 교반하였다. 이어서 2-아미노-N-[(2-[2-클로로-4-([2-(2,6-디옥소피페리딘-3-일)-1-옥소-3H-이소인돌-5-일]메틸)-카르바모일)아미노]페닐]에틸]술폰아미드 (화합물 123, 250 mg, 0.37 mmol, 1.00 당량, 85%) 및 DIEA (240 mg, 1.85 mmol, 5.00 당량)를 첨가하였다. 생성된 혼합물을 실온에서 1시간 동안 교반하였다. LCMS는 반응이 완결되었음을 나타내었다. 반응 혼합물을 하기 조건: 칼럼: 엑스셀렉트 CSH 정제용 C18 OBD 칼럼, 19*250mm, 5μm; 이동상 A:물(0.05%FA), 이동상 B:ACN; 유량:25 mL/분; 구배: 7분 내 30 B에서 60 B, 254 nm; RT1:6.67분에 의해 정제하여 조 생성물 75 mg을 수득하였다. 조 생성물을 역 플래쉬 크로마토그래피에 의해 하기 조건: 칼럼: 엑스브리지 쉘드 RP18 OBD 칼럼, 19*250mm, 10μm; 이동상 A:물(0.1%FA), 이동상 B:ACN; 유량:25 mL/분; 구배: 10분 내에 25 B에서 44 B; 254 nm; RT1:10.52분을 사용하여 재정제하였다. 수집된 분획을 동결건조시켜 화합물 (II) (41.6 mg, 10%)를 백색 고체로서 수득하였다. ^1H NMR(400MHz, DMSO- d_6) δ 10.99 (s, 1H), 8.79 (s, 1H), 8.38 (t, J=6.0Hz, 1H), 8.31 (t, J=6.0Hz, 1H), 8.12 (d, J=8.4Hz, 1H), 8.06 (t, J=5.6Hz, 1H), 8.01 (t, J=6.0Hz, 1H), 7.70-7.66 (m, 2H), 7.51 (s, 1H), 7.44 (d, J=8.0Hz, 1H), 7.25-7.21 (m, 5H), 7.19-7.14 (m, 2H), 6.99 (s, 2H), 6.82 (t, J=6.0Hz, 1H), 5.13-5.08 (m, 1H), 4.47-4.40 (m, 4H), 4.33-4.29 (m, 3H), 3.76-3.70 (m, 3H), 3.67-3.55 (m, 3H), 3.38-3.36 (m, 2H), 3.06-3.02 (m, 1H), 2.91-2.86 (m, 3H), 2.82-2.70 (m, 3H), 2.62-2.57 (m, 1H), 2.50-2.45 (m, 1H), 2.10 (m, 2H), 2.05-1.95 (m, 1H), 1.50-1.44 (m, 4H), 1.20-1.16 (m, 2H). LCMS(ES, m/z):1027,1029 $[M+H]^+$



화합물 (Im)

반응식 15: 신규분해제 P14 - AAA 링커 복합체 (화합물 (Im))의 합성

단계 1. 화합물 127의 합성

THF (240.00 mL) 중 (2-클로로-4-니트로페닐)아세트산 (화합물 126, 24.00 g, 111.32 mmol, 1.00 당량)의 교반 용액에 질소 분위기 하에 $\text{BH}_3 \cdot \text{Me}_2\text{S}$ (28.00 mL, 295.23 mmol, 2.65 당량)를 적가하였다. 생성된 혼합물을 질소 분위기 하에 70°C에서 2시간 동안 교반하였다. TLC (PE: EtOAc = 3:1)는 반응이 완결되었음을 나타내었다. 실온으로 냉각시킨 후, 생성된 혼합물을 진공 하에 농축시켰다. 잔류물을 실리카 겔 칼럼 크로마토그래피에 의해 PE/ EtOAc (3:1)로 용리시키면서 정제하여 2-(2-클로로-4-니트로페닐)에탄올 (화합물 127, 18.00 g, 80%)을 담황색 고체로서 수득하였다. ^1H NMR (300 MHz, CD_3Cl) δ 8.27 (s, 1H), 8.10-8.07 (m, 1 H), 7.52 (d, J = 3 Hz, 1H), 3.96 (t, J = 6 Hz, 2H), 3.13 (t, J = 6 Hz, 2H).

단계 2. 화합물 128의 합성

[0792] DCM (100.00 mL) 중 2-(2-클로로-4-니트로페닐)에탄올 (화합물 127, 5.00 g, 24.80 mmol, 1.00 당량)의 교반 용액에 NBS (6.62 g, 1.50 당량) 및 PPh₃ (9.76 g, 37.21 mmol, 1.50 당량)를 N₂ 하에 실온에서 조금씩 첨가하였다. 생성된 혼합물을 N₂ 하에 실온에서 밤새 교반하였다. TLC (PE: EtOAc = 10:1)는 반응이 완결되었음을 나타내었다. 반응물을 진공 하에 농축 건조시켰다. 잔류물을 실리카 겔 칼럼 크로마토그래피에 의해 PE/EtOAc (4:1)로 용리시키면서 정제하여 1-(2-브로모에틸)-2-클로로-4-니트로벤젠 (화합물 128, 5.10g, 72.31%)을 적색 오일로서 수득하였다. ¹H NMR (400 MHz, DMSO-d₆) δ 8.28 (d, J = 2.4 Hz, 1H), 8.18 (dd, J = 8.4, 2.4 Hz, 1H), 7.73 (d, J = 8.4 Hz, 1H), 3.79 (t, J = 7.2 Hz, 2H), 3.38 (t, J = 7.2 Hz, 2H).

[0793] 단계 3. 화합물 129의 합성

[0794] DMF (50.00 mL) 중 1-(2-브로모에틸)-2-클로로-4-니트로벤젠 (화합물 128, 5.00 g, 18.90 mmol, 1.00 당량)의 용액에 질소 분위기 하에 실온에서 티오아세트산칼륨 (2.16 g, 18.91 mmol, 1.00 당량)을 첨가하였다. 생성된 혼합물을 실온에서 2시간 동안 교반하였다. TLC (PE: EtOAc= 10:1)는 반응이 완결되었음을 나타내었다. 반응물을 물 (600.00 mL)로 희석하였다. 생성된 혼합물을 EtOAc (200.00mL*3)로 추출하였다. 합한 유기 층을 물 (200.00 mL), 염수 (200.00 mL*3)로 세척하고, 무수 Na₂SO₄ 상에서 건조시키고, 진공 하에 농축 건조시켜 1-[[2-(2-클로로-4-니트로페닐)에틸]술파닐]에테논 (화합물 129, 4.50 g, 85%)을 적색 오일로서 수득하였다. ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 8.24 (d, J = 2.4 Hz, 1H), 8.07 (dd, J = 8.4, 2.4 Hz, 1H), 7.45 (d, J = 8.4 Hz, 1H), 3.20 - 3.05 (m, 4H), 2.34 (s, 3H).

[0795] 단계 4. 화합물 130의 합성

[0796] MeOH (300.00 mL) 중 1-[[2-(2-클로로-4-니트로페닐)에틸]술파닐]에테논 (화합물 129, 2.00 g, 7.70 mmol, 1.00 당량)의 교반 용액에 N₂ 하에 0℃에서 MeONa (6.93 mL, 37.33 mmol, 5.00 당량, 30%)를 첨가하였다. 생성된 혼합물을 0℃에서 N₂ 하에 1시간 동안 교반하였다. TLC (PE: EtOAc =10:1)는 반응이 완결되었음을 나타내었다. 반응물을 AcOH를 사용하여 pH 값 3-4로 켄칭하였다. 생성된 혼합물을 진공 하에 농축 건조시켰다. 잔류물을 DCM (50.00 mL)으로 희석하고, 여과하였다. 여과물을 정제용- TLC (PE: EtOAc = 10:1)에 의해 정제하여 2-(2-클로로-4-니트로페닐)에탄티올 (화합물 130, 1.35 g, 72%)을 담황색 오일로서 수득하였다. ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 8.26 (d, J = 2.4 Hz, 1H), 8.09 (dd, J = 8.4, 2.4 Hz, 1H), 7.45 (d, J = 8.4 Hz, 1H), 3.14 (dd, J = 8.0, 6.8 Hz, 2H), 2.85 (dt, J = 8.0, 7.2 Hz, 2H), 1.43 (t, J= 8.0 Hz, 1H).

[0797] 단계 5. 화합물 132의 합성

[0798] DMF (200.00 mL) 중 (2S)-2-[[[(9H-플루오렌-9-일메톡시)카르보닐]아미노]프로판산 (화합물 131, 20.00 g, 64.24 mmol, 1.00 당량)의 교반 용액에 공기 분위기 하에 실온에서 TSTU (25.18 g, 83.52 mmol, 1.30 당량) 및 DIEA (16.60 g, 128.48 mmol, 2.00 당량)를 첨가하였다. 생성된 혼합물을 실온에서 1시간 동안 교반하였다. LCMS는 반응이 완결되었음을 나타내었다. 반응물을 물 (200.00 mL)로 희석하고, 생성된 혼합물을 ETOAC (100.00 mL*3)로 추출하였다. 합한 유기 층을 물 (100.00 mL), 염수 (100.00 mL)로 세척하고, 무수 Na₂SO₄ 상에서 건조시키고, 진공 하에 농축 건조시켰다. 잔류물을 실리카 겔 칼럼 크로마토그래피에 의해 (PE: EtOAc =1:2)로 용리시키면서 정제하여 2,5-디옥소피롤리딘-1-일 (2S)-2-[[[(9H-플루오렌-9-일메톡시)카르보닐]아미노]프로파노에이트 (화합물 132, 25.00 g, 83%) t를 백색 고체로서 수득하였다. LCMS(ES, m/z):431[M+Na]⁺

[0799] 단계 6. 화합물 133의 합성

[0800] 물 (200.00 mL) 중 글리신 (3.68 g, 48.97 mmol, 1.00 당량) 및 NaHCO₃ (12.34 g, 146.89 mmol, 3.00 당량)의 용액에 DMF (200.00 mL) 중 2,5-디옥소피롤리딘-1-일 (2S)-2-[[[(9H-플루오렌-9-일메톡시)카르보닐]아미노]프로파노에이트 (화합물 132, 20.00 g, 48.97 mmol, 1.00 당량)의 용액을 첨가하였다. 반응물을 실온에서 2시간 동안 교반하였다. LCMS는 반응이 완결되었음을 나타내었다. 반응물을 2 N HCl를 사용하여 pH 값 2-3으로 조정하였다. 생성된 혼합물을 EtOAc (500.00 mL*3)로 추출하고, 합한 유기 층을 염수 (500.00 mL)로 세척하고, 무수 Na₂SO₄ 상에서 건조시키고, 진공 하에 농축 건조시켜 [(2S)-2-[[[(9H-플루오렌-9-일메톡시)카르보닐]아미노]프로파노에이트]아세트산 (화합물 133, 15.00 g, 71%)을 백색 고체로서 수득하였다. LCMS(ES, m/z): 369 [M+H]⁺

[0801] 단계 7. 화합물 134의 합성

[0802] THF (300.00 mL)/톨루엔 (100.00 mL) 중 [(2S)-2-[[[(9H-플루오렌-9-일메톡시)카르보닐]아미노]-프로판아미도]아세트산 (화합물 133, 5.00 g, 13.57 mmol, 1.00 당량), Pb(OAc)₄ (7.22 g, 16.28 mmol, 1.20 당량) 및 피리딘 (1.29 g, 16.31 mmol, 1.20 당량)의 용액을 N₂ 하에 80℃에서 16시간 동안 교반하였다. LCMS는 반응이 완결되었음을 나타내었다. 실온으로 냉각시킨 후, 반응물을 여과하였다. 필터 케이크를 THF (100.00 mL)로 세척하였다. 합한 유기 층을 진공 하에 농축 건조시켰다. 잔류물을 실리카 겔 칼럼 크로마토그래피에 의해 (PE: ETOAC=1:2)로 용리시키면서 정제하여 [(2S)-2-[[[(9H-플루오렌-9-일메톡시)카르보닐]아미노]프로판아미도]메틸아세테이트 (화합물 134, 2.50 g, 45%)를 백색 고체로서 수득하였다. LCMS(ES, m/z): 405 [M+Na]⁺. ¹H NMR (400 MHz, 클로로포름-d) δ 7.77-7.73 (m, 2H), 7.58 (d, J = 7.6 Hz, 2H), 7.43 - 7.37 (m, 2H), 7.36 - 7.29 (m, 2H), 7.10 (s, 1H), 5.24 (d, J = 7.6 Hz, 2H), 4.51 - 4.35 (m, 2H), 4.22 (t, J = 6.8 Hz, 2H), 2.04 (s, 3H), 1.39 (d, J = 6.8 Hz, 3H).

[0803] 단계 8. 화합물 135의 합성

[0804] DCM (120 mL) 중 [(2S)-2-[[[(9H-플루오렌-9-일메톡시)카르보닐]아미노]-프로판아미도]메틸아세테이트 (화합물 134, 2.25 g, 5.88 mmol, 1.00 당량) 및 2-(2-클로로-4-니트로페닐)에탄티올 (화합물 500, 1.28 g, 5.88 mmol, 1.00 당량)의 교반 용액에 TFA (0.27 mL, 2.376 mmol, 0.62 당량)를 N₂ 하에 실온에서 첨가하였다. 생성된 혼합물을 40℃에서 16시간 동안 교반하였다. LCMS는 반응이 완결되었음을 나타내었다. 반응물을 진공 하에 농축 건조시켜 9H-플루오렌-9-일메틸 N-[(1S)-1-[[[2-(2-클로로-4-니트로페닐)에틸]술폰닐]메틸]카르바모일]에틸]카르바메이트 (화합물 135, 3.10 g, 90%)를 황색 고체로서 수득하였다. LCMS(ES, m/z): 540, 542 [M+H]⁺.

[0805] 단계 9. 화합물 136의 합성

[0806] DMF (155.00 mL) 중 9H-플루오렌-9-일메틸 N-[(1S)-1-[[[2-(2-클로로-4-니트로페닐)에틸]술폰닐]메틸]카르바모일]에틸]카르바메이트 (화합물 135, 3.10 g, 5.74 mmol, 1.00 당량)의 용액에 N₂ 하에 0℃에서 피페리딘 (31.00 mL)을 첨가하였다. 생성된 혼합물을 N₂ 하에 0℃에서 0.5시간 동안 교반하였다. LCMS는 반응이 완결되었음을 나타내었다. 반응물을 물 (600.00 mL)로 희석하였다. 생성된 혼합물을 EA (200.00 mLx3)로 추출하였다. 합한 유기 층을 염수 (200.00 mL)로 세척하고, 무수 Na₂SO₄ 상에서 건조시키고, 진공 하에 농축 건조시켜 조 생성물 3.00 g를 수득하였다. 조 생성물을 실리카 겔 칼럼 크로마토그래피에 의해 (DCM: MeOH = 3: 1)로 용리시키면서 재정제하여 (2S)-2-아미노-N-[[[2-(2-클로로-4-니트로페닐)에틸]술폰닐]메틸]프로판아미드 (화합물 136, 1.50 g, 78%)를 황색 오일로서 수득하였다. LCMS(ES, m/z): 318, 320 [M+H]⁺.

[0807] 단계 10. 화합물 137의 합성

[0808] DMF (75.00 mL) 중 (2S)-2-아미노-N-[[[2-(2-클로로-4-니트로페닐)에틸]술폰닐]-메틸]프로판아미드 (화합물 136, 1.50 g, 4.72 mmol, 1.00 당량)의 용액에 공기 중 실온에서 H₂O (10.00 mL) 및 Boc₂O (1.03 g, 4.72 mmol, 1.00 당량) 중 NaHCO₃ (0.59 g, 7.08 mmol, 1.50 당량)의 용액을 첨가하였다. 반응물을 실온에서 1시간 동안 교반하였다. LCMS는 반응이 완결되었음을 나타내었다. 반응물을 물 (500.00 mL)로 희석하고, EtOAc (200.00 mLx3)로 추출하였다. 합한 유기 층을 염수 (200.00 mLx3)로 세척하고, 무수 Na₂SO₄ 상에서 건조시키고, 진공 하에 농축 건조시켜 tert-부틸 N-[(1S)-1-[[[2-(2-클로로-4-니트로페닐)에틸]술폰닐]메틸]-카르바모일]에틸]카르바메이트 (화합물 137, 1.82 g, 83%)를 적색 오일로서 수득하였다. LCMS(ES, m/z): 418, 420 [M+H]⁺, 318, 320 [M+H-100]⁺.

[0809] 단계 11. 화합물 138의 합성

[0810] EtOH (100.00 mL)/H₂O (50.00 mL) 중 tert-부틸 N-[(1S)-1-[[[2-(2-클로로-4-니트로페닐)에틸]술폰닐]메틸]카르바모일]에틸]카르바메이트 (화합물 137, 1.82 g, 4.36 mmol, 1.00 당량), 철 분말 (2.43 g, 0.04 mmol, 10.00 당량) 및 NH₄Cl (2.33 g, 0.04 mmol, 10.00 당량)의 슬러리를 70℃에서 2시간 동안 교반하였다. LCMS는 반응이 완결되었음을 나타내었다. 반응물을 여과하였다. 여과물을 진공 하에 농축 건조시켰다. 잔류물을 DCM (50.00 mL)으로 용해시키고, 여과하였다. 여과물을 실리카 겔 칼럼 크로마토그래피에 의해 (DCM: MeOH = 13:

1)로 용리시키면서 정제하여 tert-부틸 N-[(1S)-1-([2-(4-아미노-2-클로로페닐)에틸]술폰닐)메틸]카르바모일]에틸]카르바메이트 (화합물 138, 1.20 g, 68%)를 황색 오일로서 수득하였다. LCMS(ES, m/z): 388,390 [M+H]⁺, 288,290 [M+H-100]⁺

[0811] 단계 12. 화합물 139의 합성

[0812] 0℃에서 DMF (5.00 mL) 중 3-[5-(아미노메틸)-1-옥소-3H-이소인돌-2-일]피페리딘-2,6-디온 (INT 1, 352 mg, 1.29 mmol, 1.00 당량)의 교반 용액에 CDI (209.00 mg, 1.29 mmol, 1 당량) 및 TEA (260 mg, 2.58 mmol, 2 당량)를 첨가하였다. 생성된 혼합물을 0℃에서 2시간 동안 교반하였다. 이어서 tert-부틸 N-[(1S)-1-([2-(4-아미노-2-클로로페닐)에틸]술폰닐)-메틸]카르바모일]-에틸]카르바메이트 (화합물 138, 500.00 mg, 1.29 mmol, 1.00 당량) 및 DMAP (472 mg, 3.87 mmol, 3.00 당량)를 첨가하였다. 생성된 혼합물을 60℃에서 24시간 동안 교반하였다. LCMS는 반응이 완결되었음을 나타내었다. 실온으로 냉각시킨 후, 반응 혼합물을 역 플래쉬 크로마토그래피에 의해 하기 조건: 칼럼, C18 실리카 겔; 이동상, 물 (0.1%FA) 중 ACN, 30분 내 0%에서 60% 구배; 검출기, UV 254 nm를 사용하여 정제하여 tert-부틸 N-[(1S)-1-([2-(2-클로로-4-([2-(2,6-디옥소피페리딘-3-일)-1-옥소-3H-이소인돌-5-일]메틸]카르바모일)아미노]페닐)에틸]술폰닐)메틸]카르바모일]에틸]카르바메이트 (화합물 139, 450.00 mg, 48%)를 황색 고체로서 수득하였다. LCMS(ES, m/z): 687,689 [M+H]⁺, 587,589 [M+H-100]⁺

[0813] 단계 13. 화합물 140의 합성

[0814] DCM (22.00 mL) 중 tert-부틸 N-[(1S)-1-([2-(2-클로로-4-([2-(2,6-디옥소피페리딘-3-일)-1-옥소-3H-이소인돌-5-일]메틸]카르바모일)아미노]페닐)에틸]술폰닐)-메틸]카르바모일]에틸]카르바메이트 (화합물 139, 440.00 mg, 0.64 mmol, 1.00 당량)의 교반 용액에 실온에서 TFA(2.20 mL)를 첨가하였다. 생성된 혼합물을 실온에서 0.5시간 동안 교반하였다. LCMS는 반응이 완결되었음을 나타내었다. 반응물을 진공 하에 농축 건조시켜 (2S)-2-아미노-N-[(2-[2-클로로-4-([2-(2,6-디옥소피페리딘-3-일)-1-옥소-3H-이소인돌-5-일]메틸]카르바모일)아미노]페닐)에틸]술폰닐)메틸]프로판아미드; 트리플루오로아세트산 (화합물 140, 400.00 mg)을 적색 오일로서 수득하였다. LCMS(ES, m/z): 578,589 [M+H-TFA]⁺

[0815] 단계 14. 화합물 142의 합성

[0816] DMSO (10 mL) 중 L-발린 (화합물 141, 0.50 g, 4.27 mmol, 1.00 당량)의 슬러리에 2,5-디옥소피롤리딘-1-일 6-(2,5-디옥소피롤-1-일)헥사노에이트 (1.32 g, 4.28 mmol, 1.00 당량) 및 DIEA (1103 mg, 8.54 mmol, 2.00 당량)를 첨가하였다. 생성된 혼합물을 실온에서 4시간 동안 교반하였다. LCMS는 반응이 완결되었음을 나타내었다. 반응 혼합물을 역 플래쉬 크로마토그래피에 의해 하기 조건: 칼럼, C18 실리카 겔; 이동상, 물 중 ACN (0.1%FA), 30분 내 0%에서 60% 구배; 검출기, UV 220 nm를 사용하여 정제하여 (2S)-2-[6-(2,5-디옥소피롤-1-일)헥산아미도]-3-메틸부탄산 (화합물 142, 1.2 g, 72%)을 갈색 고체로서 수득하였다. LCMS(ES, m/z): 311 [M+H]⁺

[0817] 단계 15. 화합물 (Im)의 합성

[0818] DMF (2 mL) 중 (2S)-2-[6-(2,5-디옥소피롤-1-일)헥산아미도]-3-메틸부탄산, (화합물 142, 59 mg, 0.19 mmol, 1.00 당량), HOBt (26 mg, 0.19 mmol, 1.00 당량) 및 HATU (72 mg, 0.19 mmol, 1.00 당량)의 용액을 공기 중에서 실온에서 1시간 동안 교반하였다. 이어서 (2S)-2-아미노-N-[(2-[2-클로로-4-([2-(2,6-디옥소피페리딘-3-일)-1-옥소-3H-이소인돌-5-일]메틸]카르바모일)아미노]페닐)에틸]술폰닐)메틸]프로판아미드 트리플루오로아세트산 (화합물 140, 200 mg, 0.19 mmol, 1.00 당량, 66.70%) 및 DIEA (197 mg, 1.52 mmol, 8.00 당량)를 실온에서 첨가하였다. 반응 혼합물을 실온에서 2시간 동안 교반하였다. LCMS는 반응이 완결되었음을 나타내었다. 생성된 혼합물을 역 플래쉬 크로마토그래피에 의해 하기 조건: 칼럼: YMC-악투스 트리아트(Actus Triart) C18, 30 mm X 150 mm, 5μm; 이동상 A: 물 (0.1%FA), 이동상 B: ACN; 유량: 60 mL/분; 구배: 10분 내에 28 B에서 45 B, 254 nm; RT1: 9.67분을 사용하여 정제하였다. 수집된 분획을 동결건조시켜 N-[(1S)-1-[(1S)-1-([2-(2-클로로-4-([2-(2,6-디옥소피페리딘-3-일)-1-옥소-3H-이소인돌-5-일]메틸]카르바모일)아미노]-페닐)에틸]술폰닐)메틸]카르바모일]에틸]카르바모일]-2-메틸프로필]-6-(2,5-디옥소피롤-1-일)헥산아미드 (화합물 (Im), 27.8 mg, 16%)를 백색 고체로서 수득하였다. LCMS(ES, m/z): 879,881 [M+H]⁺. ¹H NMR (400 MHz, DMSO-d₆) δ 10.99 (s, 1H), 8.80 (s, 1H), 8.47 (t, J=6.0Hz, 1H), 8.03 (d, J=7.2Hz, 1H), 7.78 (d, J=8.8Hz, 1H), 7.70-7.66 (m,

2H), 7.51 (s, 1H), 7.44 (d, J=8.0Hz, 1H), 7.21-7.14 (m, 2 H), 6.99 (s, 2H), 6.82 (t, J=6.0Hz, 1H), 5.13-5.10 (m, 1 H), 4.47-4.40 (m, 3H), 4.33-4.29 (m, 3H), 4.24 (t, J=7.2 Hz, 1H), 4.14 (t, J=6.8Hz, 1H), 3.38-3.36 (m, 1H), 2.97-2.90 (m, 1H), 2.86 (t, J=7.6Hz, 2H), 2.73-2.67 (m, 2H), 2.62-2.57 (m, 1H), 2.40-2.35 (m, 1H), 2.20-2.05 (m, 2H), 2.02-1.96 (m, 1H), 1.95-1.88 (m, 1H), 1.48-1.46 (m, 4H), 1.23-1.16 (m, 6H), 0.83-0.78 (m, 6H).

[0819] 실시예 4: 신규분해제 접합체의 제조 및 특징화

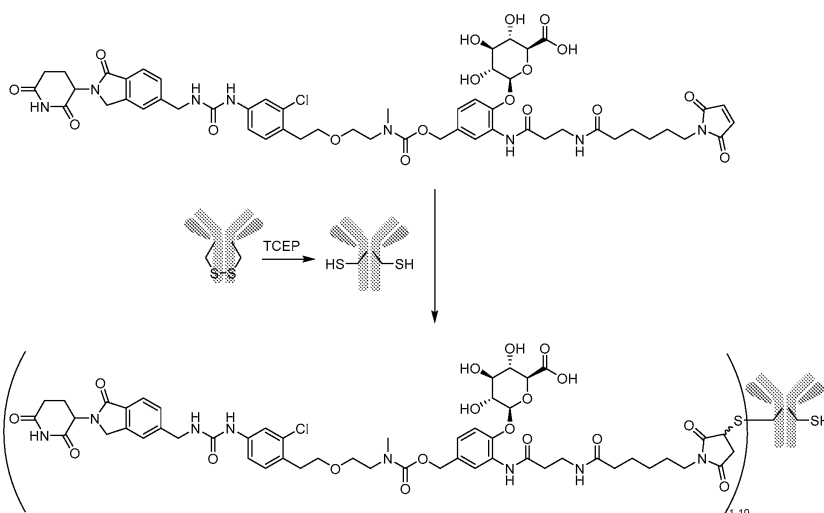
[0820] 항체의 용액을 30 당량의 트리스-(2-카르복시에틸)포스핀 (TCEP)으로 처리하고, 37℃에서 1시간 동안 인큐베이션하여 쇠간 디설피드를 환원시켰다. 환원된 항체를 일러스트라(illustra) NAP 칼럼 (지이 헬스케어(GE Healthcare))을 사용하여 50 mM EPPS, 5 mM EDTA pH 7.0 완충제 내로 정제하였다.

[0821] N,N-디메틸아세트아미드 (DMA)의 최종 농도가 15% (v/v)가 되도록 DMA 중 원액으로서 첨가된 12 당량의 링커-신규분해제를 사용하여, 50 mM EPPS, 5 mM EDTA pH 7.0 중 2-5 mg/mL의 서열식별번호: 9를 갖는 중쇄 및 서열식별번호: 10을 갖는 경쇄를 포함하는 환원된 항-CD33 항체 ("CD33AB")의 용액을 처리함으로써 접합을 수행하였다. 생성된 반응 혼합물을 4℃에서 밤새 정치하였다. 생성된 신규분해제 접합체를 일러스트라 NAP 칼럼 (지이 헬스케어)을 사용하여 20 mM 숙시네이트, 8% 슈크로스, 0.01% 트윈(Tween)-20 pH 5.5로 정제하고, 50 kD 분자량 컷오프를 갖는 아미콘 울트라(Amicon Ultra) 원심분리 농축기 (밀리포어(Millipore))를 사용하여 농축시켰다.

[0822] 농도 및 단량체는 5 μ m 입자를 갖는 7.8 x 300 mM TSKGel 3000SWXL 칼럼 (토소 바이오사이언스(Tosoh Bioscience))을 사용하여, 30분 동안 0.5 mg/mL로 전개되는 400 mM 과염소산나트륨, 50 mM 인산나트륨, 5% (v/v)이소프로판올 이동상으로 등용매적으로 용리시키는 크기 배제 크로마토그래피에 의해 결정하였다. 신규분해제 접합체를 214 nm에서 검출하는 항체 표준 곡선으로부터 정량화하였다.

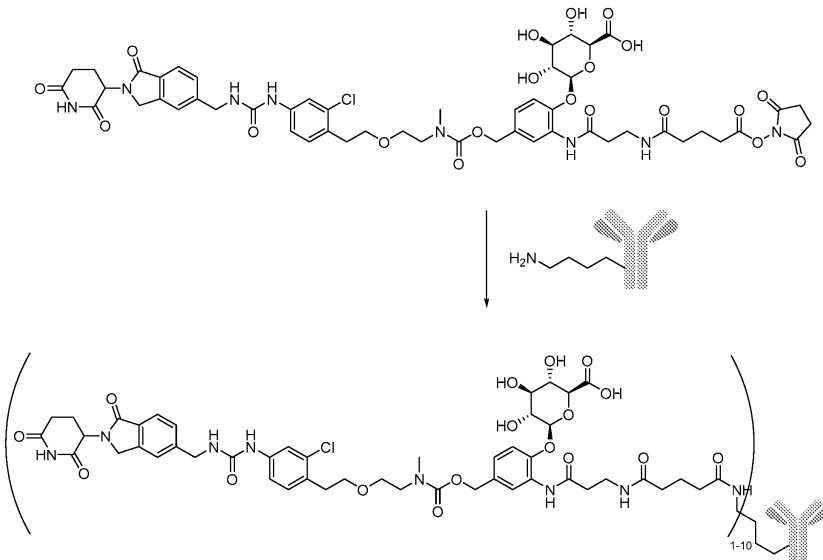
[0823] 약물 대 항체 비 (DAR)를 2.5 μ m 입자를 갖는 4.6 x 35 mm TSK겔 부틸-NPR 칼럼을 사용하여 소수성 상호작용 크로마토그래피에 의해 결정하였다. 이동상 A는 1.5 M 황산암모늄, 25 mM 인산나트륨 pH 7.0이었다. 이동상 B는 25 mM 인산나트륨 pH 7.0, 25% (v/v)이소프로판올이었다. 분석물을 0.6 mL/분의 유량으로 12분 내에 0-100% B의 선형 구배로 용리시켰다. 검출은 214 nm에서 이루어졌다.

[0824] 유리 링커-페이로드를 2.5 μ m 입자를 갖는 4.6 x 250 mm HISEP 칼럼 (수펠코(Supelco))을 사용하여 혼합-모드 크로마토그래피에 의해 결정하였다. 이동상 A는 100 mM 아세트산암모늄이었다. 이동상 B는 100% 아세토니트릴이었다. 분석물을 0.7 mL/분의 유량으로 25분 내에 25-40% B, 이어서 2분 내에 40-100% B의 구배로 용리시켰다. 칼럼 온도는 35℃였다. 유리 링커-페이로드를 254 nm에서 검출하는 외부 표준 곡선을 사용하여 정량화하였다.



[0825]

[0826] 반응식 16: 항-CD33 항체-화합물 (Ie) 접합체의 제조



[0827]

[0828] 반응식 17: 항-CD33 항체-화합물 (Ih) 접합체의 제조

[0829] 다른 접합체는 적절한 항체를 사용하여 유사한 방식으로 제조될 수 있다.

[0830] 실시예 5: 항-CD33 항체-신규분해제 접합체를 사용한 급성 골수성 백혈병 (AML)의 치료

[0831] 항-CD33 항체(CD33AB)-신규분해제 화합물을 무흉선 누드 마우스 (Cr1:NU(NCr)-Foxn1tm, 찰스 리버(Charles River))에서 시험하였다. 50% 매트릭셀(Matrigel) 중 1×10^7 개 MV411 인간 급성 단핵구성 백혈병 세포 (ATCC[®] CRL-5991TM)를 마우스의 측복부에 피하로 주사하였다 (0.1 mL/마우스). 종양이 100 - 150 mm³의 평균 크기에 도달하면 마우스에게 항-CD33 항체-신규분해제 접합체, 비-표적화 신규분해제 접합체, 및 비히클 대조군을 투여하였다.

[0832] CD33AB-화합물 (Ia), CD33AB-화합물 (Ie), 및 CD33AB-화합물 (Ih)의 원액을 비히클로 희석하여 0.3, 0.283, 및 0.299 mg/mL 투여 용액을 수득하였으며, 이를 각각의 동물의 체중에 대해 조정된 10 mL/kg (20 g 마우스당 0.2 mL)의 투여 부피로 3, 2.83, 및 2.99 mg/kg로 제공하였다. 이 투여 전략은 확실히 각각의 시험 군으로의 동일한 양의 페이로드를 전달하였다. 밀로타르그를 0.9% 염화나트륨 용액 중에 0.01 mg/mL로 희석하였으며, 이를 10 mL/kg (20 g 마우스당 0.2 mL)의 투여 부피로 3 mg/kg로 제공하였다. 베네토클락스를 초음파처리를 통해 60% PG, 30% PEG400, 10%에탄올로 구성된 용매 중에 체제화하여 5 mg/mL의 투여 현탁액을 수득하였으며, 이를 10 mL/kg의 부피로 투여하는 경우에 50 mg/kg로 전달하였다. CC-90009를 원심분리하여 바닥에서 분말을 수집한 다음; N-메틸-2-피롤리디논 (NMP), PEG400 및 염수를 첨가하고, 하나씩 잘 혼합하여 5% NMP, 45% PEG400 및 50% 염수 중 0.5 mg/mL 투여 용액을 수득하였고, 이를 10 mL/kg의 부피로 투여하는 경우에 5 mg/kg로 전달하였다.

[0833] 마우스를 다음과 같이 7개의 치료군 (N=9/군)으로 나누었다: 1) 비히클; 2) CD33AB-화합물 (Ia) (3 mg/kg, iv, qd x 1); 3) CD33AB-화합물 (Ie) (2.83 mg/kg, iv, qd x 1); 4) CD33AB-화합물 (Ih) (2.99 mg/kg, iv, qd x 1); 5) 밀로타르그 (0.1 mg/kg, iv, qd x 1); 6) 베네토클락스 (50 mg/kg, po, qd x 21); 7) CC-90009 (5 mg/kg, ip, bid x 10). 군 1-5에 대한 시험 물품을 체중에 대해 조정된 부피 (0.200 mL/20 g 마우스)로 단일 용량 (qd x 1)으로서 정맥내로 (i.v.) 투여하였다. 각각의 동물의 BW에 비례하는 10 mL/kg (20 g 마우스당 0.2 mL)의 투여 부피로 베네토클락스를 경구로 (po) 투여하는 한편, CC-90009를 복강내로 (ip) 투여하였다.

[0834] 종양을 캘리퍼를 사용하여 1주에 2회 측정하고, 각각의 동물을 그의 종양이 종점 부피 (2,000 mm³)에 도달하였을 때 또는 연구의 마지막 날 (제45일)에, 어느 쪽이든 먼저 일어났을 때 안락사시켰다. MTV(n)는 종양이 종점 부피에 도달하지 않은 남아있는 동물의 수 (n) 중 연구의 마지막 날의 중앙 종양 부피로서 정의되었다.

[0835] 도 1에 제시된 바와 같이, 모든 신규분해제 접합체는 비히클과 비교하여 시간 경과에 따라 보다 느린 종양 성장을 제공하였다.

- [0836] 실시예 6: 인간 백혈병 모델에 대한 AB1 - 화합물 (Ia) 접합체의 활성
- [0837] 시험관내 세포독성을 CD33 양성 급성 골수성 백혈병 세포주의 패널 및 비-AML CD33-음성 세포의 패널을 사용하여 측정하였다. 사전 결정된 농도의 세포를 96 웰 플레이트에 플레이팅하고, 37°C/5CO₂에서 밤새 인큐베이션한 후, 각각의 시험 물질 (TA)의 연속 희석물을 세포에 첨가하였다. 세포를 시험 물질과 함께 72시간 동안 인큐베이션하고, 생존율을 셀타이터-글로(CellTiter-Glo)® 시약 (프로메가(Promega))으로 검출하였다. 발광 값을 각각의 세포주에 대해 정규화하고, IC50을 프리즘(Prizm) 소프트웨어를 사용하여 계산하였다.
- [0838] 결과는 화합물 Ia에 접합된 huMy9-6 유래된 항체 AB1 ("AB-화합물 (Ia)")이 CD33-양성 AML 세포 상에서 CC-885 (공지된 GSPT1 분해제) 또는 밀로타르그와 대등한 전체 시험관내 효능을 나타내었으며, 일부 경우는 우월한 효능을 가짐을 나타내었다. (도 2 참조). 추가로, GSPT1 분해제 페이로드의 표적화된 CD33-매개 전달의 가설과 일치하게, AB1-화합물 (Ia)는 CD33-음성 세포 모델에서 불활성이었다.
- [0839] 실시예 7: 항체-신규분해제 접합체를 사용한 급성 골수성 백혈병 (AML)의 치료
- [0840] 피하 종양 모델 MV4-11 인간 급성 골수구성 백혈병 세포 (0.1 mL 중 1x10⁶ 개 세포)를 암컷 무흉선 누드 마우스의 우측 측복부에 피하로 접종하였다. 종양 크기가 150 mm³에 도달하였을 때 시작하여 마우스를 측면 꼬리 정맥 내로의 정맥내 주사, 복강내 주사, 경구 위관영양, 또는 그의 조합에 의해 시험 물질으로 치료하였다. 종양 크기 및 마우스 체중을 1주에 2회 측정하였다.
- [0841] 시험관내 관찰과 일치하게, 신규분해제 P1을 방출하는 여러 AB1-기반 접합체를 사용한 CD33-양성 AML 모델 종양 (MV4-11)의 생체내 치료는 종양 퇴행을 유발하였으며, 베타-글루쿠로니드 방출 촉발인자 및 천연 시스템인 접합을 함유하는 접합체에서 가장 강력한 효과가 관찰되었다. (도 3 참조).
- [0842] 실시예 8: CD33AB-화합물 (Ia) 및 겐투주맙-화합물 (Ia) 접합체의 안정성
- [0843] 항CD33-화합물 (Ia) 접합체 (~8 DAR)의 안정성 검정을 20 mM 숙시네이트, 8% 수크로스, 0.01% 트윈-20 pH 5.5 중 2.5 mg/mL로 겐투주맙, IgG1, CD33AB, 및 IgG1 L234A/L235A "LALA" Ab 포맷을 사용하여 40일에 걸쳐 수행하고, 크기 배제 크로마토그래피 (SEC)에 의해 검정하였다. 4°C에서, 어떠한 접합체에 대해서도 농도 또는 단량체의 유의한 변화가 관찰되지 않았다. (도 4.) 이와 대조적으로, 37°C에서, 천연 겐투주맙-화합물 (Ia) 및 IgG1 및 IgG1 LALA 백본을 사용한 화합물 (Ia) 접합체는 39일에 걸쳐 유의한 응집을 보였다 (20-39일로부터 15-28% 증가). 그러나, CD33AB-화합물 (Ia) (IgG1 N297A 백본을 사용함)는 37°C에서 39일에 걸쳐 88% 초과와 단량체 상태를 유지하였다 (도 4). 수일에 걸쳐 CD33AB-화합물 (Ia)에서와 같이 높은 단량체를 유지하는 것은 일반적으로 혈액 순환에서의 응집이 급속한 클리어런스 및 증가된 독성으로 이어져 치료 지수를 좁힐 수 있기 때문에 ADC에 대한 바람직한 특성이다. 또한, 천연 SEC-MS 분석에 의해, 천연 겐투주맙-화합물 (Ia)는 동일한 몰량의 페이로드-링커로 제조된 CD33AB 유래 접합체보다 훨씬 더 높은 비접합 항체를 나타낸다. 일반적으로, CD33AB-화합물 (Ia)에서와 같이 ADC에서 낮은 수준의 비접합된 항체를 갖는 것이 바람직한 품질 속성이다. 또한, 겐투주맙을 감소시키는 데 CD33AB보다 더 많은 TCEP가 필요하였다 (4.5 대 2.5 몰 당량). ADC를 제조하기 위해 CD33AB-화합물 (Ia)에서와 같이 환원제를 덜 사용하는 것이 상품의 비용을 낮추고 정제 공정을 단순화하는 데 바람직하다.
- [0844] 실시예 9: 인간 백혈병 모델에 대한 항CD33 신규분해제 접합체의 활성
- [0845] 피하 종양 모델 MV4-11 인간 급성 골수구성 백혈병 세포 (0.1 mL 중 1x10⁶ 개 세포)를 암컷 무흉선 누드 마우스의 우측 측복부에 피하로 접종하였다. 종양 크기가 150 mm³에 도달하였을 때 시작하여 마우스를 측면 꼬리 정맥 내로의 정맥내 주사, 복강내 주사, 경구 위관영양, 또는 그의 조합에 의해 시험 물질으로 치료하였다. 종양 크기 및 마우스 체중을 1주에 2회 측정하였다.
- [0846] 시험관내 관찰과 일치하게, 신규분해제 P1을 방출하는 다양한 CD33-기재 접합체를 사용한 CD33-양성 AML 모델 종양 (MV4-11)의 생체내 치료는 종양 퇴행을 유발하였으며, 가장 안정한 접합체 (CD33AB-화합물 (Ia))가 강력한 항종양 효능을 나타내었다. (도 5.)
- [0847] 실시예 10: 밀로타르그-비감수성 세포주에 대한 항CD33 신규분해제 접합체의 활성
- [0848] 시험 물질 (TA)의 세포독성을 밀로타르그 비감수성인 것으로 공지된 CD33 양성 급성 골수성 백혈병 세포주 (AML-193 및 카수미-6)의 패널을 사용하여 측정하였다. 사전 결정된 농도의 세포를 96 웰 플레이트에 플레이팅

하고, 37℃/5CO₂에서 밤새 인큐베이션한 후, 각각의 시험 물품 (TA)의 연속 희석물을 세포에 첨가하였다. 세포를 시험 물품과 함께 72시간 동안 인큐베이션하고, 생존율을 셀타이터-글로® 시약 (프로메가)으로 검출하였다. 발광 값을 각각의 세포주에 대해 정규화하고, IC50을 프리즘 소프트웨어를 사용하여 계산하였다.

[0849] 도 6a 및 6b에 제시된 바와 같이, 항-CD33 신규분해제 접합체는 두 세포주 모두에 대해 우수한 활성을 가졌다.

[0850] 발명의 내용 및 요약서 섹션이 아닌 상세한 설명 섹션은 청구범위를 해석하는 데 사용되는 것을 의도하는 것으로 이해하여야 한다. 발명의 내용 및 요약서 섹션은 본 발명자(들)에 의해 고려된 바와 같은 본 개시내용의 하나 이상의, 그러나 전부는 아닌 예시적인 측면을 제시할 수 있고, 따라서 어떠한 방식으로든 본 개시내용 및 첨부된 청구범위를 제한하는 것으로 의도되지 않는다.

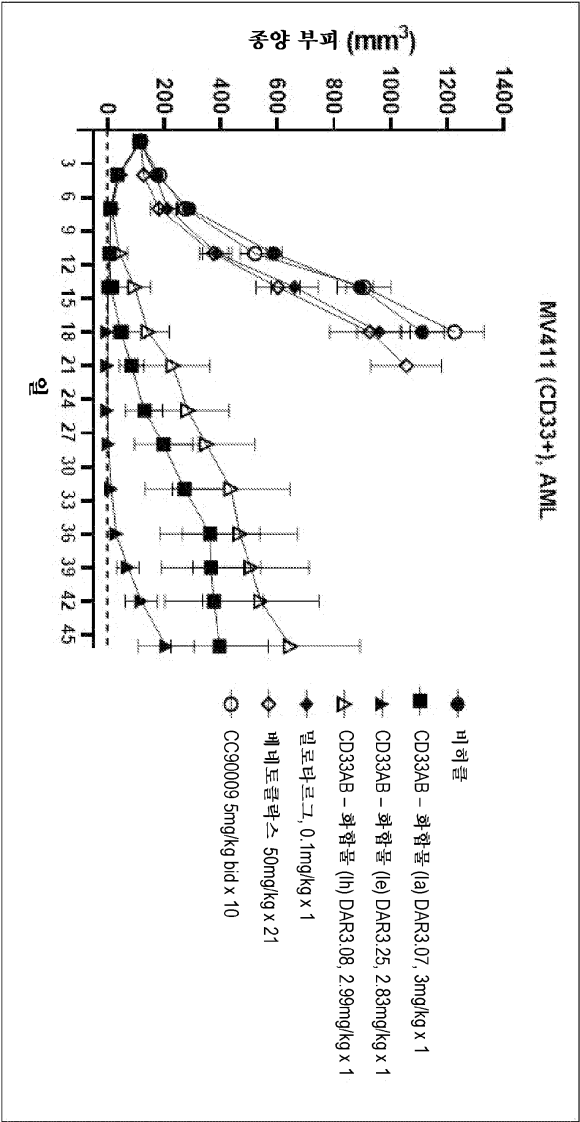
[0851] 본 개시내용은 명시된 기능 및 그의 관계의 구현을 예시하는 기능적 빌딩 블록의 도움으로 상기 기재되었다. 이들 기능적 빌딩 블록의 경계는 설명의 편의를 위해 본원에서 임의로 정의되었다. 명시된 기능 및 그의 관계가 적절하게 수행되는 한, 대안적 경계가 정의될 수 있다.

[0852] 구체적 측면에 대한 상기 기재는 본 개시내용의 일반적 성질을 충분히 드러낼 것이며, 다른 사람들은 관련 기술 분야의 기술 내의 지식을 적용함으로써, 과도한 실험 없이, 본 개시내용의 일반적 개념으로부터 벗어나지 않으면서, 이러한 구체적 측면을 다양한 적용에 대해 용이하게 변형 및/또는 적응시킬 수 있다. 따라서, 이러한 적합화 및 변형은 본원에 제시된 교시 및 지침에 기초하여 개시된 측면의 등가물의 의미 및 범위 내에 있는 것으로 의도된다. 본 명세서의 용어 또는 어구가 교시 및 지침에 비추어 통상의 기술자에 의해 해석되도록, 본원의 어구 또는 용어는 설명을 위한 것이며 제한하려는 것이 아님이 이해되어야 한다.

[0853] 본 개시내용의 범위 및 범주는 상기 기재된 예시적인 측면 중 임의의 것에 의해 제한되어서는 안되며, 단지 하기 청구범위 및 그의 등가물에 따라 정의되어야 한다.

도면

도면1

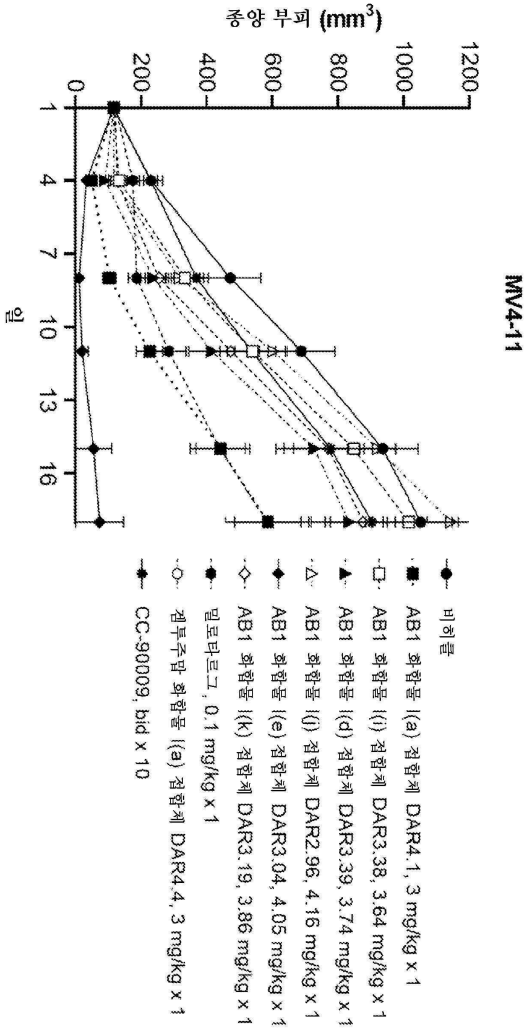


도면2

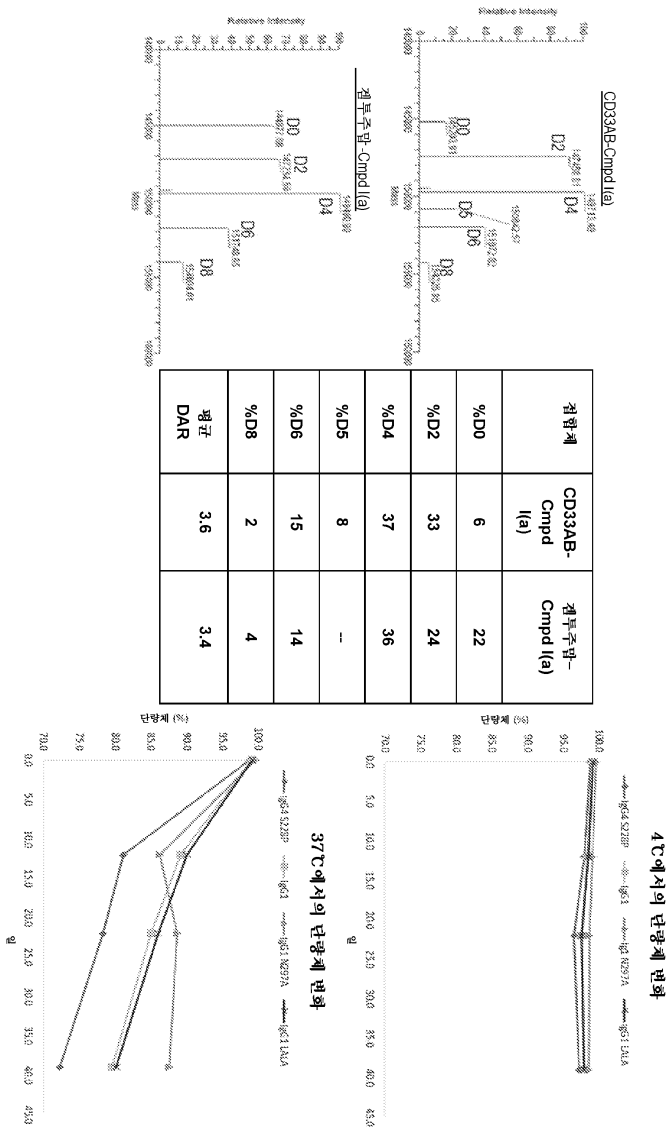
세포 증식 검정 IC50 (nM)			AB1-화합물 (a) 검량제 데이터			
세포주	실험	AB1-화합물 (a) 검량제 데이터	AB1-화합물 (a) 검량제 데이터		AB1-화합물 (a) 검량제 데이터	
			CC-885 IC50 (nM)	AB1-화합물 (a) 검량제 데이터	AB1-화합물 (a) 검량제 데이터	AB1-화합물 (a) 검량제 데이터
1	MY-4-11	백혈병, 이종표원형 B 골수단핵구성	3.02E-10	2.64E-11	5.32E-11	5.32E-11
2	ML-2	백혈병, 급성 골수단핵구성 백혈병	2.82E-10	2.63E-11	5.02E-11	5.02E-11
3	HL-60	백혈병, 급성 전골수구성	2.43E-10	2.41E-11	3.28E-10	3.28E-10
4	SKNO-1	백혈병, 급성 골수성 백혈병	1.51E-10	2.89E-11	1.34E-09	1.34E-09
5	F-36P	백혈병, 골수이형성 증후군	2.86E-10	7.24E-09	>2.00E-8	>2.00E-8
6	Kasumi-6	백혈병, 급성 골수성, 골수모세포	3.84E-10	9.64E-11	>2.00E-8	>2.00E-8
7	OCI-AML-4	백혈병, 급성 골수성 백혈병	4.14E-10	5.45E-11	2.37E-10	2.37E-10
8	Molm-13*	백혈병, 급성, 골수성, 백혈병 시스웹스 백혈병	1.51E-09	1.40E-10	2.70E-11	2.70E-11
9	AML-193	백혈병, 급성 단핵구성, 단핵구	4.01E-10	1.23E-10	>2.00E-8	>2.00E-8
10	EoL-1*	백혈병, 인간 호산구성 백혈병	3.48E-10	5.18E-11	6.87E-11	6.87E-11
11	HNT-34*	백혈병, 급성 골수성 백혈병	1.12E-10	5.38E-11	3.77E-09	3.77E-09
12	Kasumi-3	백혈병, 급성 골수모구성 백혈병	1.40E-10	>2.00E-8	>2.00E-8	>2.00E-8

세포 증식 검정 IC50 (nM)			AB1-화합물 (a) 검량제 데이터			
세포주	실험	AB1-화합물 (a) 검량제 데이터	AB1-화합물 (a) 검량제 데이터		AB1-화합물 (a) 검량제 데이터	
			CC-885	AB1-화합물 (a) 검량제 데이터	AB1-화합물 (a) 검량제 데이터	AB1-화합물 (a) 검량제 데이터
1	OCI-AML-1	백혈병, 급성 골수성 백혈병	4.24E-10	1.60E-09	2.24E-10	2.24E-10
2	OCI-AML-2	백혈병, 급성 골수성 백혈병	1.76E-09	5.65E-09	3.94E-11	3.94E-11
3	OCI-AML-3	백혈병, 급성 골수성 백혈병	1.87E-09	>2.00E-8	4.28E-09	4.28E-09
4	OCI-AML-5*	백혈병, 급성 골수성 백혈병	1.76E-09	1.50E-10	7.83E-11	7.83E-11
5	OCI-AML-6*	백혈병, 급성 골수성 백혈병	3.13E-10	7.22E-09	>2.00E-8	>2.00E-8
6	KG-1	백혈병, 급성 골수	8.47E-10	>2.00E-8	>2.00E-8	>2.00E-8
7	KO52	백혈병, 급성 골수모구성 백혈병	5.93E-10	>2.00E-8	>2.00E-8	>2.00E-8
8	KG-1a	백혈병, 급성 골수성 백혈병	8.47E-10	>2.00E-8	>2.00E-8	>2.00E-8
9	NOMO-1	백혈병, 급성 단핵구성 백혈병	6.15E-10	>2.00E-8	>2.00E-8	>2.00E-8
10	KASUMI-1	백혈병, 급성 골수성 백혈병	9.76E-10	>2.00E-8	>2.00E-8	>2.00E-8
11	OCI-ML	백혈병, 급성 골수성 백혈병	4.70E-09	>2.00E-8	>2.00E-8	>2.00E-8
12	PIB-985	백혈병, 급성 골수성 백혈병(유도)	4.48E-10	1.11E-10	7.14E-09	7.14E-09
13	MRP11	백혈병, 급성 골수모구성 백혈병	9.46E-10	>2.00E-8	>2.00E-8	>2.00E-8

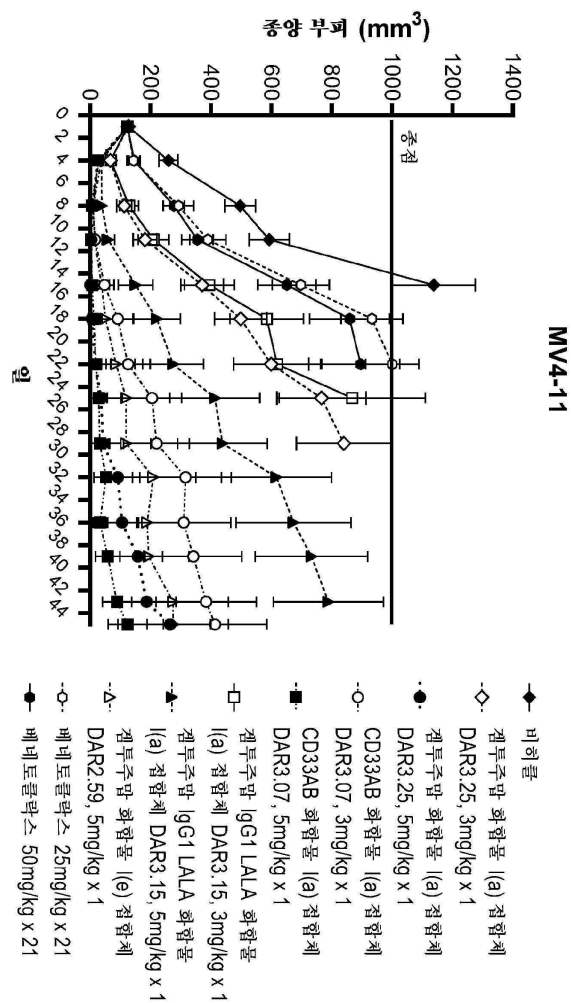
도면3



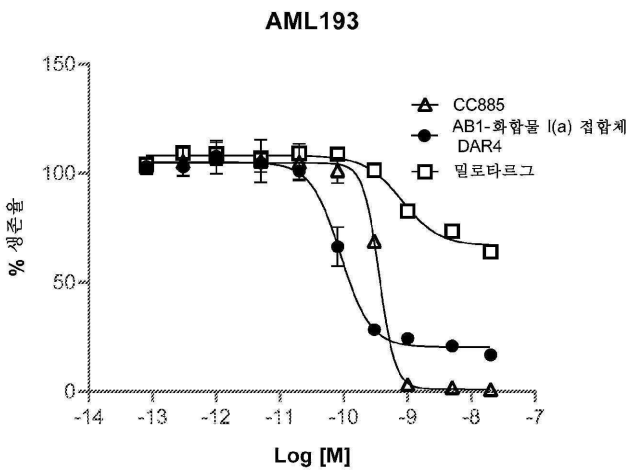
도면4



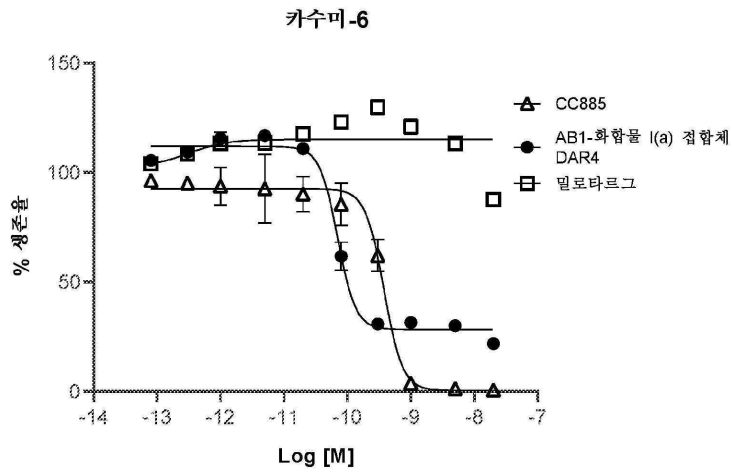
도면5



도면6a



도면6b



서열 목록

SEQUENCE LISTING

<110> ORUM THERAPEUTICS, INC.

<120> NEODEGRADER-ANTI-CD33 ANTIBODY CONJUGATES

<130> 4547.017PC02

<150> US 63/282,588

<151> 2021-11-23

<150> US 63/202,272

<151> 2021-06-03

<160> 28

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Heavy Chain CDR1

<400> 1

Asp Ser Asn Ile His

1 5

<210> 2

<211> 17

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Heavy Chain CDR2

<400>

2

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

1 5 10 15

Asn

<210> 3

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Heavy Chain CDR3

<400> 3

Gly Asn Pro Trp Leu Ala Tyr

1 5

<210> 4

<211> 116

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Heavy Chain Variable Region

<400> 4

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

1 5 10 15

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Ile Thr Asp Ser

20 25 30

Asn Ile His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Ser Leu Glu Trp Ile

35 40 45

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

50 55 60

Lys Asn Arg Ala Thr Leu Thr Val Asp Asn Pro Thr Asn Thr Ala Tyr

65 70 75 80

Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Phe Tyr Tyr Cys

85 90 95

Val Asn Gly Asn Pro Trp Leu Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val

100

105

110

Thr Val Ser Ser

115

<210> 5

<211> 15

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Light Chain CDR1

<400> 5

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

1

5

10

15

<210> 6

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Light Chain CDR2

<400> 6

Ala Ala Ser Asn Gln Gly Ser Gly

1

5

<210> 7

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Light Chain CDR3

<400> 7

Gln Gln Thr Lys Glu Val Pro Trp Ser

1

5

<210> 8

<211> 111

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Light Chain Variable Region

<400> 8

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

1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Glu Ser Leu Asp Asn Tyr

20 25 30

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

35 40 45

Lys Leu Leu Met Tyr Ala Ala Ser Asn Gln Gly Ser Gly Val Pro Ser

50 55 60

Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Glu Phe Thr Leu Thr Ile Ser

65 70 75 80

Ser Leu Gln Pro Asp Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Thr Lys

85 90 95

Glu Val Pro Trp Ser Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Val Lys

100 105 110

<210> 9

<211> 446

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> CD33AB Heavy Chain

<400> 9

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

1 5 10 15

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Ile Thr Asp Ser

20 25 30

Asn Ile His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Ser Leu Glu Trp Ile

35 40 45

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

50 55 60

Lys Asn Arg Ala Thr Leu Thr Val Asp Asn Pro Thr Asn Thr Ala Tyr

65 70 75 80

Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Phe Tyr Tyr Cys

85	90	95
Val Asn Gly Asn Pro Trp Leu 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
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
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 Ala 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
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 Lys
435 440 445

<210> 10

<211> 218

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> CD33AB Light Chain

<400> 10

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

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

65 70 75 80
Ser Leu Gln Pro Asp Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Thr Lys
85 90 95

Glu Val Pro Trp Ser Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Val 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> 11

<211> 443

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Gentuzumab Heavy Chain

<400> 11

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

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Ile Thr Asp Ser
20 25 30

Asn Ile His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Ser Leu Glu Trp Ile
35 40 45

Gly Tyr Ile Tyr Pro Tyr Asn Gly Gly Thr Asp Tyr Asn Gln Lys Phe
50 55 60

Lys Asn Arg Ala Thr Leu Thr Val Asp Asn Pro Thr Asn Thr Ala Tyr
65 70 75 80

Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Phe Tyr Tyr Cys
85 90 95

Val Asn Gly Asn Pro Trp Leu 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 Cys Ser Arg Ser Thr Ser Glu Ser 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 Lys Thr Tyr Thr Cys Asn Val Asp His Lys Pro Ser Asn Thr
195 200 205

Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Pro
210 215 220

Cys Pro Ala Pro Glu Phe Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro
225 230 235 240

Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr
245 250 255

Cys Val Val Val Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn
260 265 270

Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg
275 280 285

Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val
290 295 300

Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser
305 310 315 320

Asn Lys Gly Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys

325 330 335
 Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Gln Glu
 340 345 350

 Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe
 355 360 365
 Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu
 370 375 380
 Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe
 385 390 395 400
 Phe Leu Tyr Ser Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Glu Gly
 405 410 415

 Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr
 420 425 430
 Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Leu Gly Lys
 435 440
 <210> 12
 <211> 218
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Gemtuzumab Light Chain
 <400> 12
 Asp Ile Gln Leu Thr Gln Ser Pro Ser Thr Leu Ser Ala Ser Val Gly
 1 5 10 15
 Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Glu Ser Leu Asp Asn Tyr

 20 25 30
 Gly Ile Arg Phe Leu Thr Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro
 35 40 45
 Lys Leu Leu Met Tyr Ala Ala Ser Asn Gln Gly Ser Gly Val Pro Ser
 50 55 60
 Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Glu Phe Thr Leu Thr Ile Ser
 65 70 75 80

Ser Leu Gln Pro Asp Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Thr Lys

85 90 95

Glu Val Pro Trp Ser Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Val 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> 13

<211> 364

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Canonical CD33

<400> 13

Met Pro Leu Leu Leu Leu Leu Pro Leu Leu Trp Ala Gly Ala Leu Ala

1 5 10 15

Met Asp Pro Asn Phe Trp Leu Gln Val Gln Glu Ser Val Thr Val Gln

20 25 30

Glu Gly Leu Cys Val Leu Val Pro Cys Thr Phe Phe His Pro Ile Pro

35 40 45

Tyr Tyr Asp Lys Asn Ser Pro Val His Gly Tyr Trp Phe Arg Glu Gly

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

 115 120 125
 Tyr Lys Ser Pro Gln Leu Ser Val His Val Thr Asp Leu Thr His Arg
 130 135 140
 Pro Lys Ile Leu Ile Pro Gly Thr Leu Glu Pro Gly His Ser Lys Asn
 145 150 155 160
 Leu Thr Cys Ser Val Ser Trp Ala Cys Glu Gln Gly Thr Pro Pro Ile
 165 170 175
 Phe Ser Trp Leu Ser Ala Ala Pro Thr Ser Leu Gly Pro Arg Thr Thr

 180 185 190
 His Ser Ser Val Leu Ile Ile Thr Pro Arg Pro Gln Asp His Gly Thr
 195 200 205
 Asn Leu Thr Cys Gln Val Lys Phe Ala Gly Ala Gly Val Thr Thr Glu
 210 215 220
 Arg Thr Ile Gln Leu Asn Val Thr Tyr Val Pro Gln Asn Pro Thr Thr
 225 230 235 240
 Gly Ile Phe Pro Gly Asp Gly Ser Gly Lys Gln Glu Thr Arg Ala Gly

 245 250 255
 Val Val His Gly Ala Ile Gly Gly Ala Gly Val Thr Ala Leu Leu Ala
 260 265 270
 Leu Cys Leu Cys Leu Ile Phe Phe Ile Val Lys Thr His Arg Arg Lys
 275 280 285
 Ala Ala Arg Thr Ala Val Gly Arg Asn Asp Thr His Pro Thr Thr Gly
 290 295 300

Ser Ala Ser Pro Lys His Gln Lys Lys Ser Lys Leu His Gly Pro Thr

305 310 315 320

Glu Thr Ser Ser Cys Ser Gly Ala Ala Pro Thr Val Glu Met Asp Glu

325 330 335

Glu Leu His Tyr Ala Ser Leu Asn Phe His Gly Met Asn Pro Ser Lys

340 345 350

Asp Thr Ser Thr Glu Tyr Ser Glu Val Arg Thr Gln

355 360

<210> 14

<211> 237

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> CD33 Human Isoform 2

<400> 14

Met Pro Leu Leu Leu Leu Leu Pro Leu Leu Trp Ala Asp Leu Thr His

1 5 10 15

Arg Pro Lys Ile Leu Ile Pro Gly Thr Leu Glu Pro Gly His Ser Lys

20 25 30

Asn Leu Thr Cys Ser Val Ser Trp Ala Cys Glu Gln Gly Thr Pro Pro

35 40 45

Ile Phe Ser Trp Leu Ser Ala Ala Pro Thr Ser Leu Gly Pro Arg Thr

50 55 60

Thr His Ser Ser Val Leu Ile Ile Thr Pro Arg Pro Gln Asp His Gly

65 70 75 80

Thr Asn Leu Thr Cys Gln Val Lys Phe Ala Gly Ala Gly Val Thr Thr

85 90 95

Glu Arg Thr Ile Gln Leu Asn Val Thr Tyr Val Pro Gln Asn Pro Thr

100 105 110

Thr Gly Ile Phe Pro Gly Asp Gly Ser Gly Lys Gln Glu Thr Arg Ala

115 120 125

Gly Val Val His Gly Ala Ile Gly Gly Ala Gly Val Thr Ala Leu Leu

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

Thr Glu Thr Ser Ser Cys Ser Gly Ala Ala Pro Thr Val Glu Met Asp
195 200 205
Glu Glu Leu His Tyr Ala Ser Leu Asn Phe His Gly Met Asn Pro Ser
210 215 220
Lys Asp Thr Ser Thr Glu Tyr Ser Glu Val Arg Thr Gln
225 230 235
<210> 15
<211> 310
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220><223> CD33 Human Isoform 3
<400> 15
Met Pro Leu Leu Leu Leu Leu Pro Leu Leu Trp Ala Gly Ala Leu Ala

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

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

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

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

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

 260 265 270
 Leu Cys Leu Cys Leu Ile Phe Phe Ile Val Lys Thr His Arg Arg Lys
 275 280 285
 Ala Ala Arg Thr Ala Val Gly Arg Asn Asp Thr His Pro Thr Thr Gly
 290 295 300
 Ser Ala Ser Pro Val Arg
 305 310
 <210> 16
 <211> 418
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> CD33 Human Isoform X1

<400> 16

Met Asp Leu Gly Glu Ala Ala Thr Arg Ala Arg Pro Ala Val Ile Ser

1 5 10 15

Pro Gly Val Asn Ser Cys Ala Gln Lys Ser Thr Ser Glu Trp Lys Asp

20 25 30

Phe Arg His Gly Val Arg Met Ser Gln Met Ala Leu Lys Glu Ala Leu

35 40 45

Glu Ala Ala Ser Ser Asp Met Pro Leu Leu Leu Leu Pro Leu Leu

50 55 60

Trp Ala Gly Ala Leu Ala Met Asp Pro Asn Phe Trp Leu Gln Val Gln

65 70 75 80

Glu Ser Val Thr Val Gln Glu Gly Leu Cys Val Leu Val Pro Cys Thr

85 90 95

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

100 105 110

Tyr Trp Phe Arg Glu Gly Ala Ile Ile Ser Arg Asp Ser Pro Val Ala

115 120 125

Thr Asn Lys Leu Asp Gln Glu Val Gln Glu Glu Thr Gln Gly Arg Phe

130 135 140

Arg Leu Leu Gly Asp Pro Ser Arg Asn Asn Cys Ser Leu Ser Ile Val

145 150 155 160

Asp Ala Arg Arg Arg Asp Asn Gly Ser Tyr Phe Phe Arg Met Glu Arg

165 170 175

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

180 185 190

Thr Asp Leu Thr His Arg Pro Lys Ile Leu Ile Pro Gly Thr Leu Glu

195 200 205

Pro Gly His Ser Lys Asn Leu Thr Cys Ser Val Ser Trp Ala Cys Glu

210 215 220

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

225 230 235 240

Leu Gly Pro Arg Thr Thr His Ser Ser Val Leu Ile Ile Thr Pro Arg
245 250 255

Pro Gln Asp His Gly Thr Asn Leu Thr Cys Gln Val Lys Phe Ala Gly

260 265 270

Ala Gly Val Thr Thr Glu Arg Thr Ile Gln Leu Asn Val Thr Tyr Val

275 280 285

Pro Gln Asn Pro Thr Thr Gly Ile Phe Pro Gly Asp Gly Ser Gly Lys

290 295 300

Gln Glu Thr Arg Ala Gly Val Val His Gly Ala Ile Gly Gly Ala Gly

305 310 315 320

Val Thr Ala Leu Leu Ala Leu Cys Leu Cys Leu Ile Phe Phe Ile Val

325 330 335

Lys Thr His Arg Arg Lys Ala Ala Arg Thr Ala Val Gly Arg Asn Asp

340 345 350

Thr His Pro Thr Thr Gly Ser Ala Ser Pro Lys His Gln Lys Lys Ser

355 360 365

Lys Leu His Gly Pro Thr Glu Thr Ser Ser Cys Ser Gly Ala Ala Pro

370 375 380

Thr Val Glu Met Asp Glu Glu Leu His Tyr Ala Ser Leu Asn Phe His

385 390 395 400

Gly Met Asn Pro Ser Lys Asp Thr Ser Thr Glu Tyr Ser Glu Val Arg

405 410 415

Thr Gln

<210> 17

<211> 402

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> CD33 Human Isoform X2

<400> 17

Met Asp Leu Gly Glu Ala Ala Thr Arg Ala Arg Pro Ala Val Ile Ser

1 5 10 15

Pro Gly Val Asn Ser Cys Ala Gln Lys Ser Thr Ser Glu Trp Lys Asp

20 25 30

Phe Arg His Gly Val Arg Met Ser Gln Met Ala Leu Lys Glu Ala Leu

35 40 45

Glu Ala Ala Ser Ser Asp Met Pro Leu Leu Leu Leu Leu Pro Leu Leu

50 55 60

Trp Ala Gly Ala Leu Ala Met Asp Pro Asn Phe Trp Leu Gln Val Gln

65 70 75 80

Glu Ser Val Thr Val Gln Glu Gly Leu Cys Val Leu Val Pro Cys Thr

85 90 95

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

100 105 110

Tyr Trp Phe Arg Glu Gly Ala Ile Ile Ser Arg Asp Ser Pro Val Ala

115 120 125

Thr Asn Lys Leu Asp Gln Glu Val Gln Glu Glu Thr Gln Gly Arg Phe

130 135 140

Arg Leu Leu Gly Asp Pro Ser Arg Asn Asn Cys Ser Leu Ser Ile Val

145 150 155 160

Asp Ala Arg Arg Arg Asp Asn Gly Ser Tyr Phe Phe Arg Met Glu Arg

165 170 175

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

180 185 190

Thr Asp Leu Thr His Arg Pro Lys Ile Leu Ile Pro Gly Thr Leu Glu

195 200 205

Pro Gly His Ser Lys Asn Leu Thr Cys Ser Val Ser Trp Ala Cys Glu

210 215 220

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

225 230 235 240

Leu Gly Pro Arg Thr Thr His Ser Ser Val Leu Ile Ile Thr Pro Arg

245 250 255

Pro Gln Asp His Gly Thr Asn Leu Thr Cys Gln Val Lys Phe Ala Gly

260 265 270
Ala Gly Val Thr Thr Glu Arg Thr Ile Gln Leu Asn Val Thr Trp Lys

275 280 285
Gln Glu Thr Arg Ala Gly Val Val His Gly Ala Ile Gly Gly Ala Gly

290 295 300
Val Thr Ala Leu Leu Ala Leu Cys Leu Cys Leu Ile Phe Phe Ile Val

305 310 315 320
Lys Thr His Arg Arg Lys Ala Ala Arg Thr Ala Val Gly Arg Asn Asp

325 330 335
Thr His Pro Thr Thr Gly Ser Ala Ser Pro Lys His Gln Lys Lys Ser

340 345 350
Lys Leu His Gly Pro Thr Glu Thr Ser Ser Cys Ser Gly Ala Ala Pro

355 360 365
Thr Val Glu Met Asp Glu Glu Leu His Tyr Ala Ser Leu Asn Phe His

370 375 380
Gly Met Asn Pro Ser Lys Asp Thr Ser Thr Glu Tyr Ser Glu Val Arg

385 390 395 400
Thr Gln

<210> 18

<211> 291

<212>

> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> CD33 Human Isoform X4

<400> 18

Met Asp Leu Gly Glu Ala Ala Thr Arg Ala Arg Pro Ala Val Ile Ser

1 5 10 15
Pro Gly Val Asn Ser Cys Ala Gln Lys Ser Thr Ser Glu Trp Lys Asp

20 25 30
Phe Arg His Gly Val Arg Met Ser Gln Met Ala Leu Lys Glu Ala Leu

35 40 45

Glu Ala Ala Ser Ser Asp Met Pro Leu Leu Leu Leu Leu Pro Leu Leu

50

55

60

Trp Ala Asp Leu Thr His Arg Pro Lys Ile Leu Ile Pro Gly Thr Leu

65

70

75

80

Glu Pro Gly His Ser Lys Asn Leu Thr Cys Ser Val Ser Trp Ala Cys

85

90

95

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

100

105

110

Ser Leu Gly Pro Arg Thr Thr His Ser Ser Val Leu Ile Ile Thr Pro

115

120

125

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

130

135

140

Gly Ala Gly Val Thr Thr Glu Arg Thr Ile Gln Leu Asn Val Thr Tyr

145

150

155

160

Val Pro Gln Asn Pro Thr Thr Gly Ile Phe Pro Gly Asp Gly Ser Gly

165

170

175

Lys Gln Glu Thr Arg Ala Gly Val Val His Gly Ala Ile Gly Gly Ala

180

185

190

Gly Val Thr Ala Leu Leu Ala Leu Cys Leu Cys Leu Ile Phe Phe Ile

195

200

205

Val Lys Thr His Arg Arg Lys Ala Ala Arg Thr Ala Val Gly Arg Asn

210

215

220

Asp Thr His Pro Thr Thr Gly Ser Ala Ser Pro Lys His Gln Lys Lys

225

230

235

240

Ser Lys Leu His Gly Pro Thr Glu Thr Ser Ser Cys Ser Gly Ala Ala

245

250

255

Pro Thr Val Glu Met Asp Glu Glu Leu His Tyr Ala Ser Leu Asn Phe

260

265

270

His Gly Met Asn Pro Ser Lys Asp Thr Ser Thr Glu Tyr Ser Glu Val

275

280

285

Arg Thr Gln

290

<210> 19

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> huMy9-6 Heavy Chain CDR1

<400> 19

Ser Tyr Tyr Ile His

1 5

<210> 20

<211> 17

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> huMy9-6 Heavy Chain CDR2

<400> 20

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

1 5 10 15

Gly

<210> 21

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> huMy9-6 Heavy Chain CDR3

<400> 21

Glu Val Arg Leu Arg Tyr Phe Asp Val

1 5

<210> 22

<211> 17

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> huMy9-6 Light Chain CDR1

<400> 22

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

1 5 10 15

Ala

<210> 23

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> huMy9-6 Light Chain CDR2

<400> 23

Trp Ala Ser Thr Arg Glu Ser

1 5

<210> 24

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> huMy9-6 Light Chain CDR3

<400> 24

His Gln Tyr Leu Ser Ser Arg Thr

1 5

<210> 25

<211> 445

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> huMy9-6-IgG4-S228P Anti-CD33 Heavy Chain

<400> 25

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	Cys	Ser	Arg	Ser	Thr	Ser	Glu	Ser	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	Lys	Thr	Tyr	Thr	Cys	Asn	Val	Asp	His	Lys	Pro	Ser				
195					200					205									
Asn	Thr	Lys	Val	Asp	Lys	Arg	Val	Glu	Ser	Lys	Tyr	Gly	Pro	Pro	Cys				
210					215					220									
Pro	Pro	Cys	Pro	Ala	Pro	Glu	Phe	Leu	Gly	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Leu				
225					230					235					240				
Phe	Pro	Pro	Lys	Pro	Lys	Asp	Thr	Leu	Met	Ile	Ser	Arg	Thr	Pro	Glu				
245					250					255									
Val	Thr	Cys	Val	Val	Val	Asp	Val	Ser	Gln	Glu	Asp	Pro	Glu	Val	Gln				
260					265					270									
Phe	Asn	Trp	Tyr	Val	Asp	Gly	Val	Glu	Val	His	Asn	Ala	Lys	Thr	Lys				
275					280					285									
Pro	Arg	Glu	Glu	Gln	Phe	Asn	Ser	Thr	Tyr	Arg	Val	Val	Ser	Val	Leu				
290					295					300									

Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys
 305 310 315 320
 Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys
 325 330 335
 Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser
 340 345 350
 Gln Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys
 355 360 365

Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln
 370 375 380
 Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly
 385 390 395 400
 Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln
 405 410 415
 Glu Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn
 420 425 430

His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Leu Gly Lys
 435 440 445

<210> 26

<211> 219

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> huMy9-6-IgG4-S228P Anti-CD33 Light Chain

<400> 26

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> 27
<211> 118
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220><223> huMy9-6 Heavy Chain Variable Region
<400> 27
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> 28

<211> 112

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> huMy9-6 Light Chain Variable Region

<400> 28

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