(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2025-0067188
(43) 공개일자 2025년05월14일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C07K 7/02 (2006.01) *A61P 35/00* (2006.01)
(52) CPC특허분류
C07K 7/02 (2013.01)
A61K 38/08 (2021.08)
(21) 출원번호 10-2025-7014161(분할)
(22) 출원일자(국제) 2018년12월10일
심사청구일자 없음
(62) 원출원 특허 10-2020-7010986
원출원일자(국제) 2018년12월10일
심사청구일자 2021년12월03일
(85) 번역문제출일자 2025년04월28일
(86) 국제출원번호 PCT/CN2018/120125
(87) 국제공개번호 WO 2019/114666
국제공개일자 2019년06월20일
(30) 우선권주장
201711347535.6 2017년12월15일 중국(CN)
(뒷면에 계속)

(71) 출원인
쓰촨 케룬-바이오테크 바이오파마수티컬 컴퍼니 리미티드
중국 611138 쓰촨 원장 디스트릭트 청두 하이 샤 인더스트리얼 파크 신화 애비뉴 (섹션 2) 넘버 666
(72) 발명자
카이 지아치앙
중국 611138 쓰촨 원장 디스트릭트 청두 하이 샤 인더스트리얼 파크 신화 애비뉴 (섹션 2) 넘버 666
송 슈아이
중국 611138 쓰촨 원장 디스트릭트 청두 하이 샤 인더스트리얼 파크 신화 애비뉴 (섹션 2) 넘버 666
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
장덕순, 이상남

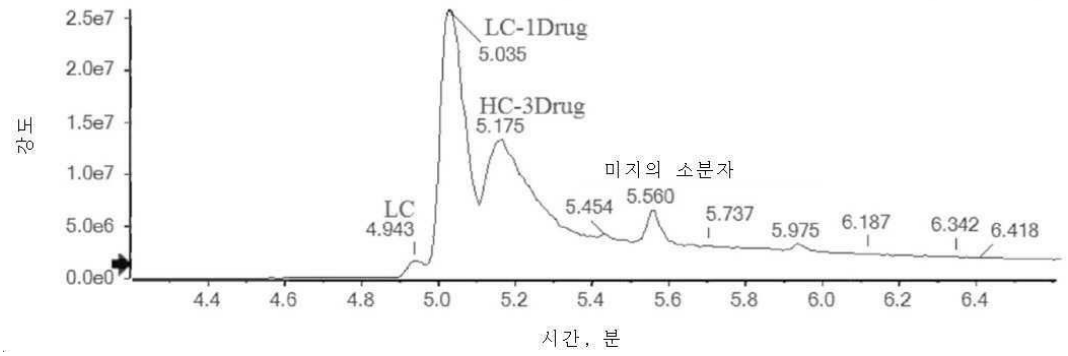
전체 청구항 수 : 총 44 항

(54) 발명의 명칭 **생체활성 분자 접합체, 이의 제조 방법 및 용도**

(57) 요 약

본 개시는 생체활성 분자 접합체, 이의 제조방법 및 이의 용도에 관한 것으로, 특히 약물과 ADC 또는 SMDC의 표적화 부분의 커플링을 개선함으로써 수득되는 신규한 생체활성 분자 접합체에 관한 것이며, 뿐만 아니라 비정상적 세포 활성과 연관된 질병의 치료를 위한 의약의 제조에서의 이의 제조방법 및 용도에 관한 것이다.

대 표 도 - 도1



(52) CPC특허분류
A61P 35/00 (2018.01)

(72) 발명자
쉐 통통
중국 611138 쓰촨 원장 디스트릭트 청두 하이 샤 인더스트리얼 파크 신화 애비뉴 (섹션 2) 넘버 666
샤오 량
중국 611138 쓰촨 원장 디스트릭트 청두 하이 샤 인더스트리얼 파크 신화 애비뉴 (섹션 2) 넘버 666
덩 한웬
중국 611138 쓰촨 원장 디스트릭트 청두 하이 샤 인더스트리얼 파크 신화 애비뉴 (섹션 2) 넘버 666
티안 치앙
중국 611138 쓰촨 원장 디스트릭트 청두 하이 샤 인더스트리얼 파크 신화 애비뉴 (섹션 2) 넘버 666
왕 징
중국 611138 쓰촨 원장 디스트릭트 청두 하이 샤 인더스트리얼 파크 신화 애비뉴 (섹션 2) 넘버 666
류 덩니엔
중국 611138 쓰촨 원장 디스트릭트 청두 하이 샤 인더스트리얼 파크 신화 애비뉴 (섹션 2) 넘버 666
류 리핑
중국 611138 쓰촨 원장 디스트릭트 청두 하이 샤 인더스트리얼 파크 신화 애비뉴 (섹션 2) 넘버 666
위 하이민
중국 611138 쓰촨 원장 디스트릭트 청두 하이 샤 인더스트리얼 파크 신화 애비뉴 (섹션 2) 넘버 666
양 저우닝
중국 611138 쓰촨 원장 디스트릭트 청두 하이 샤 인더스트리얼 파크 신화 애비뉴 (섹션 2) 넘버 666
차오 쉬
중국 611138 쓰촨 원장 디스트릭트 청두 하이 샤 인더스트리얼 파크 신화 애비뉴 (섹션 2) 넘버 666
중 궈칭
중국 611138 쓰촨 원장 디스트릭트 청두 하이 샤 인더스트리얼 파크 신화 애비뉴 (섹션 2) 넘버 666
왕 리춘
중국 611138 쓰촨 원장 디스트릭트 청두 하이 샤 인더스트리얼 파크 신화 애비뉴 (섹션 2) 넘버 666
왕 징이
중국 611138 쓰촨 원장 디스트릭트 청두 하이 샤 인더스트리얼 파크 신화 애비뉴 (섹션 2) 넘버 666

(30) 우선권주장
201810230346.9 2018년03월20일 중국(CN)
201811071947.6 2018년09월14일 중국(CN)

명 세 서

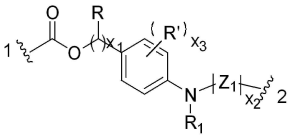
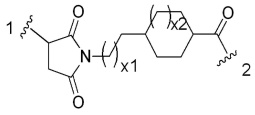
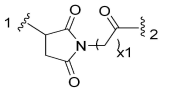
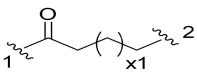
청구범위

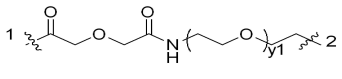
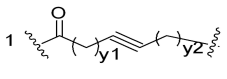
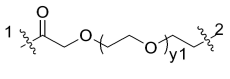
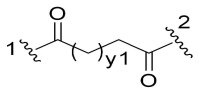
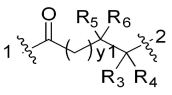
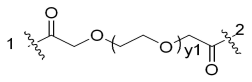
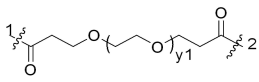
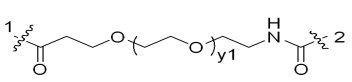
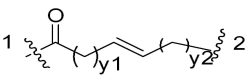
청구항 1

식 (I)의 화합물 또는 이의 약제학적으로 허용 가능한 염:

$T-[L_1-(L_2)_{m1}-(L_3)_{m2}-(L_4)_{m3}-E]-G$ 식 (I)

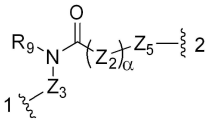
여기서 T는 생체활성 분자의 단편이고;

L_1은 , 아미노산, 2-10개의 아미노산으로 구성된 펩티드, 올리고당, $-(CH_2)_{t1}-$, $-(CH_2CH_2O)_{t1}-(CH_2)_{t2}-$, , , 

L_2는 , , , 아미노산, 2-10개의 아미노산으로 구성된 펩티드, 올리고당, $-(CH_2)_{t1}-$, $-(CH_2CH_2O)_{t1}-(CH_2)_{t2}-$, , , , ,  또는 

이고; 여기서 각각의 R_3, R_4, R_5 및 R_6은 독립적으로 수소, 중수소, 할로겐, 카르복실산기, 설폰산기, CN, C_{1-6} 알킬, 할로겐화 C_{1-6} 알킬, 시아노로 치환된 C_{1-6} 알킬, C_{1-6} 알콕시, C_{2-10} 알케닐, C_{2-10} 알키닐 또는 C_{3-6} 시클로알킬이며, 또는 R_3 및 R_4, R_5 및 R_6 또는 R_3 및 R_5는 이에 부착된 탄소 원자와 함께 3-8 원 고리를 형성하고, 각각의 t_1 및 t_2는 독립적으로 0, 1, 2, 3, 4, 5 또는 6이며, 각각의 y_1 및 y_2는 독립적으로 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 또는 10이고, L_2는 L_2의 1 위치에서 L_1에 결합되고;

L_3은 하나 이상의 R_7으로 선택적으로 치환되는 하기의 기: 5-12 원 헤테로아릴렌, 아미노, 3-8 원 시클로알킬렌, 3-8 지방족 헤테로시클릴렌, 6-12 원 브릿지 헤테로시클릴렌(bridged heterocyclylene), 6-12 원 스피로헤테로시클릴렌(spiroheterocyclylene), 6-12 원 융합 헤테로시클릴렌(fused heterocyclylene), 6-10 원 아릴렌 및 3-8 원 시클로알킬렌-W-로부터 선택되며; 여기서 W는 산소 또는 NR_8이고, R_7은 독립적으로 수소, 중수소, 할로겐, =O, CN, 카르복실, 설폰산기, C_{1-6} 알킬, 할로겐화 C_{1-6} 알킬, 시아노로 치환된 C_{1-6} 알킬, C_{1-6} 알콕시, C_{2-10} 알케닐 또는 C_{2-10} 알키닐이며, R_8은 독립적으로 수소, 중수소, C_{1-6} 알킬, C_{2-6} 알케닐, C_{3-6} 알키닐, C_{3-6} 시클로알킬, C_{1-6} 알콕시 또는 시아노로 치환된 C_{1-2} 알킬이고;

L_4는  이고, 여기서 Z_5는 C_{2-6} 알키닐, C_{2-6} 알케닐, 아미도기, 설퍼릴, 설피닐, 6-10 원 아릴렌 또는 5-6 원 헤테로아릴렌이며; Z_2는 C_{1-6} 알킬렌, C_{2-10} 알케닐렌, C_{2-10} 알키닐렌, C_{3-8} 시클로알킬렌, 6-10 원 아릴렌 또는 5-14 원 헤테로아릴렌이고; R_9는 수소 또는 C_{1-6} 알킬이며; Z_3은 부재, C_{1-6} 알킬렌, 할로겐화 C_{1-6} 알킬렌 또는 알콕시로 치환된 C_{1-6} 알킬렌이거나; 또는 R_9 및 Z_3은 이들에 부착된 질소 원자와 함께 4-8 원 헤테로시클릴렌(heterocyclylene)을 형성하며; α는 독립적으로 0, 1, 2, 3, 4, 5 또는 6이며; L_4는 L_4의 2 위치에서 E에 결합되고;

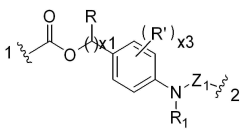
E는 하나 이상의 R_{12}로 선택적으로 치환되는 하기의 기: 피리미딜렌, 퀴놀릴렌 및 피롤로[2,3-d]피리미딜렌으로부터 선택되며; 여기서 R_{12}는 독립적으로 수소, 중수소, 할로겐, CN, 니트로, C_{1-6} 알킬 또는 할로겐화 C_{1-6} 알킬이고;

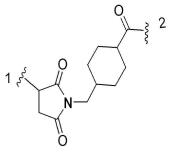
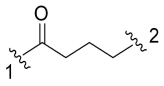
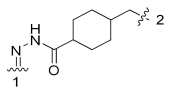
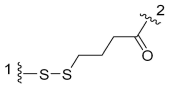
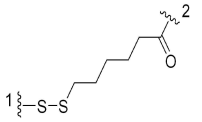
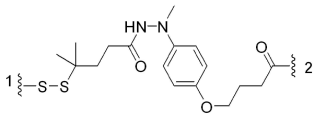
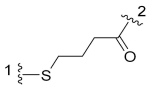
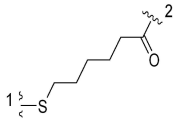
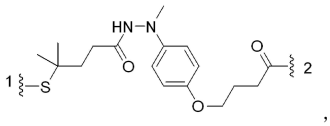
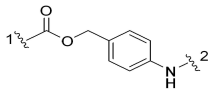
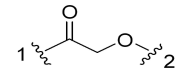
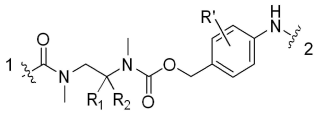
G는 친핵성 치환을 위한 이탈기이며;

각각의 m_1, m_2, 및 m_3은 독립적으로 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 또는 10이다.

청구항 2

제1항에 있어서,

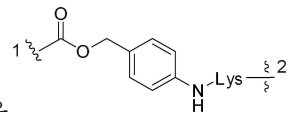
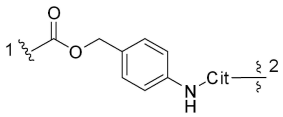
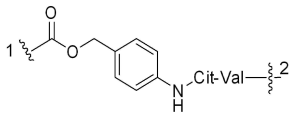
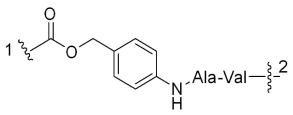
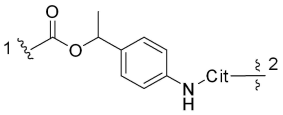
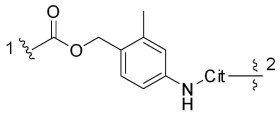
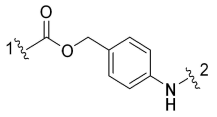
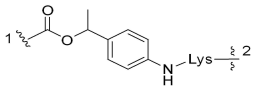
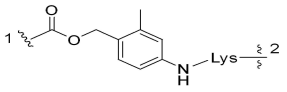
L_1은  , Val, Cit, Phe, Lys, D-Val, Leu, Gly, Ala, Asn, 2-5개의 아미노산으로 구성된 펩티드,

, , , , , , , , , ,  또는  이고; 여기서 각각의 R, R', R_1 및 R_2는 독립적으로 수소, 중수소, C_{1-6} 알킬, C_{2-10} 알케닐, C_{2-10} 알키닐 또는 C_{3-6} 시클로알킬이고, Z_1은 Lys, Val, Cit, Phe, D-Val, Leu, Gly, Ala, Asn, Val-Cit, Cit-Val, Cit-Ala, Val-Ala, Lys-Val, Val-Lys(Ac), Phe-Lys, Phe-Lys(Ac), D-Val-Leu-Lys, Gly-Gly-Arg 또는 Ala-Ala-Asn이고, x_1은 0, 1, 2 또는 3이며, x_3은 0, 1, 2, 3 또는 4인,

화합물 또는 이의 약제학적으로 허용 가능한 염.

청구항 3

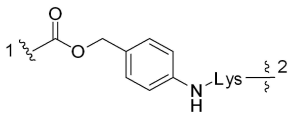
제1항에 있어서,

L_1은 , , , , , , Lys, Cit, Cit-Val, Val-Ala, Lys-Val, ,  또는  인,

화합물 또는 이의 약제학적으로 허용 가능한 염.

청구항 4

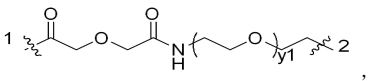
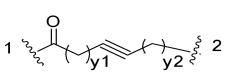
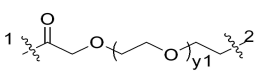
제3항에 있어서,

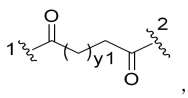
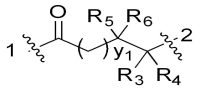
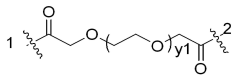
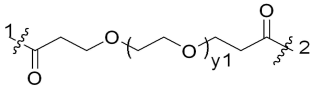
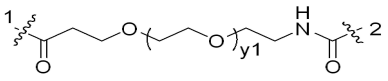
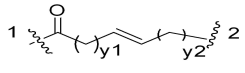
L_1은  인,

화합물 또는 이의 약제학적으로 허용 가능한 염.

청구항 5

제1항 내지 제4항 중 어느 한 항에 있어서,

L_2는 , , , Val, Cit, Phe, Lys,

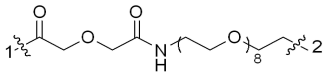
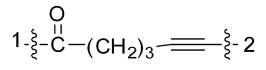
D-Val, Leu, Gly, Ala, Asn, 2-5개의 아미노산으로 구성된 펩티드, , , , ,  또는  이고; 여기서 각각의 R_3, R_4, R_5 및 R_6은 독립적으로 수소, 중수소, 할로겐, 카르복실산기, 설폰산기, CF_3, CN, CH_2CN, C_{1-4} 알킬, C_{1-4} 알콕시, C_{2-6} 알케닐, C_{2-6} 알키닐 또는 C_{3-6} 시클로알킬이며, 각각의 y_1 및 y_2는 독립적으로 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 또는 8이며, L_2는 L_2의 1 위치에서 L_1에 결합되고;

m_1은 0, 1, 2 또는 3인,

화합물 또는 이의 약제학적으로 허용 가능한 염.

청구항 6

제5항에 있어서,

L_2는  또는  인,

화합물 또는 이의 약제학적으로 허용 가능한 염.

청구항 7

제1항 내지 제6항 중 어느 한 항에 있어서,

L_3은 하나 이상의 R_7로 선택적으로 치환된 하기의 기: 5-12 원 헤테로아릴렌, 아미노, 3-8 원 시클로알킬렌, 3-8 지방족 헤테로시클릴렌, 6-12 원 브릿지 헤테로시클릴렌, 6-12 원 스피로헤테로시클릴렌, 6-12 원 융합 헤테로시클릴렌, 6-10 원 아릴렌 및 3-8 원 시클로알킬렌-W-로부터 선택되고; 여기서 W는 산소 또는 NR_8이며, R_7은 독립적으로 수소, 중수소, 할로겐, =O, CF_3, CN, CH_2CN, 카르복실, 설폰산기, C_{1-4} 알킬, C_{1-4} 알콕시, C_{2-6} 알케닐 또는 C_{2-6} 알키닐이고; R_8은 독립적으로 수소, 중수소, C_{1-6} 알킬, C_{2-6} 알케닐, C_{3-6} 알키닐, C_{3-6} 시클로알킬, C_{1-6} 알콕시 또는 시아노로 치환된 C_{1-2} 알킬이며;

m_2는 0, 1, 2 또는 3인,

화합물 또는 이의 약제학적으로 허용 가능한 염.

청구항 8

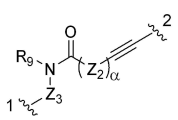
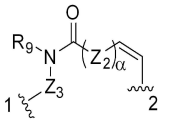
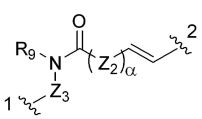
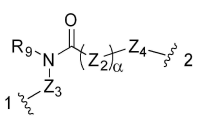
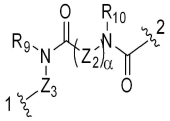
제7항에 있어서,

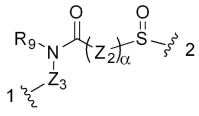
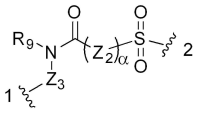
L_3은 트리아졸릴렌(triazolylene)이고, m_2는 0 또는 1인,

화합물 또는 이의 약제학적으로 허용 가능한 염.

청구항 9

제1항 내지 제8항 중 어느 한 항에 있어서,

L_4는 , , , , ,

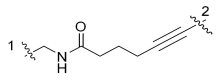
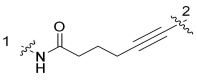
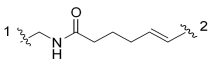
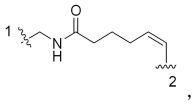
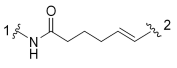
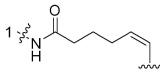
 또는  이고, 여기서 Z_4는 6-10 원 아릴렌 또는 5-6 원 헤테로아릴렌이며; R_{10}은 수소 또는 C_{1-6} 알킬이며; Z_2는 C_{1-6} 알킬렌, C_{2-10} 알케닐렌, C_{2-10} 알키닐렌 또는 C_{3-8} 시클로알킬렌이고; R_9는 수소 또는 C_{1-6} 알킬이며; Z_3은 부재 또는 C_{1-6} 알킬렌이거나; 또는 R_9 및 Z_3은 이들에 부착된 질소 원자와 함께 4-8 원 헤테로시클릴렌을 형성하며; α는 독립적으로 0, 1, 2, 3, 4, 5 또는 6이고, L_4는 L_4의 2 위치에서 E에 결합되며;

m_3은 0, 1, 2 또는 3인,

화합물 또는 이의 약제학적으로 허용 가능한 염.

청구항 10

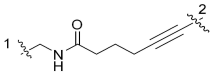
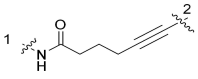
제9항에 있어서,

L_4는 , , , ,  또는  로부터 선택되고; m_3은 1인,

화합물 또는 이의 약제학적으로 허용 가능한 염.

청구항 11

제10항에 있어서,

L_4는  또는  이고; m_3은 1인,

화합물 또는 이의 약제학적으로 허용 가능한 염.

청구항 12

제1항 내지 제11항 중 어느 한 항에 있어서,

E는 하나 이상의 R_{12}로 선택적으로 치환된 피리미딜렌이고; 여기서 R_{12}는 독립적으로 수소 또는 중수소인,

화합물 또는 이의 약제학적으로 허용 가능한 염.

청구항 13

제1항 내지 제12항 중 어느 한 항에 있어서,

G는 알킬 설포닐, 할로겐, OMs, OTs, OTf, 니트로, 또는 하나 이상의 R_{13}으로 선택적으로 치환된 하기의 기: 알킬티오, 아릴티오, 헤테로아릴티오, 알킬 설피닐, 아릴 설피닐, 헤테로아릴 설피닐, 아릴 설포닐 또는 헤테로아릴 설포닐로부터 선택되고; 여기서 R_{13}은 수소, 중수소, 할로겐, CN, 니트로, C_{1-6} 알킬, 할로겐화 C_{1-6} 알킬, C_{1-6} 알콕시, 6-10 원 아릴 또는 5-12 원 헤테로아릴 중에서 독립적으로 선택되는,

화합물 또는 이의 약제학적으로 허용 가능한 염.

청구항 14

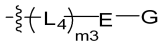
제13항에 있어서,

G는 Cl 또는 메틸설포닐인,

화합물 또는 이의 약제학적으로 허용 가능한 염.

청구항 15

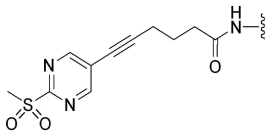
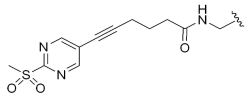
제1항 내지 제14항 중 어느 한 항에 있어서,


에서, G는 메틸설포닐이고, E는 피리미딜렌이고, m_3은 1인,

화합물 또는 이의 약제학적으로 허용 가능한 염.

청구항 16

제1항 내지 제15항 중 어느 한 항에 있어서,

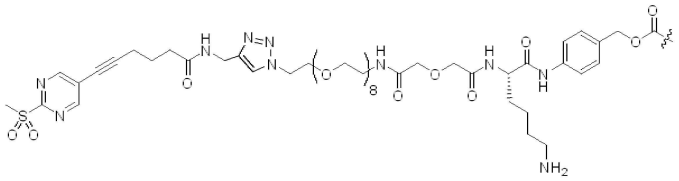
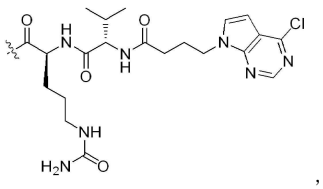
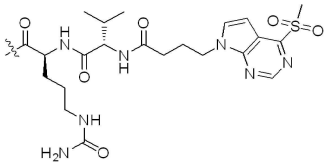
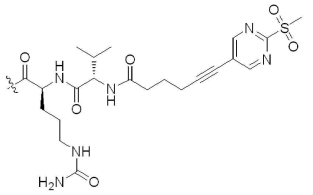
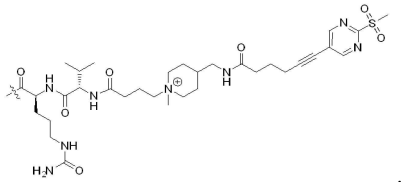
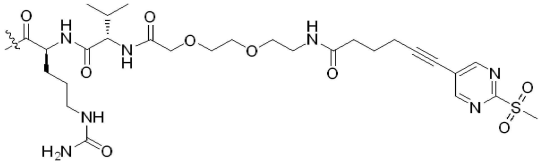
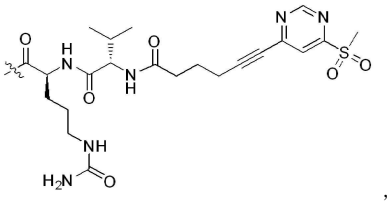
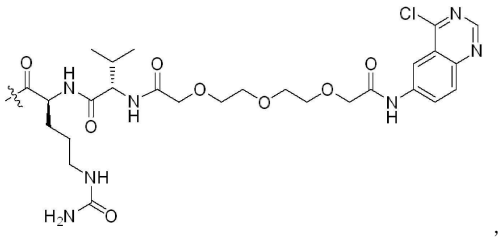
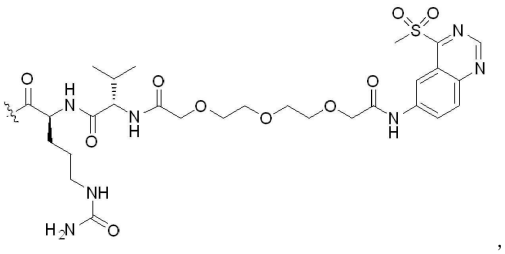
는  또는  인,

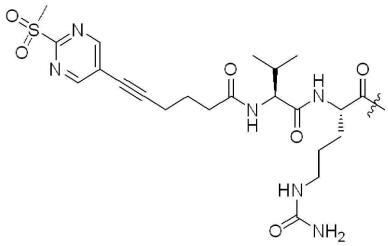
화학물 또는 이의 약제학적으로 허용 가능한 염.

청구항 17

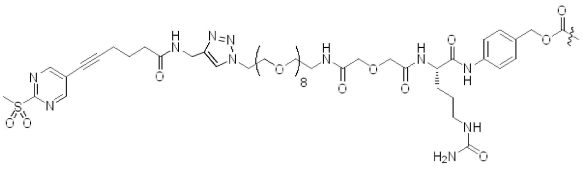
제1항에 있어서,

$-[L_1-(L_2)_{m1}-(L_3)_{m2}-(L_4)_{m3}-E]-G$는 하기 단편으로부터 선택되는 것인, 화합물 또는 이의 약제학적으로 허용 가능한 염:

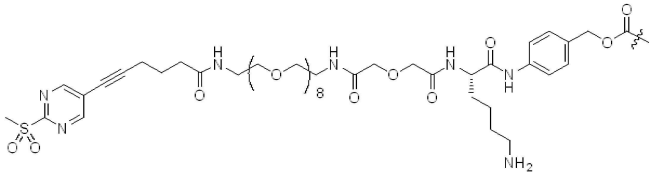

,

,

,

,

,

,

,

,

,



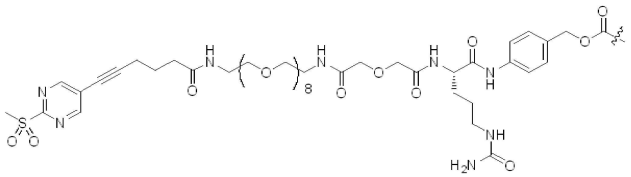
,



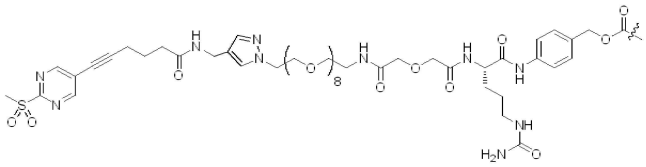
,



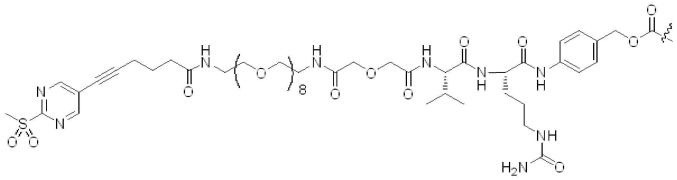
,



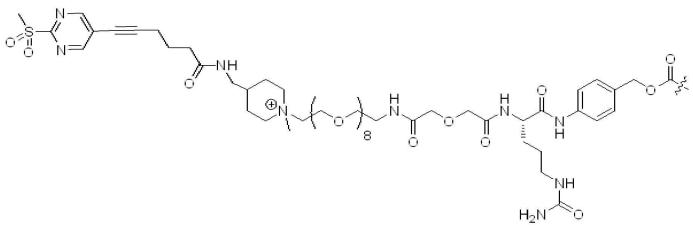
,



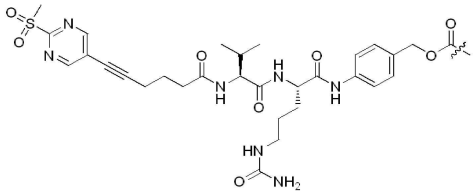
,



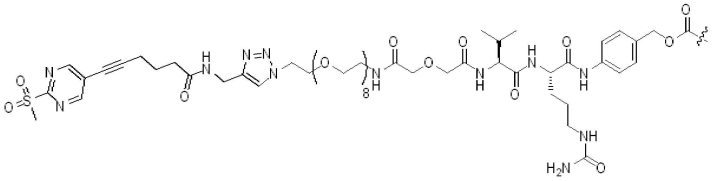
,



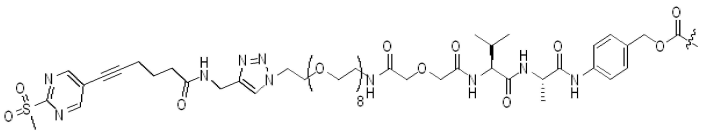
,



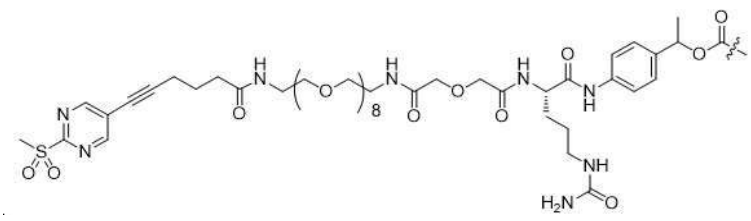
,



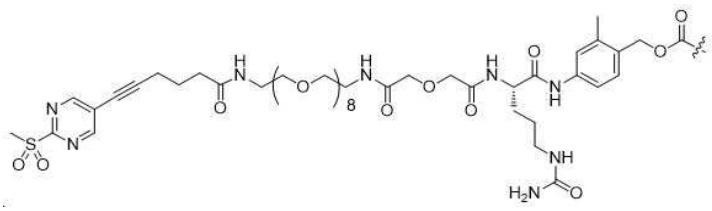
,



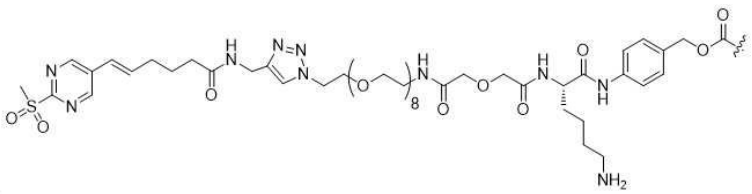
,



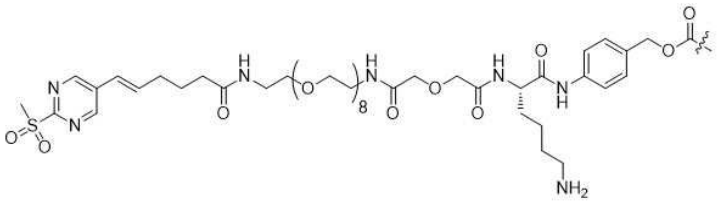
,



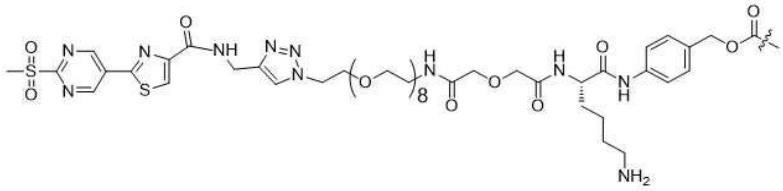
,



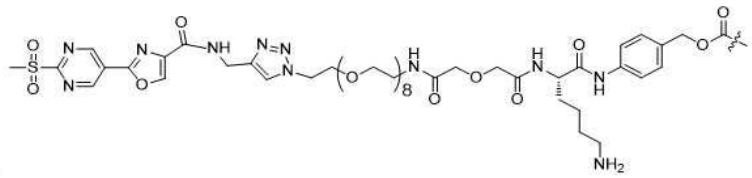
,



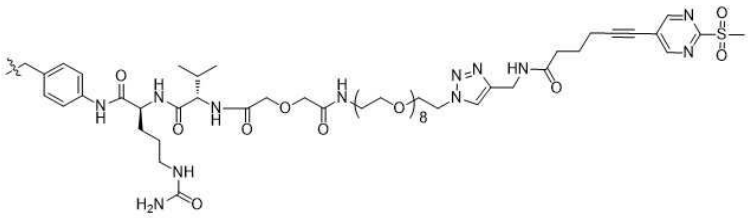
,



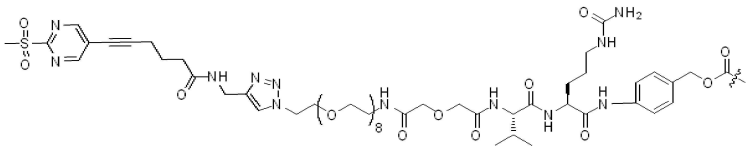
,



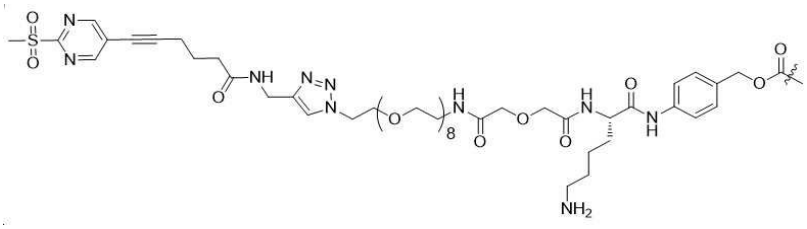
,



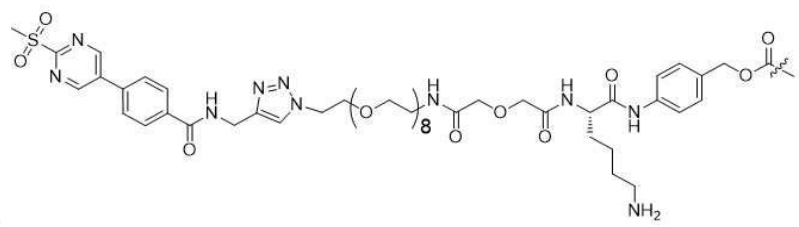
,



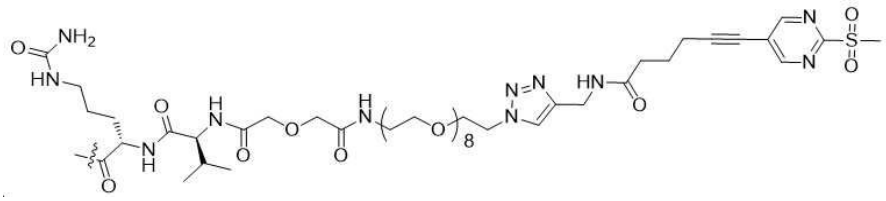
,



,



또는



.

청구항 18

제1항 내지 제17항 중 어느 한 항에 있어서,

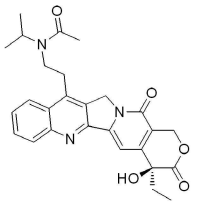
T는 생체활성 분자의 단편이고, 상기 생체활성 분자는 금속 착물; 글리코펩티드 항생물질; DNA 국소이성질화 효소 억제제; DNA 합성을 방해하는 약물; 구조 단백질에 작용하는 약물; 종양 세포 신호전달 경로 억제제(tumor cell signaling pathway inhibitor); 프로테아좀 억제제; 히스톤탈아세틸화효소 억제제(histone deaceylase inhibitor); 종양 혈관 생성 억제제(tumor angiogenesis inhibitor); 사이클린 억제제; 메이탄신 유도체(maytansine derivative); 칼리키아마이신 유도체(calicheamicin derivative); 아우리스타틴 유도체(auristatin derivative); 피롤로벤조디아제핀 이합체(pyrrolobenzodiazepine dimers, PBD) 유도체; 멜팔란(melphalan); 미토마이신 C(mitomycin C); 클로람부실(chlorambucil); 또는 종양 세포의 성장을 억제하고, 종양 세포의 아팝토시스 또는 괴사를 촉진하는 다른 활성 물질인,

화합물 또는 이의 약제학적으로 허용 가능한 염.

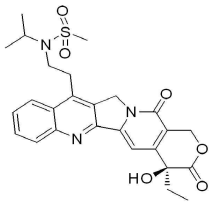
청구항 19

제18항에 있어서,

상기 생체활성 분자는



또는



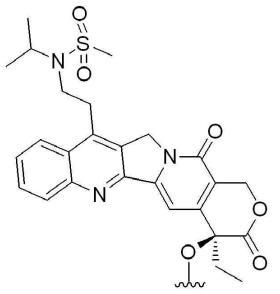
인,

화합물 또는 이의 약제학적으로 허용 가능한 염.

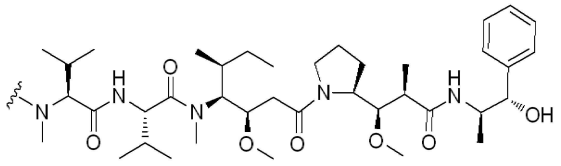
청구항 20

제1항 내지 제17항 중 어느 한 항에 있어서,

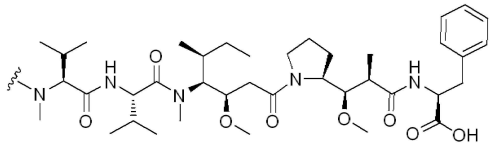
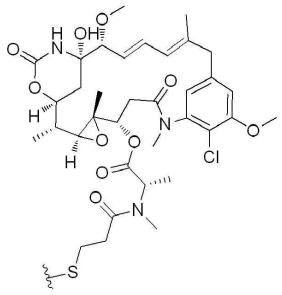
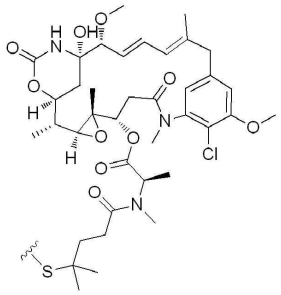
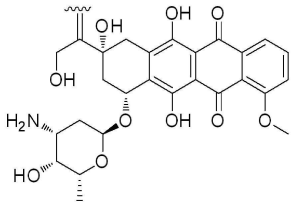
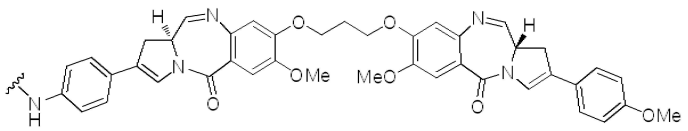
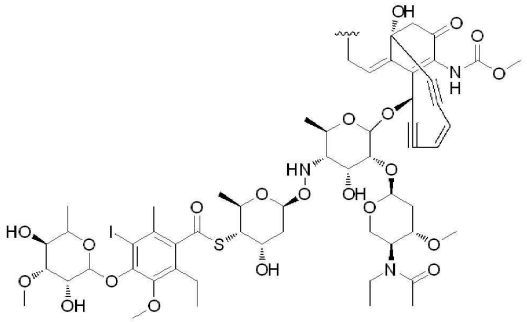
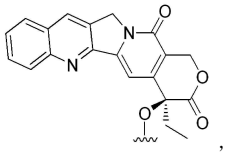
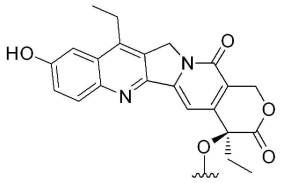
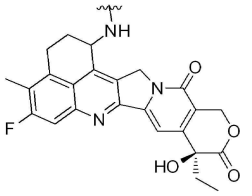
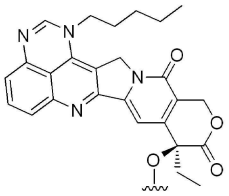
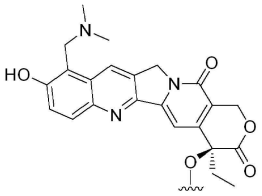
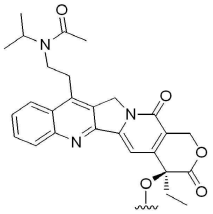
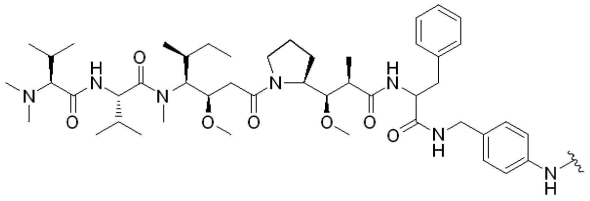
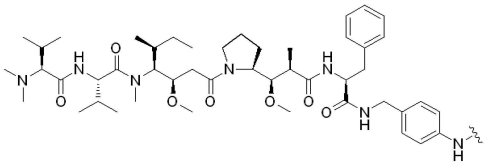
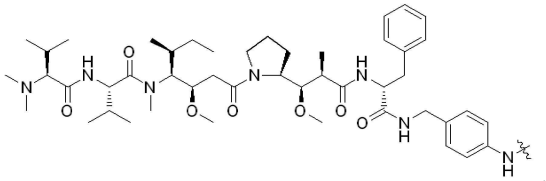
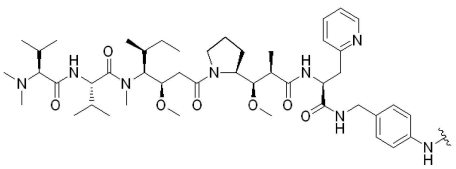
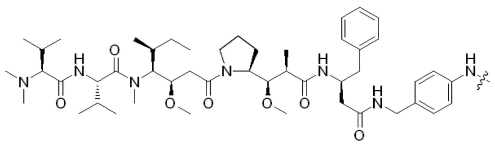
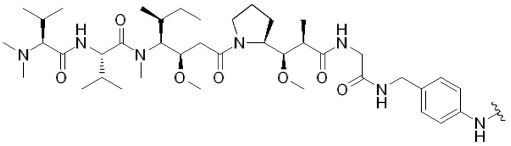
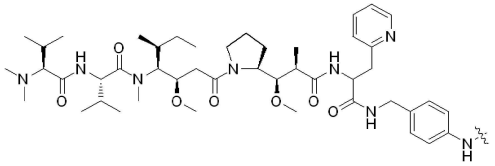
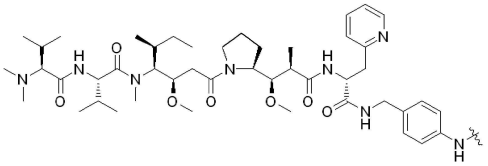
T는

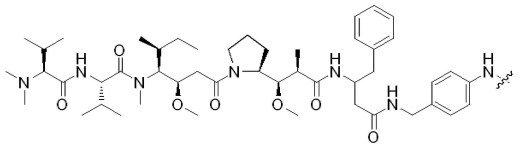
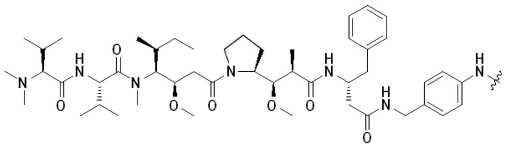
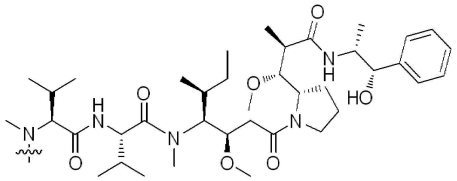
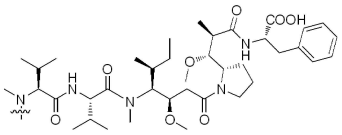
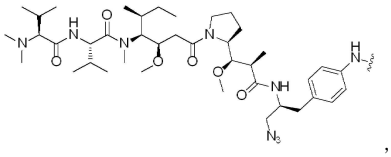


,



,


,

,

,

,

,

,

,

,

,

,

,

,

,

,

,

,

,

,

,

,

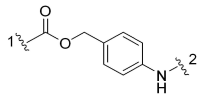
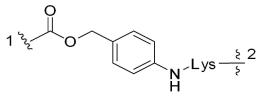

,

,

,

또는

,

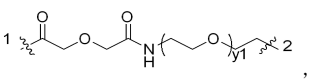
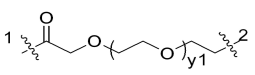
인, 화합물 또는 이의 약제학적으로 허용 가능한 염.

청구항 21

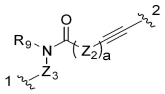
제1항에 있어서,

T는 생체활성 분자의 단편이고,

L_1은 아미노산, 2-10개의 아미노산으로 구성된 펩티드, $-(CH_2)_{t1}-$,  또는  으로부터 선택되며, t_1은 0, 1, 2, 3, 4, 5 또는 6이고;

L_2는 , , 아미노산 또는 2-10개의 아미노산으로 구성된 펩티드로부터 선택되며; y_1 및 y_2는 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 또는 10이고;

L_3은 5-12 원 헤테로아릴렌 또는 아미노로부터 선택되며;

L_4는  으로부터 선택되고, 여기서 Z_2는 C_{1-6} 알킬렌이며; Z_3은 부재 또는 C_{1-6} 알킬렌이고; R_9는 수소이며; a는 독립적으로 0, 1, 2, 3, 4, 5 또는 6이고;

E는 피리미딜렌이며;

G는 친핵성 치환을 위한 이탈기이고;

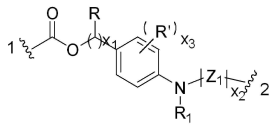
각각의 m_1, m_2, 및 m_3은 독립적으로 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 또는 10인,

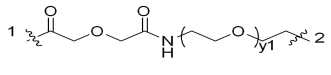
화합물 또는 이의 약제학적으로 허용 가능한 염.

청구항 22

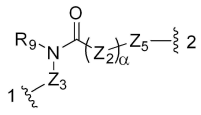
제1항에 있어서,

T는 생체활성 분자의 단편이고,

L_1은  또는 $-(CH_2)_{t1}-$이며, 여기서 각각의 R, R' 및 R_1은 독립적으로 수소, 중수소, 할로겐, 카르복실산기, 설폰산기, 시아노, C_{1-6} 알킬, 할로겐화 C_{1-6} 알킬, 시아노로 치환된 C_{1-6} 알킬, C_{1-6} 알콕시, C_{2-10} 알케닐, C_{2-10} 알키닐, C_{3-6} 시클로알킬, 6-10 원 아릴 또는 5-12 원 헤테로아릴이고, Z_1은 독립적으로 아미노산 또는 2-10개의 아미노산으로 구성된 펩티드이며, t_1은 0, 1, 2, 3, 4, 5 또는 6이고, 각각의 x_1 및 x_2는 독립적으로 0, 1, 2, 3, 4, 5 또는 6이며, 각각의 x_3은 독립적으로 0, 1, 2, 3 또는 4이고, L_1은 L_1의 1 위치에서 T에 결합되며;

L_2는 , 아미노산, 2-10개의 아미노산으로 구성된 펩티드로부터 선택되고, y_1은 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 또는 10이며, L_2는 L_2의 1 위치에서 L_1에 결합되고;

L_3은 5-12 원 헤테로아릴렌이며;

L_4는  이고, 여기서 Z_5는 C_{2-6} 알키닐, C_{2-6} 알케닐, 아미도기, 설퍼릴, 설피닐, 6-10 원 아릴렌 또는 5-6 원 헤테로아릴렌으로부터 선택되며; Z_2는 C_{1-6} 알킬렌, C_{2-10} 알케닐렌, C_{2-10} 알키닐렌, C_{3-8} 시클로알킬렌, 6-10 원 아릴렌 또는 5-14 원 헤테로아릴렌으로부터 선택되고; R_9는 수소 또는 C_{1-6} 알킬로부터 선택되며; Z_3은 부재 또는 C_{1-6} 알킬렌, 할로겐화 C_{1-6} 알킬렌 또는 알콕시로 치환된 C_{1-6} 알킬렌으로부터 선택되거나; 또는 R_9 및 Z_3은 이들에 부착된 질소 원자와 함께 4-8 원 헤테로시클릴을 형성하며; α는 독립적으로 0, 1, 2, 3, 4, 5 또는 6이고; L_4는 L_4의 2 위치에서 E에 결합되며;

E는 하나 이상의 R_{12}로 선택적으로 치환되는 피리미딜렌이고; 여기서 R_{12}는 수소, 중수소, 할로겐, CN, 니트로, C_{1-6} 알킬 또는 할로겐화 C_{1-6} 알킬로부터 독립적으로 선택되며;

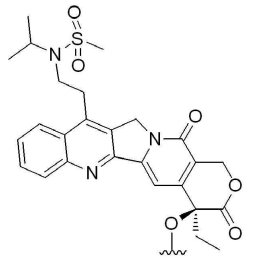
G는 친핵성 치환을 위한 이탈기이고;

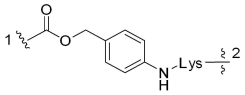
각각의 m_1, m_2 및 m_3은 독립적으로 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 또는 10인,

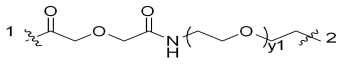
화합물 또는 이의 약제학적으로 허용 가능한 염.

청구항 23

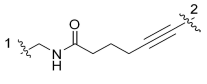
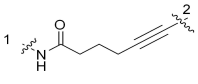
제1항에 있어서,

T는  이고,

L_1은  이며, L_1은 L_1의 1 위치에서 T에 결합되며;

L_2는  이고, y_1은 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 또는 8이며, L_2는 L_2의 1 위치에서 L_1에 결합되고; m_1은 1이며;

L_3은 트리아졸릴렌이고; m_2는 0 또는 1이며;

L_4는  또는  이고; m_3은 1이며; L_4는 L_4의 2 위치에서 E에 결합되고;

E는 피리미딜렌이며;

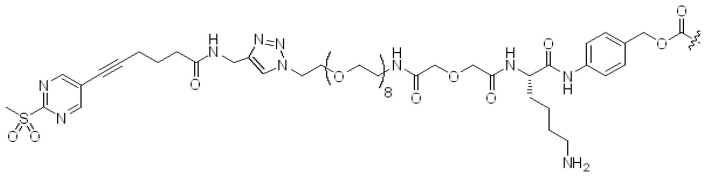
G는 메틸설포닐인,

화합물 또는 이의 약제학적으로 허용 가능한 염.

청구항 24

제1항에 있어서,

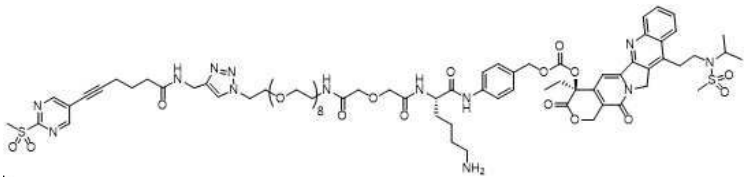
$-[L_1-(L_2)_{m1}-(L_3)_{m2}-(L_4)_{m3}-E]-G$는 하기의 단편인, 화합물 또는 이의 약제학적으로 허용 가능한 염:

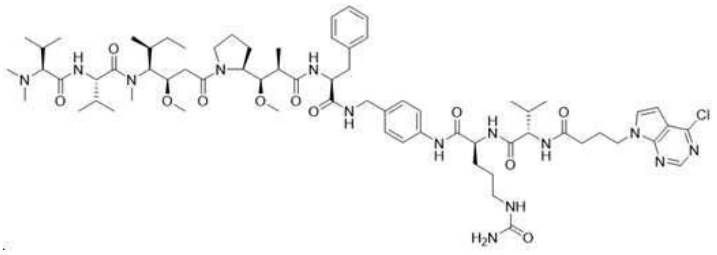


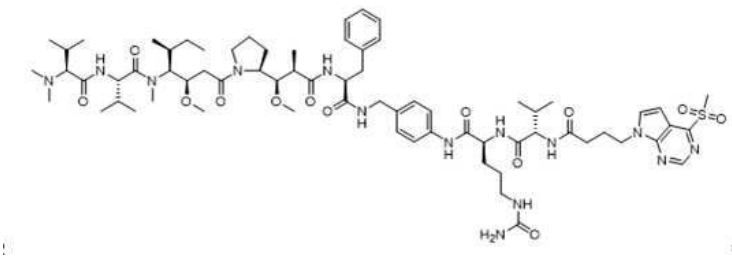
청구항 25

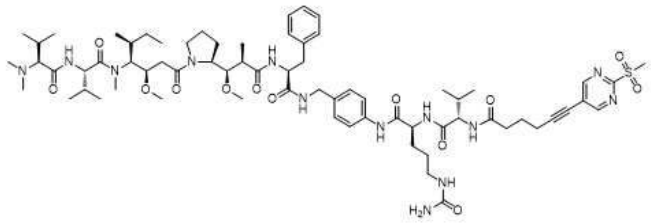
제1항에 있어서,

화합물이

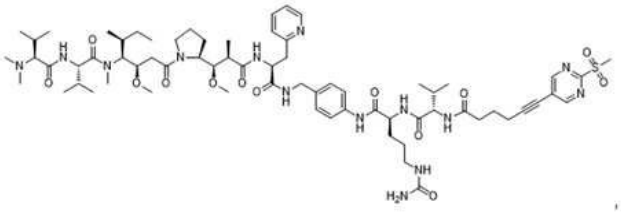
,

,

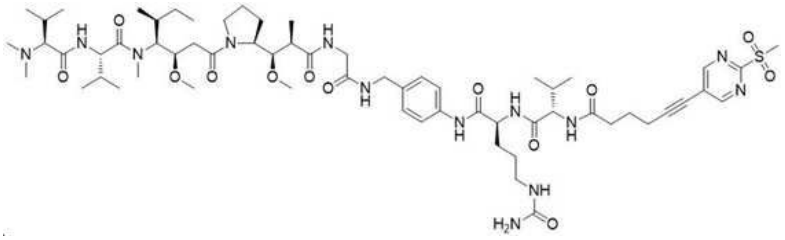
,



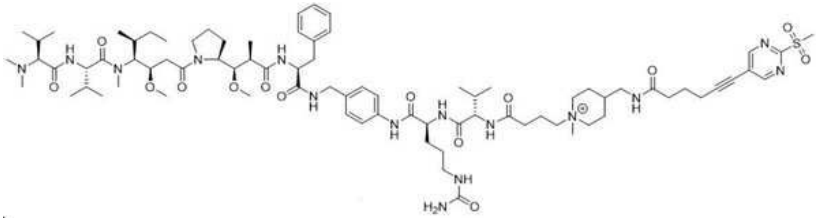
,



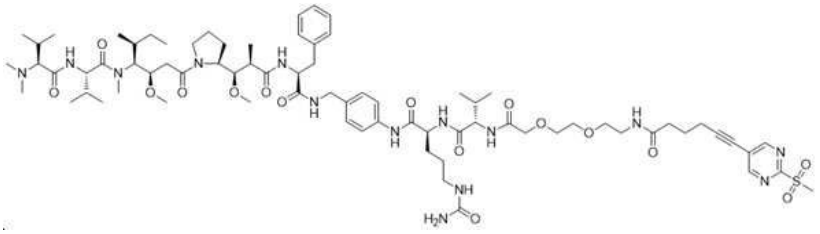
,



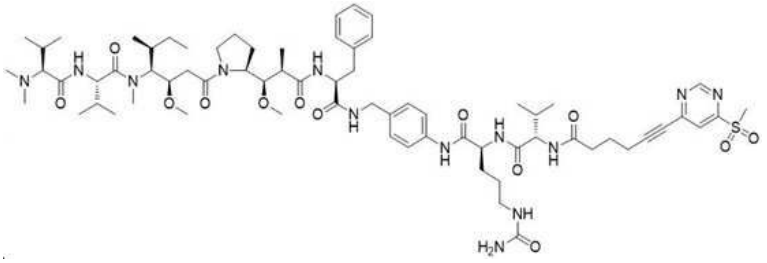
,



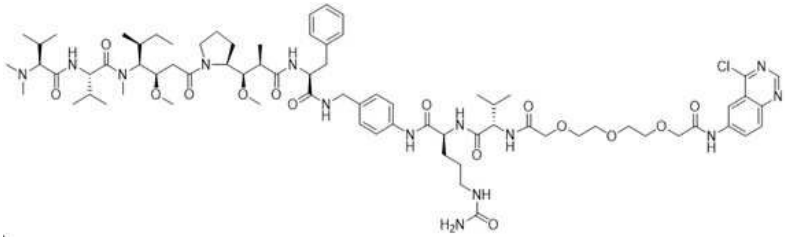
,



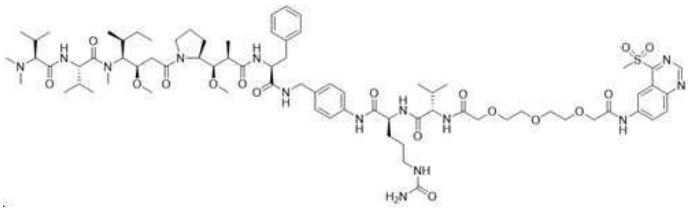
,



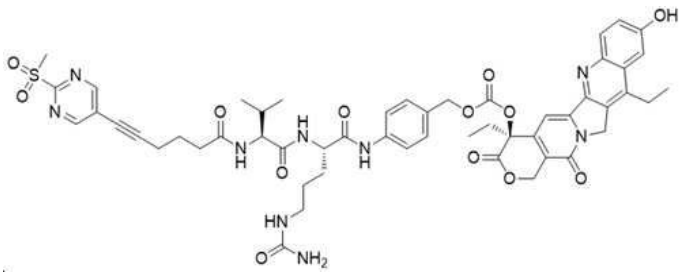
,



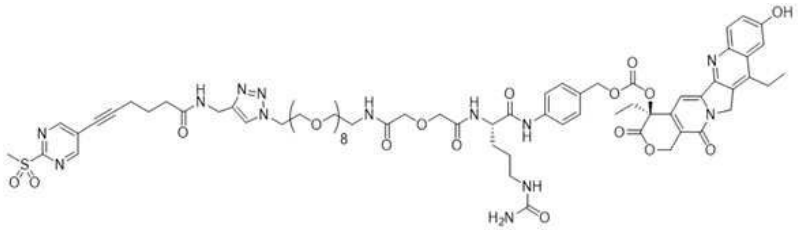
,



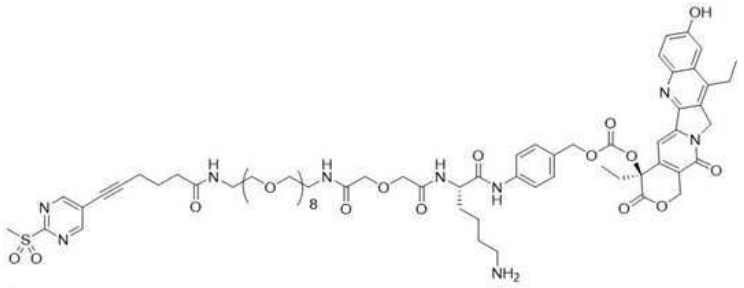
,



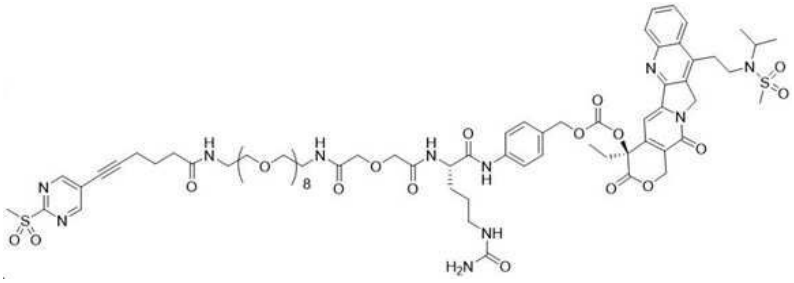
,



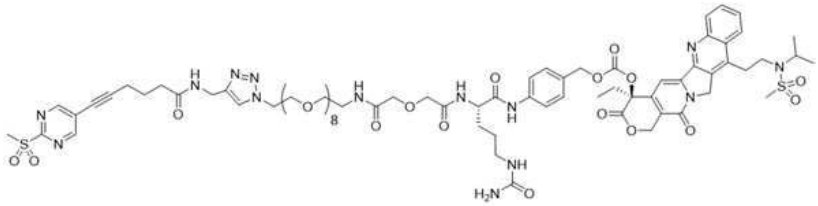
,



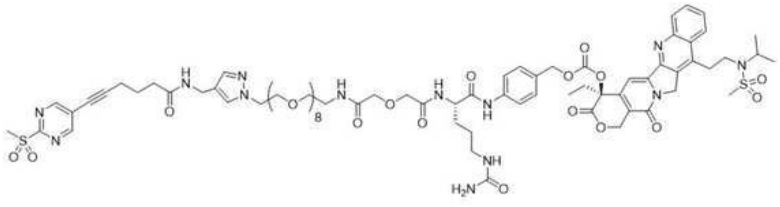
,



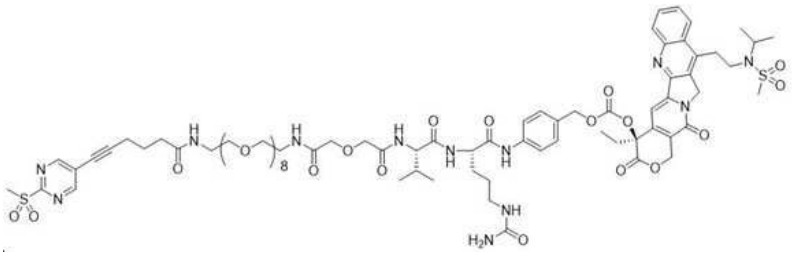
,



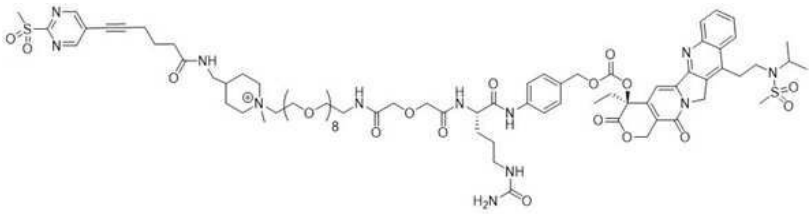
,



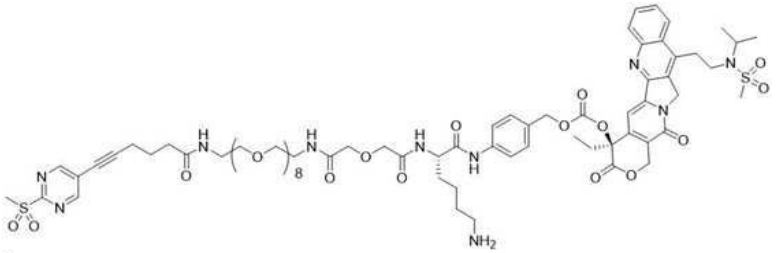
,



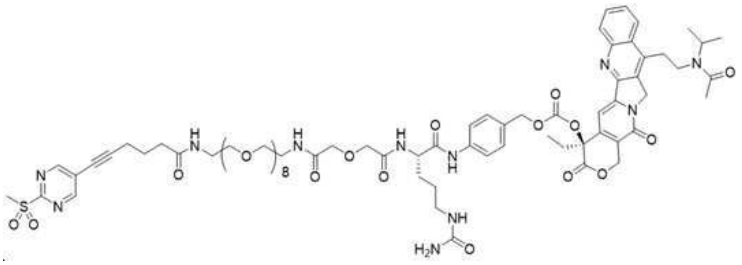
,



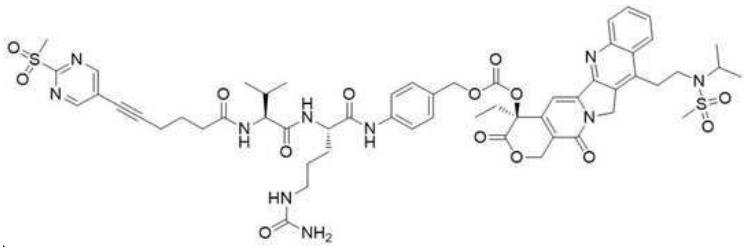
,



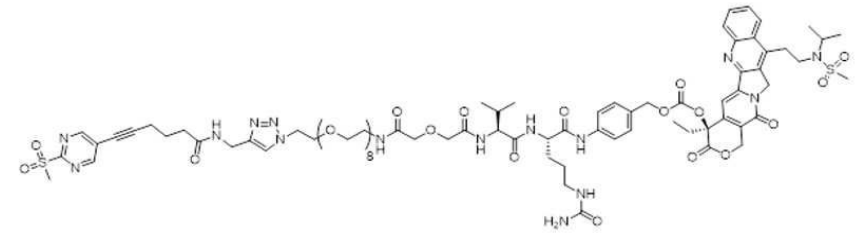
,



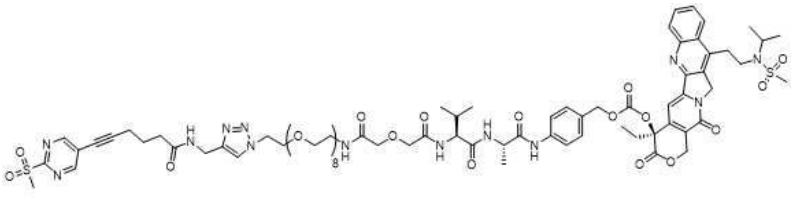
,



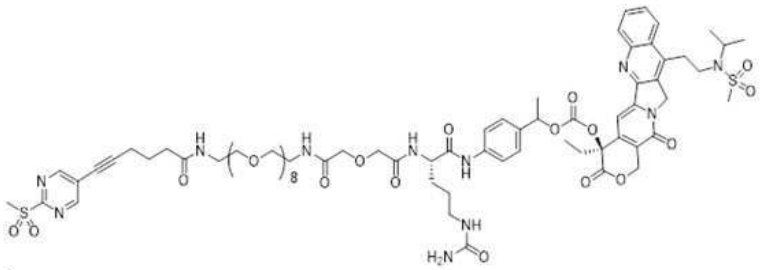
,



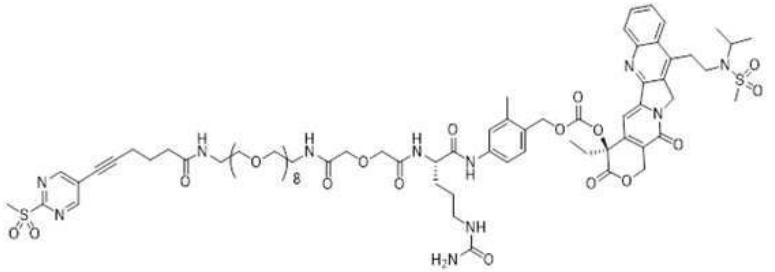
,



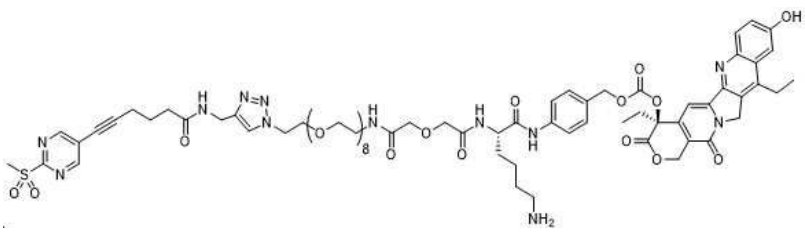
,



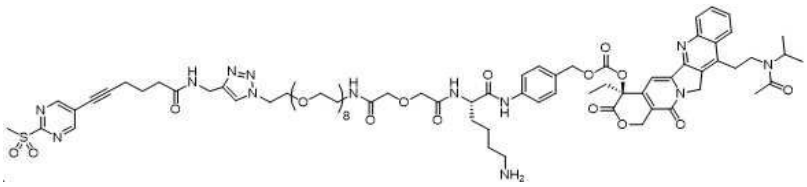
,



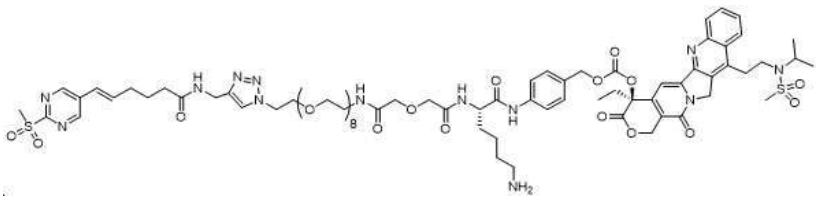
,



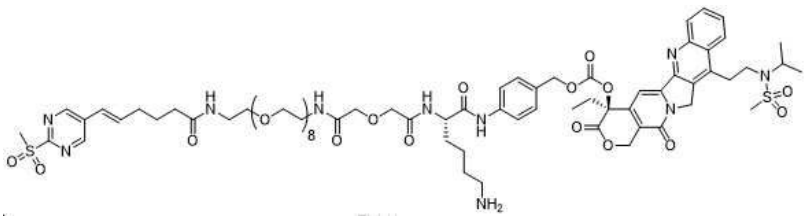
,



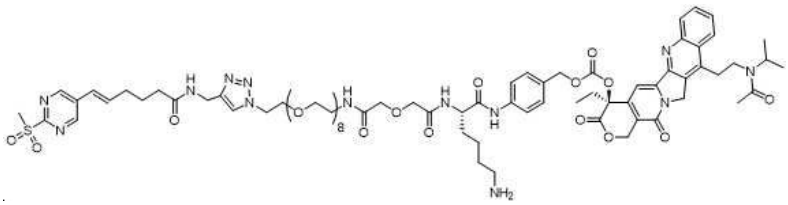
,



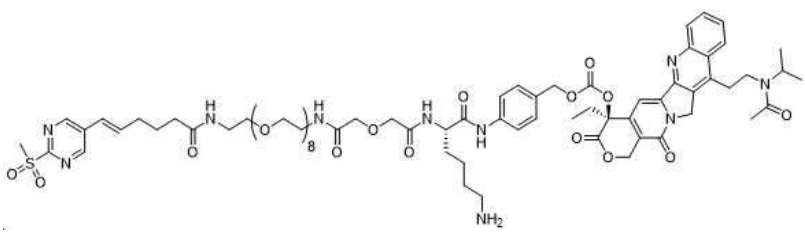
,



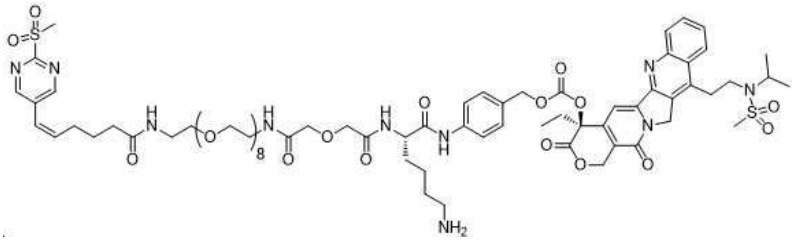
,



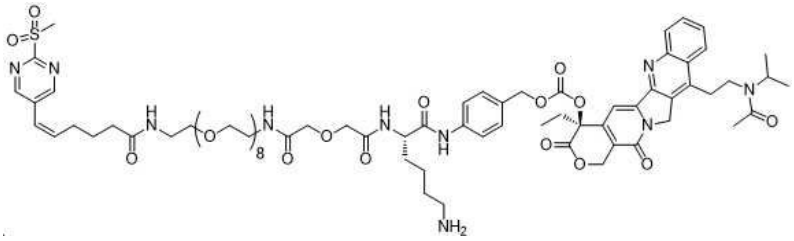
,



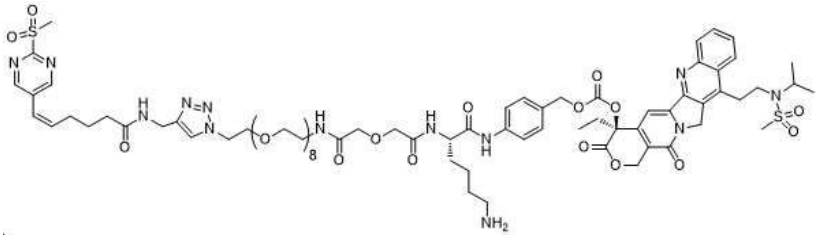
,



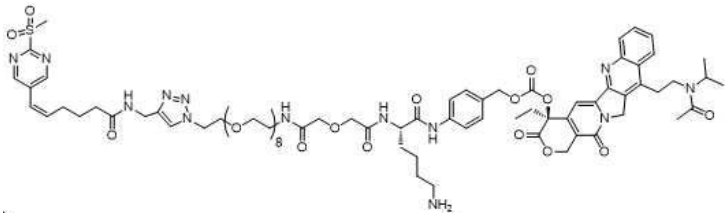
,



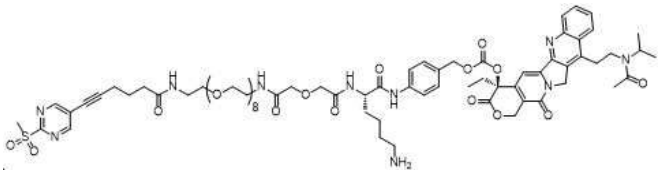
,



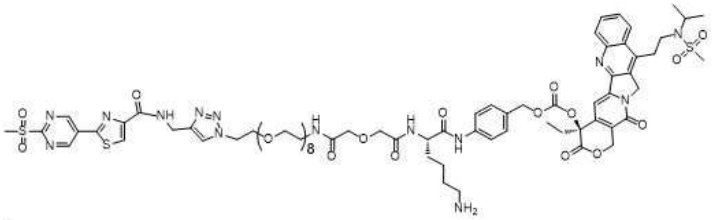
,



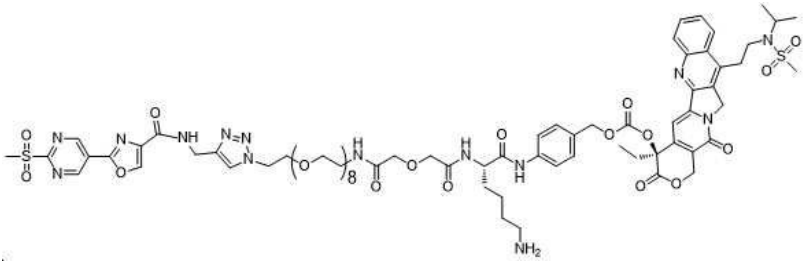
,



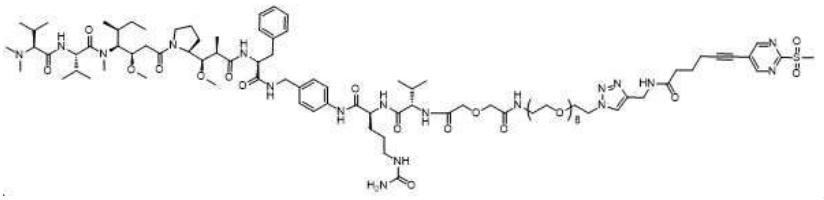
,



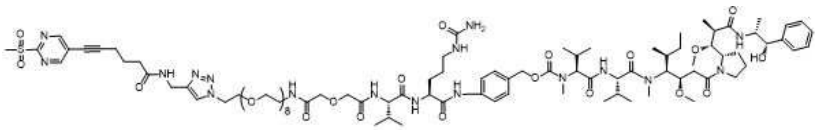
,



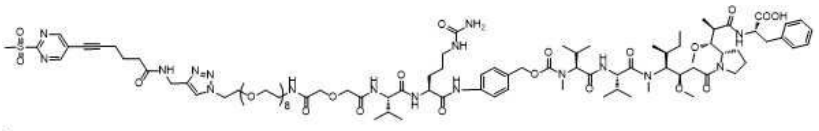
,



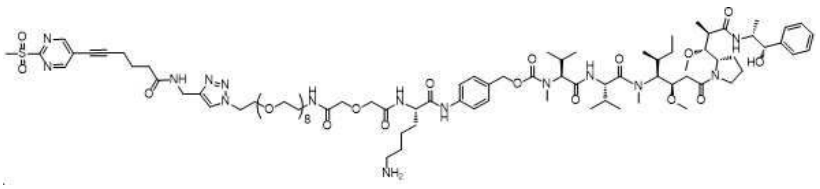
,



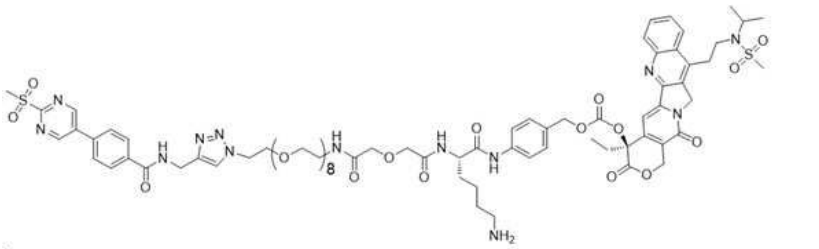
,



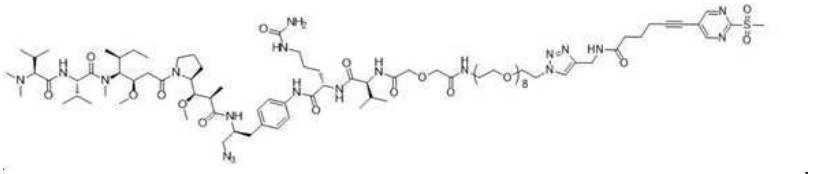
,



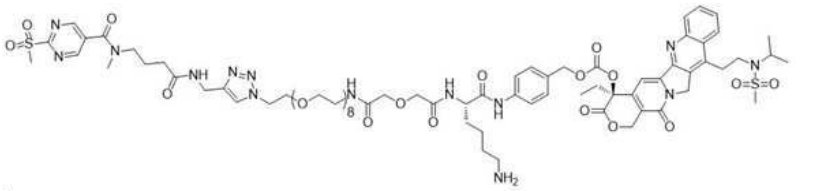
,



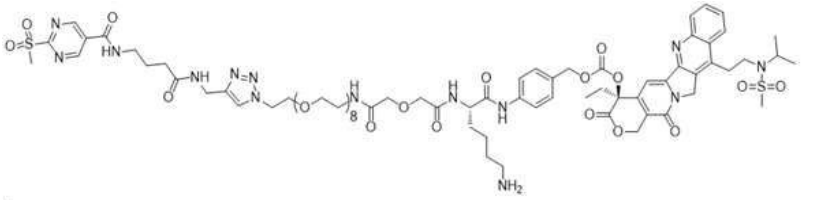
,



,



또는

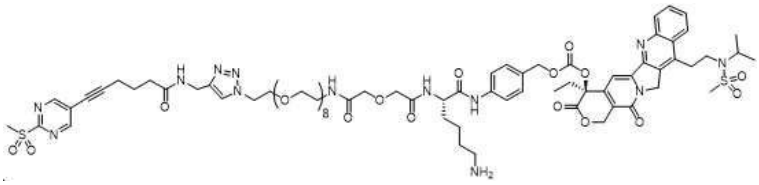


인, 화합물 또는 이의 약제학적으로 허용 가능한 염.

청구항 26

제1항에 있어서,

화합물은

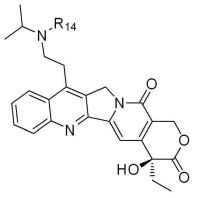
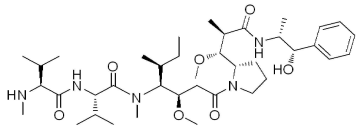
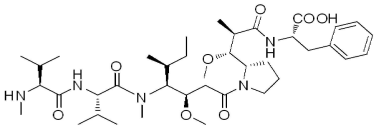
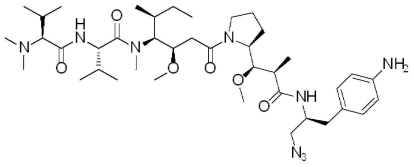
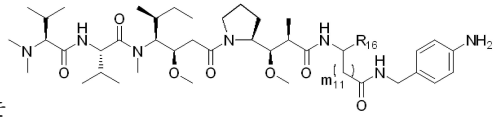


인, 화합물 또는 이의 약제학적으로 허용 가능한 염.

청구항 27

화합물 또는 이의 약제학적으로 허용 가능한 염:

여기서 화합물은


,

,

,

또는

이고,

여기서 R_{14}는 아실 또는 설포닐으로부터 선택되며, 이는 R_{15}로 치환되고, R_{15}는 C_{1-6} 알킬, 할로겐화 C_{1-6} 알킬, 6-10 원 아릴 또는 5-12 원 헤테로아릴로부터 선택되며; R_{16}은 수소, 중수소, C_{1-6} 알킬 또는 R_{17}로 치환된 C_{1-6} 알킬로부터 선택되고, R_{17}은 페닐 및 피리딜을 포함하지만 이에 제한되지 않은, 아릴 또는 헤테로아릴로부터 선택되며, m_{11}은 0, 1 또는 2이다.

청구항 28

제1항 내지 제27항 중 어느 한 항의 화합물 및 하나 이상의 제약 부형제를 포함하는 약제학적 조성물.

청구항 29

제1항 내지 제27항 중 어느 한 항의 화합물 또는 이의 약제학적으로 허용 가능한 염을 포함하는, 비정상 세포 활성과 관련된 질환을 치료하기 위한 약제학적 조성물.

청구항 30

제29항에 있어서, 질환이 암인 약제학적 조성물.

청구항 31

제30항에 있어서,

상기 암은 식도암, 뇌종양, 폐암, 편평 세포 암종, 방광암, 위암, 난소암, 복막암, 췌장암, 유방암, 두경부암, 자궁경부암, 자궁내막암, 결장직장암, 간암, 신장암, 비 호지킨 림프종, 중추 신경계 종양, 전립선암 또는 갑상선암인 약제학적 조성물.

청구항 32

제31항에 있어서,

상기 식도암은 식도 선암종 또는 식도 편평세포 암종이고; 상기 폐암은 소세포 폐암 또는 비-소세포 폐암이고; 상기 중추 신경계 종양은 신경아교종, 다형성 교아종(glioblastoma multiforme), 신경교종 또는 육종인 약제학적 조성물.

청구항 33

생체활성 분자의 단편, 링커 및 표적화 부분(targeting moiety)을 포함하는 접합체(conjugate)이며, 여기서 상기 표적화 부분은 활성기를 통해 링커에 연결되어 접합체를 형성하고;

여기서 상기 접합체는 식 (II)로 나타낸 구조를 갖고,

$\{T-[L_1-(L_2)_{m1}-(L_3)_{m2}-(L_4)_{m3}-E]\}_y-A$ 식 (II)

여기서 A는 표적화 부분이고; ɣ은 1부터 10까지의 정수 또는 소수이며; 나머지 기들은 제1항 내지 제26항 중 어느 한 항에서 정의된 바와 같은, 접합체.

청구항 34

제33항의 접합체 또는 이의 약제학적으로 허용 가능한 염, 및 하나 이상의 제약 부형제를 포함하는 약제학적 조성물.

청구항 35

제33항의 접합체 또는 이의 약제학적으로 허용 가능한 염을 포함하는, 암의 치료를 위한 약제학적 조성물.

청구항 36

제35항에 있어서,

상기 암은 식도암, 뇌종양, 폐암, 편평 세포 암종, 방광암, 위암, 난소암, 복막암, 췌장암, 유방암, 두경부암, 자궁경부암, 자궁내막암, 결장직장암, 간암, 신장암, 비 호지킨 림프종, 중추 신경계 종양, 전립선암 또는 갑상선암인 약제학적 조성물.

청구항 37

제1항 내지 제27항에 정의된 식 (I) 화합물의 링커를 표적화 부분의 활성기와 커플링하는 단계를 포함하는, 제33항의 접합체의 제조 방법.

청구항 38

생체활성 분자의 단편, 링커 및 표적화 부분을 포함하는 접합체이며, 여기서 상기 표적화 부분은 활성기를 통해 링커에 연결되어 접합체를 형성하고; 상기 표적화 부분은 항체 M1, M2 또는 M3의 항-Trop-2 단일클론항체이고;

여기서 상기 항체는

SEQ ID No.: 11의 아미노산 서열을 갖는 항체 M1의 중사슬 가변 영역 및 SEQ ID No.: 12의 아미노산 서열을 갖는 항체 M1의 경사슬 가변 영역;

SEQ ID No.: 13의 아미노산 서열을 갖는 항체 M2의 중사슬 가변 영역 및 SEQ ID No.: 14의 아미노산 서열을 갖는 항체 M2의 경사슬 가변 영역; 또는

SEQ ID No.: 15의 아미노산 서열을 갖는 항체 M3의 중사슬 가변 영역 및 SEQ ID No.: 16의 아미노산 서열을 갖는 항체 M3의 경사슬 가변 영역

을 포함하는 것인 접합체.

청구항 39

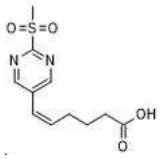
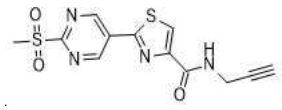
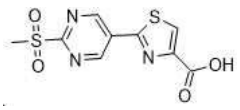
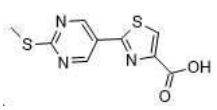
제38항의 접합체 및 하나 이상의 제약 부형제를 포함하는 약제학적 조성물.

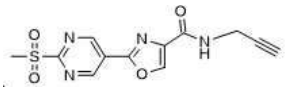
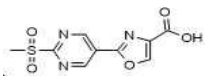
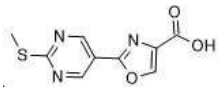
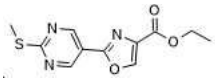
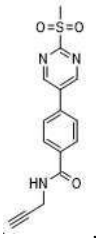
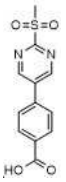
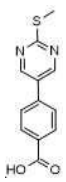
청구항 40

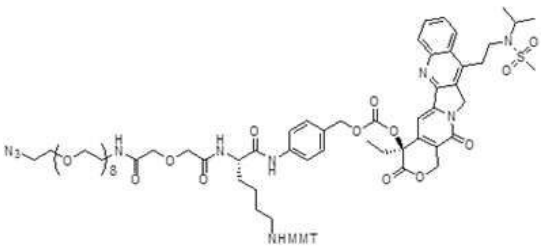
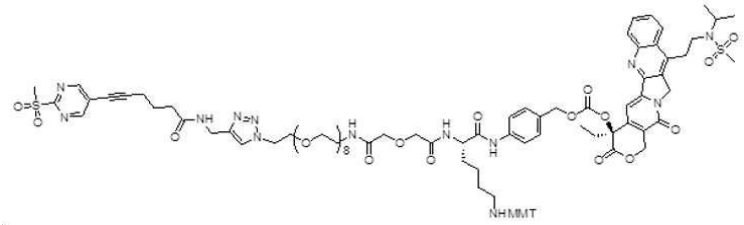
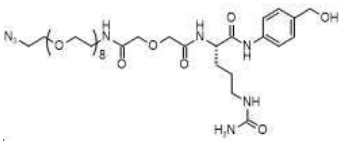
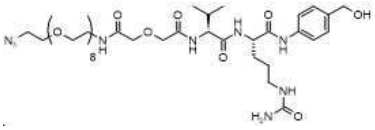
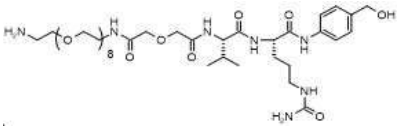
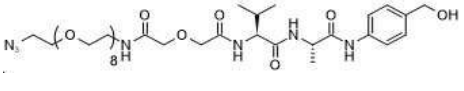
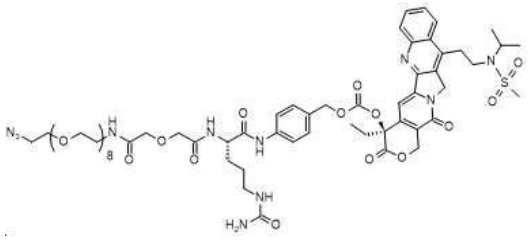
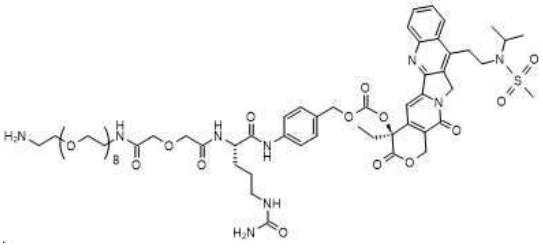
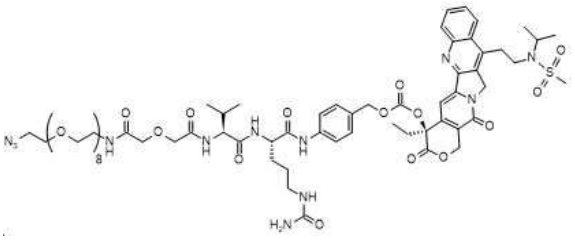
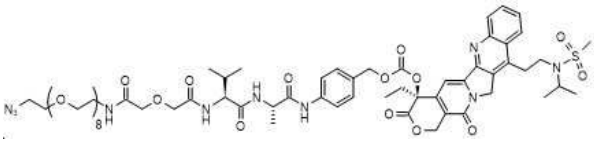
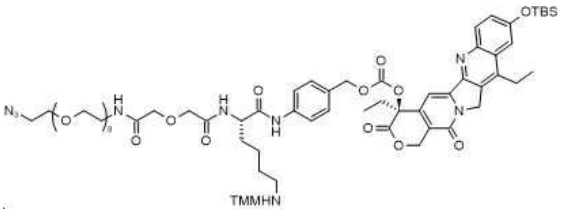
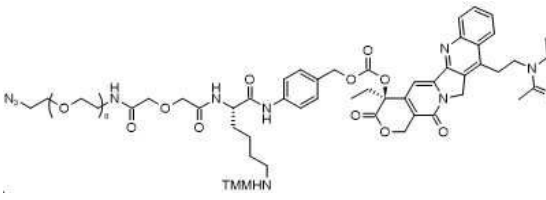
제38항의 접합체 또는 이의 약제학적으로 허용 가능한 염을 포함하는, 암을 치료하기 위한 약제학적 조성물.

청구항 41

다음의 화합물:

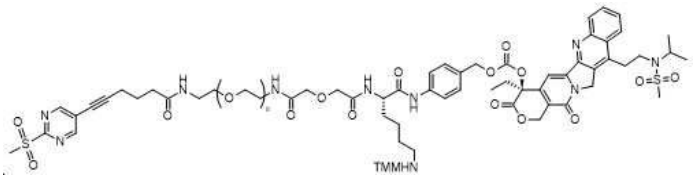

,

,

,

,

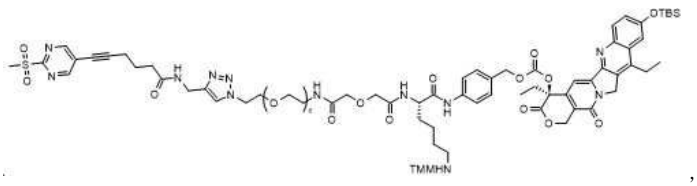

NHMMT

NHMMT











OTBS
TMMHN

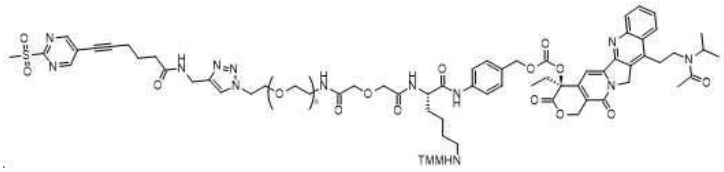
TMMHN



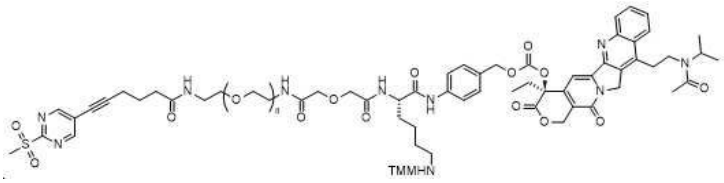
,



,



,



,

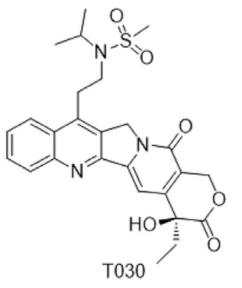
6-(2-(메틸설포닐)피리미딘-5-일)-5-헥신산,

6-(2-(메틸티오)피리미딘-5-일)-5-헥신산, 또는

6-(2-(메틸티오)피리미딘-5-일)-5-헥시노에이트.

청구항 42

벨로테칸 염산을 메탄설포닐 클로라이드와 반응시키는 단계를 포함하는 화합물 T030을 제조하기 위한 공정:

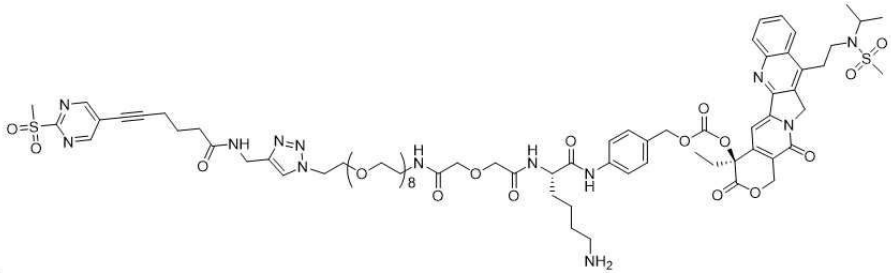


.

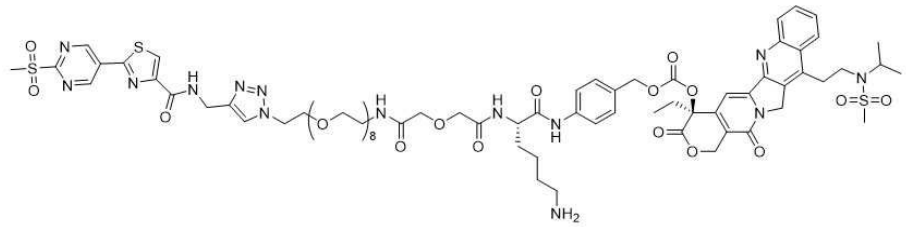
청구항 43

하기 단계를 포함하는, 화합물을 제조하기 위한 공정:

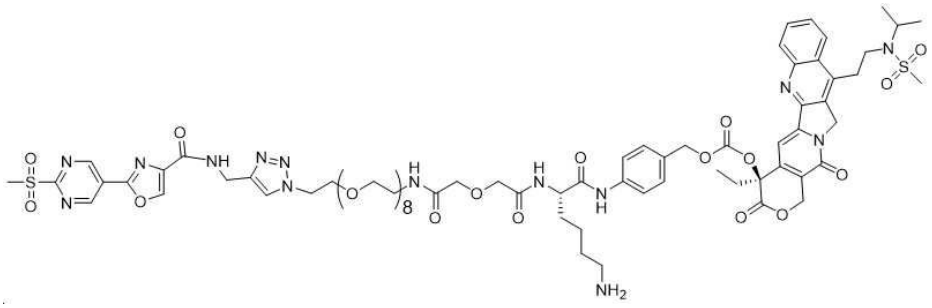
(i) 화합물의 보호 형태를 탈보호하는 단계:



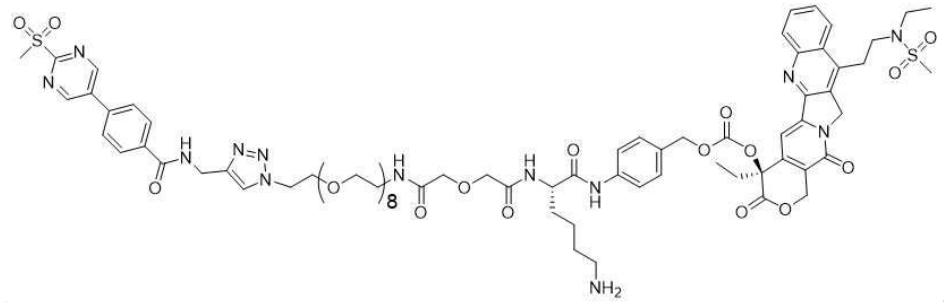
여기서 상기 화합물은 .



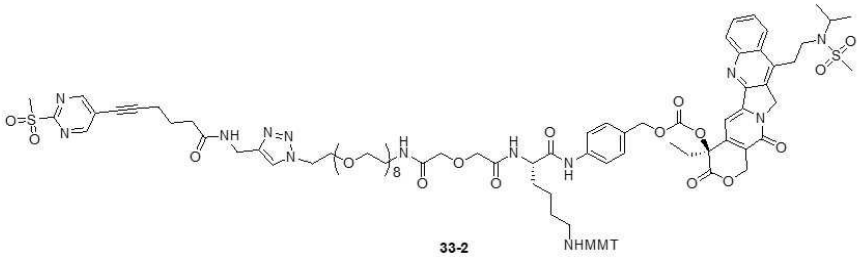
,



또는

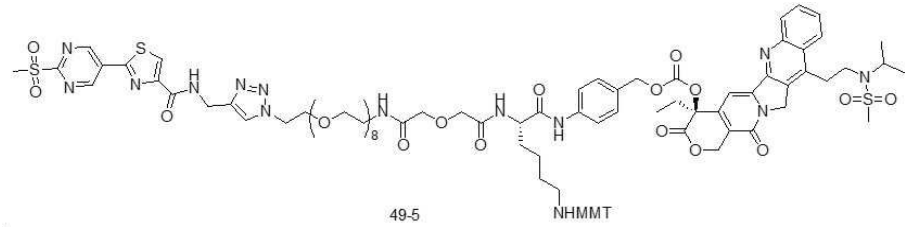


이고;



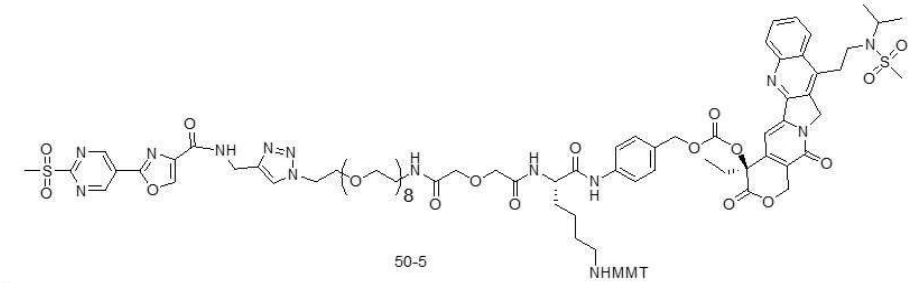
33-2

상기 화합물의 보호 형태는 ,



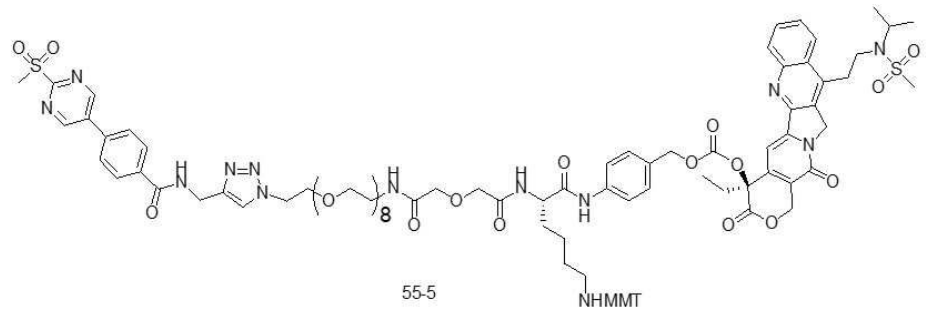
49-5

,



50-5

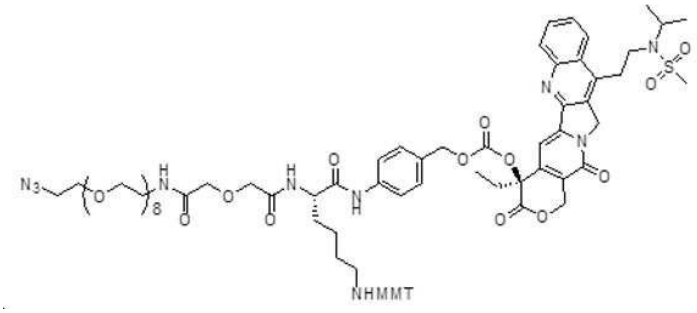
또는



이고;

(ii) 아지드 화합물을 알키닐 화합물과 반응시키는 것을 포함하는, 상기 화합물의 보호 형태를 제조하는 단계:

여기서 상기 아지드 화합물은

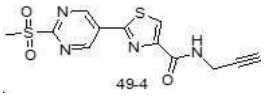


이고,

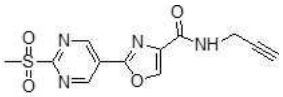
상기 알키닐 화합물은



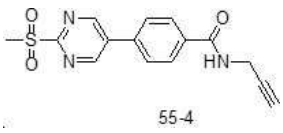
,



,

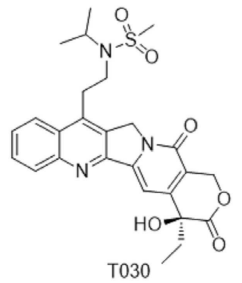


또는



이고;

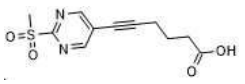
(iii) 화합물 T030을 (S)-2-(32-아지도-5-옥소-3,9,12,15,18,21,24,27,30-노나옥사-6-아자트리아세트아미도)-N-(4-(히드록시메틸)페닐)-6(((4-메톡시페닐)벤즈히드릴)아미노)아세트아미드와 반응시키는 것을 포함하는, 아지드 화합물을 제조하는 단계:



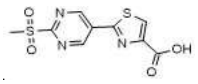
;

(iv) 카르복실산을 프로파길아민과 반응시키는 것을 포함하는, 알키닐 화합물을 제조하는 단계:

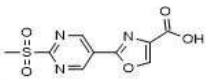
여기서 카르복실산은



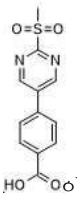
,



,



또는

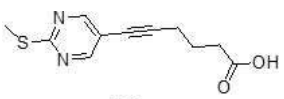


이고;

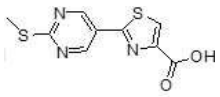
(v) 2-메틸티오피리미딘 화합물을 m-클로로퍼옥시벤조산과 반응시키는 것을 포함하는, 카르복실산을 제조하는

단계:

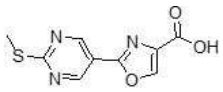
여기서 상기 2-메틸티오피리미딘 화합물은


3-3

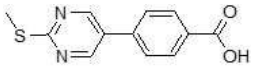
,


49-2

,


50-2

또는


55-2

이고;

(vi) 메틸 6-(2-(메틸티오)피리미딘-5-일)-5-헥시노에이트를 가수분해하는 것을 포함하는, 2-메틸티오피리미딘 화합물을 제조하는 단계:

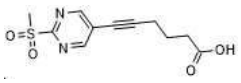
여기서 2-메틸티오피리미딘 화합물은 6-(2-(메틸티오)피리미딘-5-일)-5-헥신산이고; 및/또는

(vii) 메틸 5-헥시노에이트를 5-브로모-2-메틸티오피리미딘과 반응시키는 것을 포함하는, 메틸 6-(2-(메틸티오)피리미딘-5-일)-5-헥시노에이트를 제조하는 단계.

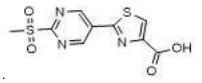
청구항 44

카르복실산을 아민과 반응시키는 단계를 포함하는, 아미드 화합물의 제조 공정이고,

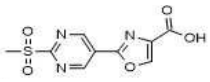
상기 카르복실산은



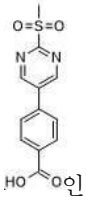
,



,



또는



인, 공정.

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 본 개시는 의료기술의 기술분야에 속하며, 생체활성 분자 접합체, 이의 제조 방법, 및 비정상 세포 활성과 관련된 질환의 예방 및/또는 치료에 관한 것이며, 종양 질환(neoplastic disease)의 예방 및/또는 치료를 포함하지만 이에 제한되지 않는다.

배 경 기 술

[0002] 화학요법(Chemotherapy)은 한 때 암에 대한 표준 요법이었지만, 높은 파괴 효과를 갖는 생물활성 분자는 실수로 정상 세포를 파괴하여, 심각한 부작용을 초래할 수 있다. 표적요법(Targeted therapy)은 표적화 및 항-종양 활동으로 인해 종양학 분야에서 촉망 받는 연구 주제가 되었다. 20 세기 이래로, 바이오-거대분자 약물(예, 치료용 항체 또는 항체 단편) 및 표적화된 소분자 리간드를 사용하여 항-종양 약물 및 종양 표적요법의 개발에 획기적인 발전이 이루어졌다. 그러나, 이들의 높은 표적성에도 불구하고, 바이오-거대분자 약물은 고형 종양에 대해 제한된 치료적 효과를 갖는다. 또한, 생체활성 분자는, 암 세포에 대한 높은 사멸 효과에도 불구하고, 종종 표적성이 부족하고 우연히 정상 세포를 손상시키며, 암 세포에 대한 높은 파괴 효과에도 불구하고 심각한 독성 및 부작용을 유발한다.

[0003] 최근의 연구는 치료용 항체가 생체활성 분자에 연결되어 항체-약물 접합체(ADC)를 형성할 수 있음을 발견했다. ADC는 항체의 표적 효과와 생체활성 분자의 활성을 결합하여 "생물학적 미사일(biological missile)"로 만든다. ADC는 항체에 의해 유도되어 표적 세포에 결합한 후, 세포에 의해 내재화되어 약물을 방출함으로써 관련 질환을 치료한다. 종양 세포 관련 표적에 대한 특이성 및 표적성으로 인해, 항체의 적용 값이 치료에 반영될 뿐만 아니라 약물 표적 전달을 위한 이상적인 담체가 되며 약물의 부작용을 감소시킨다. 소분자 약물 접합체(SMDC)는 항체-약물 접합체(ADC)와 동일한 원리에 기초하여 설계된다. 즉, 화학 공정을 통해 생체활성 분자를 종양 세포 표면의 수용체에 선택적으로 결합할 수 있는 일부 소분자 리간드와 결합하여, 이로써 작용체 분자(effector molecules, 생체활성 분자)의 종양 세포에 대한 표적성을 개선시킨다. SMDC와 ADC의 차이점은 SMDC가 항체 대신 소분자 리간드를 사용한다는 것이며, 아직 시판되는 SMDC는 없다.

[0004] 현재, 4개의 시판되는 ADC가 있다: Mylotarg(젬투주맙 오조가마이신, Gemtuzumab Ozogamicin), Adcetris(Brentuximab Vedotin, CD30 단일클론항체-MMAE), Kadcyla(트라스투주맙 엠탄신, Trastuzumab

Emtansine) 및 Besponsa(이노투주맙 오조가마이신, Inotuzumab ozogamicin, CD22 단일클론항체-칼리키아마이신(calicheamicin). ADC는 일반적으로 항체, 생체활성 분자 및 링커로 구성된다. 생체활성 분자는 링커를 통해 항체에 공유 결합되고; 항체(예를 들어, 단일클론 항체)는 종양 세포의 표면상의 특정 표적을 특이적으로 인식할 수 있어, ADC가 암 세포의 표면에 도달하도록 유도하며 ADC가 엔도시토시스 효과(endocytosis effect)를 통해 암 세포로 진입할 수 있게 하고; 그런 다음, 생체활성 분자는 암 세포에서 방출되어 정상 조직 세포를 손상시키지 않으면서 암 세포를 특이적으로 파괴시키는 효과를 달성한다.

[0005] 리신(Lysine)은 항체에 가장 흔한 연결 부위이고, 이의 ε-아미노기는 링커의 활성화된 카르복실기와 반응하여 아미드 결합을 형성할 수 있다. 부위-특이적 커플링을 위한 기술이 현재 이용 가능하며, 즉, 링커의 카르복실기가 활성화된 후 항체의 특정 리신 ε-아미노기와 아미드 결합을 형성하여, 커플링을 완결한다. 그러나, 이런 아미드 결합은 생체 내 효소의 작용 하에서 가수 분해되기 쉬우며, 그 결과, 표적 세포에 도달하기 전에 생체활성 분자 및 항체가 해리되어 ADC의 표적성을 상실하면서 독성을 증가시키게 되었다.

[0006] 항체 시스테인의 티오기는 일반적으로 이황화 결합 형태로 존재한다. 항체에서 이황화 결합은 개방되어 다중의 유리-설프히드릴기(free sulfhydryl groups)를 커플링 부위로서 제공할 수 있다. 항체의 설프히드릴기와 커플링하는 한 가지 방법은 항체의 유리-설프히드릴기와 말레이미드(maleimide) 사이의 마이클 첨가반응(Michael addition reaction), 또는 항체의 특정 기질과 유리-설프히드릴기 사이의 2번의 마이클 첨가반응으로 고유 구조의 황-브릿지 결합을 형성하는 것이다. 그러나, 많은 문헌에서 티올-마이클 첨가방법에 의해 수득된 ADC가 체순환에서 역-마이클 첨가를 하여, 독성반응을 초래할 것이라고 보고해 왔다. 특허 WO2016142049는 생체활성 분자로 아마톡신, 및 메틸설포닐-치환된 벤조비스옥사디아졸(benzobisoxadiazole) 및 링커의 구조를 갖는 생체활성 분자를 포함하는 구조를 개시하고 있지만, 항체와 커플링하는 세부적인 내용은 구체적으로 기재되어 있지 않다.

[0007] 본 발명은 ADC 또는 SMDC에서 약물의 커플링 방식 및 표적화 부위(표적화 부분)를 개선함으로써 수득되는 신규한 생체활성 분자 접합체를 개시한다. 상기 접합체는 높은 안정성, 매우 높은 커플링 효율(90 %) 및 높은 DAR(5-8)을 갖는다. 본 개시는 상기 발견을 기초로 한다. 집중적인 연구를 통해, 본 발명의 ADC, 예를 들어 BT001021(실시예 32)는, 정맥 내 투여 후, 종양에서의 생체활성 소분자 톡신의 노출이 혈장에서의 노출보다 현저하게 더 높은 반면, Immu-132는 동일한 투여 경로 하에서 종양 노출보다 현저하게 높은 혈장 노출을 갖는다는 것을 놀랍게도 발견하였다. 따라서, 본 발명의 ADC는 Immu-132보다 더 나은 치료 범위(therapeutic window)를 갖는다. 또한, 본 발명자들은 본 발명의 ADC가 위암, 유방암 및 비-소세포 폐암의 동물 모델에서 Immu-132보다 우수한 효능을 갖는다는 것에 또한 놀랐다.

발명의 내용

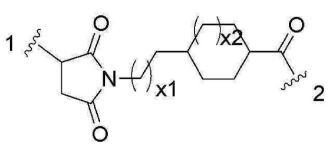
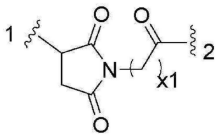
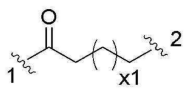
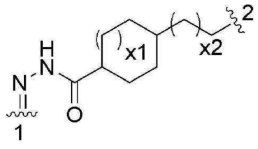
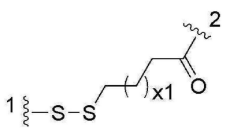
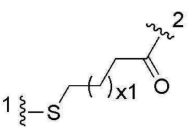
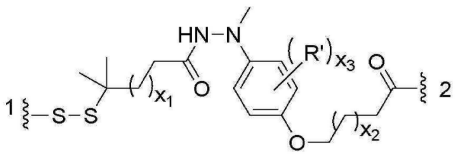
[0008] 본 개시의 제1 측면은, 식 (I)로 나타낸 화합물 또는 이의 약제학적으로 허용 가능한 염을 제공하고,

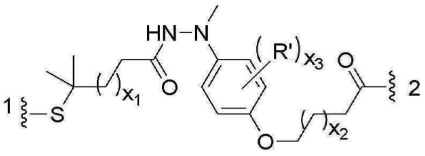
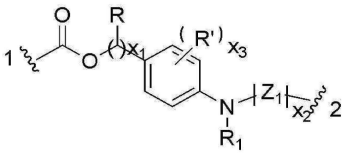
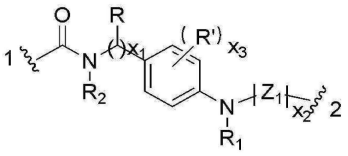
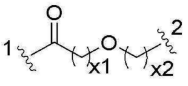
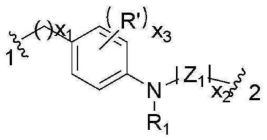
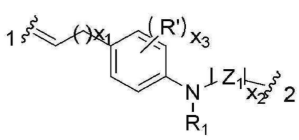
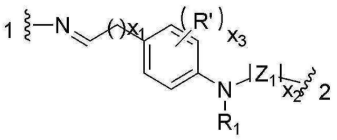
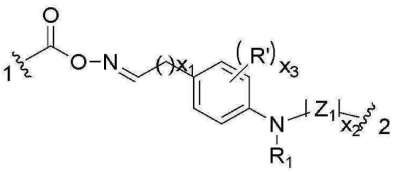
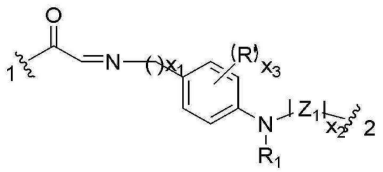
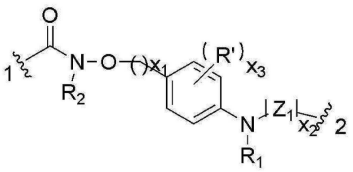
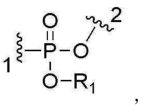
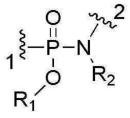
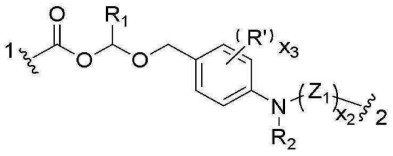
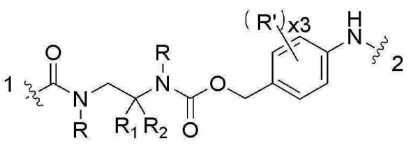
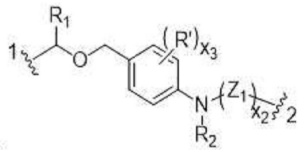
[0009] $T-[L_1-(L_2)_{m1}-(L_3)_{m2}-(L_4)_{m3}-E]-G$

[0010] 식 (I)

[0011] 여기서, T는 생체활성 분자의 단편, 바람직하게는 항-종양 생체활성을 갖는 분자의 단편이고;

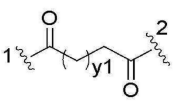
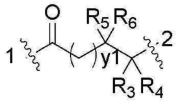
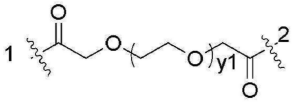
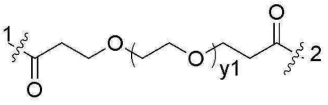
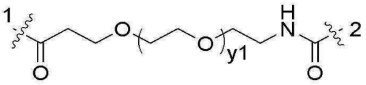
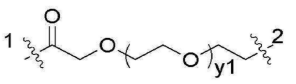
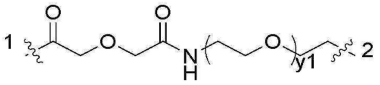
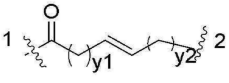
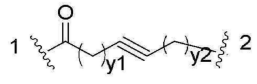
[0012] L_1은 아미노산, 2-10 개의 아미노산으로 구성된 펩티드, 올리고당, $-(CH_2)_{t1}-$, $-(CH_2CH_2O)_{t1}-(CH_2)_{t2}-$,


,

,

,

,

,

,

,


,

,

,

,

,

,

,

,

,

,

,

,

,

또는

으로부터 선택되고;

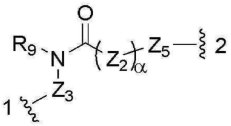
[0013] 여기서, 각각의 R, R', R_1 및 R_2는 독립적으로 H(수소), D(중수소), 할로겐, 카르복실산기, 설폰산기, 시아노, C_{1-6} 알킬, 할로겐화 C_{1-6} 알킬(예: $-CF_3$), 시아노로 치환된 C_{1-6} 알킬(예: $-CH_2CN$), C_{1-6} 알콕시, C_{2-10} 알케닐, C_{2-10} 알키닐, C_{3-6} 시클로알킬, 6-10 원 아릴 또는 5-12 원 헤테로아릴이고, 각각의 Z_1는 독립적으로 또는 2-10 개의 아미노산으로 구성된 펩티드이며, 각각의 t_1 및 t_2는 독립적으로 0, 1, 2, 3, 4, 5 또는 6이고, 각각의 x_1 및 x_2는 독립적으로 0, 1, 2, 3, 4, 5 또는 6이며, 각각의 x_3는 독립적으로 0, 1, 2, 3 또는 4이고, L_1은 L_1의 위치에서 T에 결합되며;

[0014] L_2는 아미노산, 2-10 개의 아미노산으로 구성된 펩티드, 올리고당, $-(CH_2)_{t1}-$, $-(CH_2CH_2O)_{t1}-(CH_2)_{t2}-$,


,

,

,

,

,

,

,

또는

으로부터 선택되고; 여기서 각각의 R_3, R_4, R_5 및 R_6는 독립적으로 H(수소), D(중수소), 할로겐, 카르복실산기, 설폰산기, CN, C_{1-6} 알킬, C_{1-6} 할로겐화 알킬, 시아노로 치환된 C_{1-6} 알킬, C_{1-6} 알콕시, C_{2-10} 알케닐, C_{2-10} 알키닐 또는 C_{3-6} 시클로알킬로부터 독립적으로 선택되며, 또는 R_3/R_4, R_5/R_6 또는 R_3/R_5는 이에 부착된 탄소 원자와 함께 3-8 원 고리를 형성하고, 각각의 t_1 및 t_2는 독립적으로 0, 1, 2, 3, 4, 5 또는 6이며, 각각의 y_1 및 y_2는 독립적으로 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 또는 10이고, L_2는 L_2의 1 위치에서 L_1에 결합되며;

[0015] L_3는 하나 이상의 R_7으로 선택적으로 치환되는 이는 하기의 기; 아미노, 3-8 원 시클로알킬렌, 3-8 지방족 헤테

로시클릴렌, 6-12 원 브릿지 헤테로시클릴렌, 6-12 원 스피로헤테로시클릴렌, 6-12 원 융합 헤테로시클릴렌, 6-10 원 아릴렌(예: 페닐렌 또는 나프틸렌), 5-12 원 헤테로아릴렌 또는 3-8 원 시클로알킬렌-W-로부터 선택되고; 여기서 W는 산소 또는 NR_8이고, R_7은 독립적으로 H(수소), D(중수소), 할로겐, =O, CN, 카르복실, 설폰산기, C_{1-6} 알킬, 할로겐화 C_{1-6} 알킬, 시아노로 치환된 C_{1-6} 알킬, C_{1-6} 알콕시, C_{2-10} 알케닐 또는 C_{2-10} 알키닐로부터 선택되며, R_8는 H(수소), D(중수소), C_{1-6} 알킬, C_{3-6} 시클로알킬, C_{1-6} 알콕시 또는 시아노 C_{1-2} 알킬로부터 독립적으로 선택되고, L_3는 L_3의 1 위치에서 L_2에 결합되며;

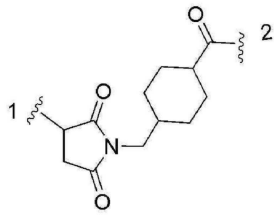
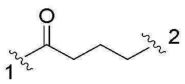
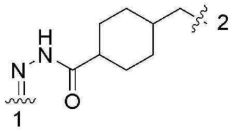
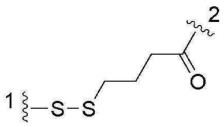
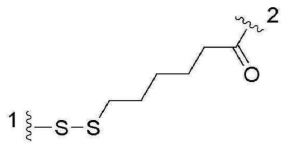
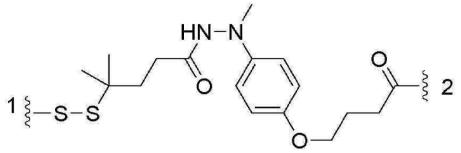
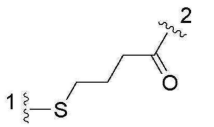
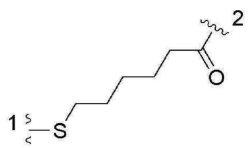
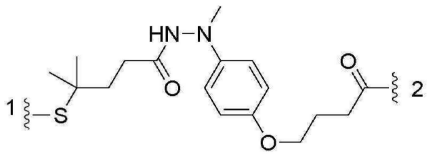
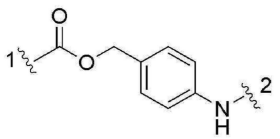
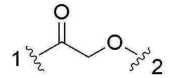
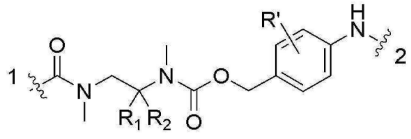
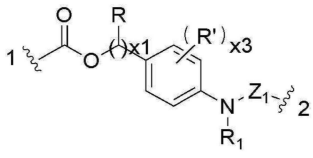
[0016] L_4는  으로부터 선택되며, 여기서 Z_5는 바람직하게는 C_{2-6} 알케닐리덴, C_{2-6} 알키닐리덴, 아미도기, 설퍼릴(sulfuryl), 설피닐(sulfinyl), 6-10 원 아릴렌 또는 5-6 원 헤테로아릴렌으로부터 선택되고; Z_2는 C_{1-6} 알킬렌, C_{2-10} 알케닐렌, C_{2-10} 알키닐렌, C_{3-8} 시클로알킬렌, 6-10 원 아릴렌 또는 5-14 원 헤테로아릴렌으로부터 선택되며; R_9는 H(수소) 또는 C_{1-6} 알킬로부터 선택되며; Z_3는 부재 또는 C_{1-6} 알킬렌, 할로겐화 C_{1-6} 알킬렌 또는 알콕시로 치환된 C_{1-6} 알킬렌로부터 선택되고; 또는 R_9 및 Z_3는 이에 부착된 질소 원자와 함께 4-8 원 헤테로시클릴(heterocyclyl)을 형성하고; α는 독립적으로 0, 1, 2, 3, 4, 5 또는 6이며; L_4는 L_4의 2 위치에서 E에 결합되고;

[0017] E는 하나 이상의 R_{12}로 선택적으로 치환되며 이는 하기의 기: 6-10 원 아릴렌 또는 5-14 원 헤테로아릴렌으로부터 선택되고; 여기서 R_{12}는 H(수소), D(중수소), 할로겐, CN, 니트로, C_{1-6} 알킬 또는 할로겐화 C_{1-6} 알킬로부터 독립적으로 선택되며;

[0018] G는 친핵성 치환을 위한 이탈기이고; 예를 들어, 할로겐, 설포닐, 설폰산 에스테르기, 니트로 등이며;

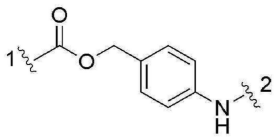
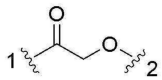
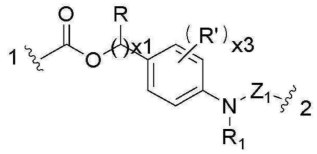
[0019] 각각의 m_1, m_2, 및 m_3는 독립적으로 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 또는 10이다.

[0020] 일부 바람직한 구현예에서, L_1은 Val, Cit, Phe, Lys, D-Val, Leu, Gly, Ala, Asn, 2-5 개의 아미노산으로 구성된 펩티드,

[0021] , , , , , , , , , , ,  또는  으로부터 선택되고; 여기서 각각의 R,

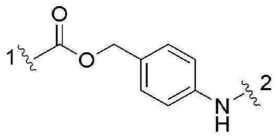
R', R_1 및 R_2는 독립적으로 H(수소), D(중수소), C_{1-6} 알킬, C_{2-10} 알케닐, C_{2-10} 알키닐 또는 C_{3-6} 시클로알킬이며, Z_1은 Val, Cit, Phe, Lys, D-Val, Leu, Gly, Ala, Asn, Val-Cit, Cit-Val, Cit-Ala, Val-Ala, Lys-Val, Val-Lys(Ac), Phe-Lys, Phe-Lys(Ac), D-Val-Leu-Lys, Gly-Gly-Arg 또는 Ala-Ala-Asn이고, x_1는 0, 1, 2 또는 3이며, x_3는 0, 1, 2, 3 또는 4이다.

[0022] 일부 바람직한 구현예에서, L_1은 Val, Cit, Phe, Lys, D-Val, Leu, Gly, Ala, Asn, Cit-Val, Val-Ala, Lys-Val, Val-Lys(Ac), Phe-Lys, Phe-Lys(Ac), D-Val-Leu-Lys, Gly-Gly-Arg, Ala-Ala-Asn,

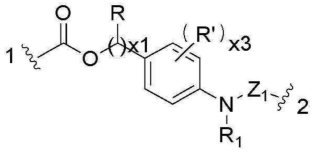




또는 으로부터 선택되고; 여기서 각각의 R, R' 및 R_1은 독립적으로 H(수소), D(중수소), C_{1-6} 알킬, C_{2-10} 알케닐, C_{2-10} 알키닐 또는 C_{3-6} 시클로알킬이고, Z_1은 Val, Cit, Phe, Lys, D-Val, Leu, Gly, Ala, Asn, Val-Cit, Cit-Val, Cit-Ala, Val-Ala, Lys-Val, Val-Lys(Ac), Phe-Lys, Phe-Lys(Ac), D-Val-Leu-Lys, Gly-Gly-Arg 또는 Ala-Ala-Asn이며, 각각의 x_1 및 x_3는 독립적으로 0, 1, 2 또는 3이다.

[0023] 일부 바람직한 구현예에서, L_1은 Lys, Cit, Cit-Val, Val-Ala, Lys-Val,

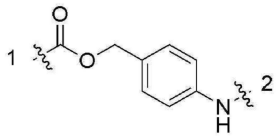


또는

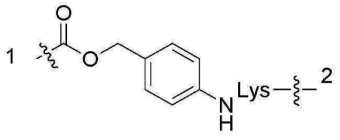
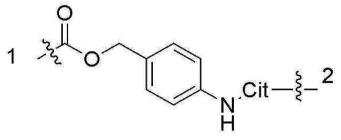
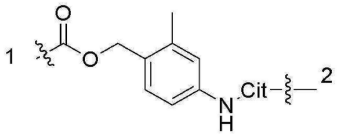
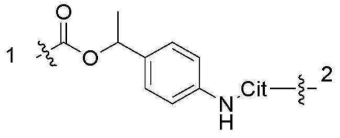
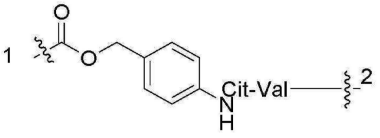
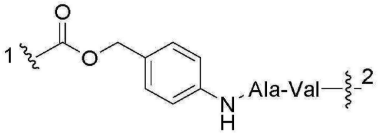
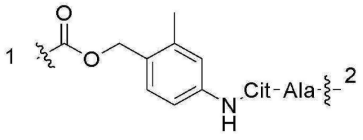
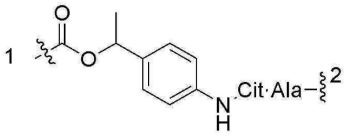
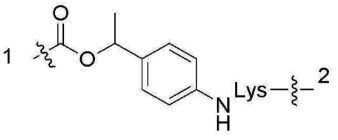


으로부터 선택되고; 여기서 각각의 R, R' 및 R_1은 독립적으로 H(수소), D(중수소) 또는 C_{1-4} 알킬이고, Z_1은 Cit, Lys, Cit-Val, Cit-Ala, Val-Ala 또는 Lys-Val이며, 각각의 x_1 및 x_3는 독립적으로 0, 1 또는 2이다.

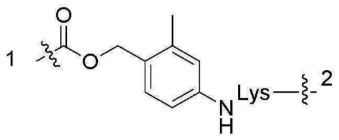
[0024] 일부 바람직한 구현예에서, L_1은 Lys, Cit, Cit-Val, Val-Ala, Lys-Val,



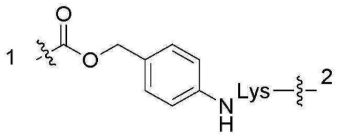
,


,

,

,

,

,

,

,

,


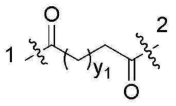
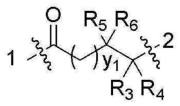
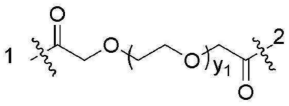
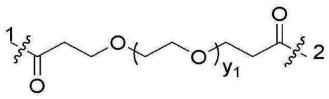
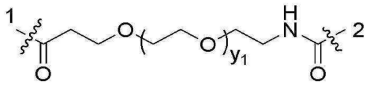
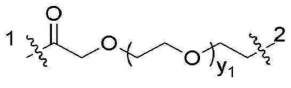
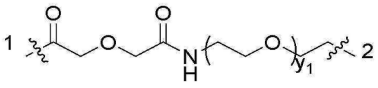
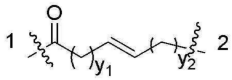
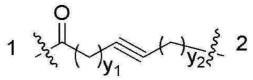
또는



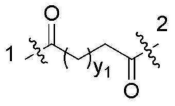
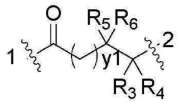
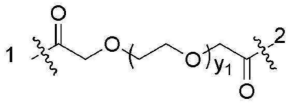
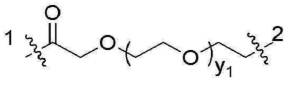
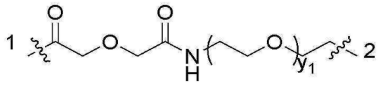
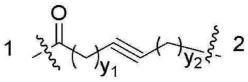
으로부터 선택된다.



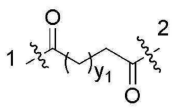
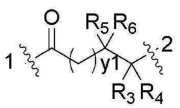
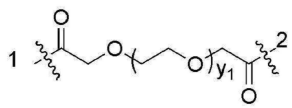
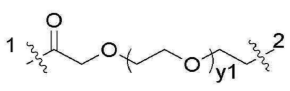
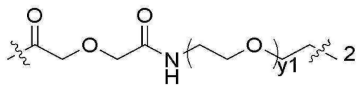
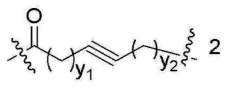
[0025] 일부 바람직한 구현예에서, L_1은 으로부터 선택된다.

[0026] 일부 바람직한 구현예에서, L_2는 Val, Cit, Phe, Lys, D-Val, Leu, Gly, Ala, Asn, 2-5 개의 아미노산으로 구성된 펩티드, , , , , , , ,  또는  으로부터 선택되고; 여기서 각각의 R_3, R_4, R_5 및 R_6는 H(수소), D(중수소), 할로겐, a 카르복실산기, 설폰산기, CF_3, CN, CH_2CN, C_{1-4} 알킬, C_{1-4} 알콕시, C_{2-6} 알케닐, C_{2-6} 알키닐 또는 C_{3-6} 시클로알킬로부터 독립적으로 선택되고, 각각의 y_1 및 y_2는 독립적으로 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 또는 8이며, L_2는 L_2의 위치 1에서 L_1에 결합되며;

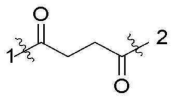
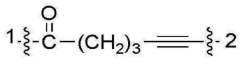
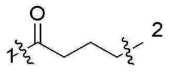
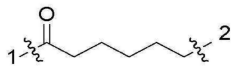
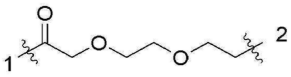
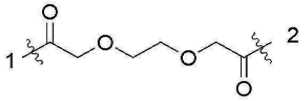
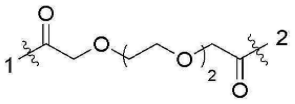
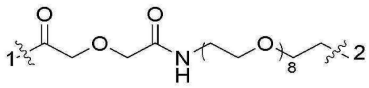
[0027] m_1은 0, 1, 2 또는 3이다.

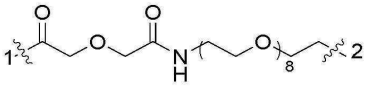
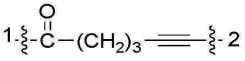
[0028] 일부 바람직한 구현예에서, L_2는 Val, Cit, Phe, Lys, D-Val, Leu, Gly, Ala, Asn, Val-Cit, Cit-Val, Val-Ala, Lys-Val, Val-Lys(Ac), Phe-Lys, Phe-Lys(Ac), D-Val-Leu-Lys, Gly-Gly-Arg, Ala-Ala-Asn, , , , ,  또는  으로부터 선택되고; 여기서 각각의 R_3, R_4, R_5 및 R_6는 H(수소), D(중수소), 할로겐, 카르복실산기, 설폰산기, CF_3, CN, CH_2CN, C_{1-4} 알킬, C_{1-4} 알콕시, C_{2-6} 알케닐, C_{2-6} 알키닐 또는 C_{3-6} 시클로알킬로부터 독립적으로 선택되고, 각각의 y_1 및 y_2는 독립적으로 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 또는 8이며, L_2는 L_2는 L_2의 위치 1에서 L_1에 결합되며;

[0029] m_1은 0, 1 또는 2이다.

[0030] 일부 바람직한 구현예에서, L_2은 , , , ,  또는  으로부터 선택되며; 여기서 각각의 R_3, R_4, R_5 및 R_6은 H(수소), D(중수소) 또는 C_{1-4} 알킬로부터 독립적으로 선택되고, 각각의 y_1 및 y_2는 독립적으로 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 또는 8이고, L_2는 L_2의 위치 1에서 L_1에 결합되며;

[0031] m_1은 1이다.

[0032] 일부 바람직한 구현예에서, L_2은 , , , , , , , 또는 으로부터 선택된다.

[0033] 일부 바람직한 구현예에서, L_2은  및 로부터 선택된다.

[0034] 일부 바람직한 구현예에서, L_3은 하나 이상의 R_7로 선택적으로 치환된 하기의 기: 아미노, 3-8 원 시클로알킬렌, 3-8 지방족 헤테로시클릴렌, 6-12 원 브릿지(bridged) 헤테로시클릴렌, 6-12 원 스피로헤테로시클릴렌, 6-12 원 융합(fused) 헤테로시클릴렌, 6-10 원 아릴렌, 5-12 원 헤테로아릴렌 또는 3-8 원 시클로알킬렌-W-로부터 선택되고; 여기서 W는 산소 또는 NR_8이고, R_7은 H(수소), D(중수소), 할로겐, =O, CF_3, CN, CH_2CN, 카르복실, 설폰산기, C_{1-4} 알킬, C_{1-4} 알콕시, C_{2-6} 알케닐 또는 C_{2-6} 알키닐로부터 독립적으로 선택되며; 바람직하게는, 상기 3-8 지방족 헤테로시클릴렌, 6-12 원 브릿지 헤테로시클릴렌, 6-12 원 스피로헤테로시클릴렌 또는 6-12 원 융합 헤테로시클릴렌은 하나 이상의 질소 원자를 갖고; 바람직하게는, 상기 3-8 원 지방족 헤테로시클릴렌, 6-12 원 브릿지 헤테로시클릴렌, 6-12 원 스피로헤테로시클릴렌 또는 6-12 원 융합 헤테로시클릴렌은 하나 이상의 4차화 질소 원자를 가지며; 바람직하게는, 상기 3-8 원 지방족 헤테로시클릴렌, 6-12 원 브릿지 헤테로시클릴렌, 6-12 원 스피로헤테로시클릴렌 또는 6-12 원 융합 헤테로시클릴렌은 하나 이상의 질소 원자를 갖고, 적어도 하나의 질소가 =O로 치환되며; R_8는 H(수소), D(중수소), C_{1-6} 알킬, C_{2-6} 알케닐, C_{3-6} 알키닐, C_{3-6} 시클로알킬, C_{1-6} 알콕시 또는 시아노 C_{1-2} 알킬로부터 독립적으로 선택되고;

[0035] m_2는 0, 1, 2 또는 3이다.

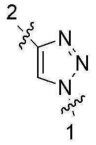
[0036] 일부 바람직한 구현예에서, L_3은 하나 이상의 R_7로 선택적으로 치환된 하기의 기: 아미노, 3-6 원 지방족 헤테로시클릴렌 또는 5-10 원 헤테로아릴렌으로부터 선택되고; 여기서 R_7은 H(수소), D(중수소), 할로겐, =O, CF_3, CN, CH_2CN, 카르복실, 설폰산기, C_{1-4} 알킬, C_{1-4} 알콕시, C_{2-6} 알케닐 또는 C_{2-6} 알키닐로부터 독립적으로 선택되며; 바람직하게는, 상기 3-6 원 지방족 헤테로시클릴렌은 하나 이상의 질소 원자를 갖고; 바람직하게는, 상기 3-6 원 지방족 헤테로시클릴렌은 하나 이상의 4차화 질소 원자를 가지며; 바람직하게는, 상기 3-6 원 지방족 헤테로시클릴렌은 하나 이상의 질소 원자를 갖고, 적어도 하나의 질소 원자가 =O로 치환되며;

[0037] m_2는 0, 1 또는 2이다.

[0038] 일부 바람직한 구현예에서, L_3은 하나 이상의 R_7로 선택적으로 치환된 하기의 기: 아미노 또는 5-6 원 헤테로아릴렌으로부터 선택되고; 여기서 R_7은 H(수소), D(중수소), 할로겐, =O, CF_3, CN, CH_2CN, 카르복실, 설폰산기, C_{1-4} 알킬, C_{1-4} 알콕시, C_{2-6} 알케닐 또는 C_{2-6} 알키닐로부터 독립적으로 선택되고; m_2는 0 또는 1이다.

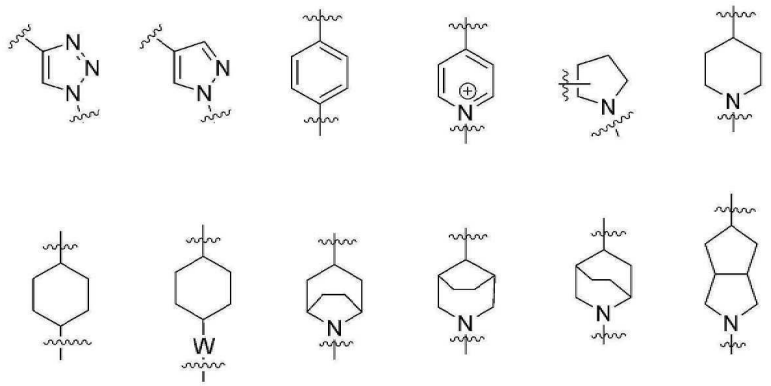
[0039] 일부 바람직한 구현예에서, L_3은 하나 이상의 R_7로 선택적으로 치환된 하기의 기: 아미노, N-메틸피페리딜렌(methylpiperidylene), 피라졸릴렌(pyrazolylene) 또는 트리아졸릴렌(triazolylene)로부터 선택되며; 여기서 R_7은 H(수소), D(중수소), 할로겐, =O, CF_3, CN, CH_2CN, 카르복실, 설폰산기, C_{1-4} 알킬, C_{1-4} 알콕시, C_{2-6} 알케닐 또는 C_{2-6} 알키닐로부터 독립적으로 선택되고; m_2는 0 또는 1이다.

[0040] 일부 바람직한 구현예에서, L_3은 트리아졸릴렌으로부터 선택되고; m_2는 0 또는 1이다.



[0041] 일부 바람직한 구현예에서, L_3은 으로부터 선택된다. m_2는 0 또는 1이다. 바람직하게는, L_3은 L_3의 위치 1에서 L_2에 결합된다.

[0042] 일부 바람직한 구현예에서, L_3은 하나 이상의 R_7로 선택적으로 치환된 하기의 기: 아미노,

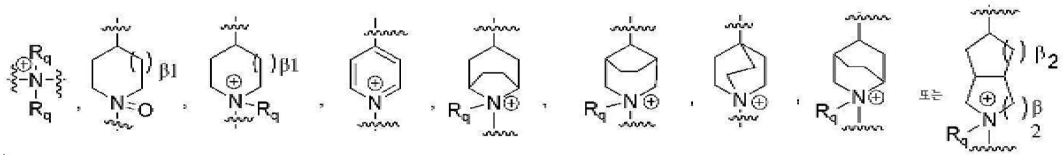


[0043] 으로부터 선택되고 ;

[0044] R_7는 H(수소), D(중수소), =O, CN, CH_2CN, 메틸 또는 CF_3로부터 독립적으로 선택되며;

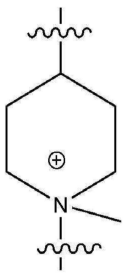
[0045] W는 NR_8, 및 R_8는 H(수소), D(중수소), C_{1-6} 알킬, C_{2-6} 알케닐, C_{3-6} 알키닐 또는 C_{3-6} 시클로알킬로부터 선택된다.

[0046] 일부 바람직한 구현예에서, L_3은

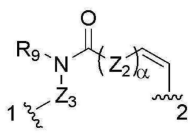
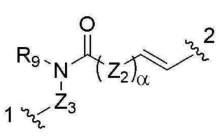
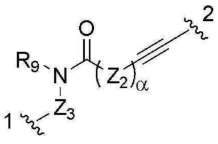


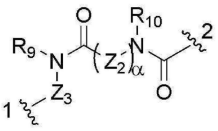
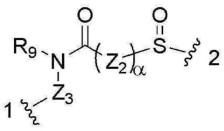
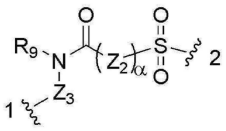
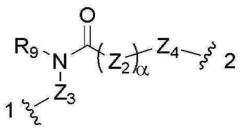
[0047] 으로부터 선택되고;

[0048] 여기서 각각 R_q는 C_{1-6} 알킬, C_{2-6} 알케닐, C_{3-6} 알키닐 또는 C_{3-8} 시클로알킬로부터 독립적으로 선택되며; β_1은 0, 1 또는 2이고; β_2는 1, 2 또는 3이다.

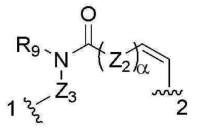
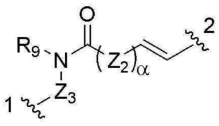
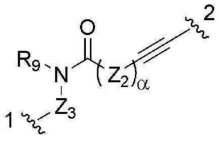
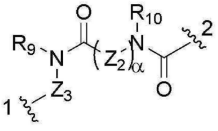
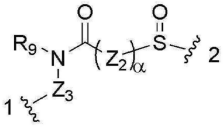
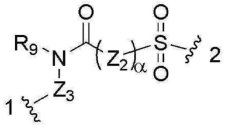
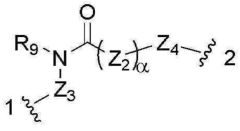


[0049] 일부 바람직한 구현예에서, L_3은 으로부터 선택된다.

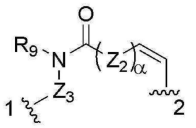
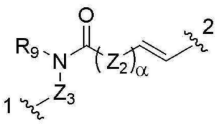
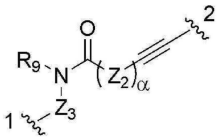
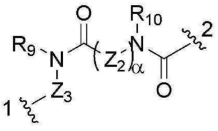
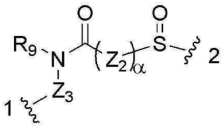
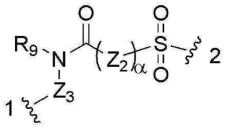
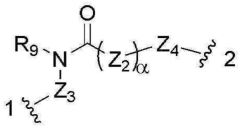
[0050] 일부 바람직한 구현예에서, L_4는 , , ,




또는

으로부터 선택되며, 여기서 Z_4는 6-10 원 아릴 또는 5-6 원 헤테로아릴이고; R_{10}은 H(수소) 또는 C_{1-6} 알킬로부터 선택되며; Z_2는 C_{1-6} 알킬렌, C_{2-10} 알케닐렌, C_{2-10} 알키닐렌 또는 C_{3-8} 시클로알킬렌으로부터 선택되고; R_9는 H(수소) 또는 C_{1-6} 알킬로부터 선택되며; Z_3은 부재 또는 C_{1-6} 알킬렌으로부터 선택되고; 또는 R_9 및 Z_3은 이에 부착된 질소 원자와 함께 4-8 원 헤테로시클릴렌(heterocyclylene)을 형성하며; α는 독립적으로 0, 1, 2, 3, 4, 5 또는 6이고, L_4는 L_4의 위치 2에서 E에 결합되며;

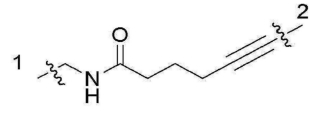
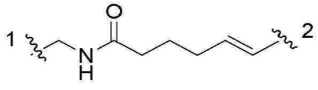
[0051] m_3은 0, 1, 2 또는 3이다.

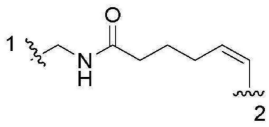
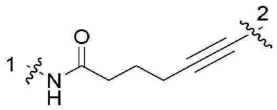
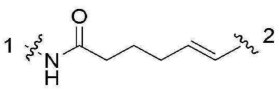
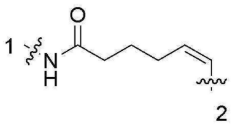
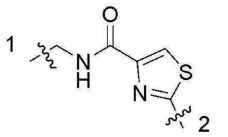
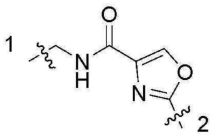
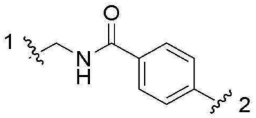
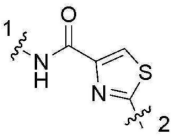
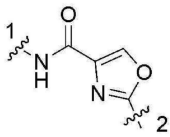
[0052] 일부 바람직한 구현예에서, L_4는






또는

으로부터 선택되고, 여기서 Z_4는 벤젠 고리이며, R_{10}은 H(수소) 및 C_{1-6} 알킬으로부터 선택되고; Z_2는 C_{1-6} 알킬렌, C_{2-10} 알케닐렌, C_{2-10} 알키닐렌 또는 C_{3-8} 시클로알킬렌으로부터 선택되며; R_9는 H(수소) 또는 C_{1-6} 알킬로부터 선택되고; Z_3은 부재 또는 C_{1-6} 알킬렌로부터 선택되거나, 또는 R_9 및 Z_3은 이에 부착된 질소 원자와 함께 4-8 원 헤테로시클릴렌을 형성하며; α는 독립적으로 0, 1, 2, 3, 4, 5 또는 6이고, L_4는 L_4의 위치 2에서 E에 연결되며;

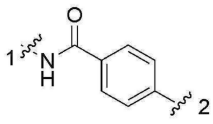
[0053] m_3은 0, 1, 2 또는 3이다.

[0054] 일부 바람직한 구현예에서, L_4는






또는

으로부터 선택되고, Z_4는 5-6 원 헤테로아릴렌이며; R_{10}은 H(수소) 또는 C_{1-6} 알킬로부터 선택되고; Z_2는 C_{1-6} 알킬렌, C_{2-10} 알케닐렌, C_{2-10} 알키닐렌 또는 C_{3-8} 시클로알킬렌으로부터 선택되며; R_9는 H(수소) 또는 C_{1-6} 알킬로부터 선택되고; Z_3은 부재 또는 C_{1-6} 알킬렌으로부터 선택되며; 또는 R_9 및 Z_3은 이에 부착된 질소 원자와 함께 4-8 원 헤테로시클릴렌을 형성하며; α는 독립적으로 0, 1, 2, 3, 4, 5 또는 6이고, L_4는 L_4의 위치 2에서 E에 연결되며;

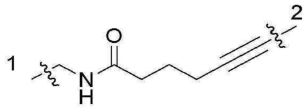
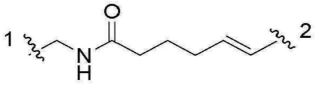
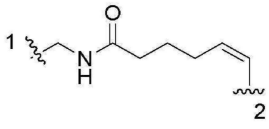
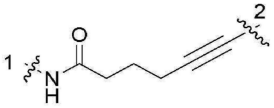
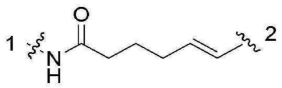
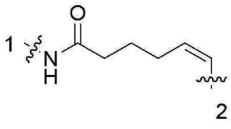
[0055] m_3은 0, 1, 2 또는 3이다.

[0056] 일부 바람직한 구현예에서, L_4는



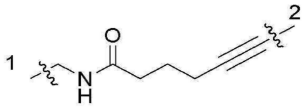
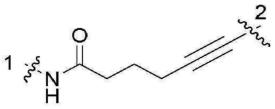









또는


으로부터 선택되고;

[0057] m_3은 1이다.

[0058] 일부 바람직한 구현예에서, L_4는 , , , ,  또는  으로부터 선택되고;

[0059] m_3은 1이다.

[0060] 일부 바람직한 구현예에서, L_4는  또는  이고;

[0061] m_3은 1이다.

[0062] 일부 바람직한 구현예에서, E는 하나 이상의 R_{12}로 선택적으로 치환된 5-10 원 헤테로아릴렌으로부터 선택되고; 여기서 R_{12}는 H(수소), D(중수소), 할로겐, CN, 니트로, C_{1-4} 알킬 또는 할로겐화 C_{1-4} 알킬로부터 독립적으로 선택된다.

[0063] 일부 바람직한 구현예에서, E는 하나 이상의 R_{12}로 선택적으로 치환된 하기의 기: 피리미딜렌, 퀴놀린렌 또는 피롤로 [2,3-d] 피리미딜렌으로부터 선택되고; 여기서 R_{12}는 H(수소), D(중수소), 할로겐, CN, 니트로, C_{1-2} 알킬 또는 할로겐화 C_{1-2} 알킬로부터 독립적으로 선택된다.

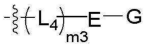
[0064] 일부 바람직한 구현예에서, E는 하나 이상의 R_{12}로 선택적으로 치환된 5-10 원 피리미딜로부터 선택되고; 여기서 R_{12}는 H(수소) 또는 D(중수소)로부터 독립적으로 선택된다.

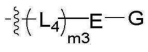
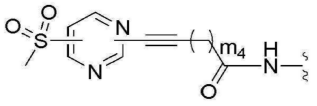
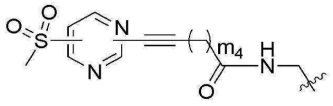
[0065] 일부 바람직한 구현예에서, G는 할로겐, OMs, OTs, OTf, 니트로, 또는 R_{13}으로 선택적으로 치환된 하기의 기: 알킬티오, 아릴티오, 헤테로아릴티오, 알킬 설피닐, 아릴 설피닐, 헤테로아릴 설피닐, 알킬 설포닐, 아릴 설포닐 또는 헤테로아릴 설포닐 중 하나 이상으로 선택되고; 여기서 R_{13}은 H(수소), D(중수소), 할로겐, CN, 니트로, C_{1-6} 알킬, 할로겐화 C_{1-6} 알킬, C_{1-6} 알콕시, 6-10 원 아릴 또는 5-12 원 헤테로아릴로부터 독립적으로 선택된다.

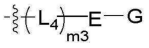
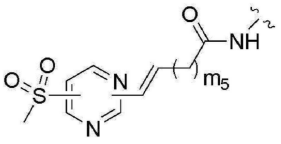
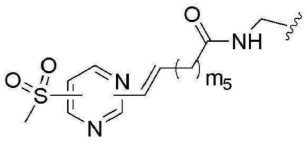
[0066] 일부 바람직한 구현예에서, G는 F, Cl, Br, I, OMs, OTs, OTf, 메틸설포닐, 에틸설포닐, p-톨루엔설포닐 또는 나프탈렌설포닐으로부터 선택된다.

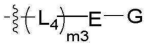
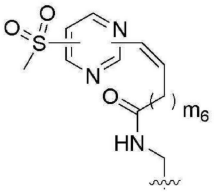
[0067] 일부 바람직한 구현예에서, G는 F, Cl, Br, OMs, OTs, 메틸설포닐 또는 p-톨루엔설포닐으로부터 선택된다.

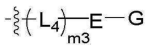
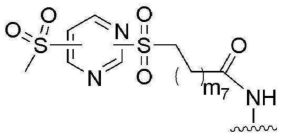
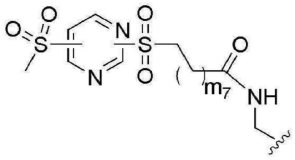
[0068] 일부 바람직한 구현예에서, G는 Cl 또는 메틸설포닐으로부터 선택된다.

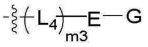
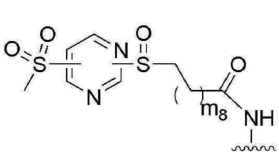
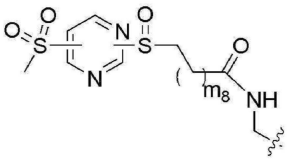
[0069] 일부 바람직한 구현예에서,  에서, G는 바람직하게는 메틸설포닐이며, E는 바람직하게는 피리미딜렌이고, m_3는 1이다.

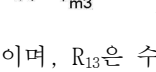
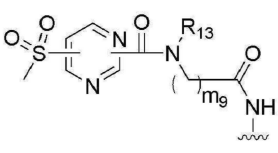
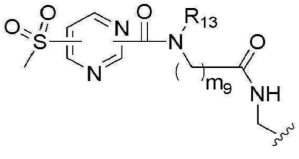
[0070] 일부 바람직한 구현예에서,  는  또는  이고, 여기서 m_4는 바람직하게는 0 내지 6의 정수이며, 메틸설포닐은 피리미딘 고리의 질소 원자에 인접한 탄소 원자상의 치환기이다.

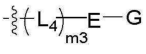
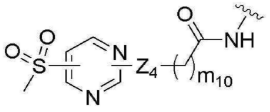
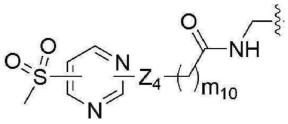
[0071] 일부 바람직한 구현예에서,  는  또는  이고, 여기서 m_5는 바람직하게는 0 내지 6의 정수이며, 메틸설포닐은 피리미딘 고리의 질소 원자에 인접한 탄소 원자상의 치환기이다.

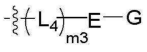
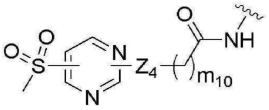
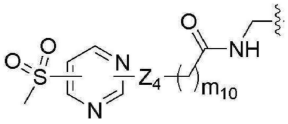
[0072] 일부 바람직한 구현예에서,  는  또는  이고, 여기서 m_6은 바람직하게는 0 내지 6의 정수이며, 메틸설포닐은 피리미딘 고리의 질소 원자에 인접한 탄소 원자상의 치환기이다.

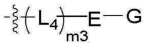
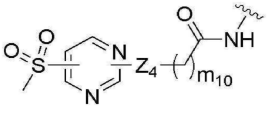
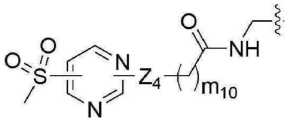
[0073] 일부 바람직한 구현예에서,  는  또는  이고, 여기서 m_7은 바람직하게는 0 내지 5의 정수이며, 메틸설포닐은 피리미딘 고리의 질소 원자에 인접한 탄소 원자상의 치환기이다.

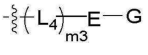
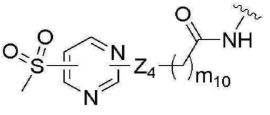
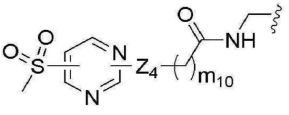
[0074] 일부 바람직한 구현예에서,  는  또는  이고, 여기서 m_8은 1 내지 5의 정수이며, 메틸설포닐은 피리미딘 고리의 질소 원자에 인접한 탄소 원자상의 치환기이다.

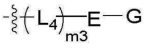
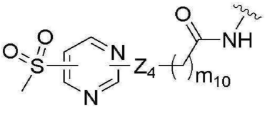
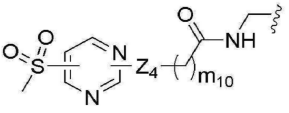
[0075] 일부 바람직한 구현예에서,  는  또는  이고, 여기서 m_9는 1 내지 5의 정수이며, R_{13}은 수소 또는 C_{1-6} 알킬로부터 선택되고, 메틸설포닐은 피리미딘 고리의 질소 원자에 인접한 탄소 원자상의 치환기이다.

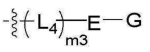
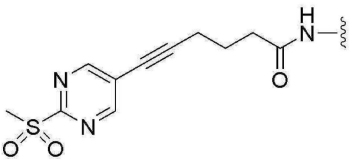
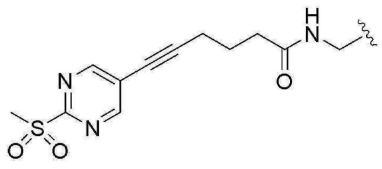
[0076] 일부 바람직한 구현예에서,  는  또는  이고, 여기서 m_{10}은 내지 6의 정수이며, Z_4은 피리딜렌, 피리미딜렌, 피라졸릴렌, 티아졸릴렌, 옥사졸릴렌 또는 트리아졸릴렌으로부터 선택되고; 메틸설포닐은 피리미딘 고리의 질소 원자에 인접한 탄소 원자상의 치환기이고; 더 바람직하게는, m_{10}은 0-6의 정수이다.

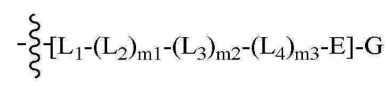
[0077] 일부 바람직한 구현예에서,  는  또는  이고, Z_4는 피리딜렌, 피리미딜렌, 피라졸릴렌 또는 트리아졸릴렌으로부터 선택된다. 더 바람직하게는, m_{10}은 0-6의 정수이다.

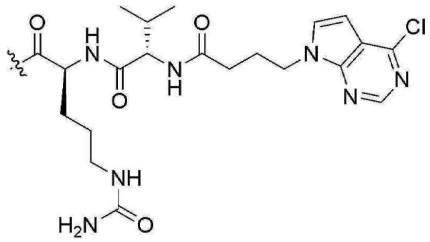
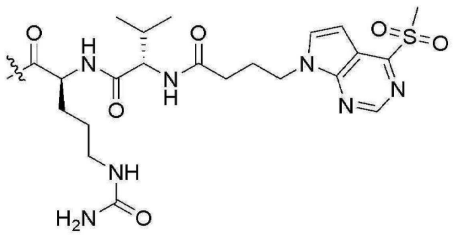
[0078] 일부 바람직한 구현예에서,  는  또는  이고, Z_4는 옥사졸릴렌 또는 티아졸릴렌으로부터 선택되며, 메틸설포닐피리미딘 고리의 질소 원자에 인접한 탄소 원자상의 치환기이다. 더 바람직하게는, m_{10}은 0-6의 정수이다.

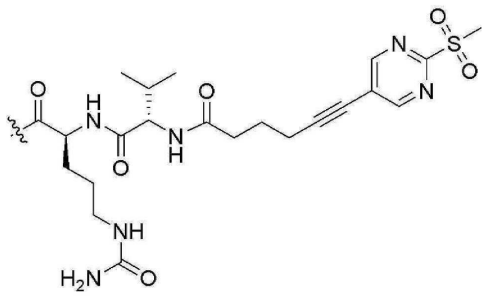
[0079] 일부 바람직한 구현예에서,  는  또는  이고, 여기서 m_{10}은 0-6의 정수이며, Z_4는 6-10 원 아릴렌으로부터 선택되고; 메틸설포닐은 질소 원자에 인접한 탄소 원자상의 치환기이다. 더 바람직하게는, m_{10}은 0-6의 정수이다.

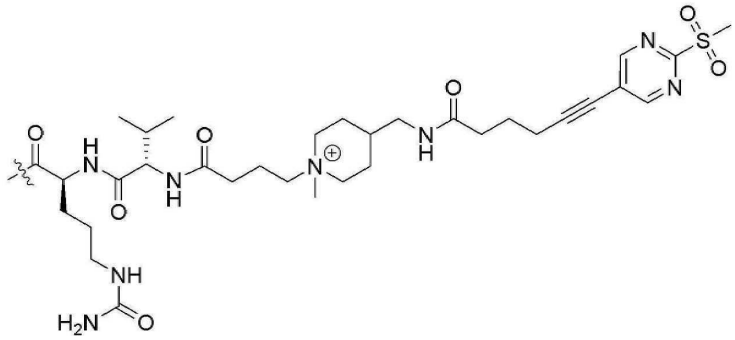
[0080] 일부 바람직한 구현예에서,  는  또는  이고, 여기서 m_{10}은 0-6의 정수이며, Z_4는 벤젠 고리이다.

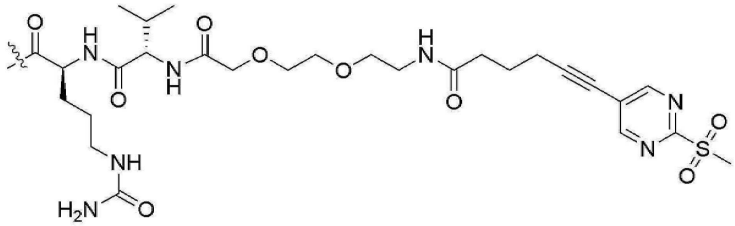
[0081] 일부 바람직한 구현예에서,  는  또는  이다.

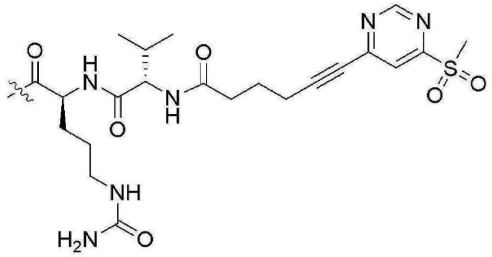
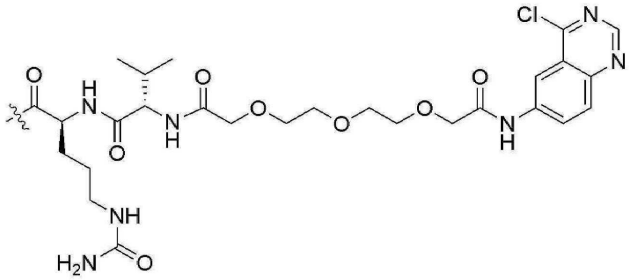
[0082] 일부 바람직한 구현예에서, 식 (I)의  은 하기의 단편:

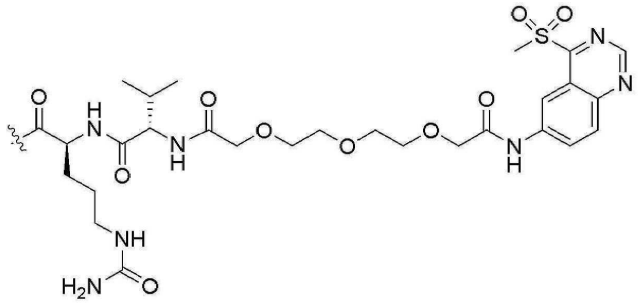
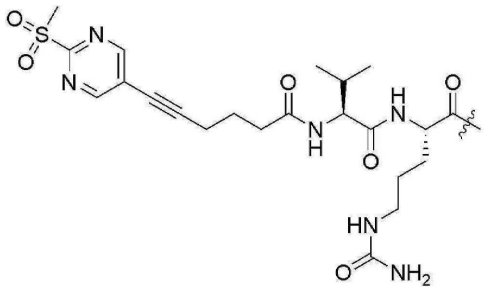
[0083] , ,

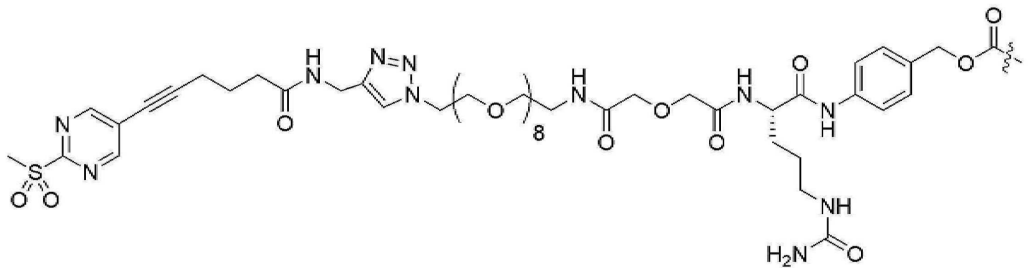
,

,

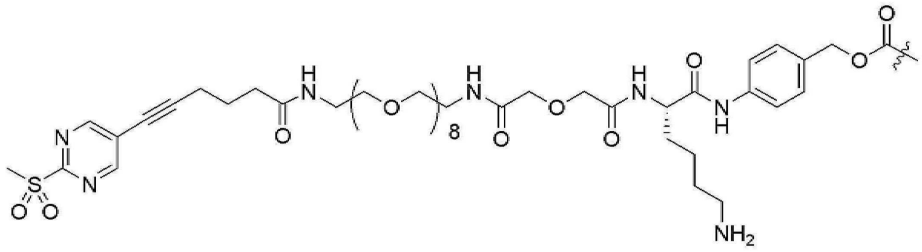
,

, ,

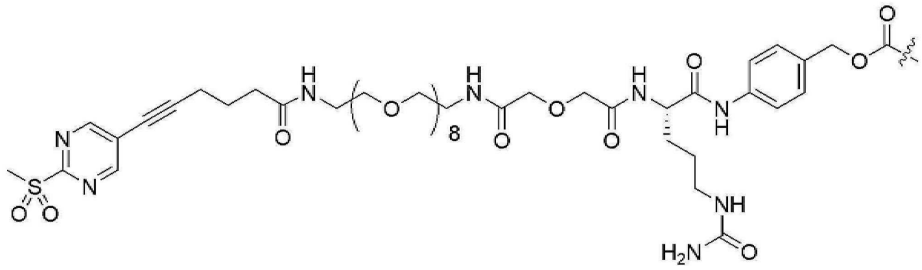
, ,



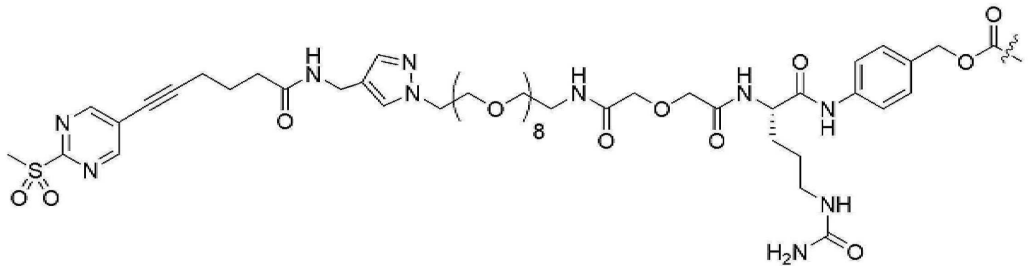
,



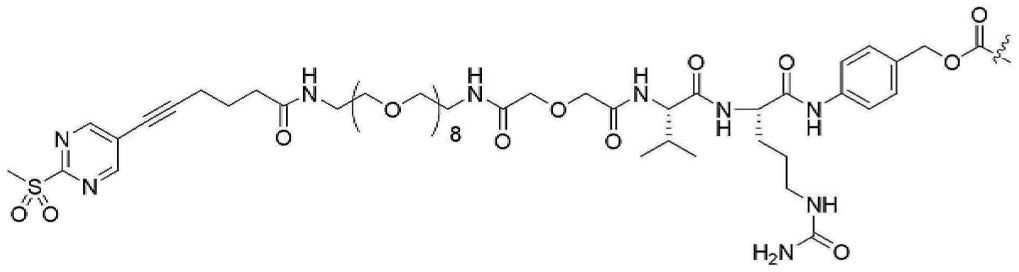
,



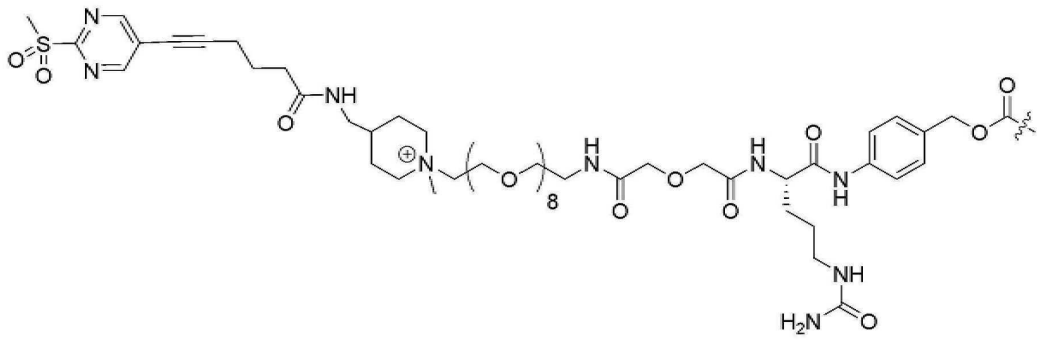
,



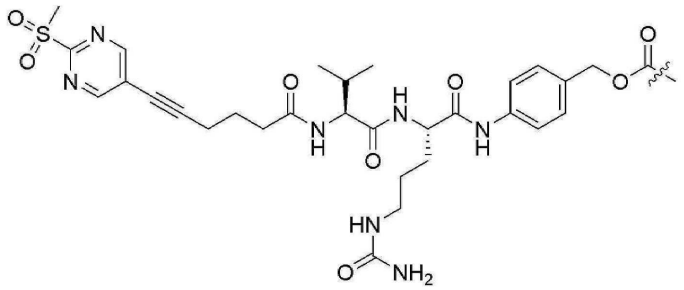
,

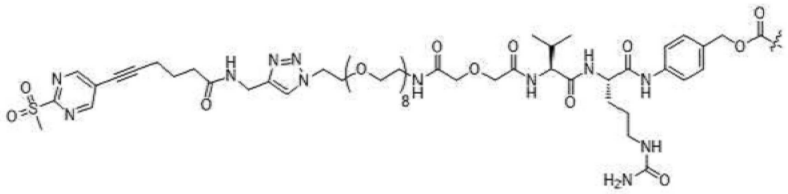


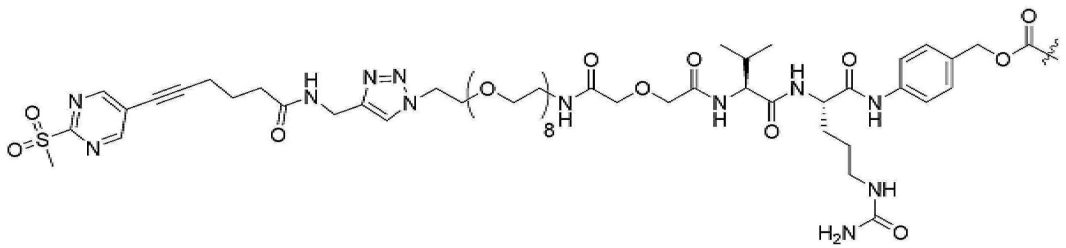
,

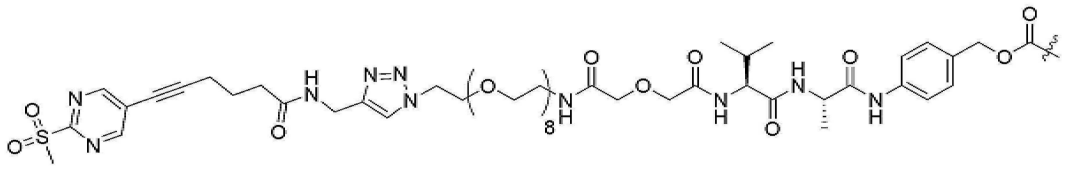


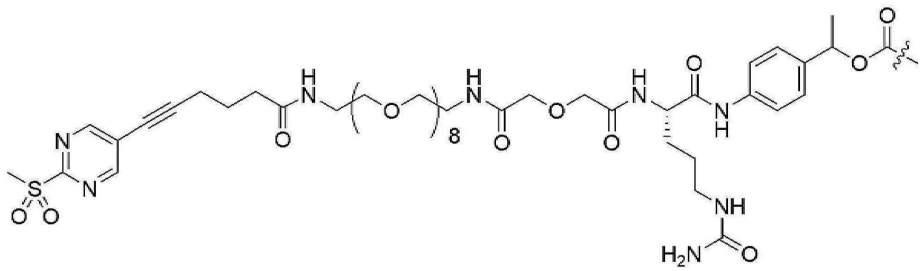
,

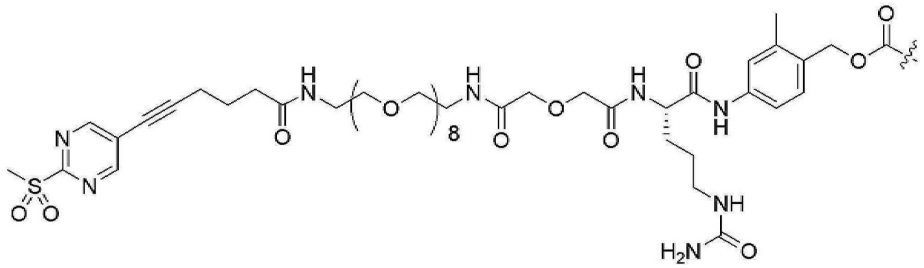


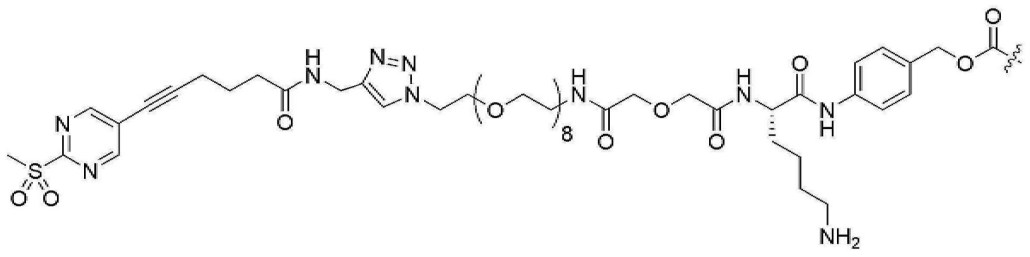


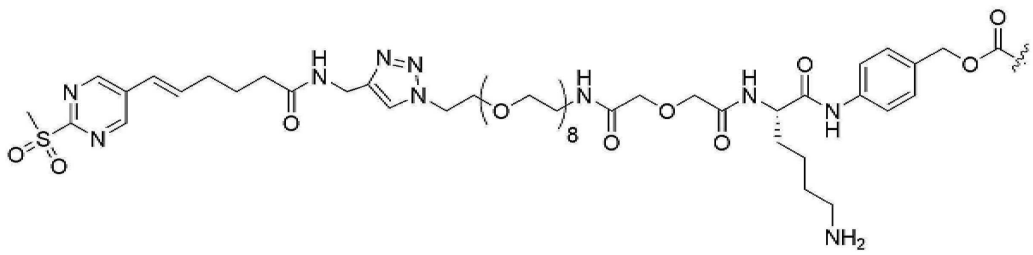




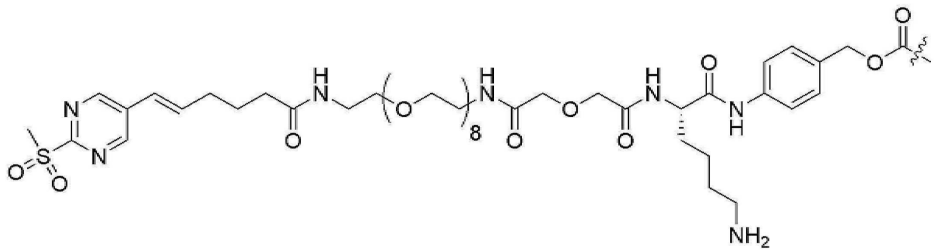




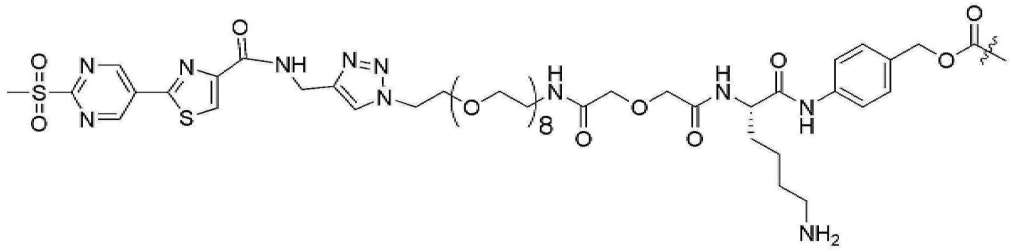




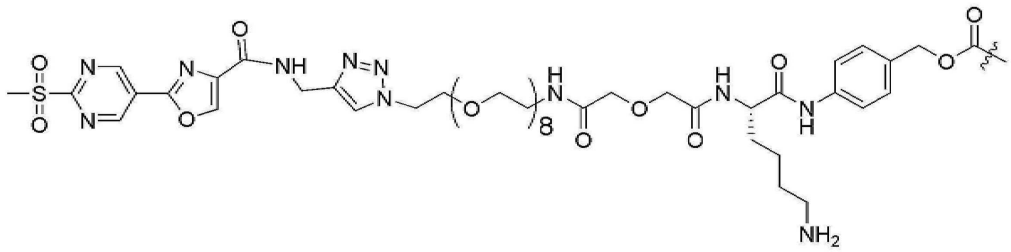
,



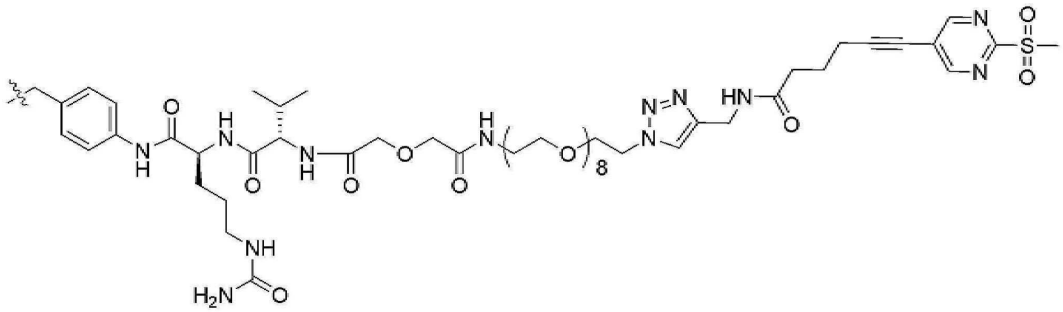
,



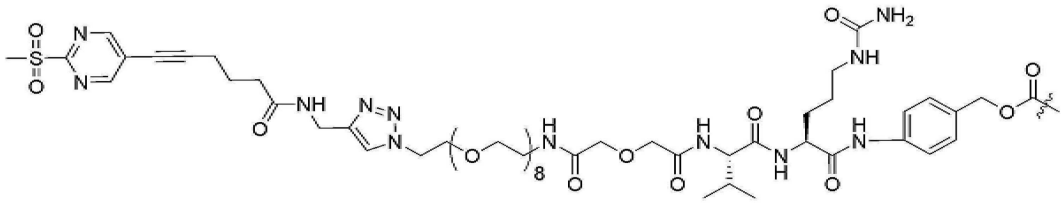
,



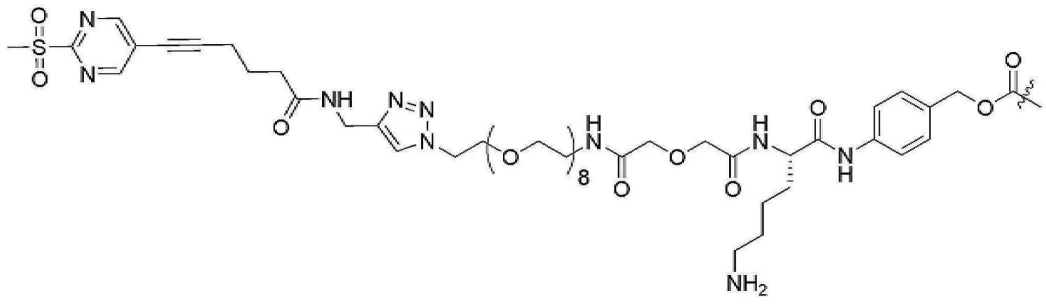
,



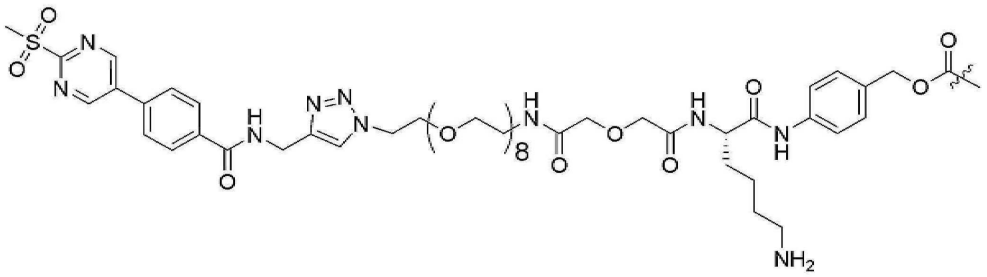
,

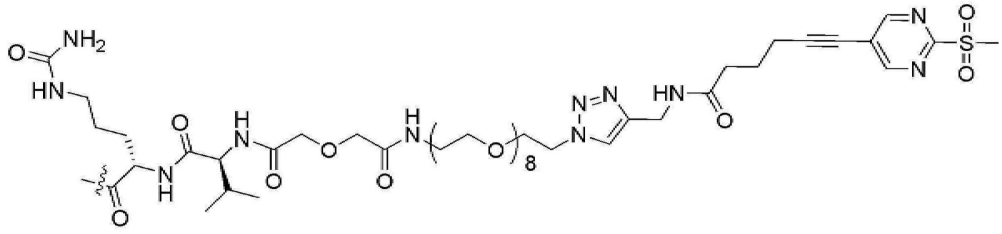


,



,

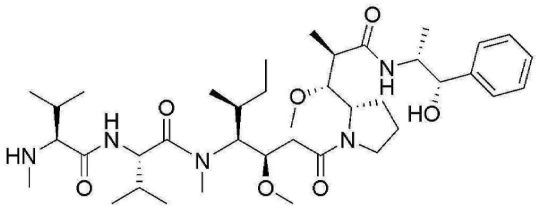
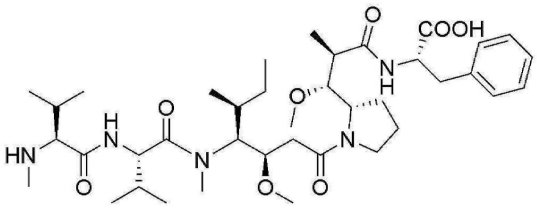


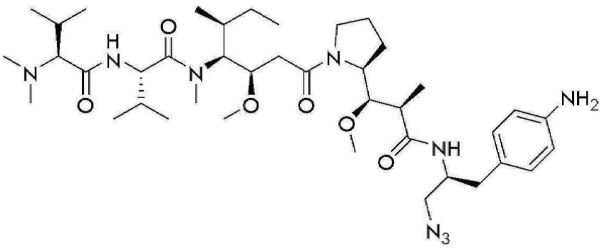
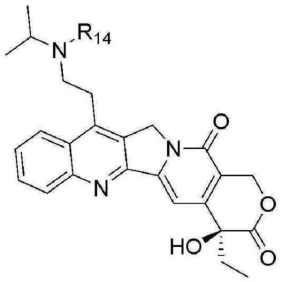
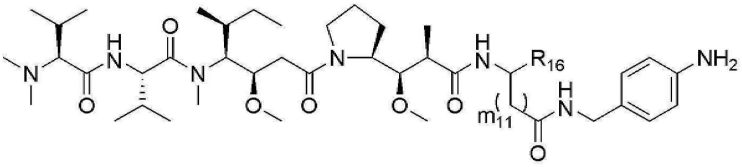


[0084] 또는 으로부터 선택된다.

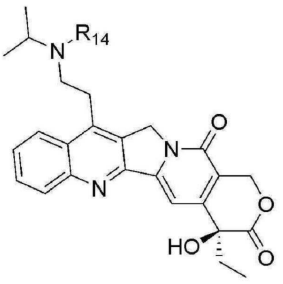
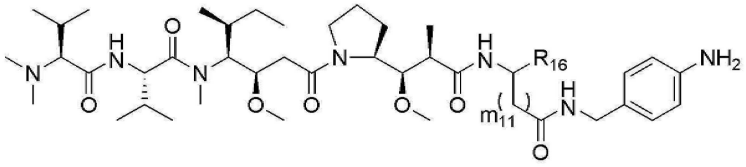
[0085] 일부 바람직한 구현예에서, T는 생체활성 분자의 단편이다. 일부 바람직한 구현예에서, 상기 생체활성 분자는 백금 금속 착물(예: 옥살리플라틴) 또는 금 금속 착물과 같은 금속 착물(complex); 블레오마이신(bleomycin) 또는 핑양마이신(pingyangmycin)과 같은 글리코펩티드 항생물질; 국소이성질화 효소 I 억제제(예: 캠프토테신(camptothecin), 히드록시캠프토테신, 9-아미노캠프토테신, SN-38, 이리노테칸(irinotecan), 토포테칸(topotecan), 벨로테칸(belotecan) 또는 루비테칸(rubitecan)) 또는 국소이성질화 효소 II 억제제(예: 악티노마이신(actinomycin D), 독소루비신(doxorubicin), 듀오카르마이신(duocarmycin), 다우노루비신(daunorubicin), 미톡산트론(mitoxantrone), 포도필로톡신(podophyllotoxin) 또는 에토포시드(etoposide))와 같이, DNA 국소이성질화 효소 억제제; 메토트렉세이트(methotrexate), 5-플루오로우라실(5-fluorouracil), 사이타라빈(cytarabine), 젬시타빈(gemcitabine), 메르캅토퓨린(mercaptopurine), 펜토스타틴(pentostatin), 플루다라빈(fludarabine), 클라드리빈(cladribine) 또는 넬라라빈(nelarabine)과 같이, DNA 합성을 방해하는 약물; 튜불린 억제제, 빈블라스틴 알칼로이드(vinblastine alkaloid), 빈크리스틴(vincristine), 빈블라스틴(vinblastine), 파클리탁셀(paclitaxel), 도세탁셀(docetaxel) 또는 카바지탁셀(cabazitaxel)과 같이, 구조 단백질에 작용하는 약물; 세린/트레오닌 키나아제 억제제, 티로신 키나아제 억제제, 아스파르토키나아제 억제제 또는 히스티딘 키나아제 억제제와 같이, 종양 세포 신호전달 경로 억제제(tumor cell signaling pathway inhibitor); 프로테아좀 억제제; 히스톤탈아세틸화효소 억제제(histone deaceylase inhibitor); 종양 혈관 생성(tumorgiogenesis); 사이클린 억제제; 메이탄신 유도체(maytansine derivative); 칼리키아마이신 유도체(calicheamicin derivative); 아우리스타틴 유도체(auristatin derivative); 피롤로벤조디아제핀 이합체(Pyrrolobenzodiazepine dimers, (PBD)) 유도체; 멜팔란(melphalan); 미토마이신 C(mitomycin C); 클로람부실(chlorambucil); 및 종양 세포의 성장을 억제하고, 종양 세포의 아팝토시스 또는 괴사를 촉진하는 다른 활성 물질로부터 선택된다.

[0086] 일부 바람직한 구현예에서, 상기 생체활성 분자는

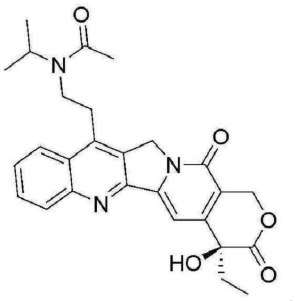
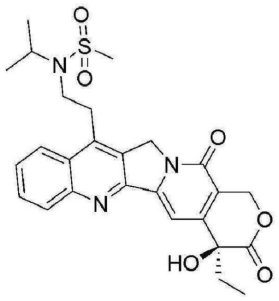
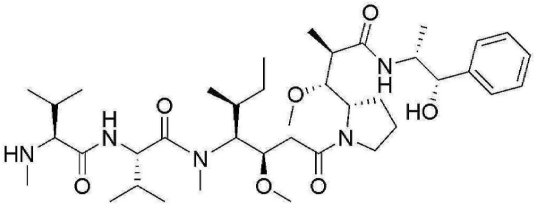
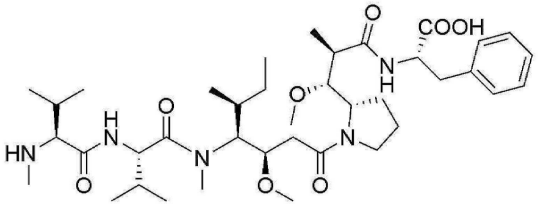
[0087] , ,

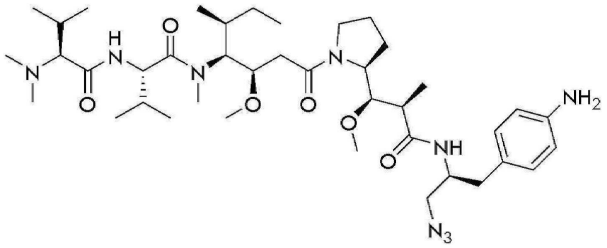

,

또는

으로부터 선택되고, 여기서 R_{14}는 아실 또는 설포닐로부터 선택되며, 이는 R_{15}로 치환되고, R_{15}는 C_{1-6} 알킬, 할로겐화 C_{1-6} 알킬, 6-10 원 아릴 또는 5-12 원 헤테로아릴으로부터 선택되며; R_{16}은 H(수소), D(중수소), C_{1-6} 알킬 또는 R_{17}로 치환된 C_{1-6} 알킬로부터 선택되고, R_{17}은 페닐 및 피리딜을 포함하지만 이에 제한되지 않은, 아릴 또는 헤테로아릴로부터 선택되며, m_{11}은 0, 1 또는 2이다.

[0088] 일부 바람직한 구현예에서, 상기 생체활성 분자는

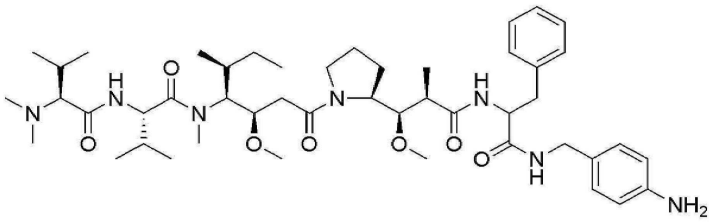

,
또는


[0089] 으로부터 선택되며, 여기서 R_{14}는 아실 또는 설포닐로부터 선택되는데, 이는 R_{15}로 치환되며, R_{15}은 C_{1-6} 알킬, 할로겐화 C_{1-6} 알킬, 6-10 원 아릴 또는 5-12 원 헤테로아릴로부터 선택되고; R_{16}은 H(수소), D(중수소), C_{1-6} 알킬, R_{17}로 치환된 C_{1-6} 알킬로부터 선택되며, R_{17}은 아릴 또는 헤테로아릴로부터 선택되는데, 페닐 또는 피리딜을 포함하지만 이에 제한되는 것은 아니며, m_{11}은 0, 1, 또는 2이다.

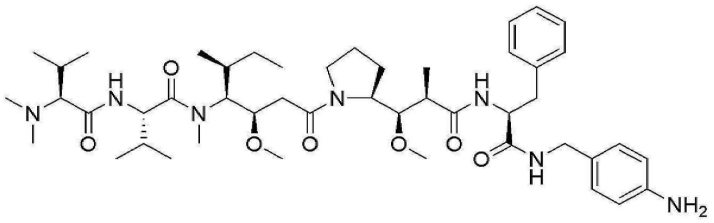
[0090] 일부 바람직한 구현예에서, 상기 생체활성 분자는

,

,

,

,



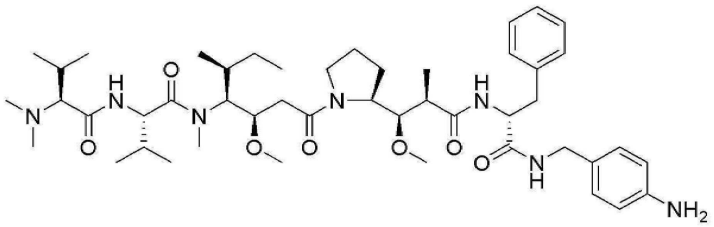
,



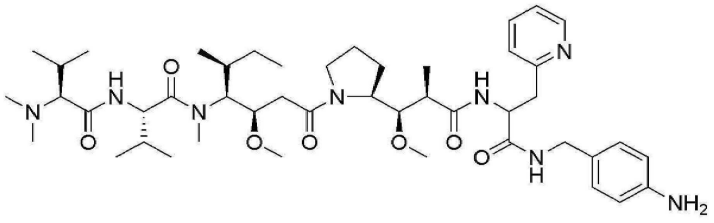
,



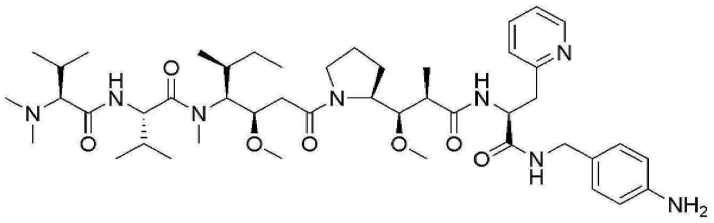
,



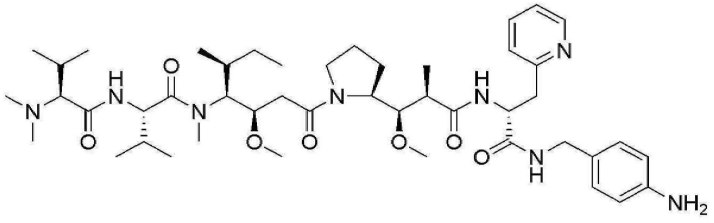
,



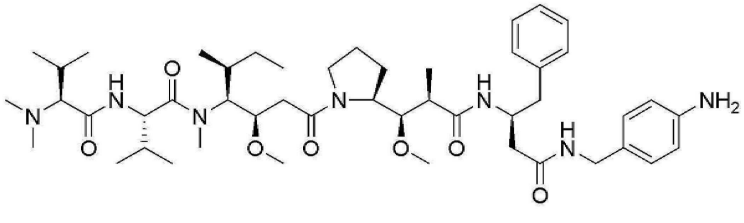
,



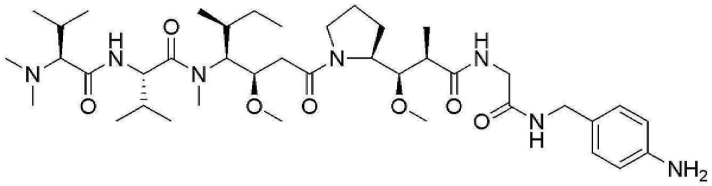
,

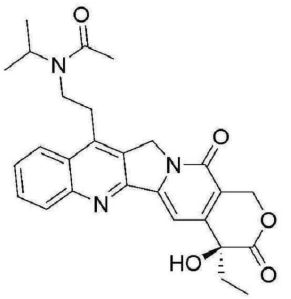
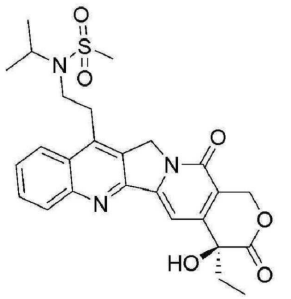


,

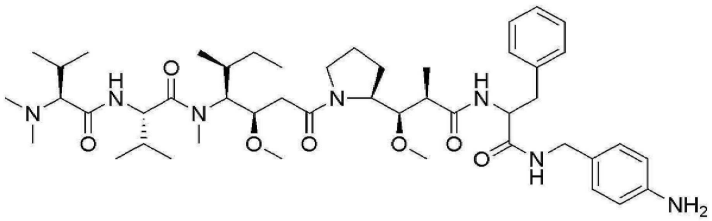


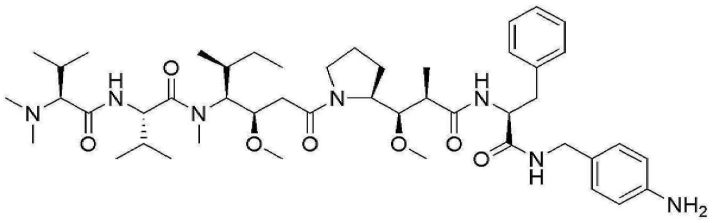
또는

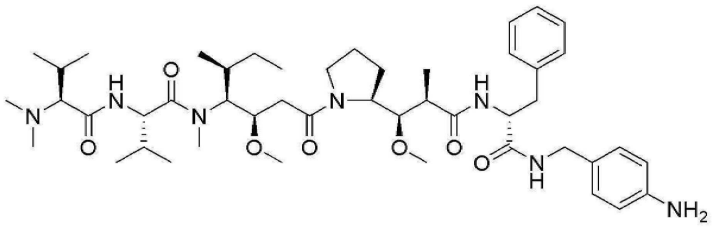

으로부터 선택된다.

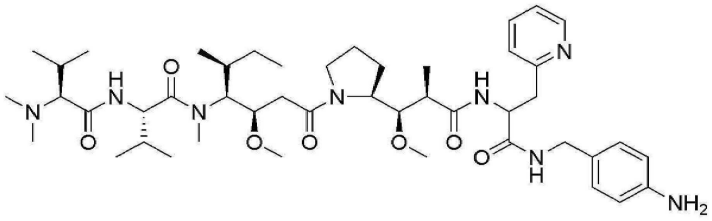

,

,

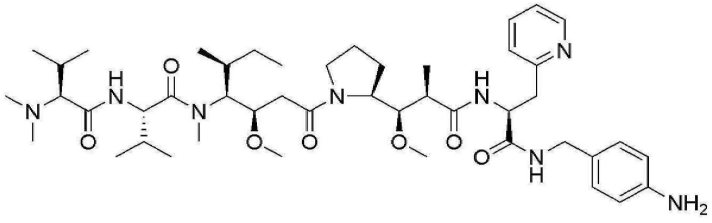
[0091] 일부 바람직한 구현예에서, 상기 생체활성 분자는

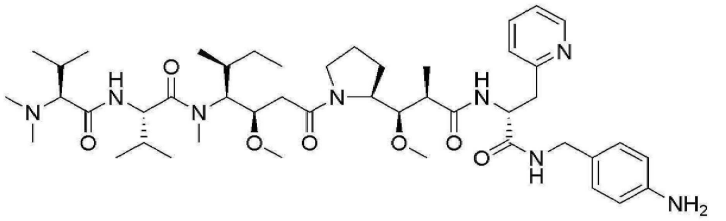

,

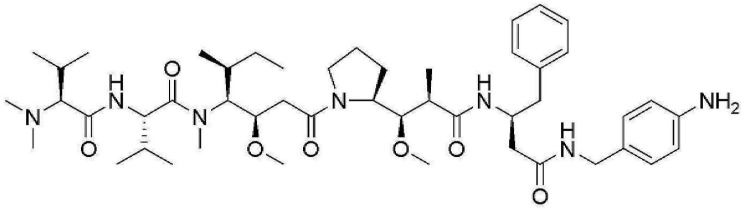

,


,

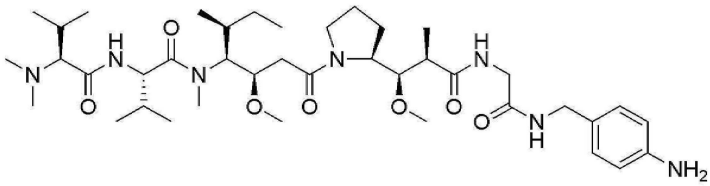

,


,

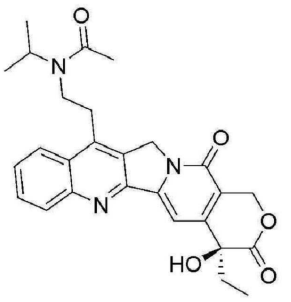

,

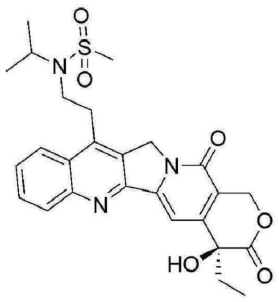


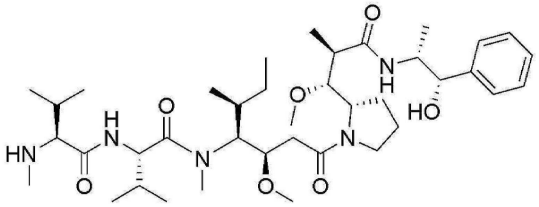
또는

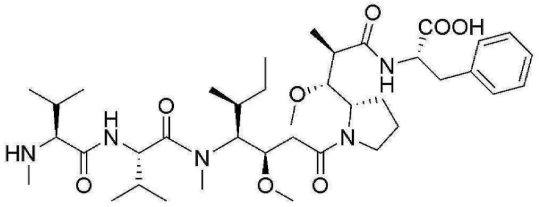

으로부터 선택된다.

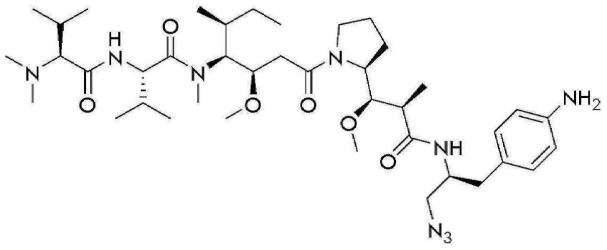
[0092] 일부 바람직한 구현예에서, 상기 생체활성 분자는


,

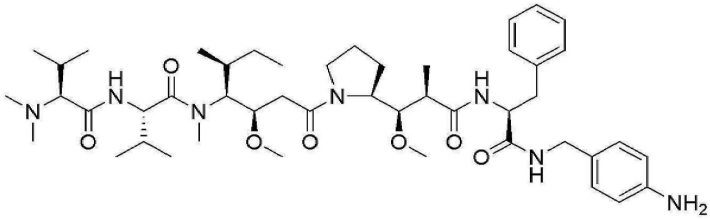

,


,


,

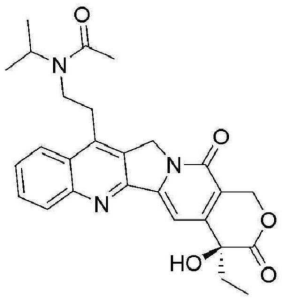
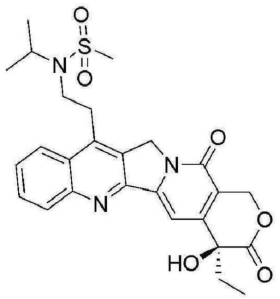
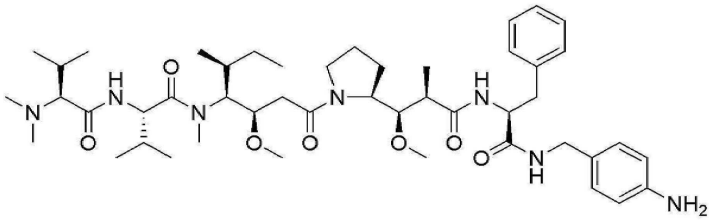


또는

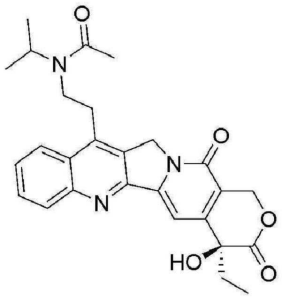
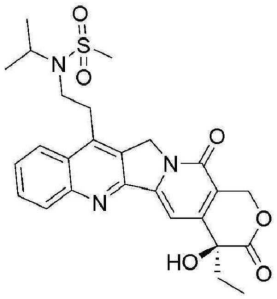


[0093] 으로부터 선택된다.

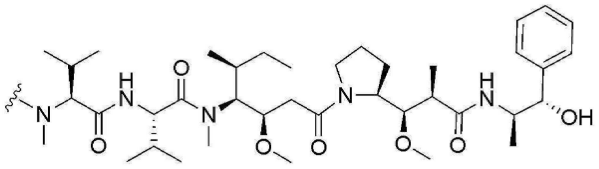
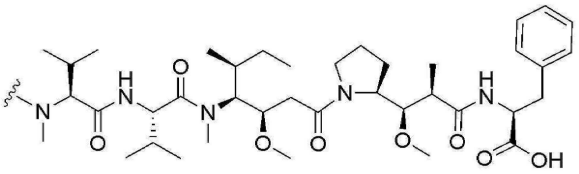
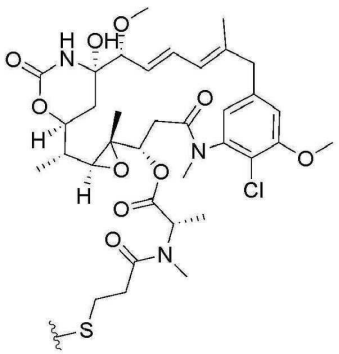
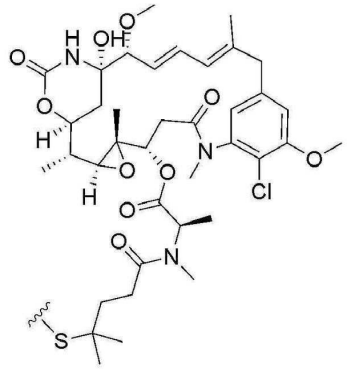
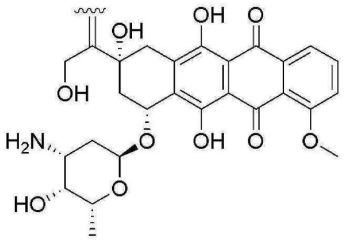
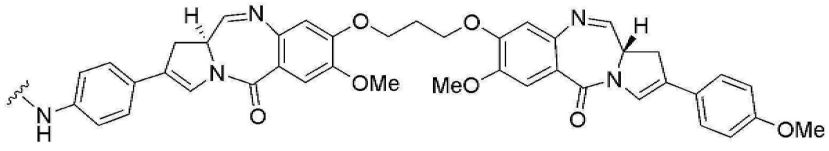
[0094] 일부 바람직한 구현예에서, 상기 생체활성 분자는

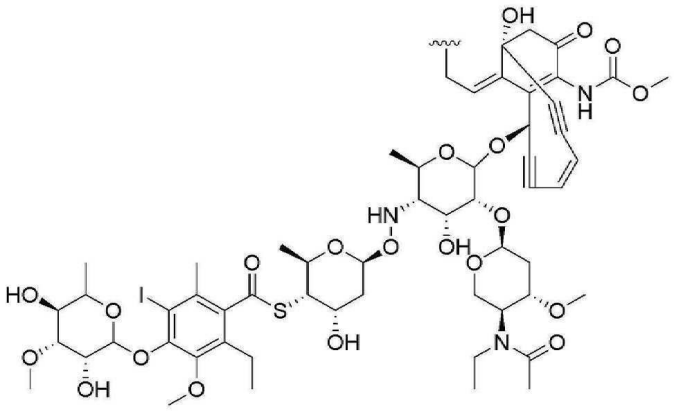
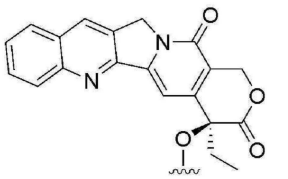
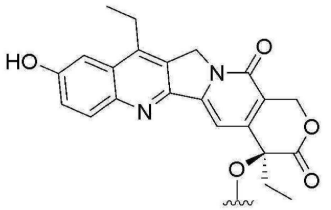
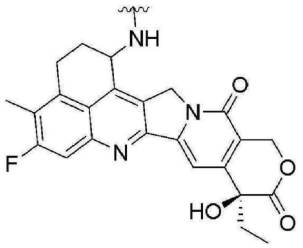
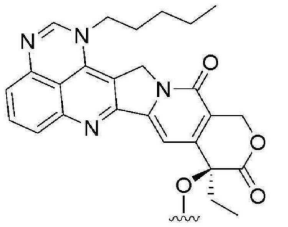
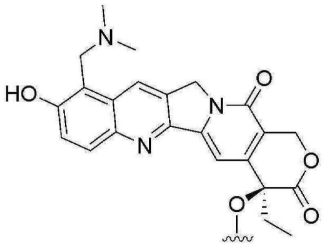
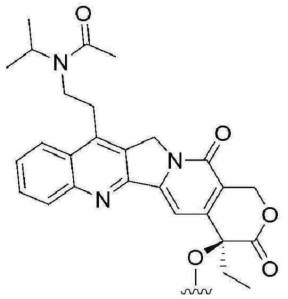
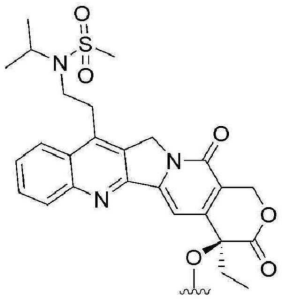
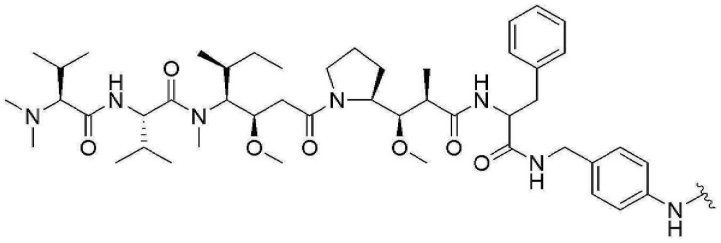
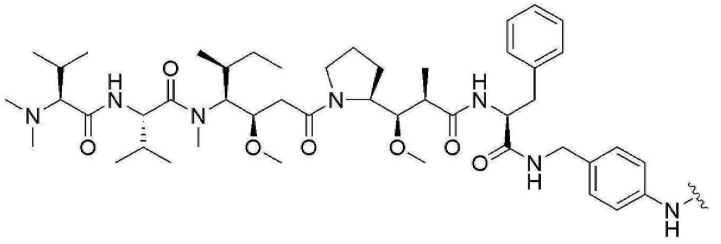
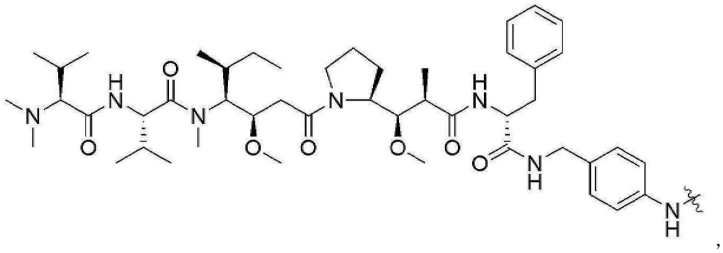
[0095]  ,  또는  으로부터 선택된다.

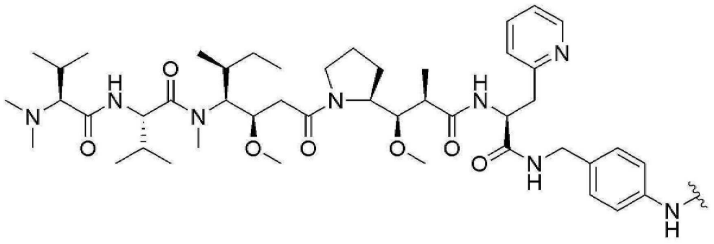
[0096] 일부 바람직한 구현예에서, 상기 생체활성 분자는

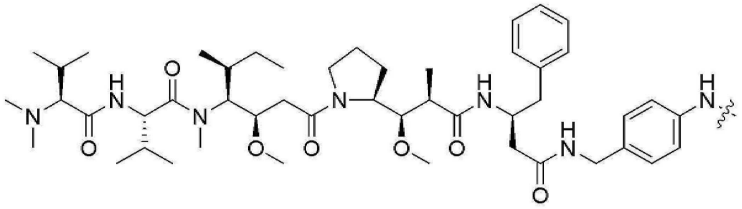
[0097]  또는  으로부터 선택된다.

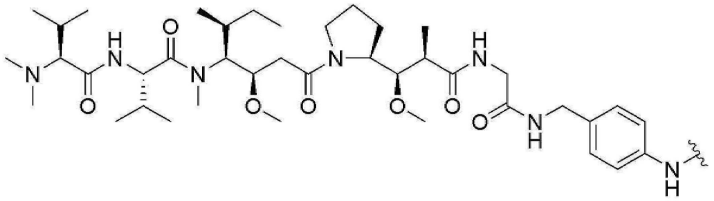
[0098] 일부 바람직한 구현예에서, T는

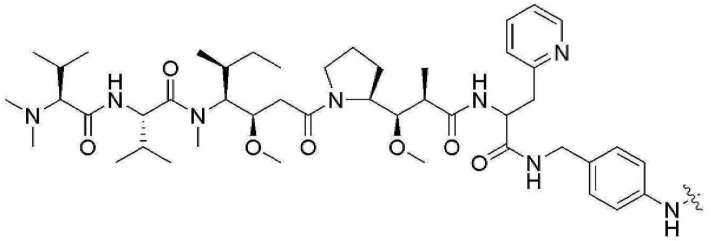
[0099]  ,  ,  ,  ,  ,  ,

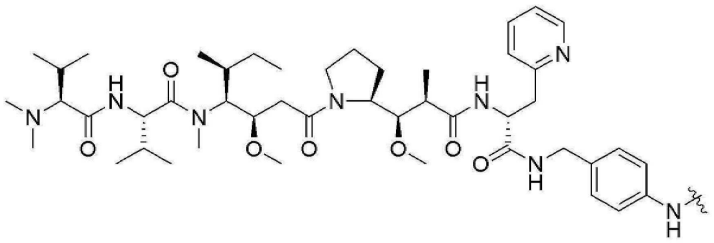

,

,

,

,

,

,

,

,

,

,

,

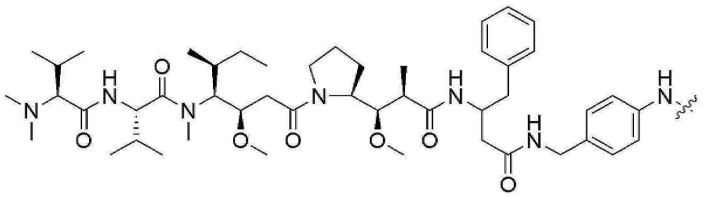

,

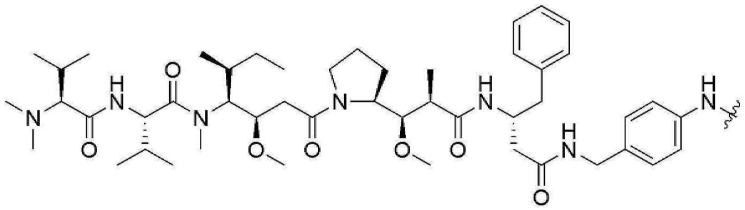

,

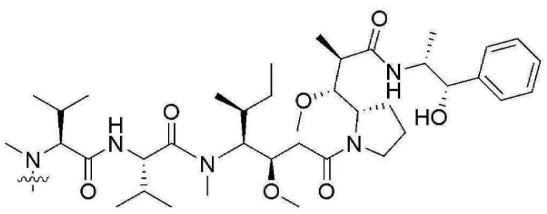

,

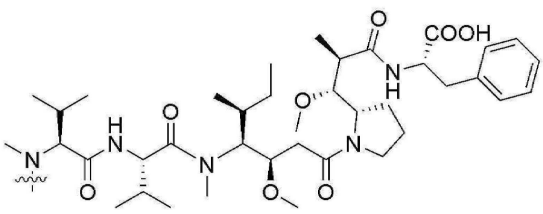

,

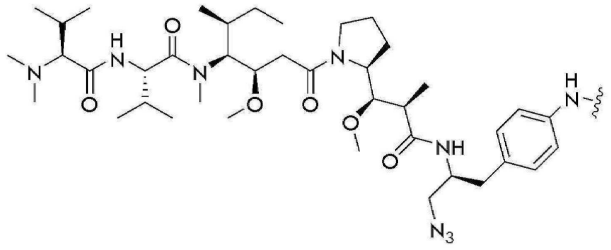

,


,


,

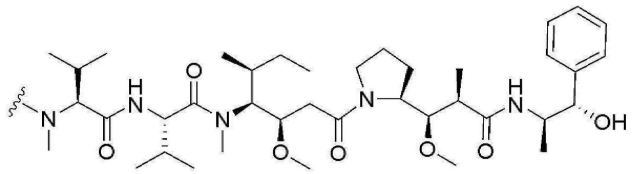

,

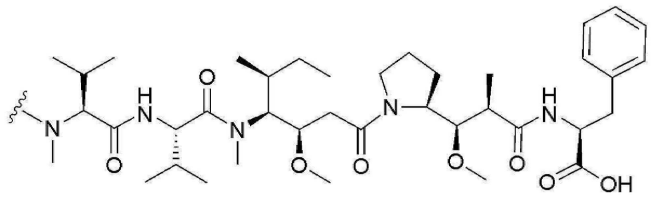
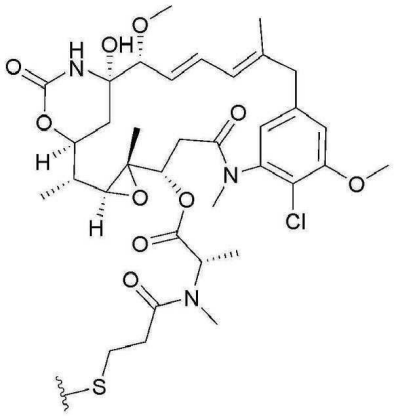

또는

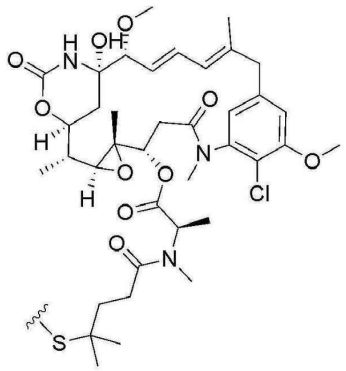
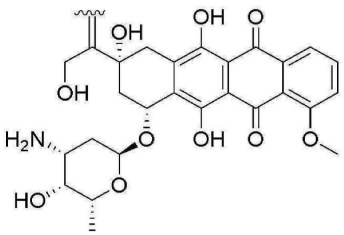


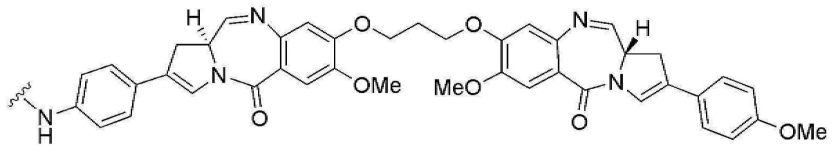
으로부터 선택된다.

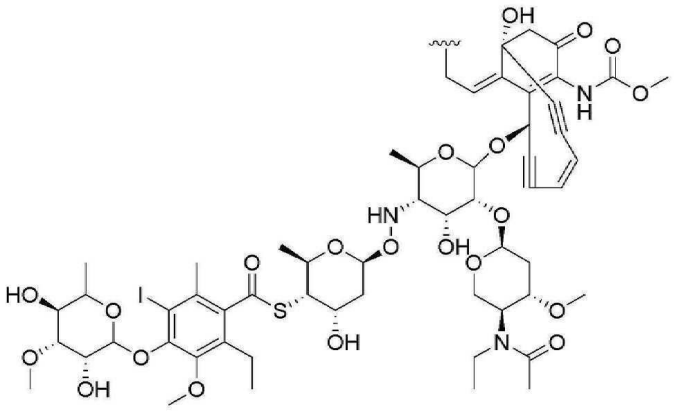
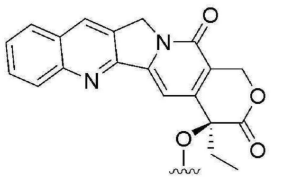
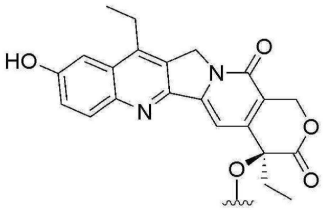
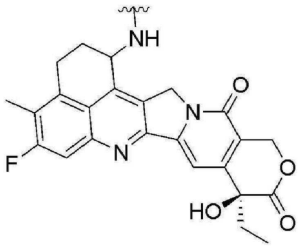
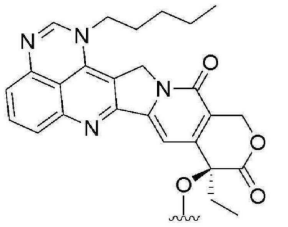
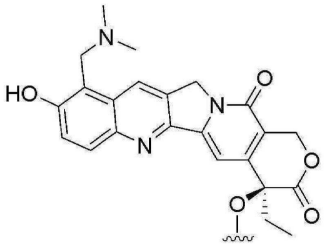
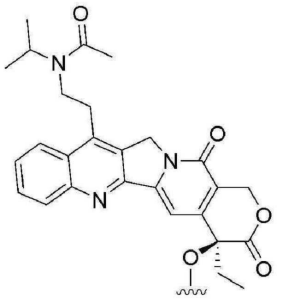
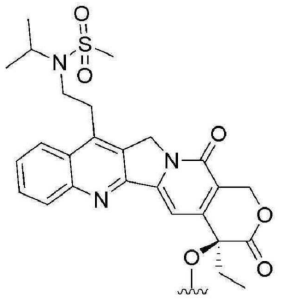
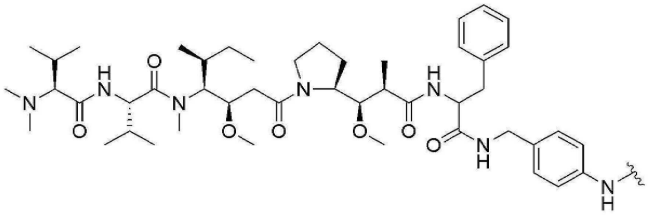
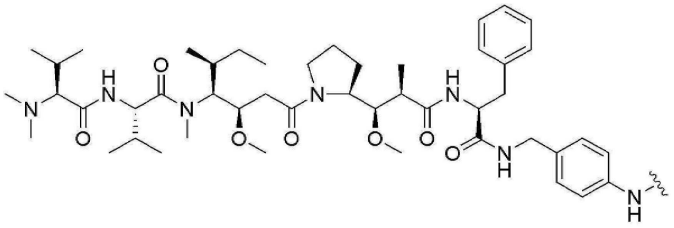
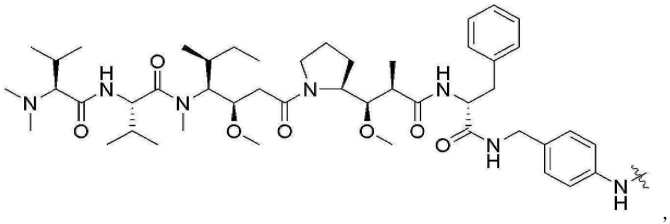
[0100] 일부 바람직한 구현예에서, T는

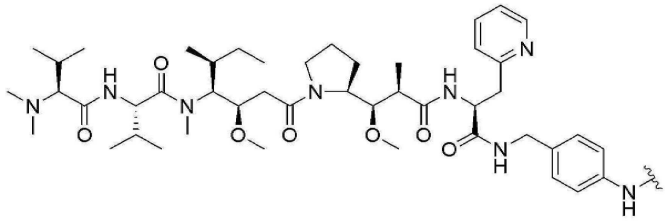
[0101] ,

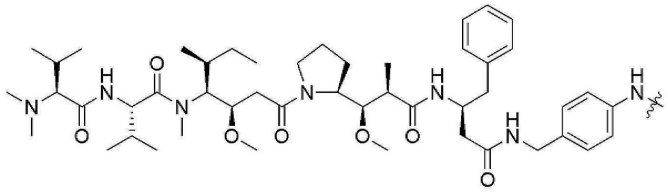
, ,

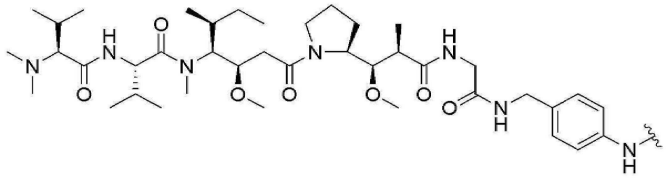
, ,

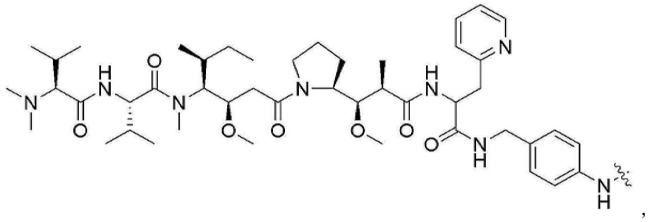
,

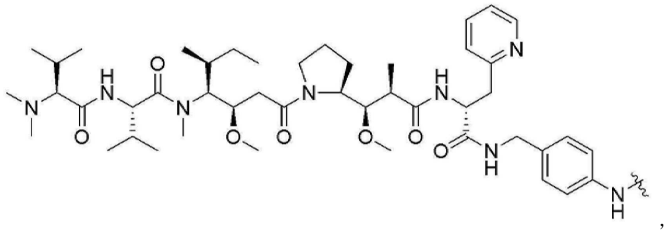

,

,

,

,

,

,

,

,

,

,

,

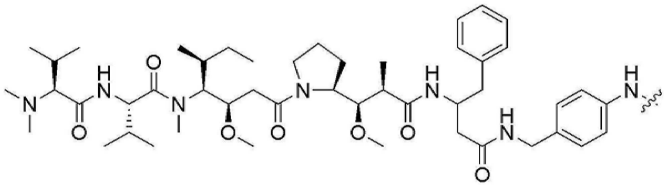

,

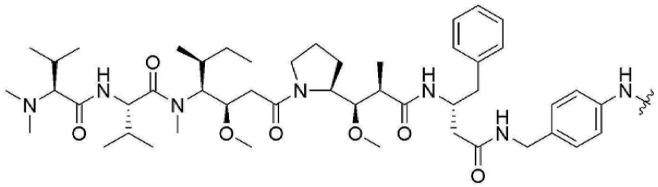

,


,

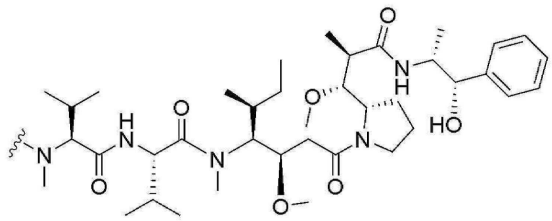

,

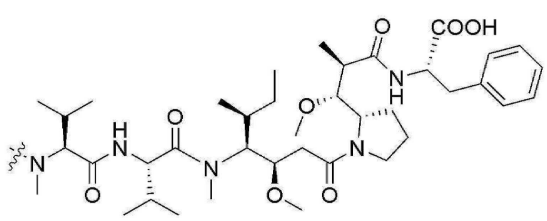

,


또는

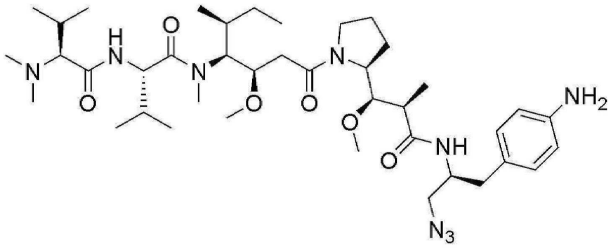

으로부터 선택된다.

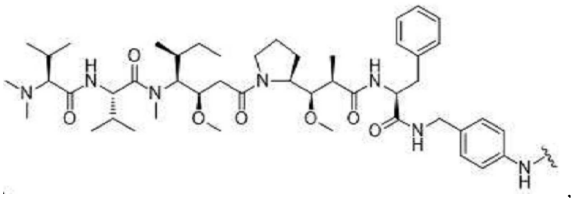
[0102] 일부 바람직한 구현예에서, T는

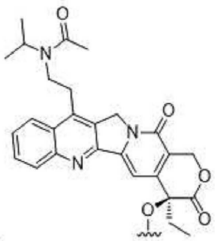
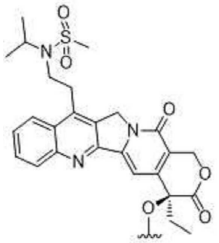
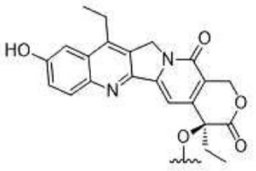

,


,

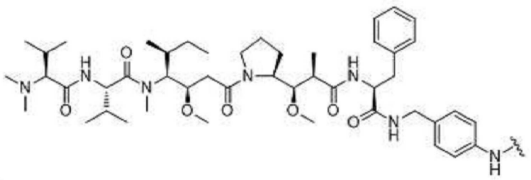
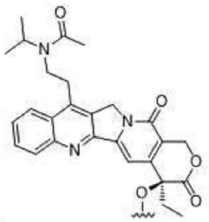
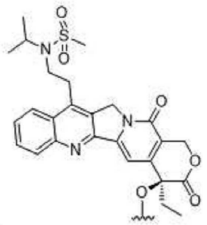
[0103]

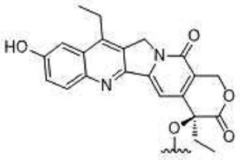

,

[0104] 
,

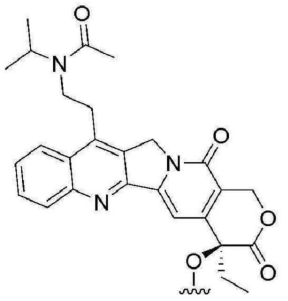
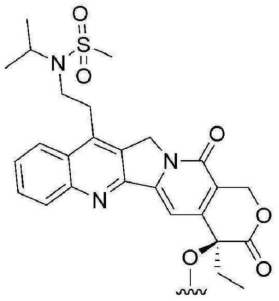
[0105] 
, 
또는 
으로부터 선택된다.

[0106] 일부 바람직한 구현예에서, T는

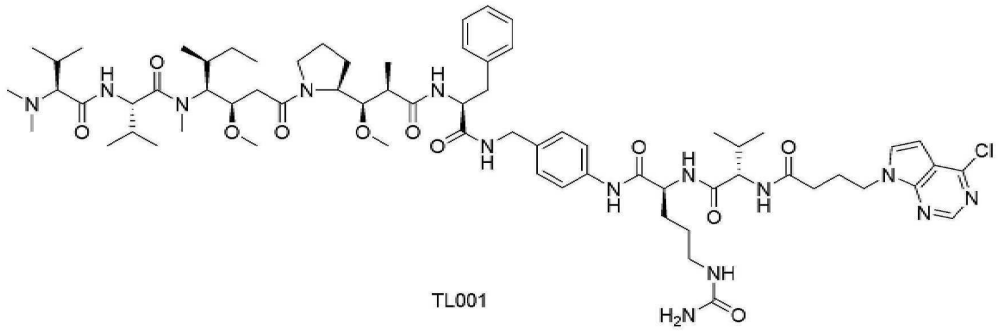
[0107] 
, 
, 
또는

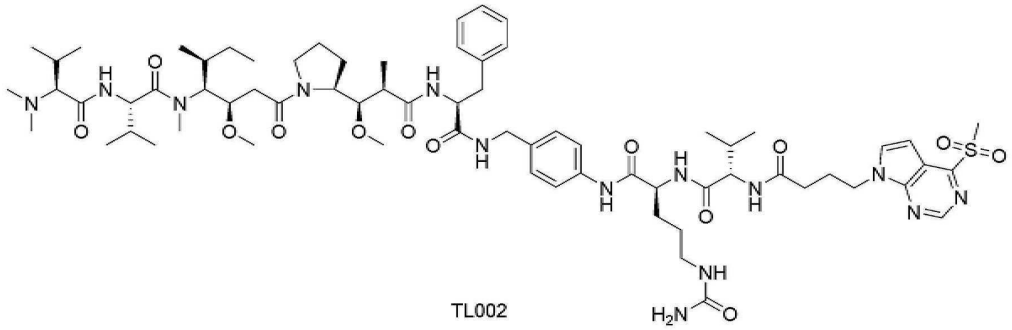

으로부터 선택된다.

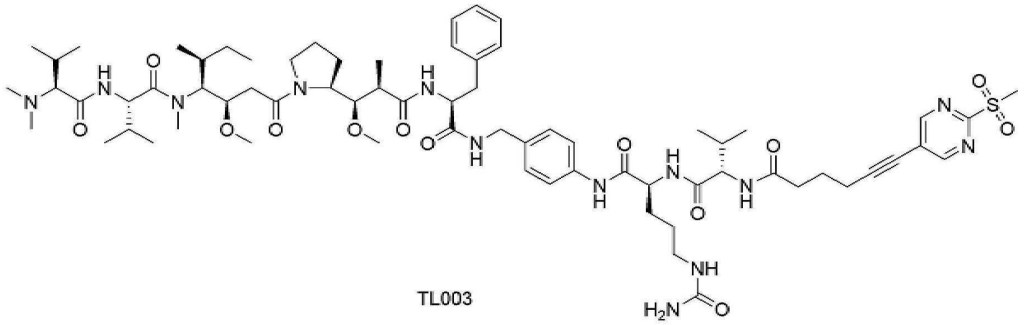
[0108] 일부 바람직한 구현예에서, T는

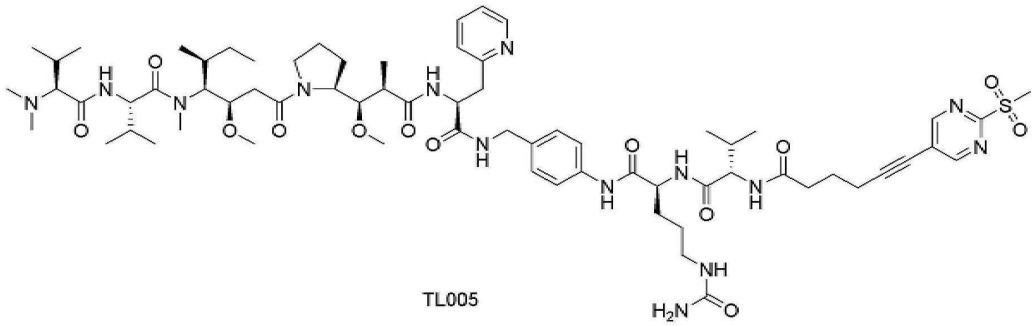
[0109] 
또는 
으로부터 선택된다.

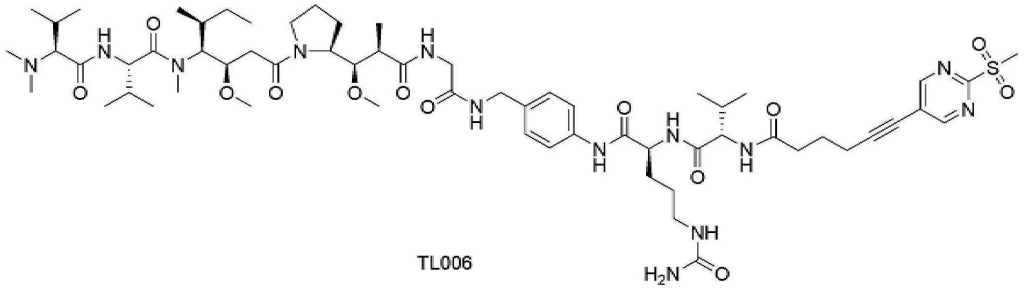
[0110] 일부 바람직한 구현예에서, 식 (I)로 나타낸 화합물은 하기로부터 선택된다.

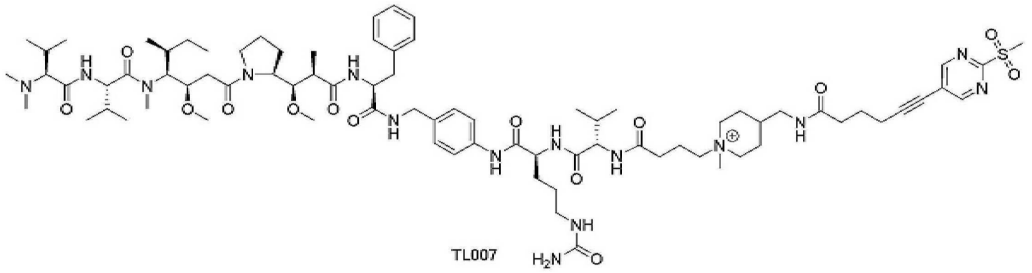
[0111] 
TL001 ,

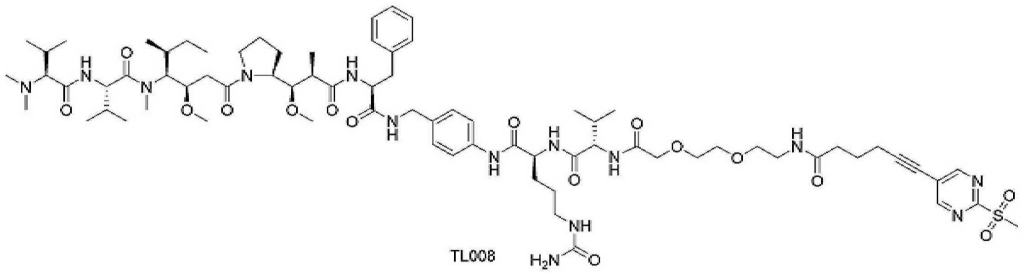
[0112] 
TL002 ,

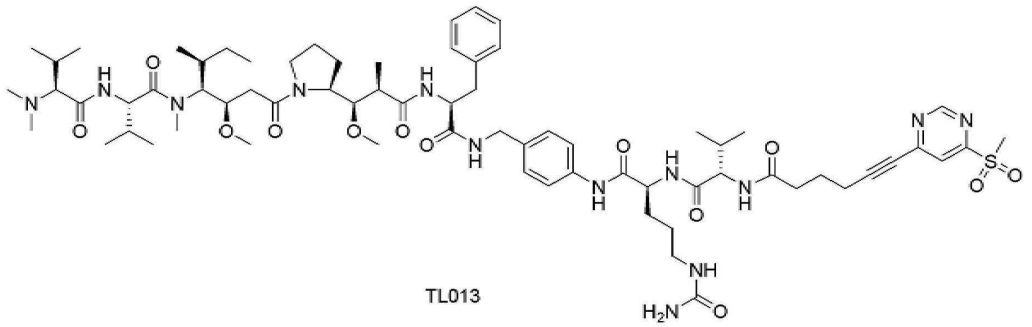
[0113] 
TL003 ,

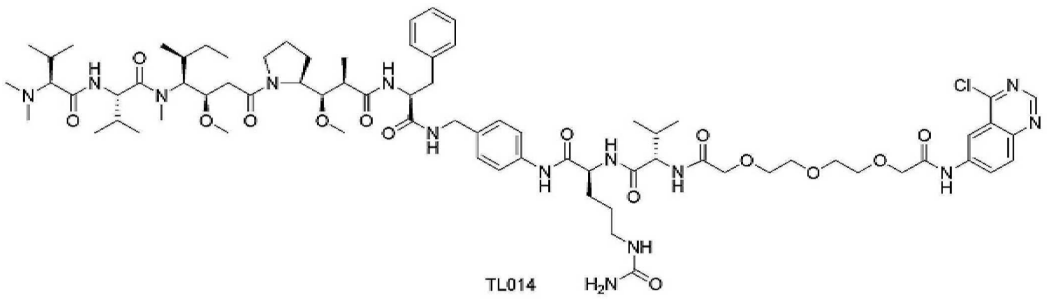
[0114] 
TL005 ,

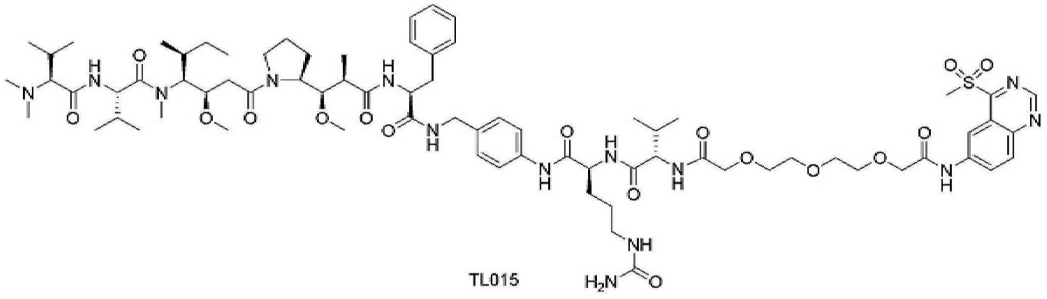
[0115] 
TL006 ,

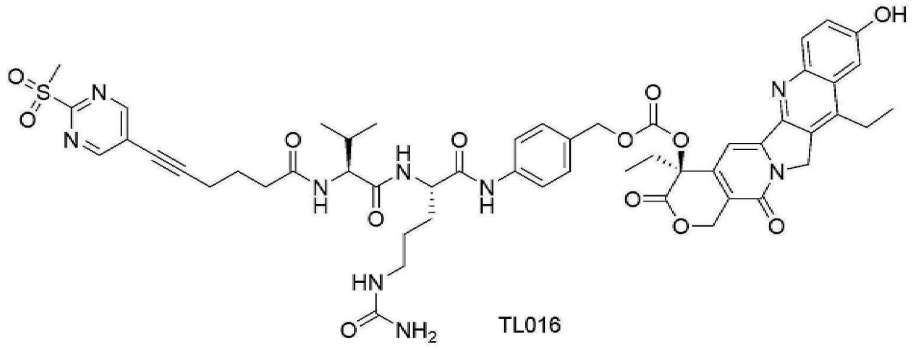
[0116] 
TL007 ,

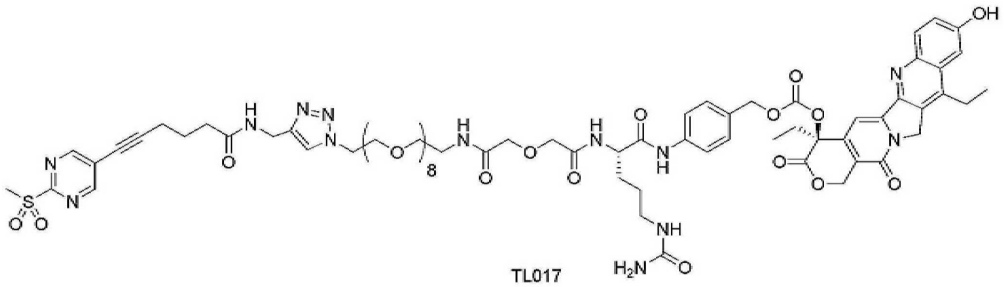
[0117] 
TL008 ,

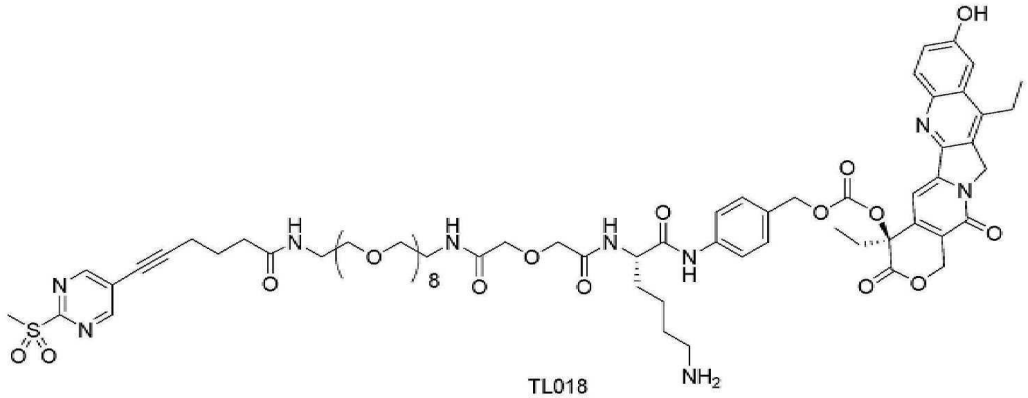
[0118] 
TL013 ,

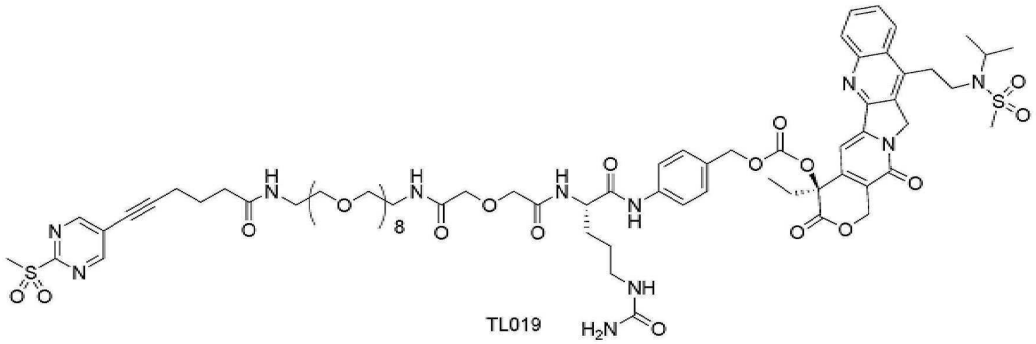
[0119] 
TL014 ,

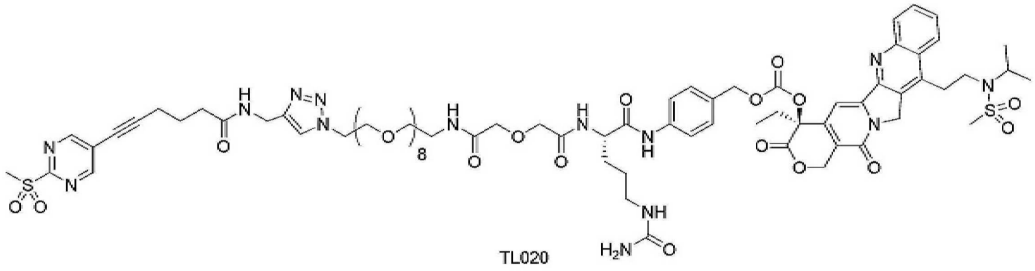
[0120] 
TL015 ,

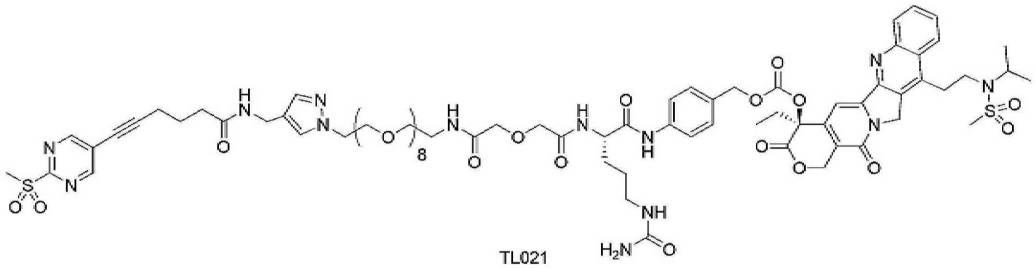
[0121] 
TL016 ,

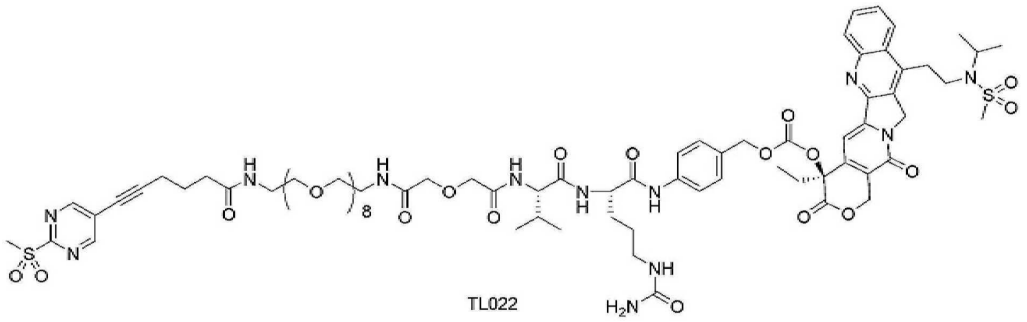
[0122] 
TL017 ,

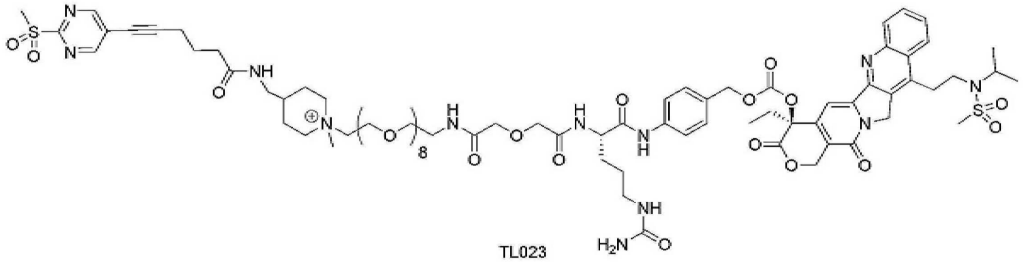
[0123] 
TL018 ,

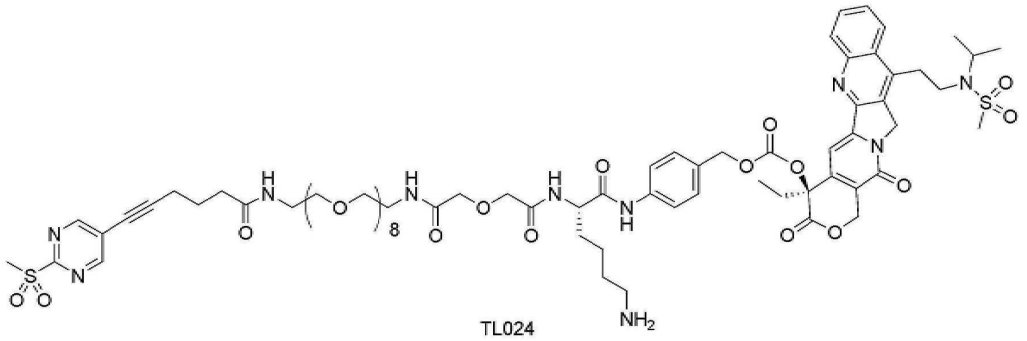
[0124] 
TL019 ,

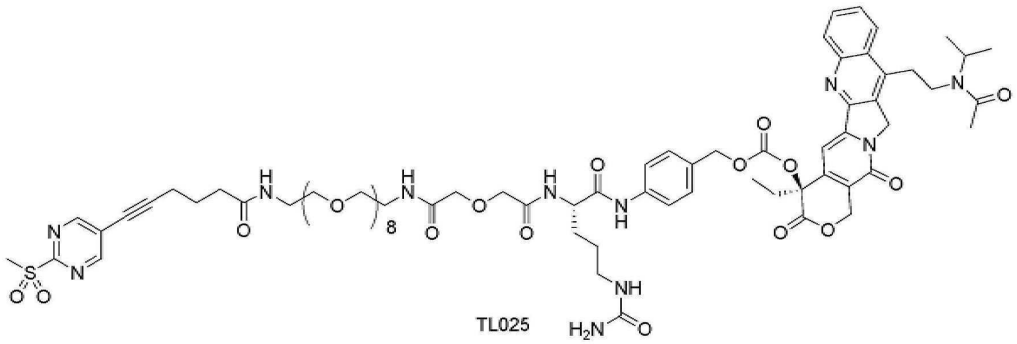
[0125] 
TL020 ,

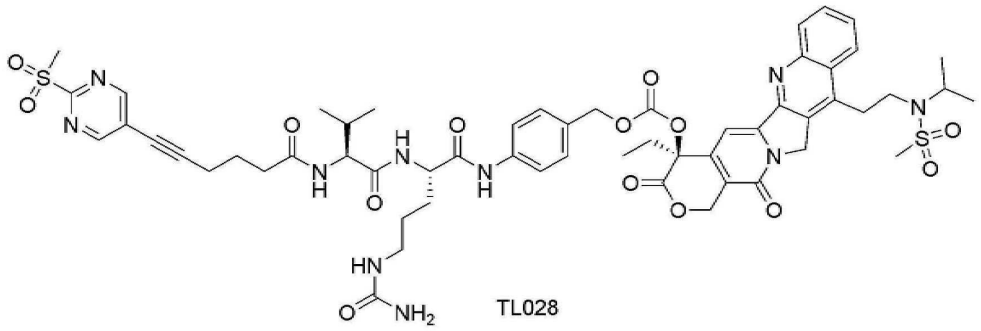
[0126] 
TL021 ,

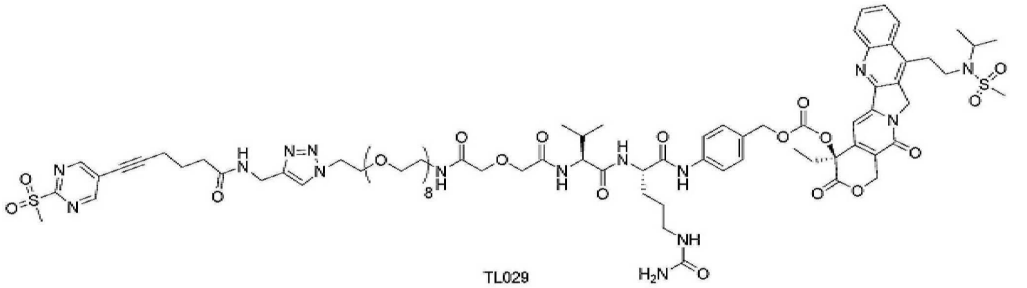
[0127] 
TL022 ,

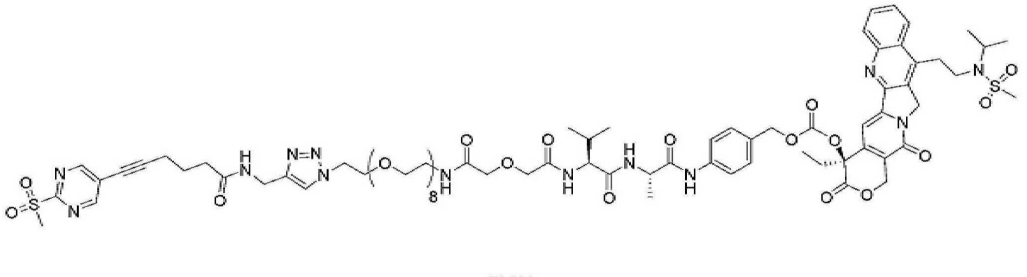
[0128] 
TL023 ,

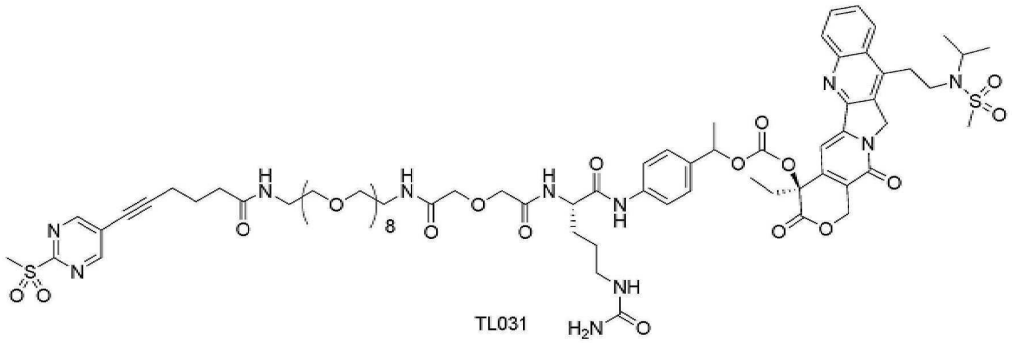
[0129] 
TL024 ,

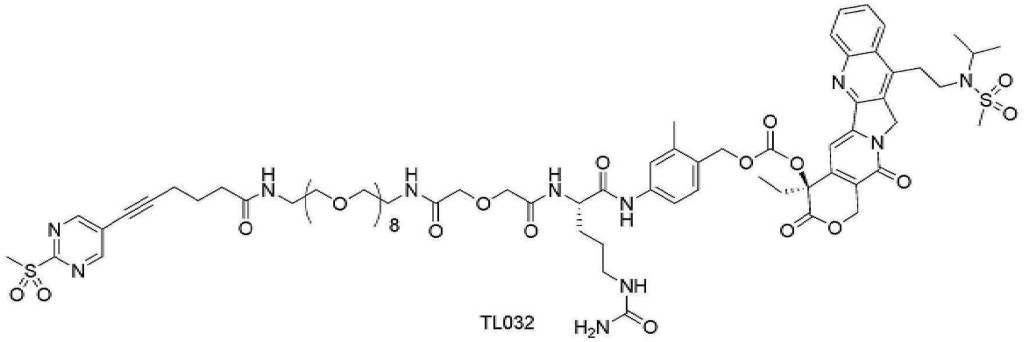
[0130] 
TL025 ,

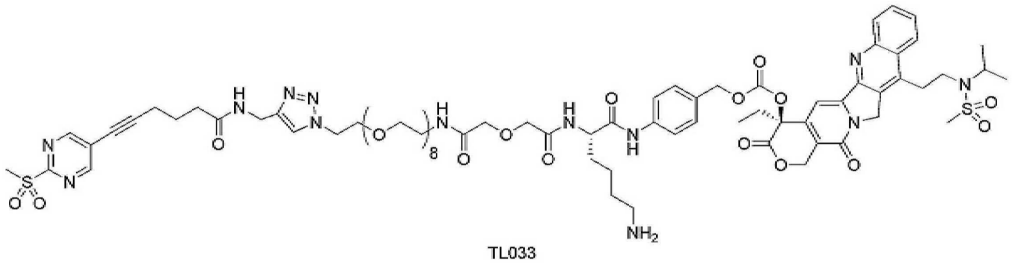
[0131] 
TL028 ,

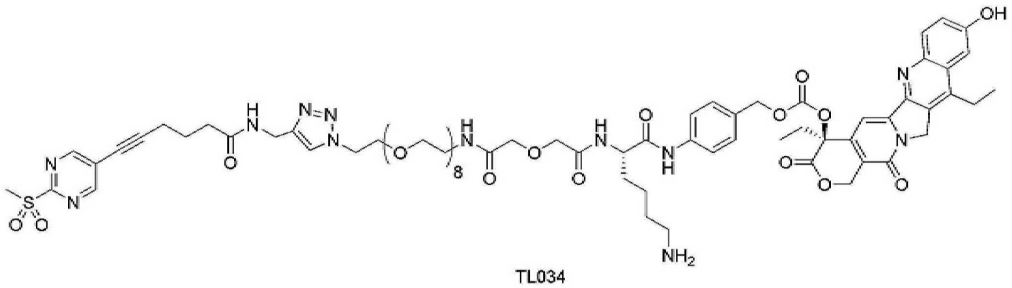
[0132] 
TL029 ,

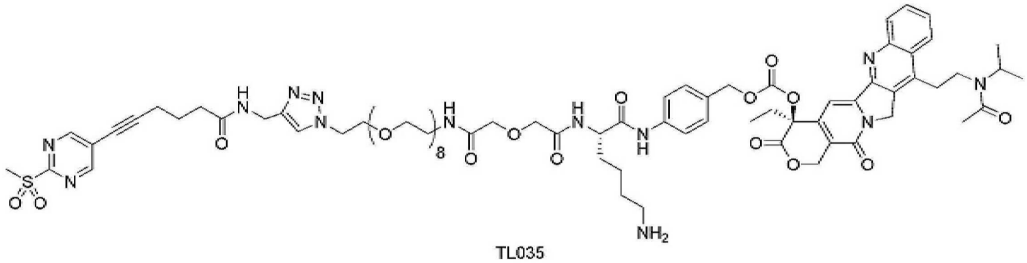
[0133] 
TL030 ,

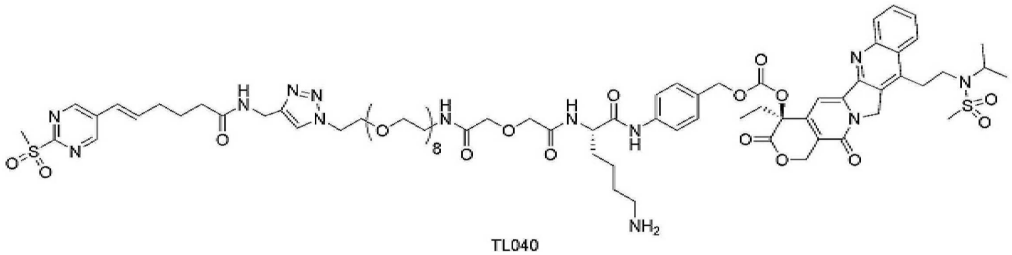
[0134] 
TL031 ,

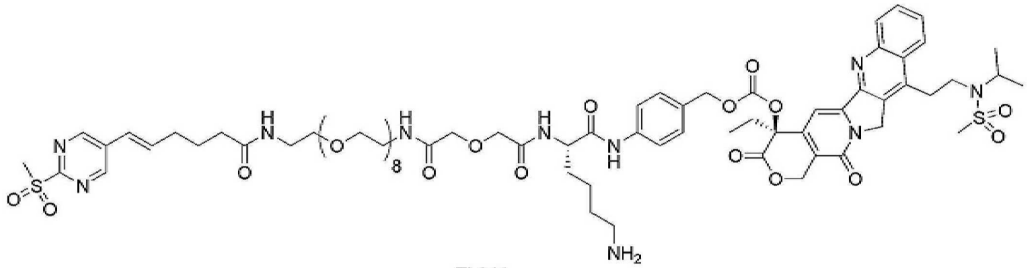
[0135] 
TL032 ,

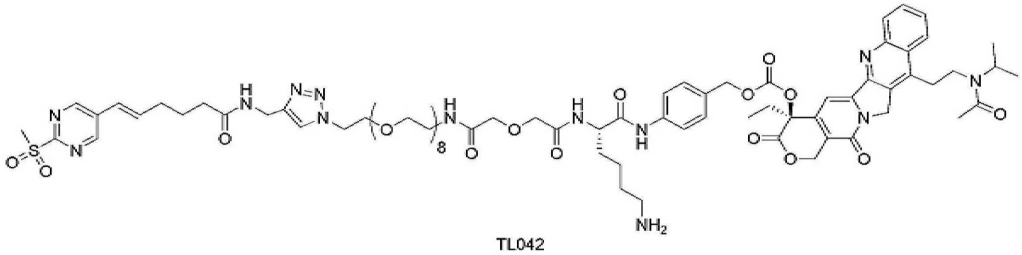
[0136] 
TL033 ,

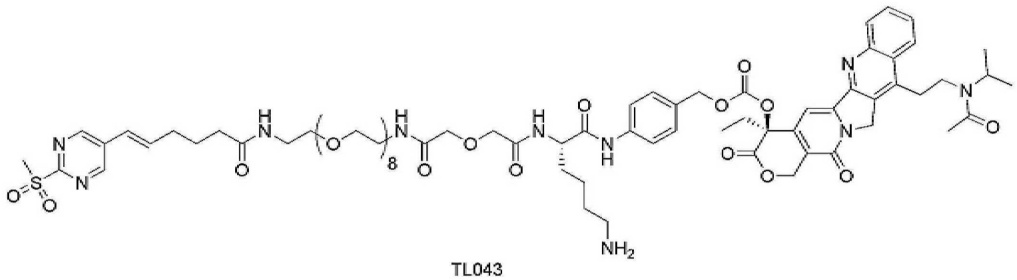
[0137] 
TL034 ,

[0138] 
TL035 ,

[0139] 
TL040 ,

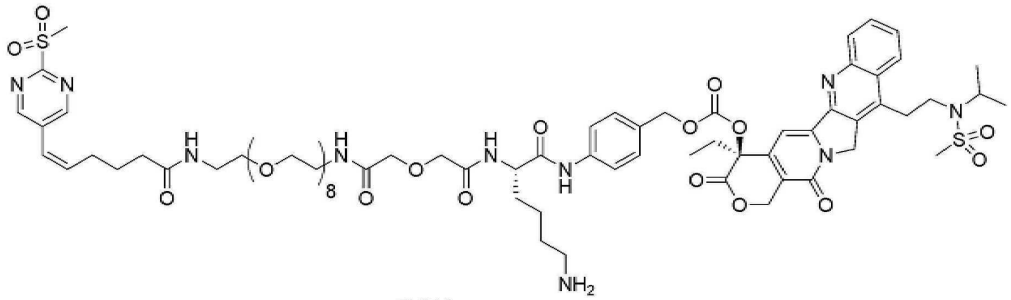
[0140] 
TL041 ,

[0141] 
TL042



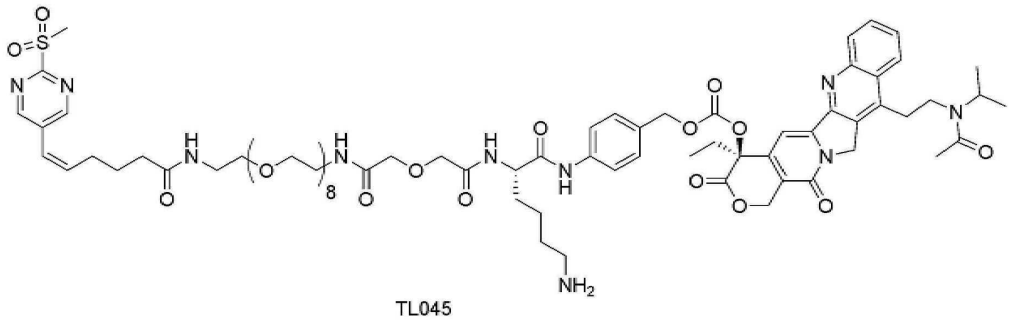
TL043

,



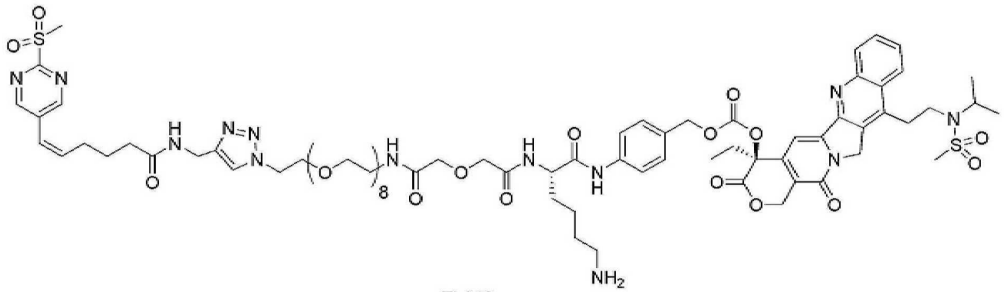
TL044

[0142] ,



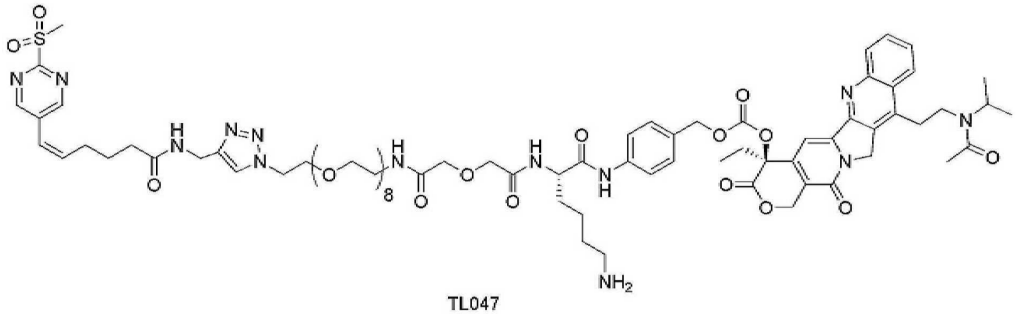
TL045

[0143] ,



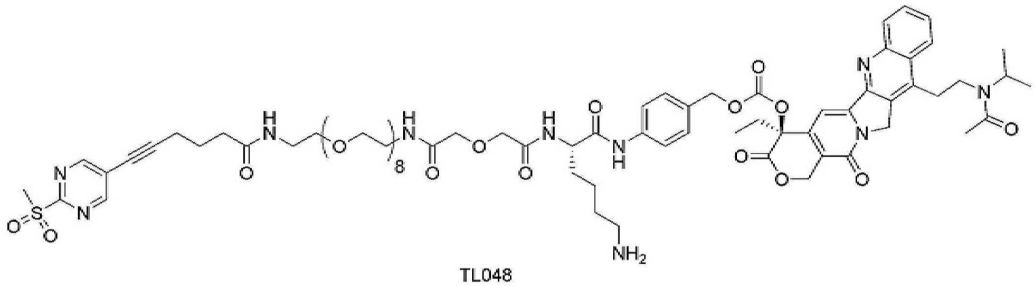
TL046

,



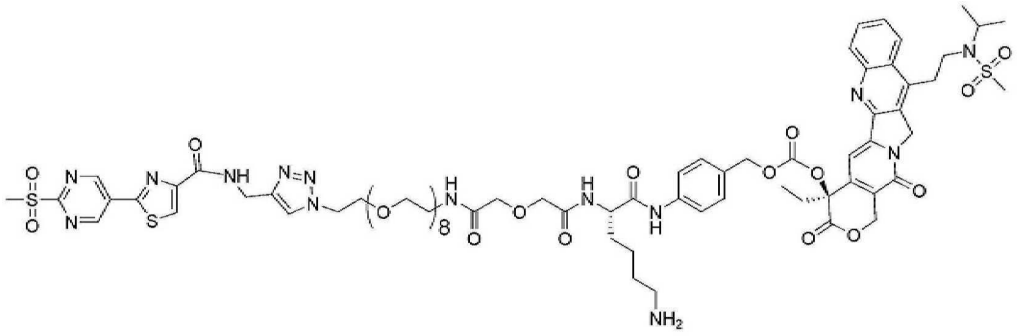
TL047

,



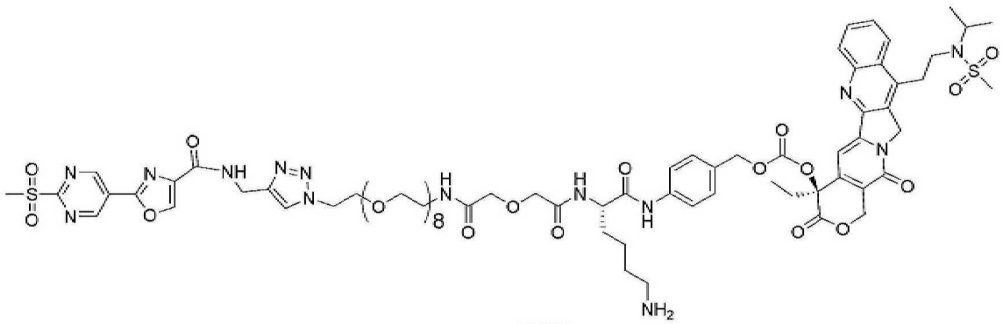
TL048

[0144] ,



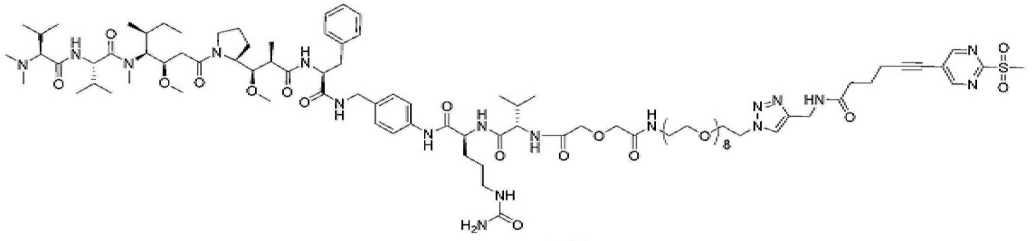
TL049

[0145] ,



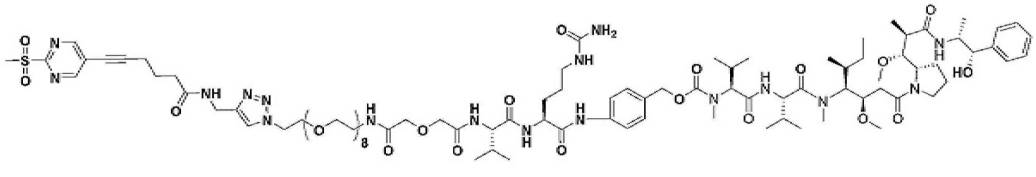
TL050

[0146] ,



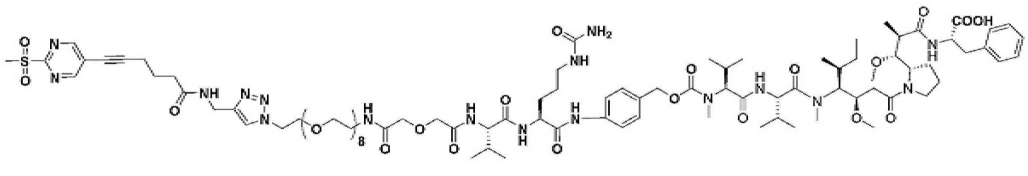
TL051

[0147] ,



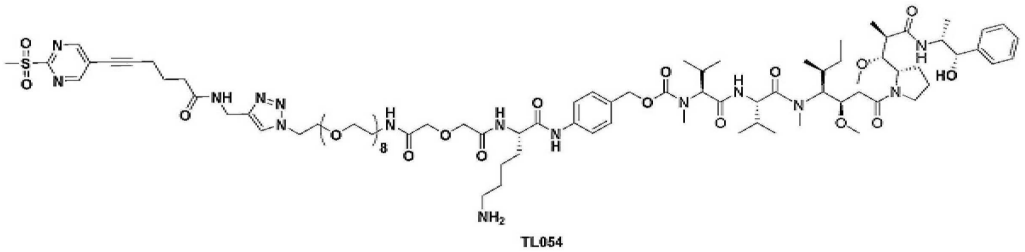
TL052

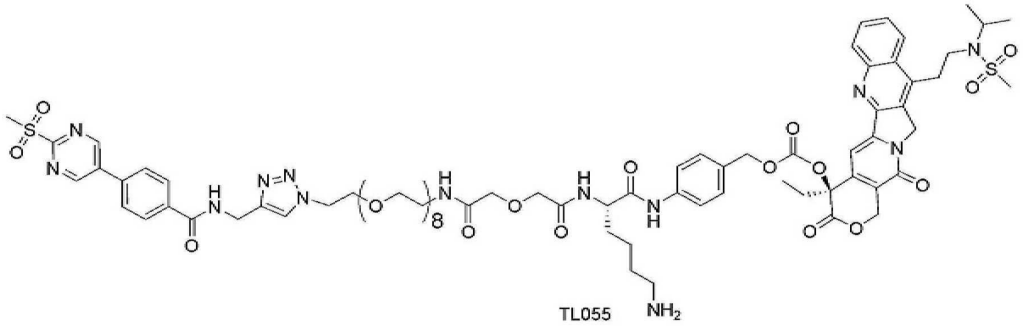
[0148] ,

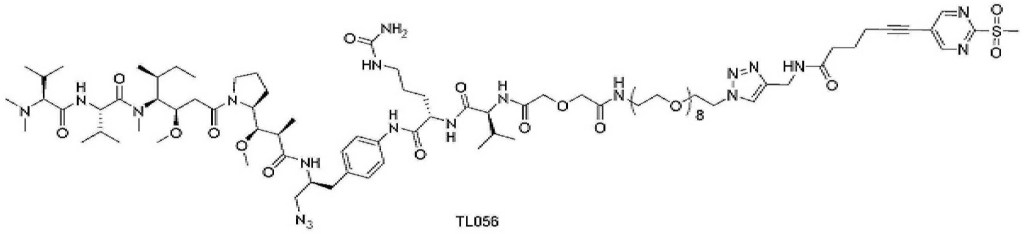


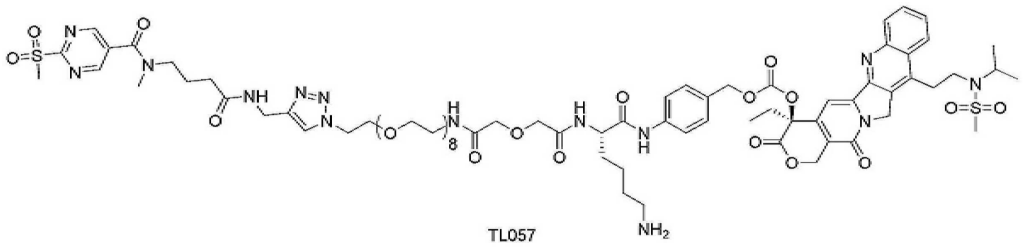
TL053

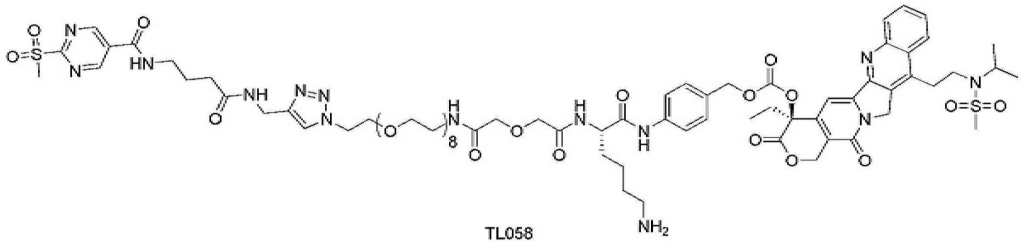
[0149] ,

[0150] 
TL054 ,

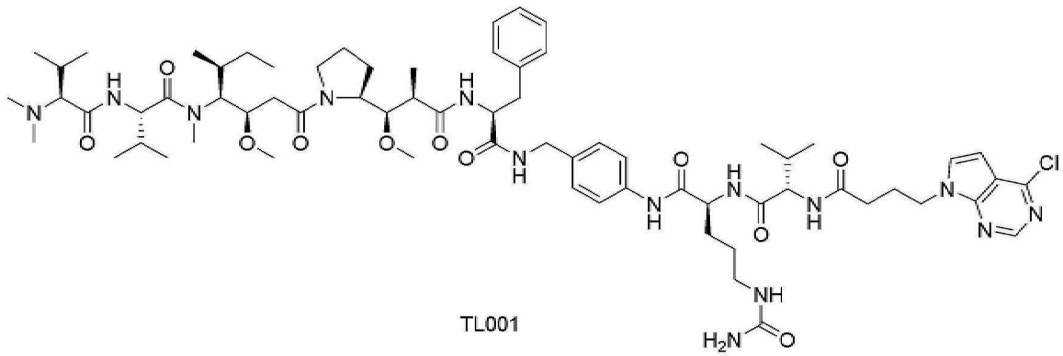
[0151] 
TL055 ,

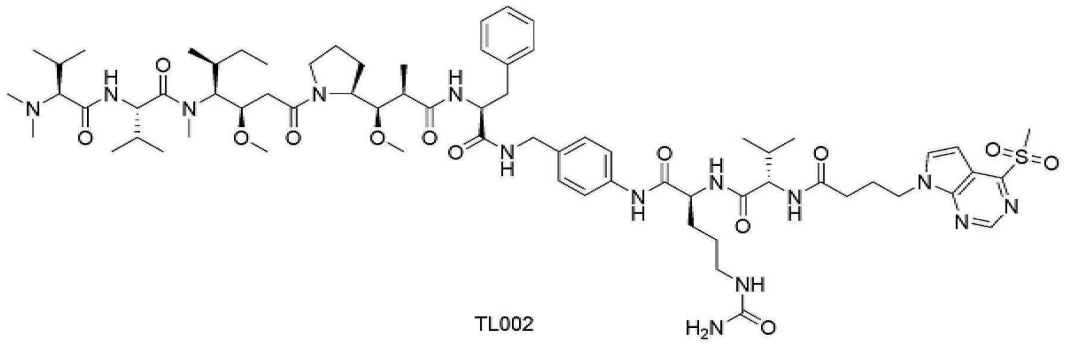
[0152] 
TL056 ,

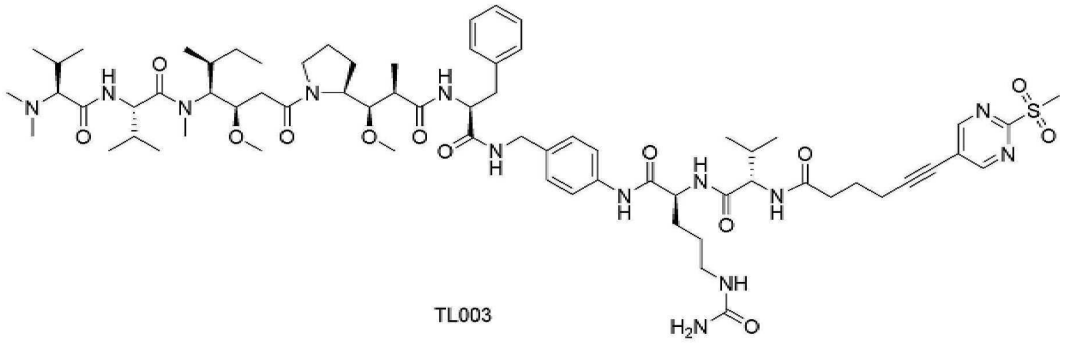
[0153] 
TL057 , 또는

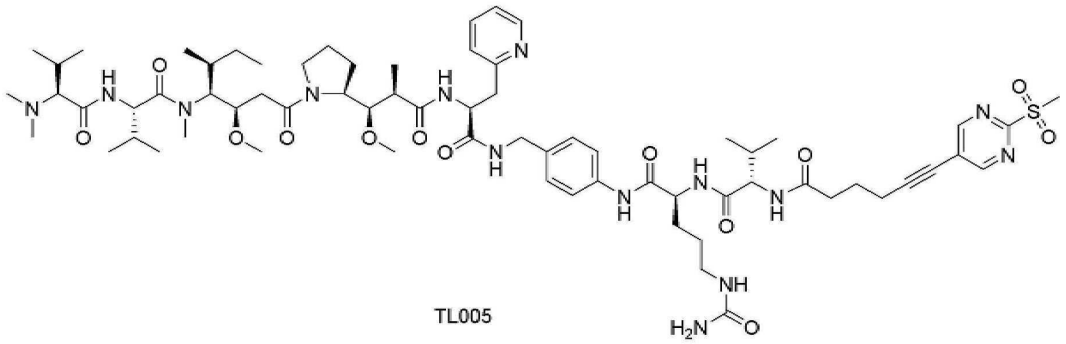
[0154] 
TL058 .

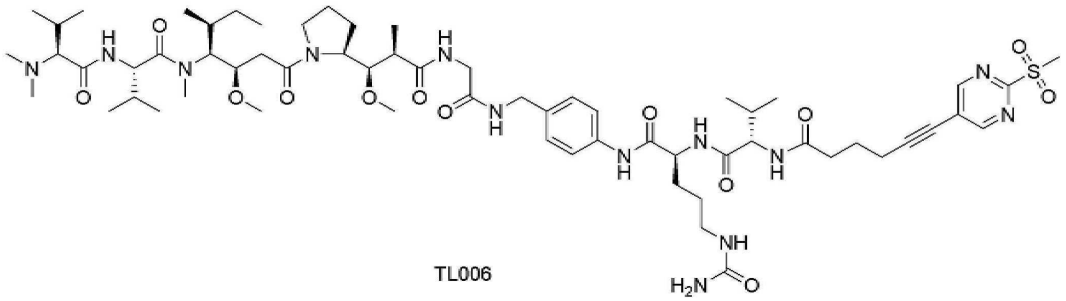
[0155] 일부 바람직한 구현예에서, 상기 화합물은 하기로부터 선택된다.

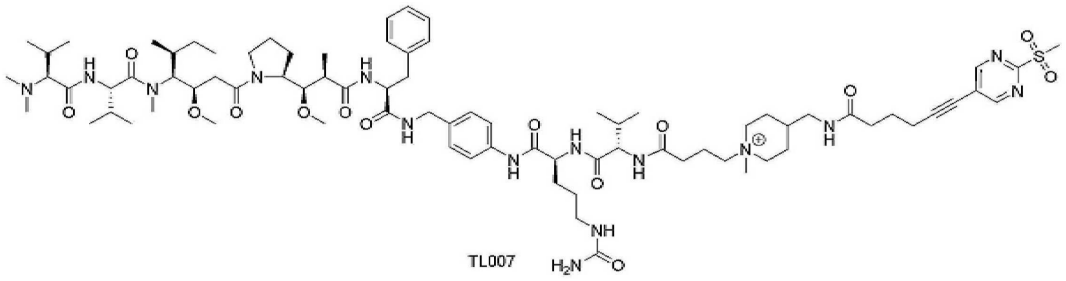
[0156] 
TL001 ,

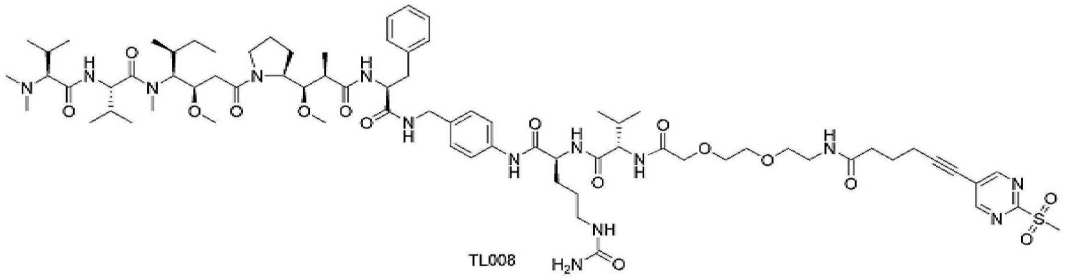
[0157] 
TL002 ,

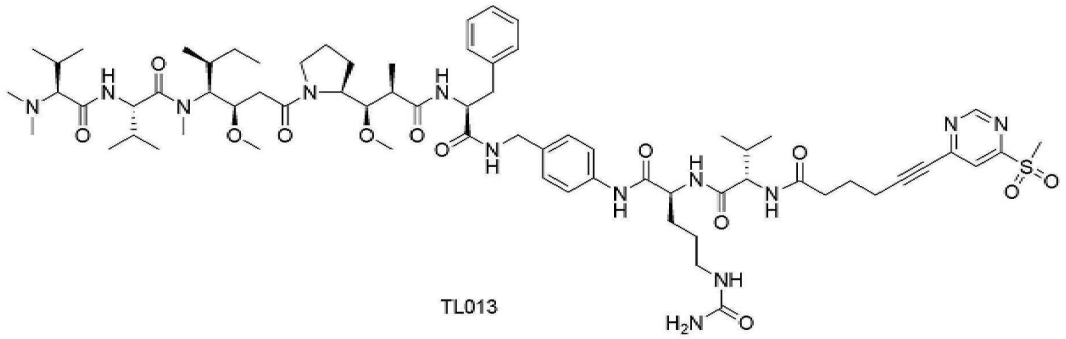
[0158] 
TL003 ,

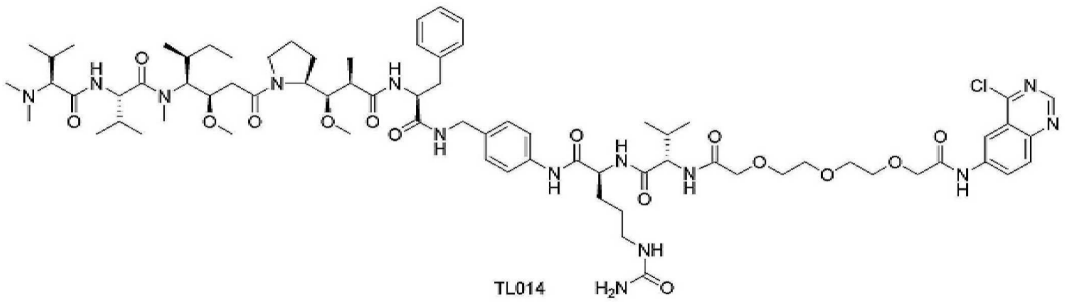
[0159] 
TL005 ,

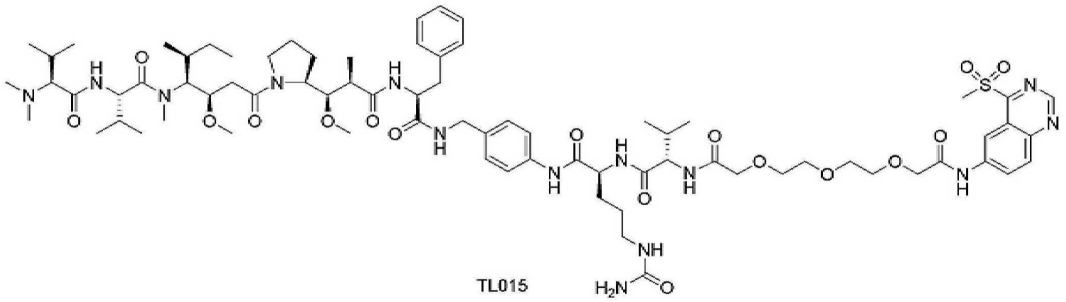
[0160] 
TL006 ,

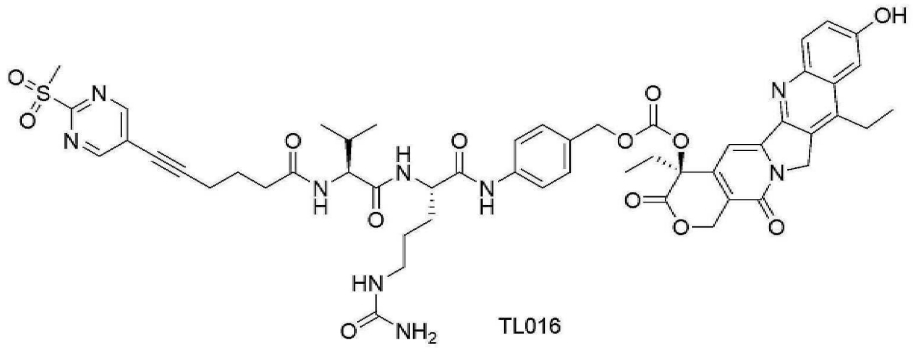
[0161] 
TL007 ,

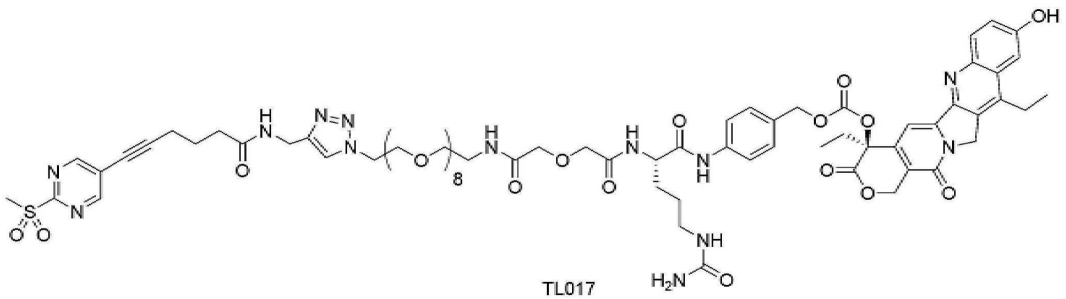
[0162] 
TL008 ,

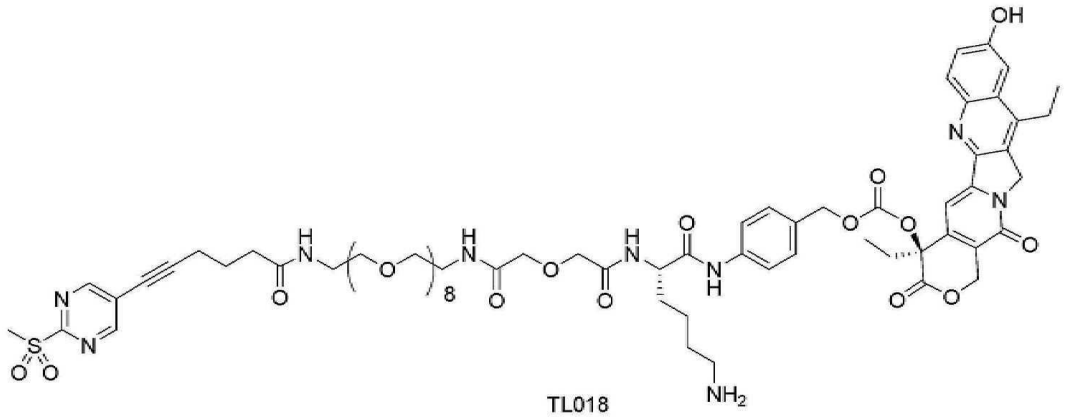
[0163] 
TL013 ,

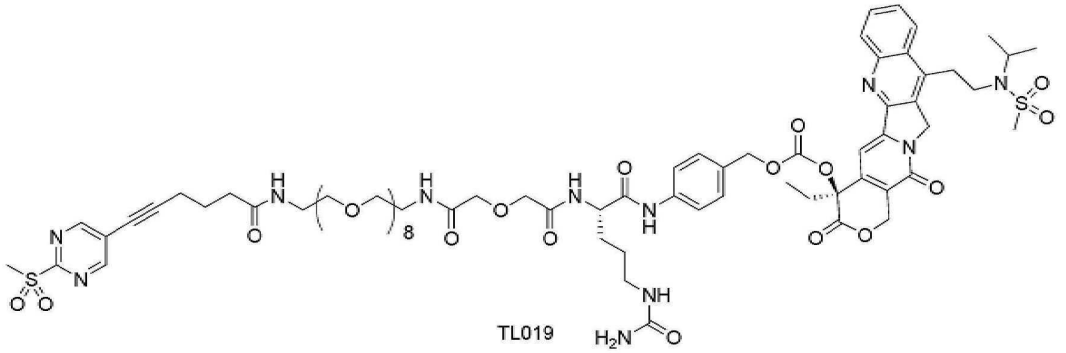
[0164] 
TL014 ,

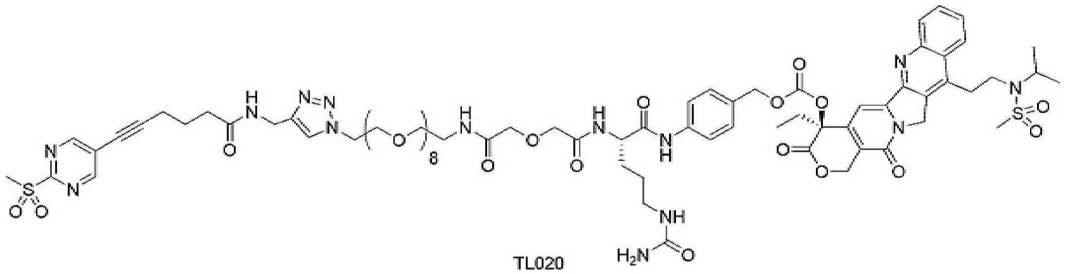
[0165] 
TL015 ,

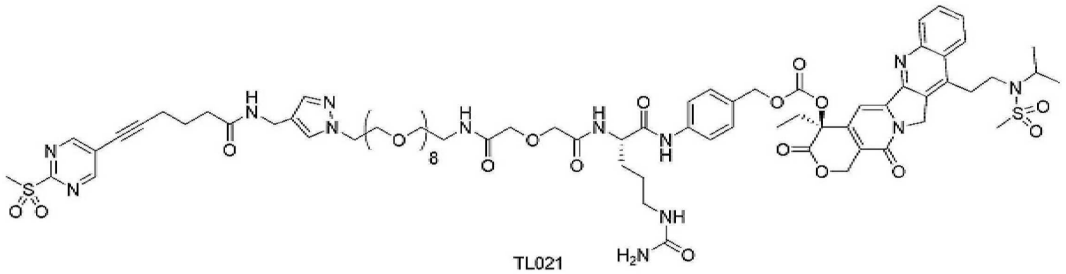
[0166] 
TL016 ,

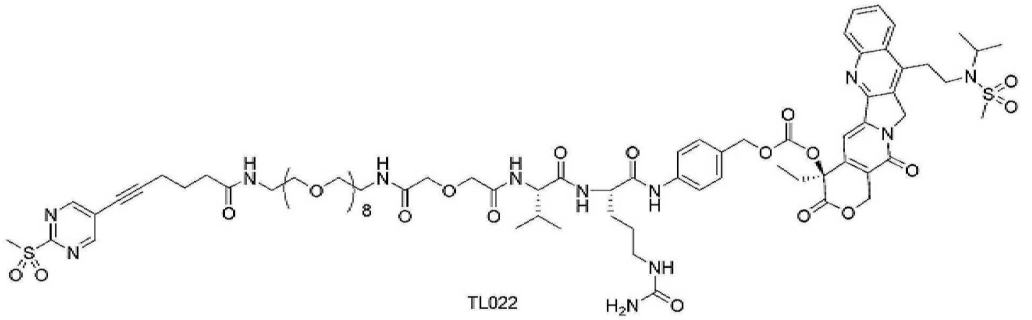
[0167] 
TL017 ,

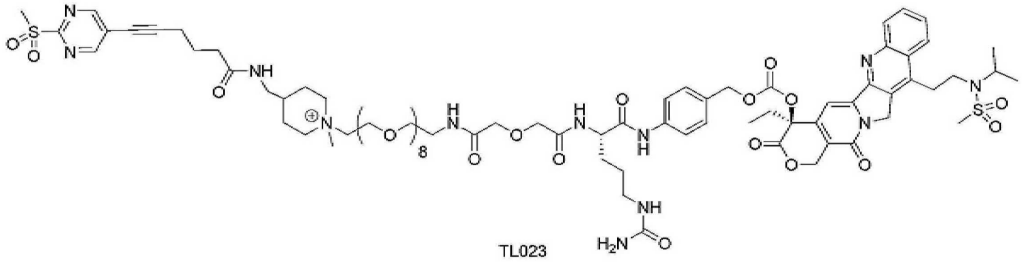
[0168] 
TL018 ,

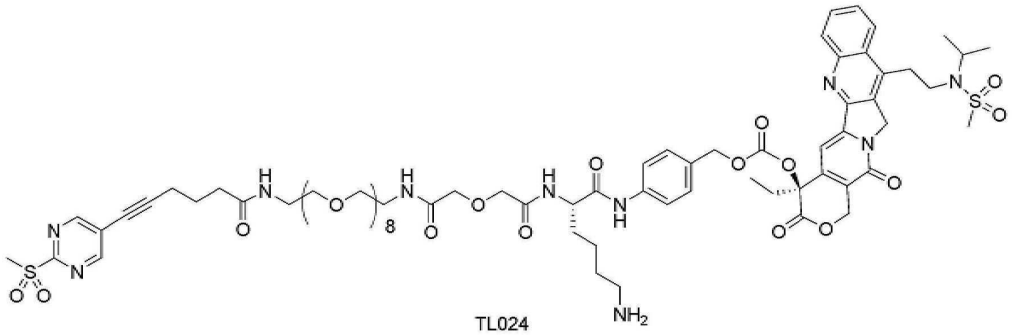
[0169] 
TL019 ,

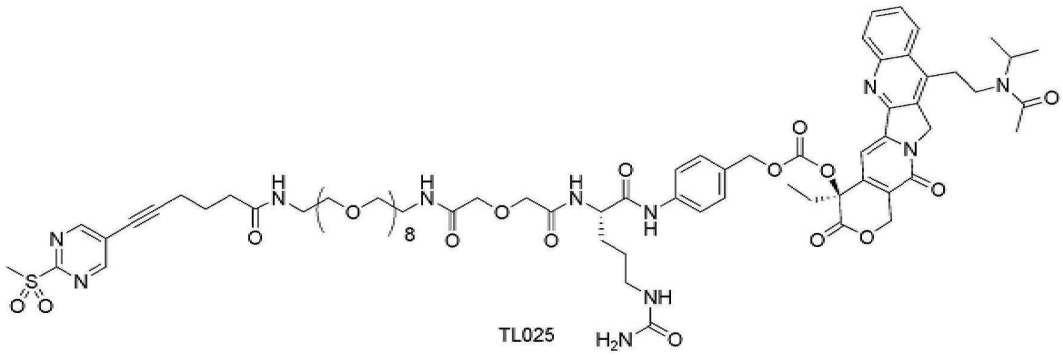
[0170] 
TL020 ,

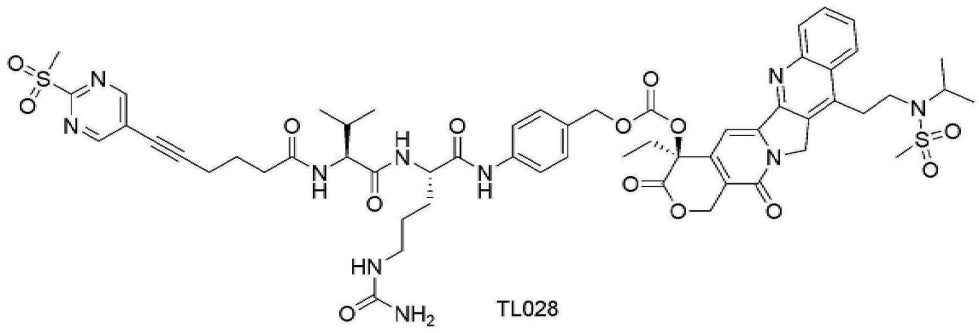
[0171] 
TL021 ,

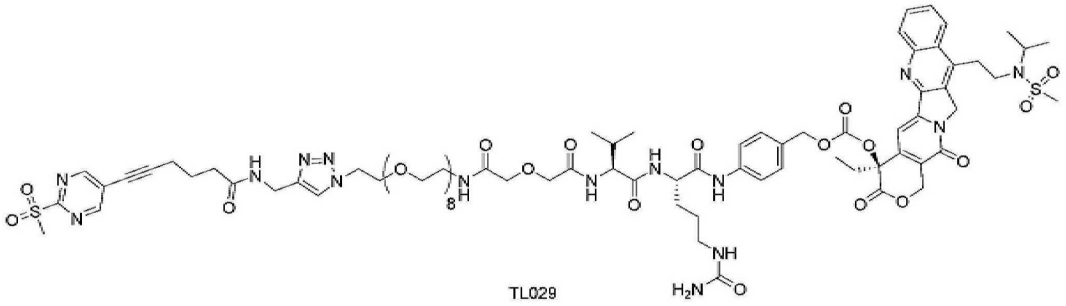
[0172] 
TL022 ,

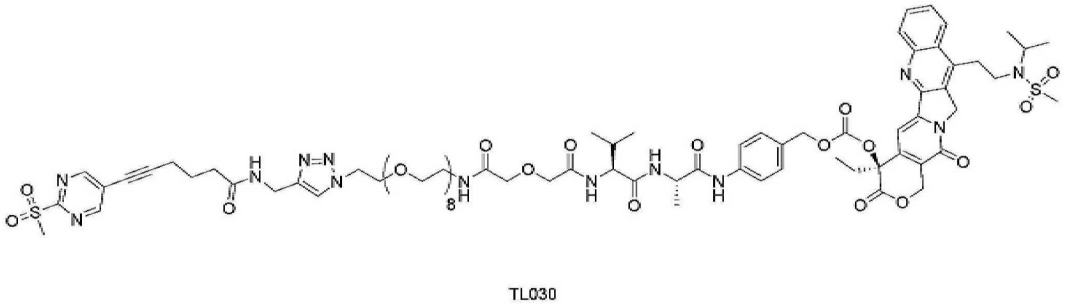
[0173] 
TL023 ,

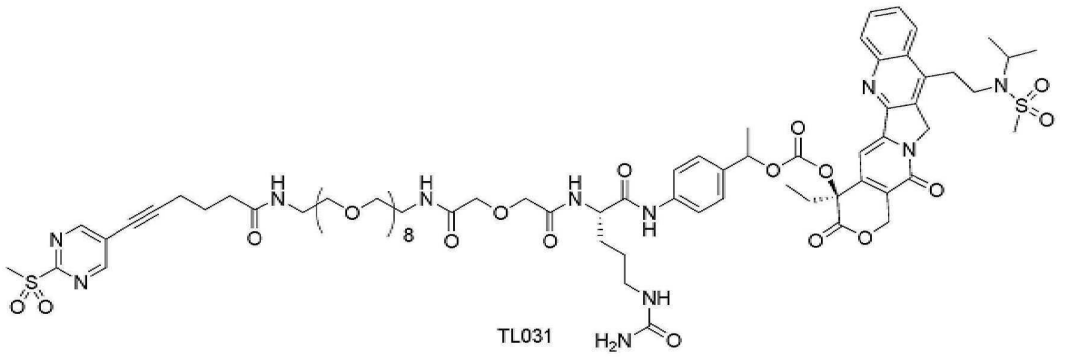
[0174] 
TL024 ,

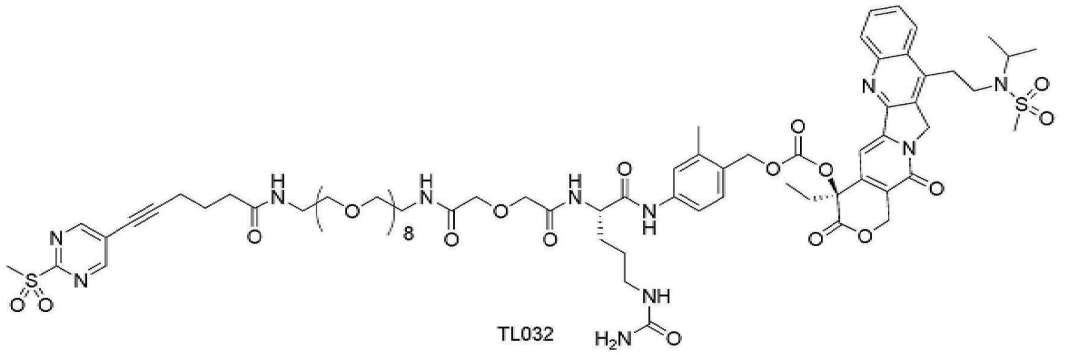
[0175] 
TL025 ,

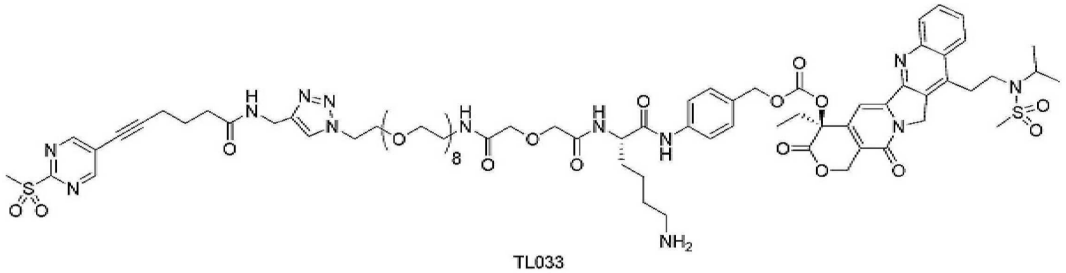
[0176] 
TL028 ,

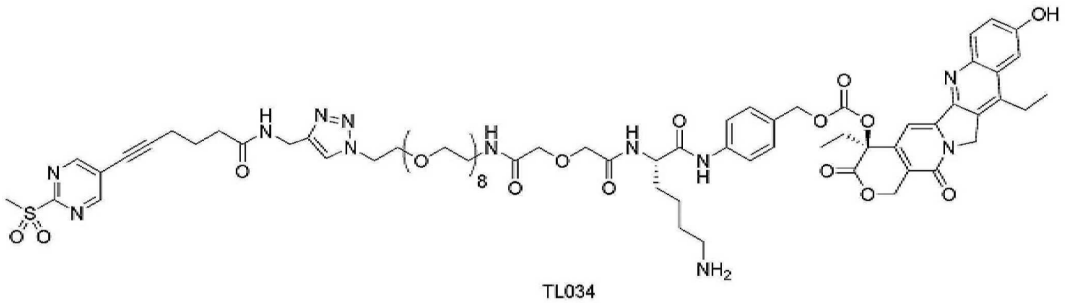
[0177] 
TL029 ,

[0178] 
TL030 ,

[0179] 
TL031 ,

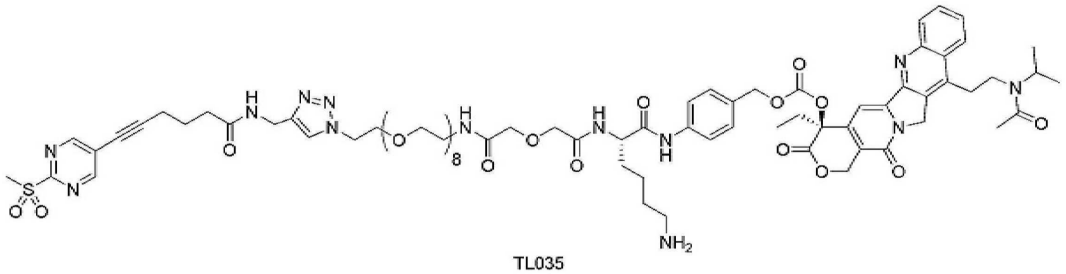
[0180] 
TL032 ,

[0181] 
TL033 ,



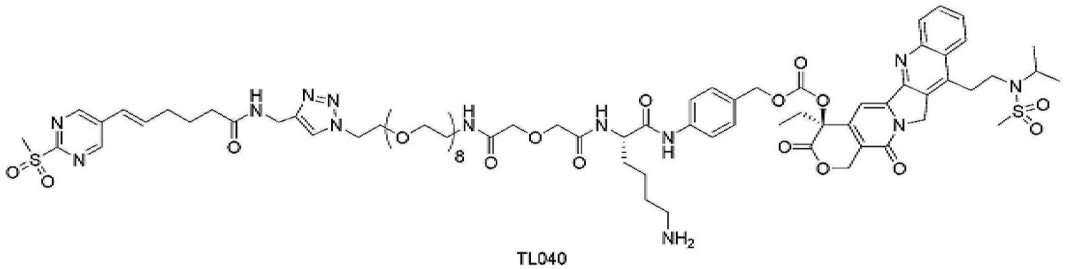
TL034

[0182] ,



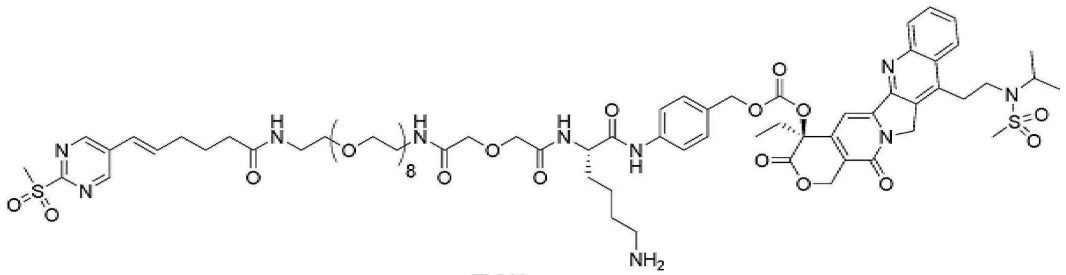
TL035

[0183] ,



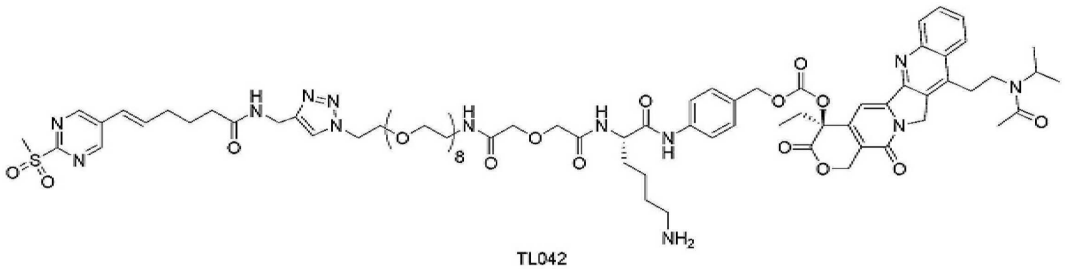
TL040

[0184] ,



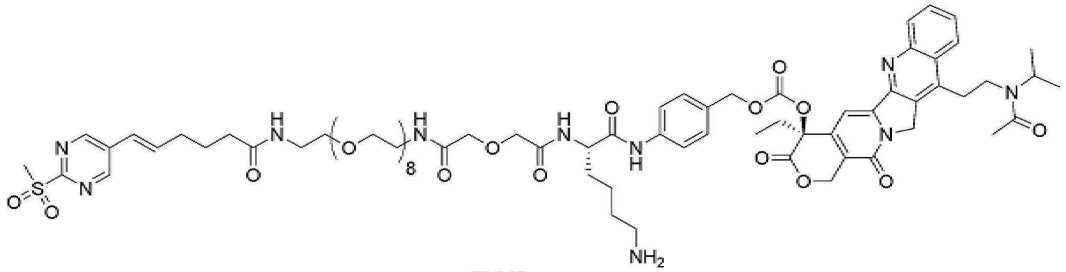
TL041

[0185] ,



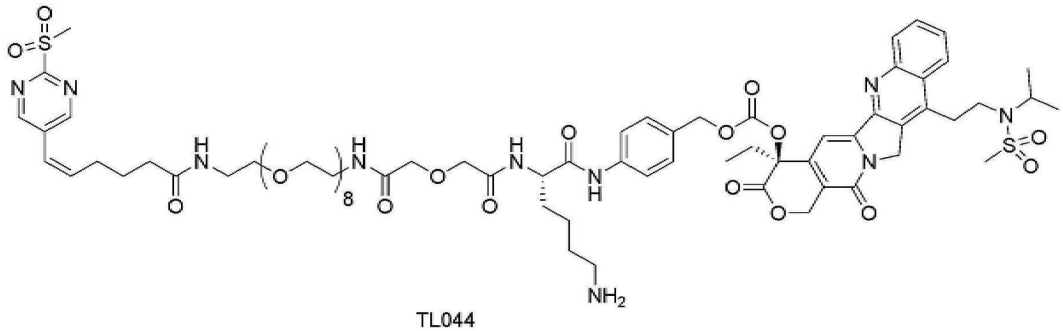
TL042

[0186] ,



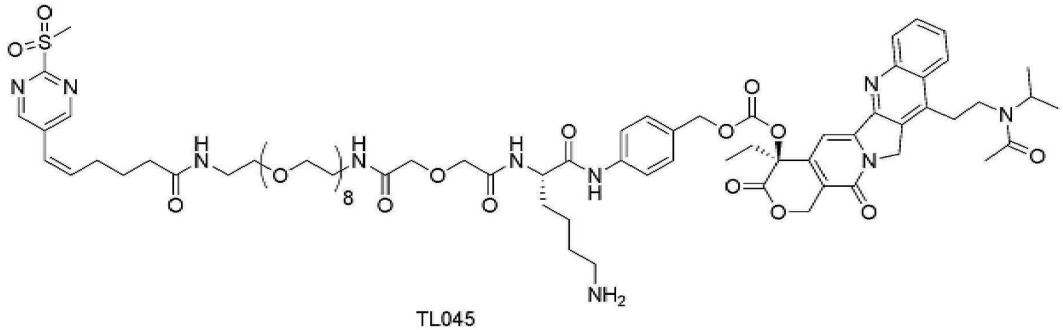
TL043

[0187] ,



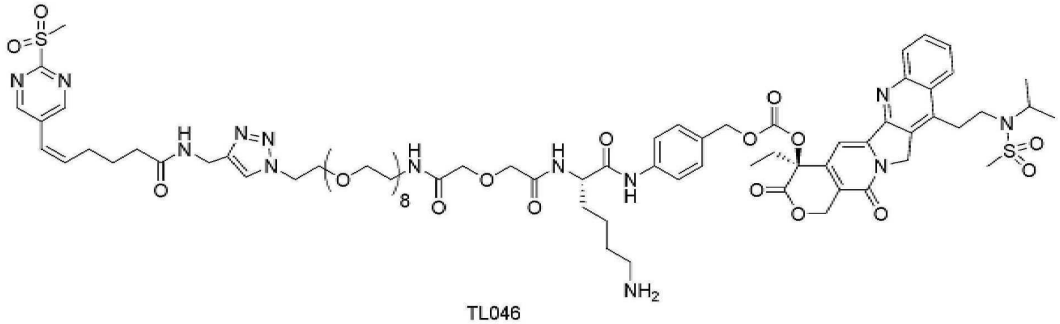
TL044

[0188] ,



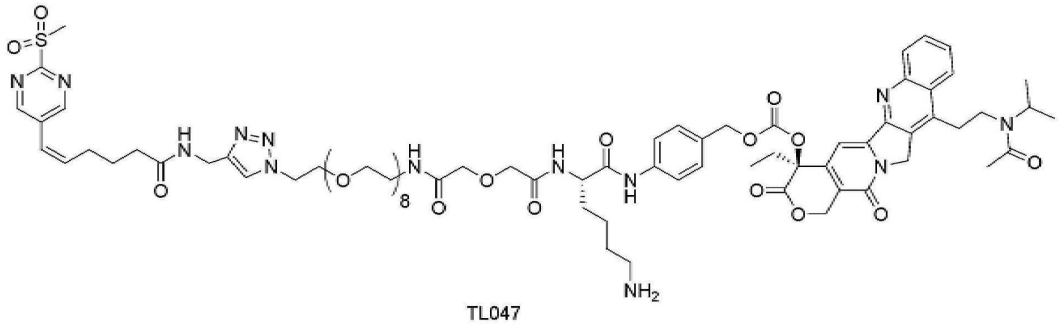
TL045

[0189] ,



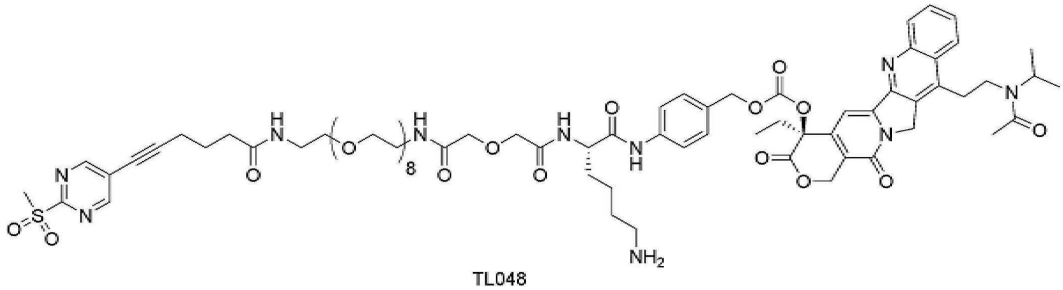
TL046

[0190] ,



TL047

[0191] 또는



TL048

[0192] .

[0193] 제2 측면에서, 본 개시는 생체활성 분자, 링커 및 표적화 부분(targeting moiety)을 포함한 접합체(conjugate)을 제공한다. 상기 표적화 부분은 활성기(예: 티올 기)를 통해 링커에 연결되어, 접합체를 형성한다.

[0194] 일부 바람직한 구현예에서, 상기 접합체의 구조는 식 (II)로 나타낸다:

[0195] $\{T-[L_1-(L_2)_{m1}-(L_3)_{m2}-(L_4)_{m3}-E]\}_{y}-A$

[0196] 식 (II)

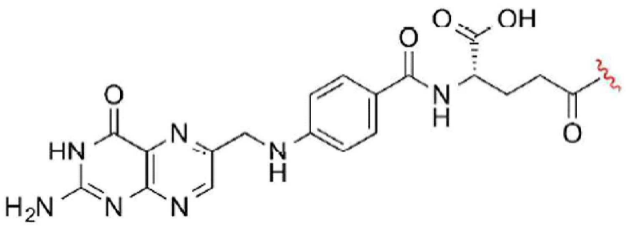
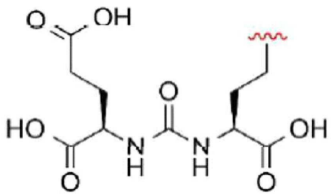
[0197] 이중, 상기 A는 표적화 부분(예: 소분자 리간드, 단백질, 폴리펩티드 또는 비-단백질 시료(예: 당류, RNA 또는 DNA))이고; y은 1부터 10까지의 정수 또는 소수이며; 바람직하게는, y은 5부터 8(예: 5, 6, 7 또는 8)까지의 정수 또는 소수이고;

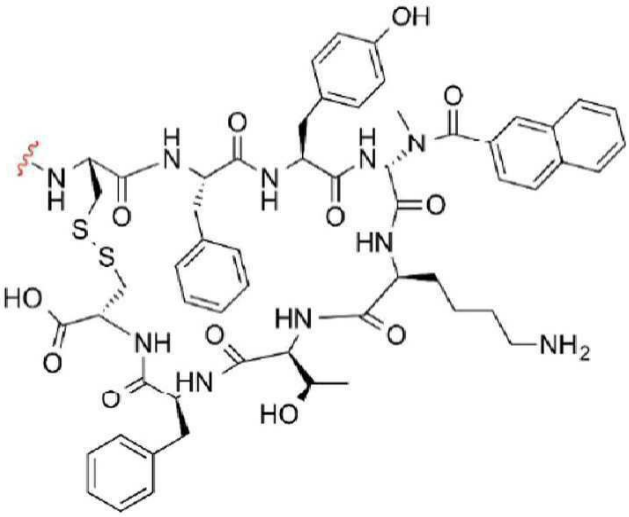
[0198] 나머지 기들은 본 개시의 제1 측면에서 설명된 바와 같다.

[0199] 일부 바람직한 구현예에서, A의 표적은 표피생장인자(epidermal growth factor), Trop-2, CD37, HER2, CD70, EGFRvIII, 메소텔린(Mesothelin), 엽산 수용체1(Folate Receptor1), 뮤신 1, CD138, CD20, CD19, CD30, SLTRK6, 넥틴4, 조직인자(Tissue factor), 뮤신 16, 엔도텔린 수용체(Endothelin receptor), STEAP1, SLC39A6, 구아닐산 고리화 효소 C(Guanylyl cyclase C), PSMA, CCD79b, CD22, 인산 나트륨 공동수송체 2B, GPNMB, 세포영양막 당단백질(Trophoblast glycoprotein), AGS-16, EGFR, CD33, CD66e, CD74, CD56, PD-L1, TACSTD2, DR5, E16, 0772P, MPF, Napi3b, Sema 5b, PSCA hlg, ETBR, MSG783, STEAP2, TrpM4, CRIPTO, CD21, CD79b, FcRH2, NCA, MDP, IL20Rα, 브레비칸(Brevican), EphB2R, ASLG659, PSCA, GEDA, BAFF-R, CD79a, CXCR5, HLA-DOB, P2X5, CD72, LY64, FcRH1, IRTA2, TENB2, 인테그린 α5β6, α4β7, FGF2, FGFR2, Her3, CA6, DLL3, DLL4, P-캐드헤린, EpCAM, pCAD, CD223, LYPD3, LY6E, EFNA4, ROR1, SLITRK6, 5T4, ENPP3, 클라우딘 18.2, BMPR1B, Tyro7, c-Met, ApoE, CD1 lc, CD40, CD45(PTPRC), CD49D(ITGA4), CD80, CSF1R, CTSD, GZMB, Ly86, MS4A7, PIK3AP1, PIK3CD, CCR5, IFNG, IL10RA1, IL-6, ACTA2, COL7A1, LOX, LRRC15, MCPT8, MMP10, NOG, SERPINE1, STAT1, TGFBR1, CTSS, PGF, VEGFA, C1QA, C1QB, ANGPTL4, EGLN, EGLN3, BNIP3, AIF1, CCL5, CXCL10, CXCL11, IFI6, PLOD2, KISS1R, STC2, DDIT4, PFKFB3, PGK1, PDK1, AKR1C1, AKR1C2, CADM1, CDH11, COL6A3, CTGF, HMOX1, KRT33A, LUM, WNT5A, IGFBP3, MMP14, CDCP1, PDGFRA, TCF4, TGF, TGFB1, TGFB2, CD1 lb, ADGRE1, EMR2, TNFRSF21, UPK1B, TNFSF9, MMP16, MFI2, IGF-1R, RNF43, NaPi2b, 또는 BCMA로부터 선택된다.

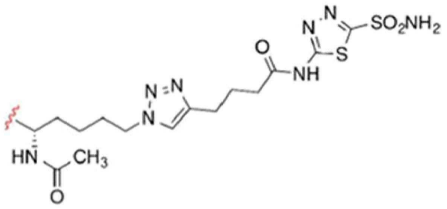
[0200] 일부 바람직한 구현예에서, A는 엽산 유도체, 글루타메이트 우레아 유도체, 소마토스타틴 유도체, 아릴설폰아미드 유도체(예: 탄산무수화효소 IX inhibitor), 2개의 지방족 인돌을 연결하는 폴리엔, 시아닌 염료 또는 IR-783 또는 이의 유도체와 같이, 소분자 리간드이다.

[0201] 일부 바람직한 구현예에서, A는

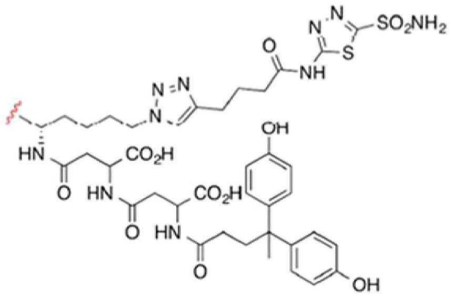
[0202] , ,



,



또는



으로부터 선택된다.

[0203] 일부 바람직한 구현예에서, A는 단일클론항체 또는 이의 단편에 결합하는 항원과 같은 항체이며, 여기서 상기 단일클론항체 또는 이의 단편에 결합하는 항원은 Fab, Fab', $F(ab')_2$, Fd, Fv, dAb, 상보성 결정 단편(complementary determinant fragment), 단일 사슬 항체(예: scFv), 인간을 제외한 항체(non-human antibody), 인간화항체, 키메라항체(chimeric antibody), 완전 인간화항체, 프로바디(probody), 이중 특이적 항체 또는 다중 특이적 항체를 포함한다.

[0204] 일부 바람직한 구현예에서, A는 트라스투주맙(Trastuzumab), 퍼투주맙(Pertuzumab)과 같이, 항-Her 2 단일클론항체; 또는 삭시투주맙(Sacituzumab)과 같이, 항-Trop-2 단일클론항체이다.

[0205] 일부 바람직한 구현예에서, A는 항체 M1, M2 또는 M3과 같이, 항-Trop-2 단일클론항체이다.

[0206]

항체	M1	M2	M3
중사슬 CDR1	GYTFTNY (SEQ ID No.:1)	GYTFTNY (SEQ ID No.:1)	GYTFTNY (SEQ ID No.:1)
중사슬 CDR2	NTDSGE (SEQ ID No.:2)	NTDSGE (SEQ ID No.:2)	NTDSGE (SEQ ID No.:2)
중사슬 CDR3	GGFGSSYWYFDV (SEQ ID No.:3)	GGFGSSYWYFDV (SEQ ID No.:3)	GGFGSSYWYFDV (SEQ ID No.:3)
경사슬 CDR1	KASQDVSSAVA (SEQ ID No.:4)	KASQDVSSAVA (SEQ ID No.:4)	KASQDVSIAVA (SEQ ID No.:8)
경사슬 CDR2	SASYRYT (SEQ ID No.:5)	SASYRYT (SEQ ID No.:5)	SASYRYT (SEQ ID No.:5)
경사슬 CDR3	QQHYSTPLT (SEQ ID No.:6)	QQHYITPLT (SEQ ID No.:7)	QQHYSTPLT (SEQ ID No.:6)

[0207] 각각 영역(region) 또는 도메인(domain)에 아미노산의 배열은 Chothia & Lesk(1987) J. Mol. Biol. 196:901-917에 따를 수 있으며; Chothia et al.(1989) in Nature 342: 878-883. 1의 정의에 따를 수 있다.

[0208] 1. 소수성으로 개질된 항체 M1의 중사슬 및 경사슬 서열

[0209] M1의 중사슬 가변 영역의 아미노산 서열:(121 aa)

[0210] QVQLQQSGSELKKPGASVKVSCKASGYTFTNYGMNWVKQAPGQGLKWMGWINTDSGEPTYTDDFKGRFAFSLDTSVSTAYLQISSLKADDTAVYFCARGGFG SSYWYFDVWGQGSLVTVSS (SEQ ID No.(서열번호): 11)

[0211] M1의 경사슬 가변 영역의 아미노산 서열 :(107 aa)

[0212] DIQLTQSPSSLSASVGDRVSITCKASQDVSSAVAWYQQKPGKAPKLLIYSASYRYTGVPDRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFAVYYCQQHYSTPLTFGAGT KVEIK (SEQ ID No.: 12)

[0213] 2. 소수성으로 개질된 항체 M2의 중사슬 및 경사슬 서열

[0214] M2의 중사슬 가변 영역의 아미노산 서열 :(121 aa)

[0215] QVQLQQSGSELKKPGASVKVSCKASGYTFTNYGMNWVKQAPGQGLKWMGWINTDSGEPTYTDDFKGRFAFSLDTSVSTAYLQISSLKADDTAVYFCARGGFG SSYWYFDVWGQGSLVTVSS (SEQ ID No.: 13)

[0216] M2의 경사슬 가변 영역의 아미노산 서열 :(107 aa)

[0217] DIQLTQSPSSLSASVGDRVSITCKASQDVSSAVAWYQQKPGKAPKLLIYSASYRYTGVPDRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFAVYYCQQHYITPLTFGAGT KVEIK (SEQ ID No.: 14)

[0218] 3. 소수성으로 개질된 항체 M3의 중사슬 및 경사슬 서열

[0219] M3의 중사슬 가변 영역의 아미노산 서열 :(121 aa)

[0220] QVQLQQSGSELKKPGASVKVSCKASGYTFTNYGMNWVKQAPGQGLKWMGWINTDSGEPTYTDDFKGRFAFSLDTSVSTAYLQISSLKADDTAVYFCARGGFG SSYWYFDVWGQGSLVTVSS (SEQ ID No.: 15)

[0221] M3의 경사슬 가변 영역의 아미노산 서열 :(107 aa)

[0222] DIQLTQSPSSLSASVGDRVSITCKASQDVSIAVAWYQQKPGKAPKLLIYSASYRYTGVPDRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFAVYYCQQHYSTPLTFGAGT KVEIK (SEQ ID No.: 16)

[0223] M1, M2, M3의 경사슬 불변 영역의 서열 :(107 aa)

[0224] RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSF NRGEC (SEQ ID No.: 9)

[0225] M1, M2, M3의 중사슬 불변 영역의 서열:(330 aa)

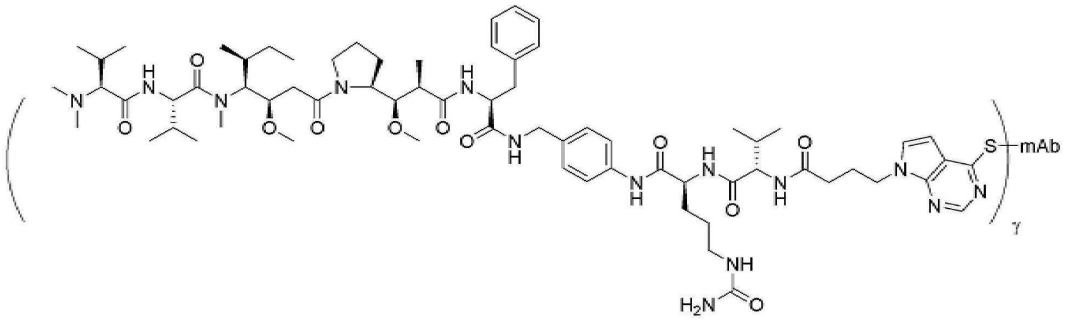
[0226] ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKS CDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKC KVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVF SCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID No.: 10)

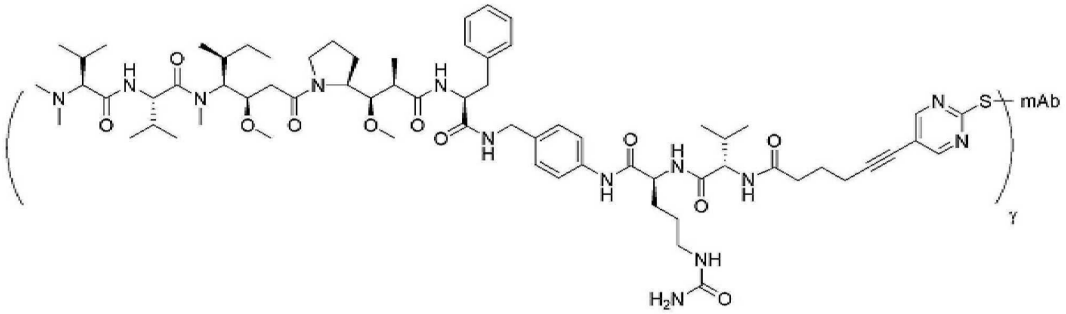
[0227] 중사슬의 말단 Lys는 쉽게 결실되지만, 이러한 결실은 생체활성에 영향을 미치지 않는다(Dick, L.W. et al., Biotechnol. Bioeng., 100 참조: 1132-1143 참조). 중사슬의 말단에서 결실된 Lys를 갖는 상기 단일클론 항체 M1, M2, M3 및 이의 서열 또는 단편은 모두 본 발명의 M1, M2, M3 단일클론 항체에 속한다.

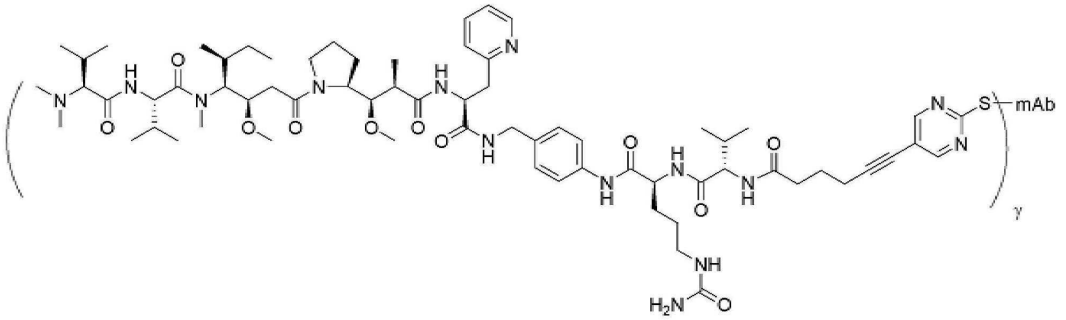
[0228] 일부 바람직한 구현예에서, A는 세포 표면 인테그린 수용체를 인식하는 RGD 펩티드; EGF, PDGF 또는 VEGF와 같이, 세포 표면 성장 인자 수용체를 인식하는 성장 인자; 또는 기능적 세포 표면 플라스미노겐 활성화제, 봄베신(bombesin), 브래디키닌(bradykinin), 소마토스타틴(somatostatin) 또는 전립선-특이적 막 항원 수용체를 인식할 수 있는 펩티드로부터 선택된다.

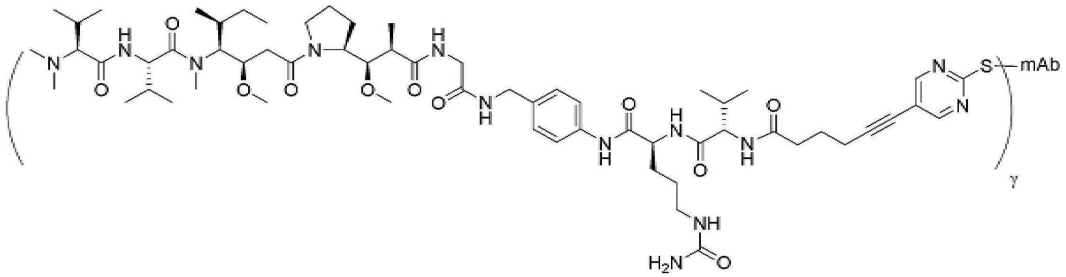
[0229] 일부 바람직한 구현예에서, A는 CD40 리간드, CD30 리간드, OX40 리간드, PD-1 리간드, ErbB 리간드, Her2 리간드, TACSTD2 리간드, 또는 DR5 리간드로부터 선택된다.

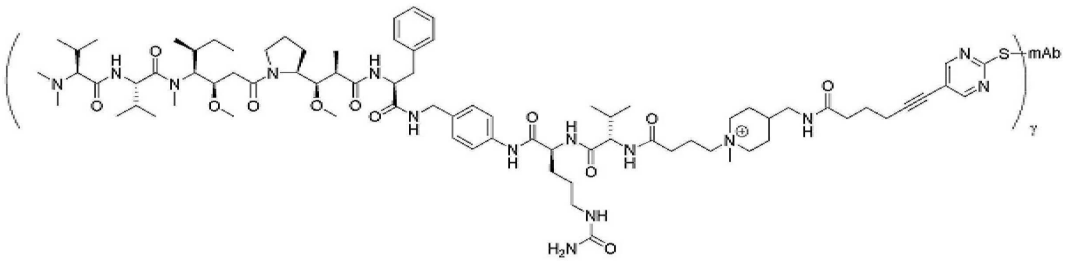
[0230] 일부 바람직한 구현예에서, 접합체(conjugate)는:

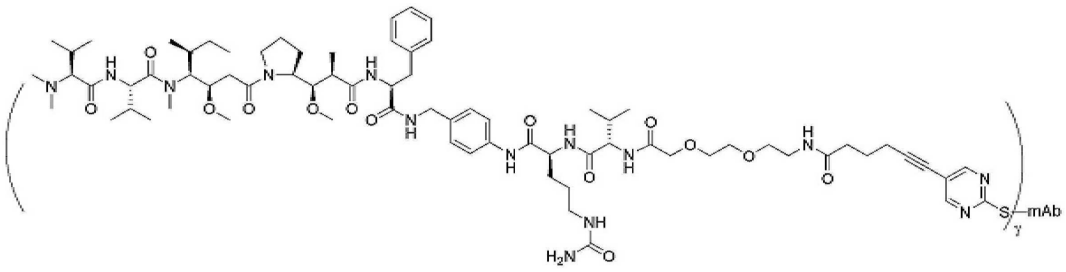
[0231] 

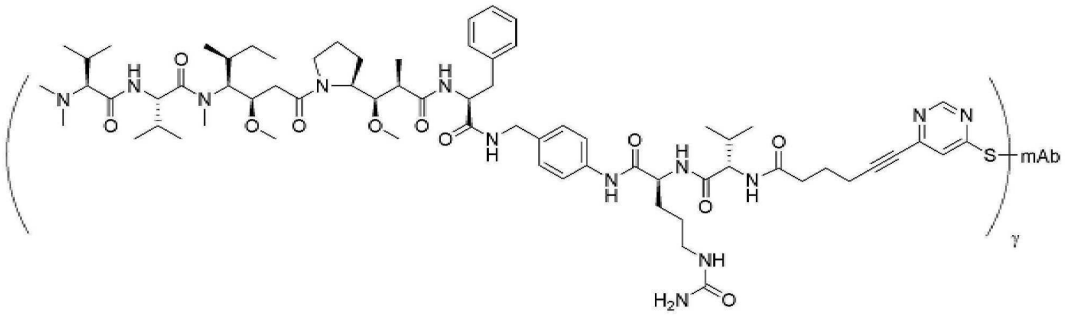
[0232] 

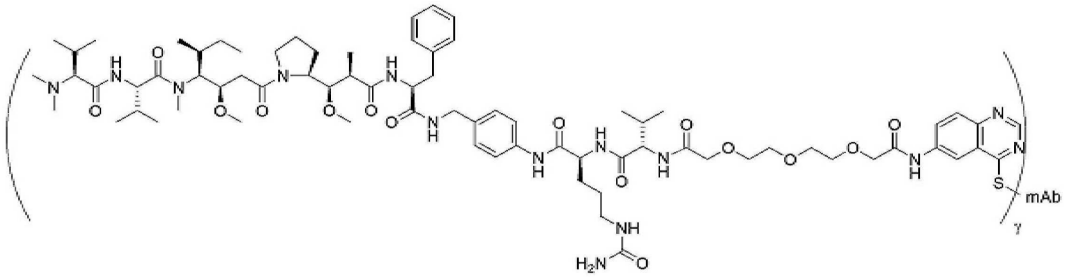
[0233] 

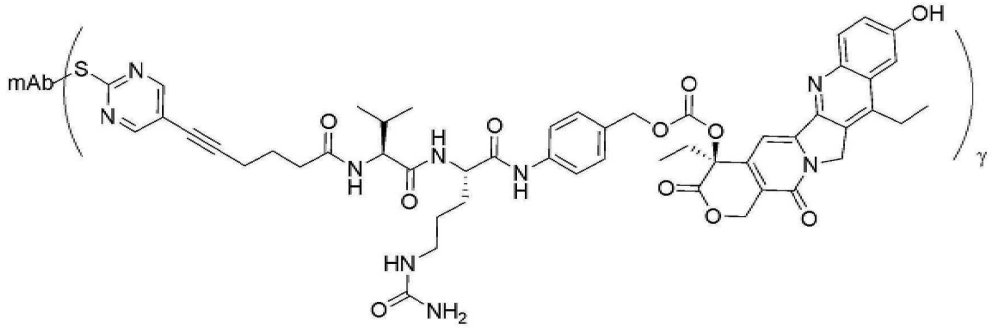
[0234] 

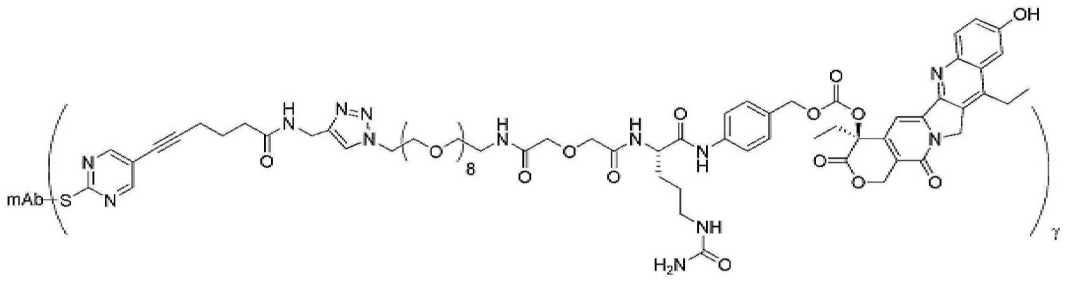
[0235] 

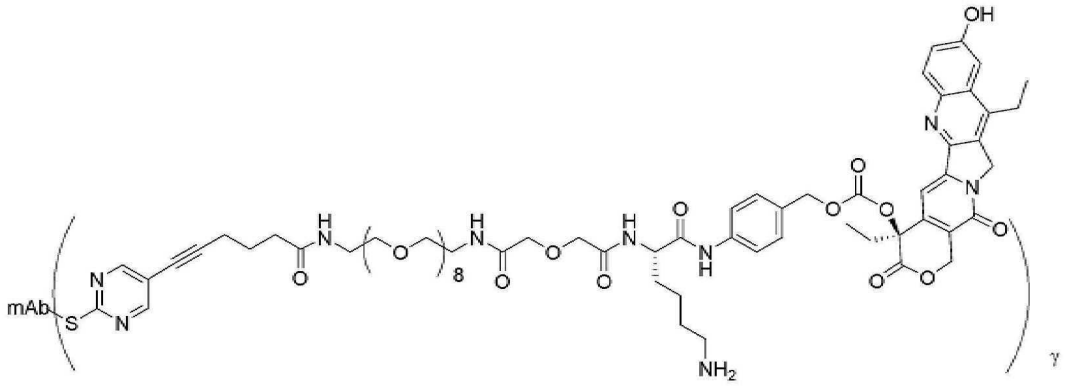
[0236] 

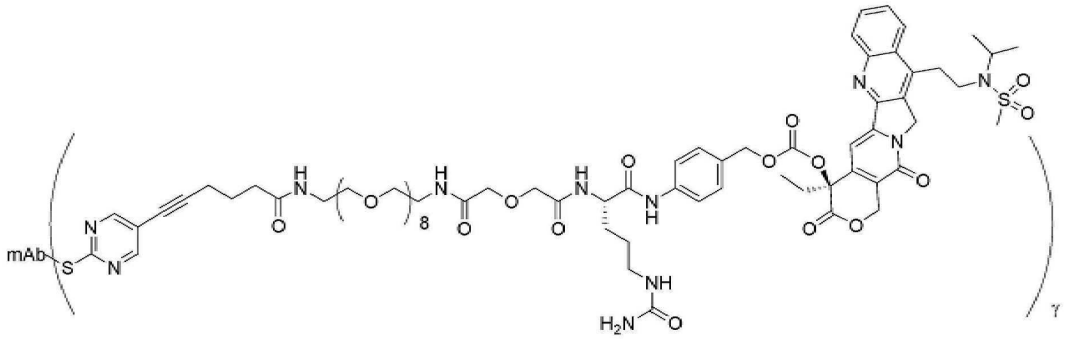
[0237] 

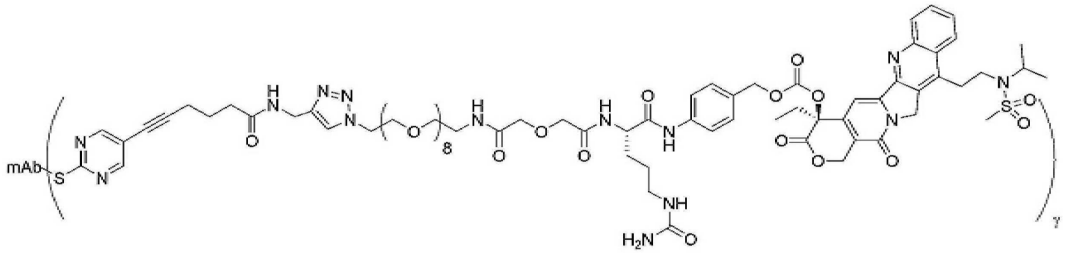
[0238] 

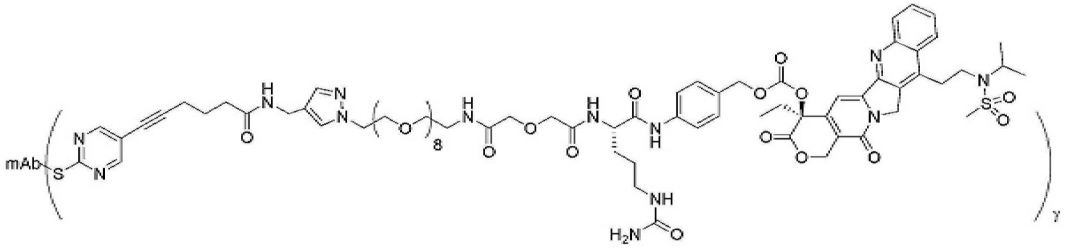
[0239] 

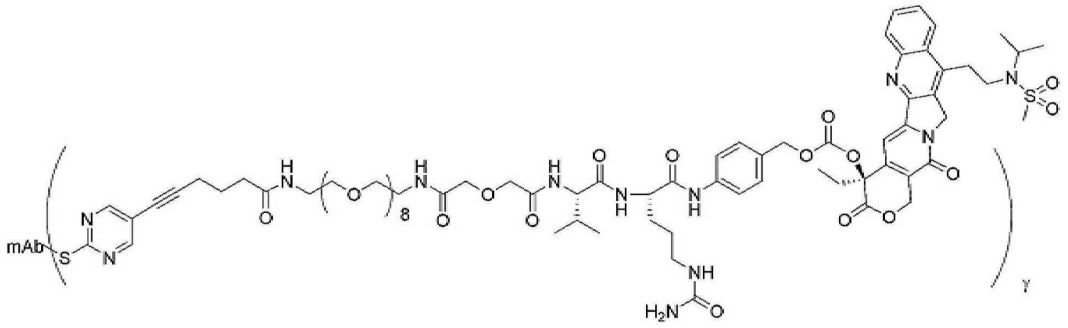
[0240] 

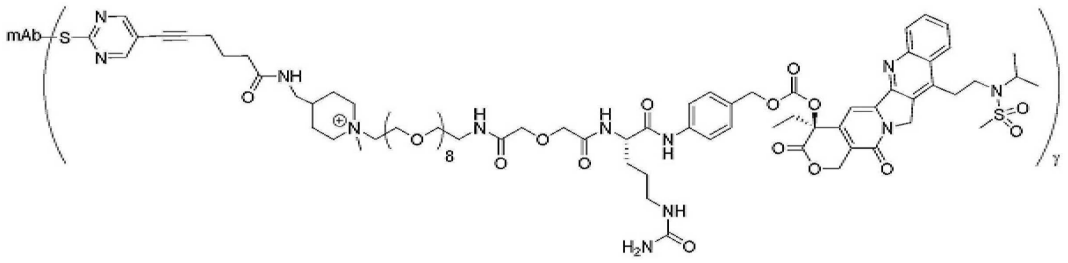
[0241] 

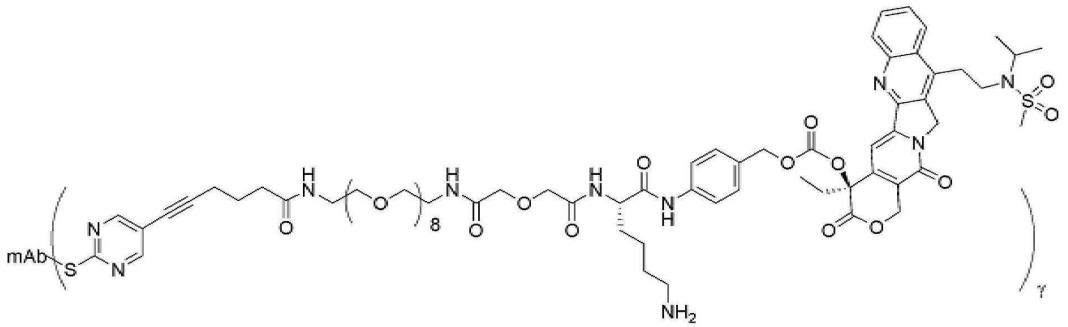
[0242] ,

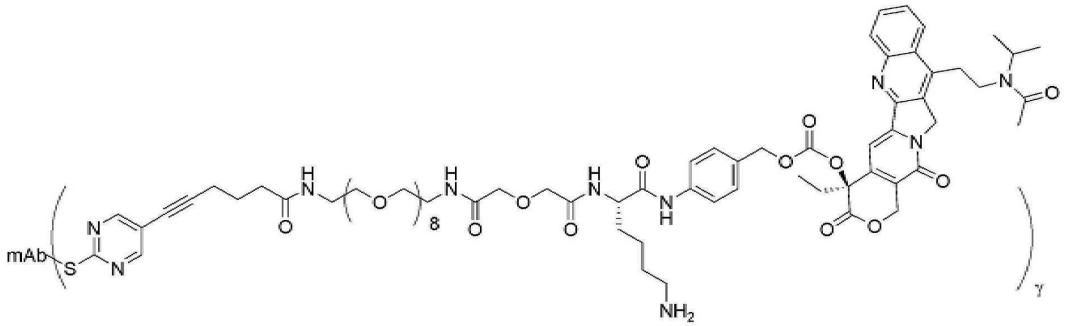
[0243] ,

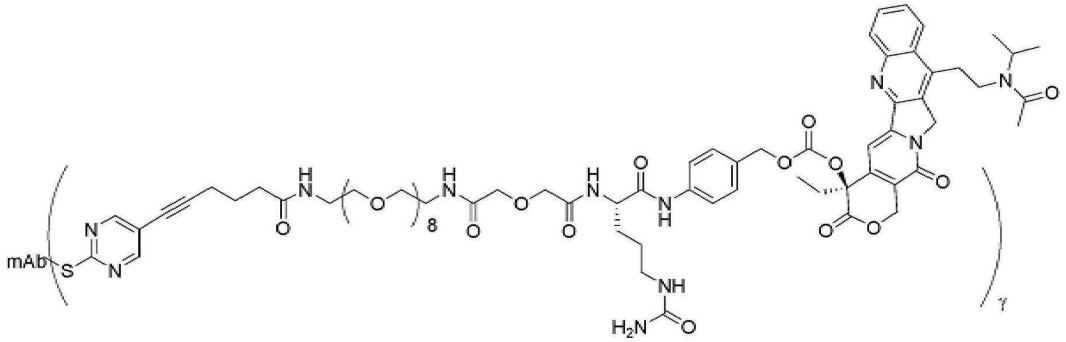
[0244] ,

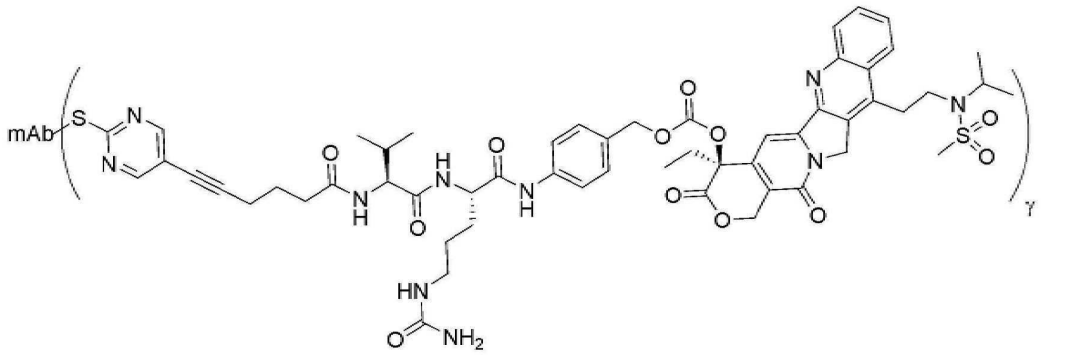
[0245] ,

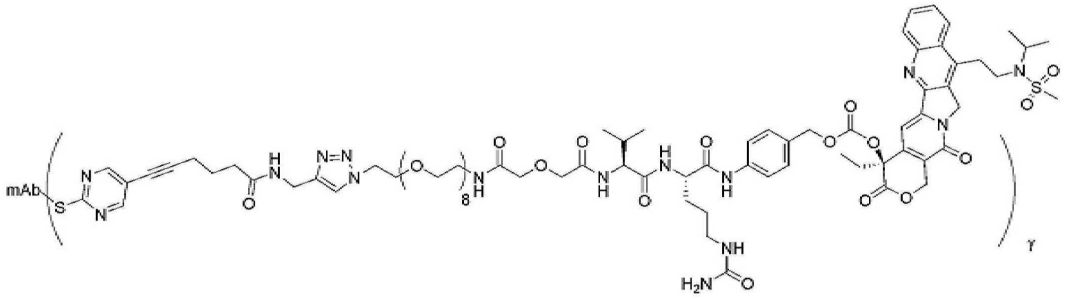
[0246] ,

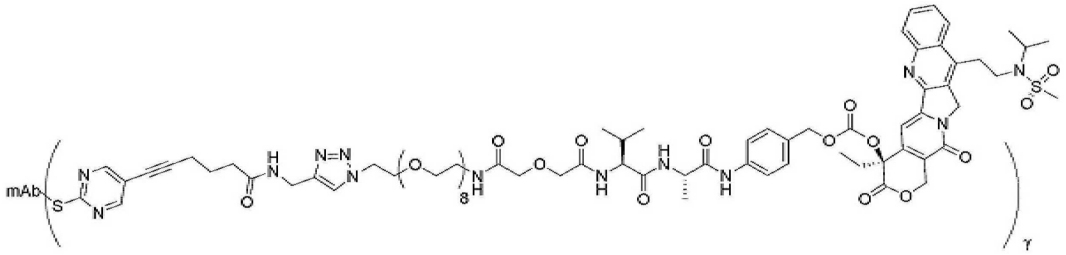
[0247] ,

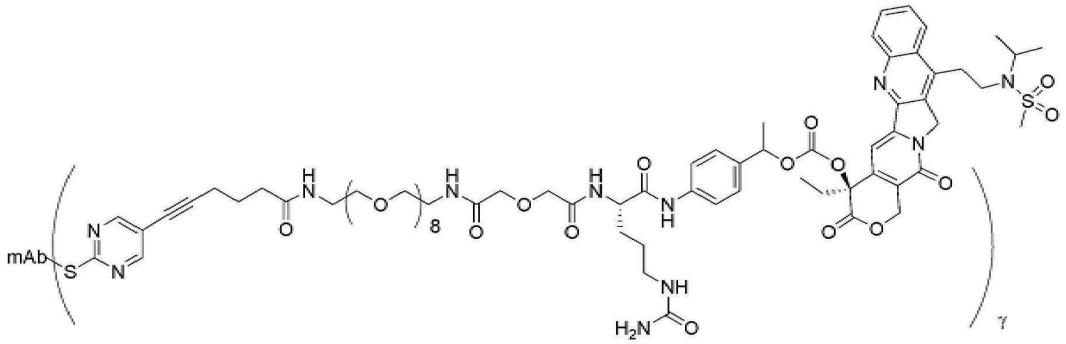
[0248] 

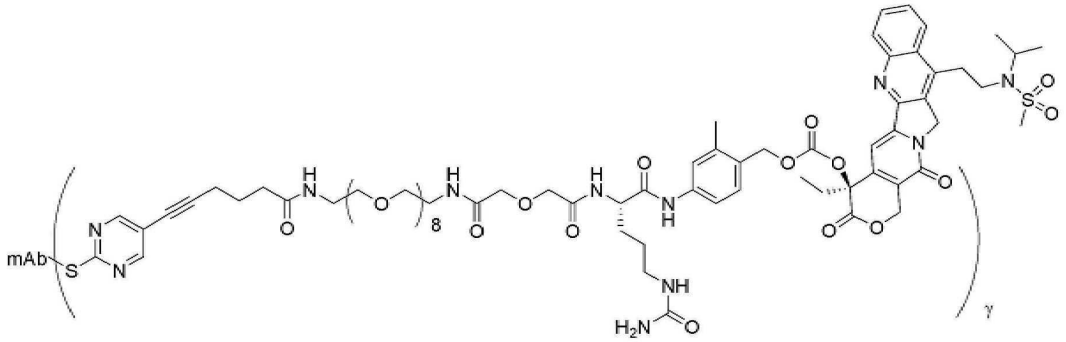
[0249] 

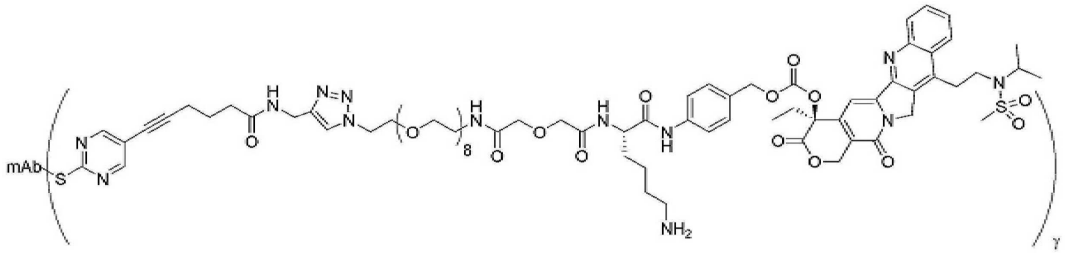
[0250] 

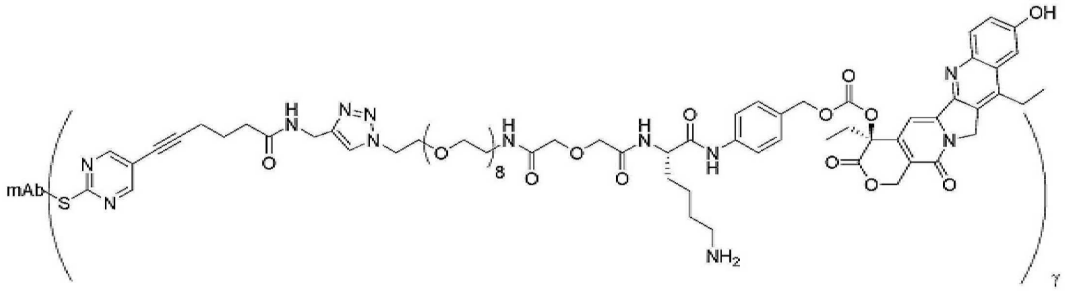
[0251] 

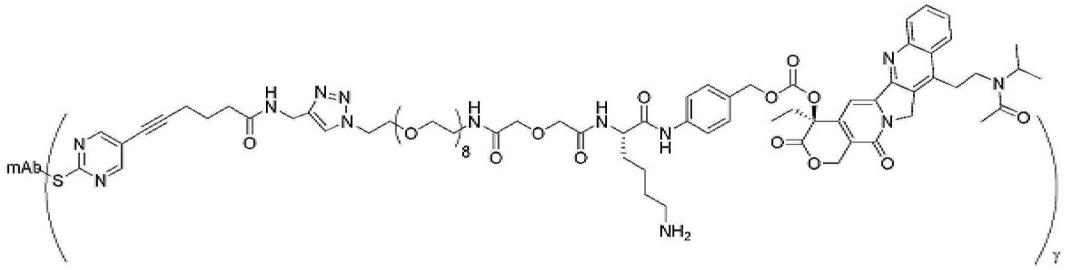
[0252] 

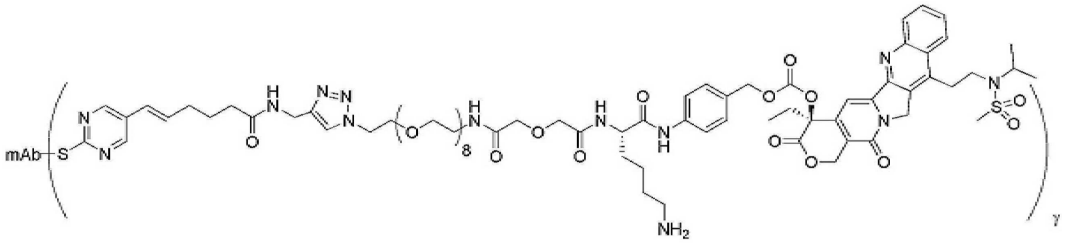
[0253] 

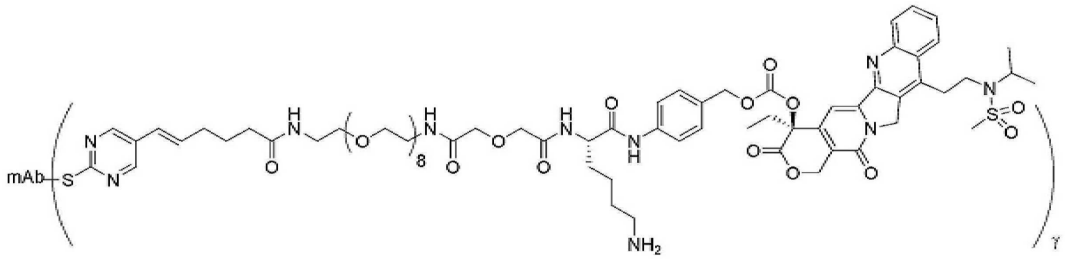
[0254] 

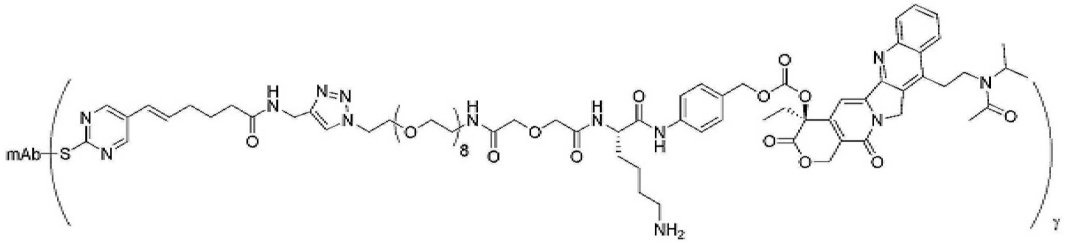
[0255] 

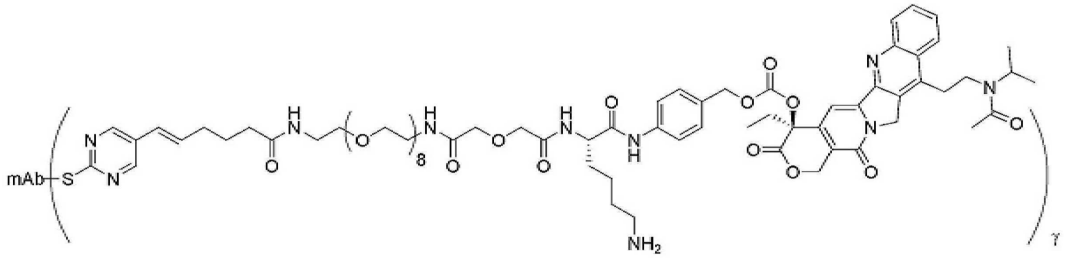
[0256] 

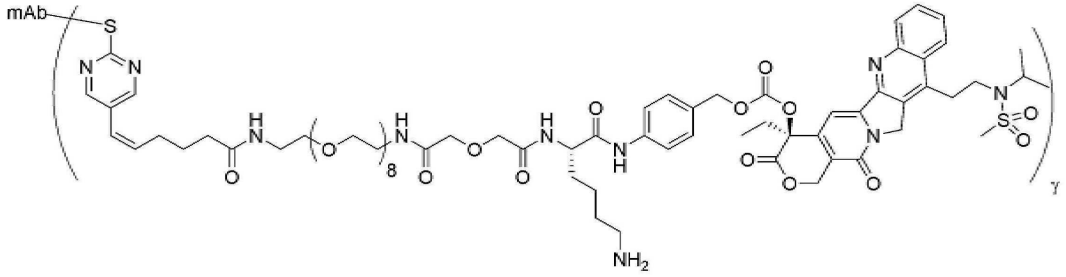
[0257] 

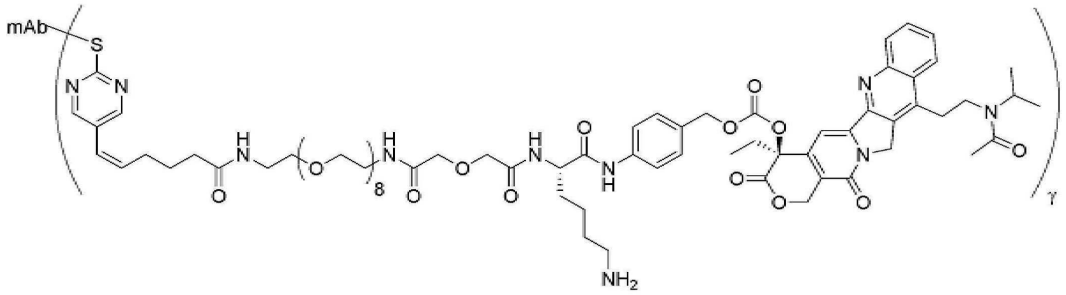
[0258] 

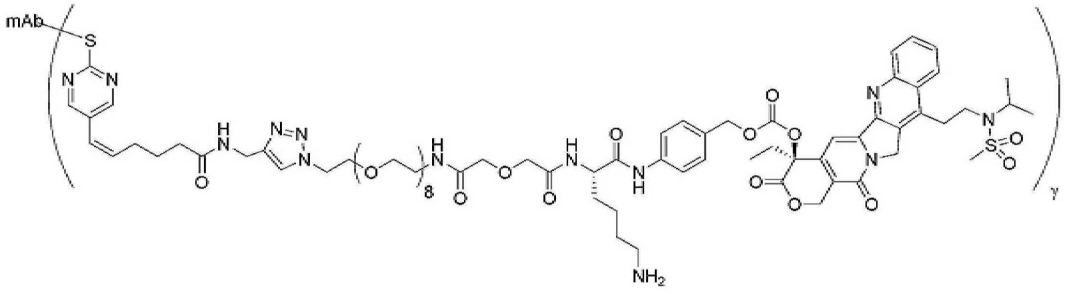
[0259] ,

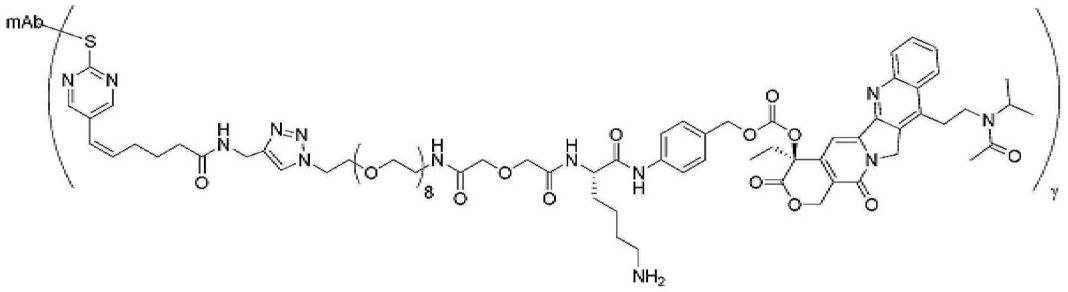
[0260] ,

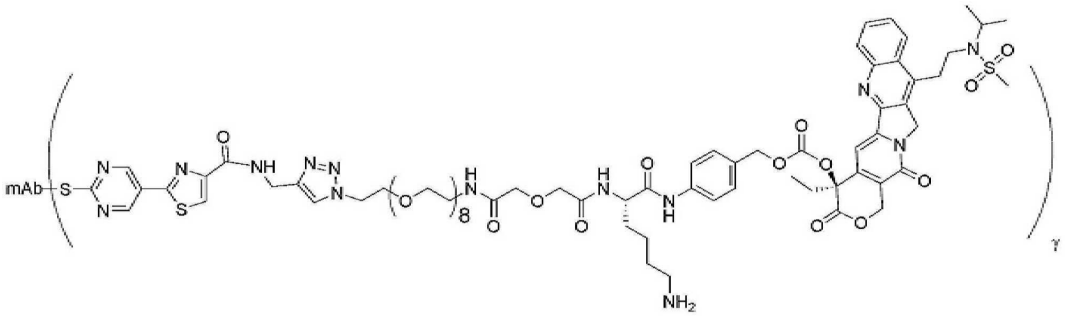
[0261] ,

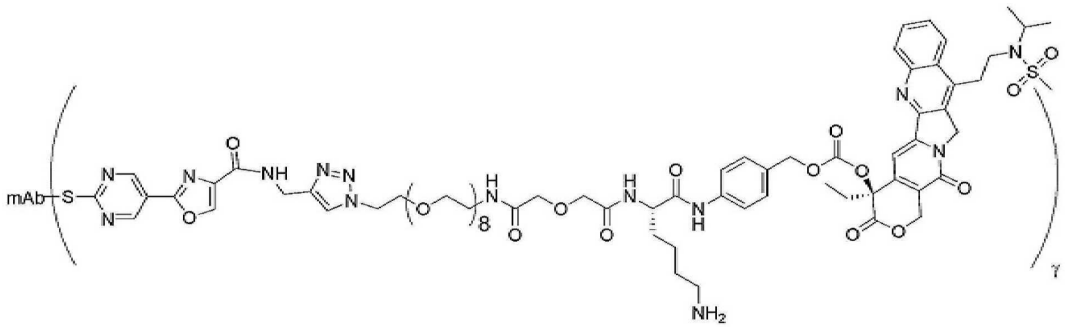
[0262] ,

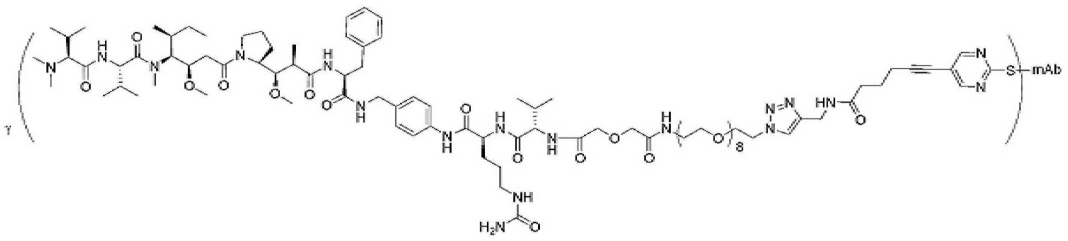
[0263] ,

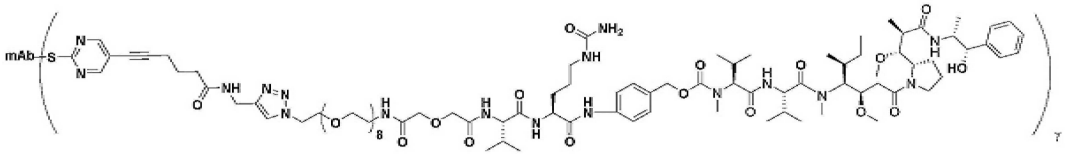
[0264] ,

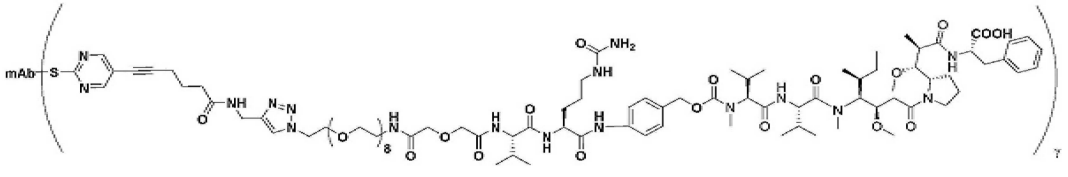
[0265] ,

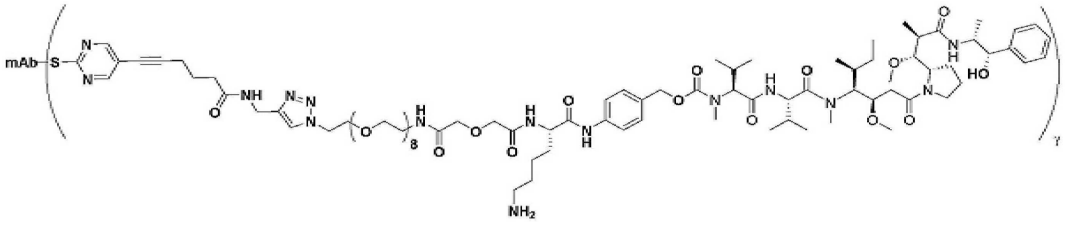
[0266] ,

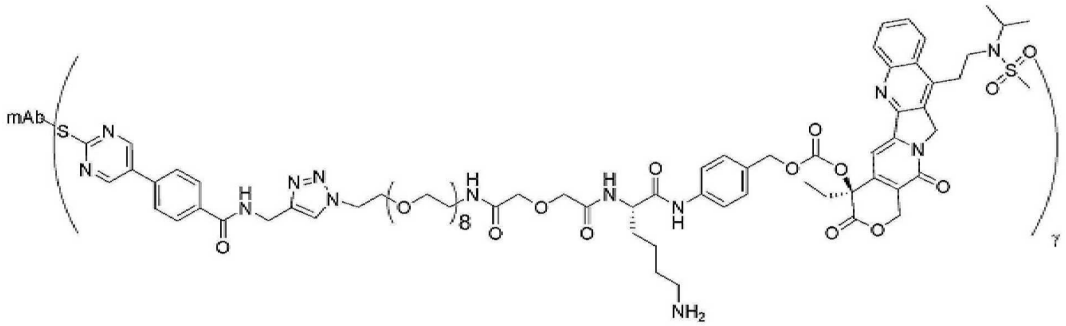
[0267] ,

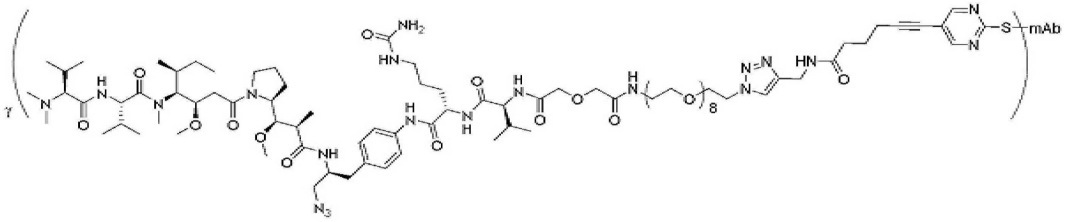
[0268] ,

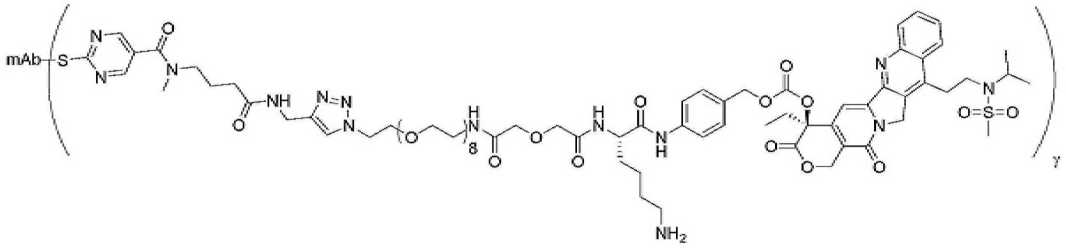
[0269] ,

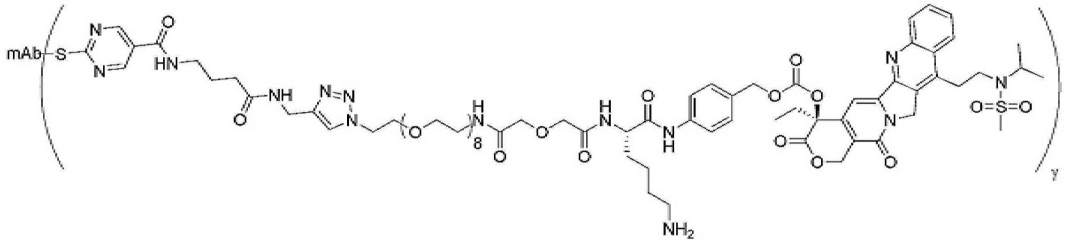
[0270] ,

[0271] ,

[0272] 
,

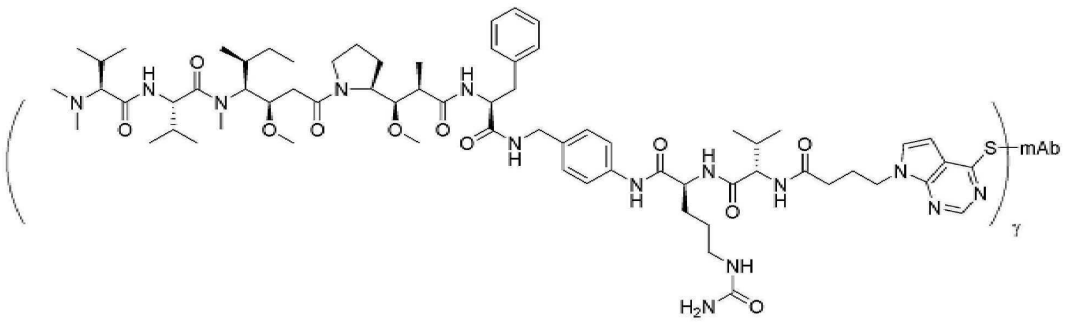
[0273] 
,

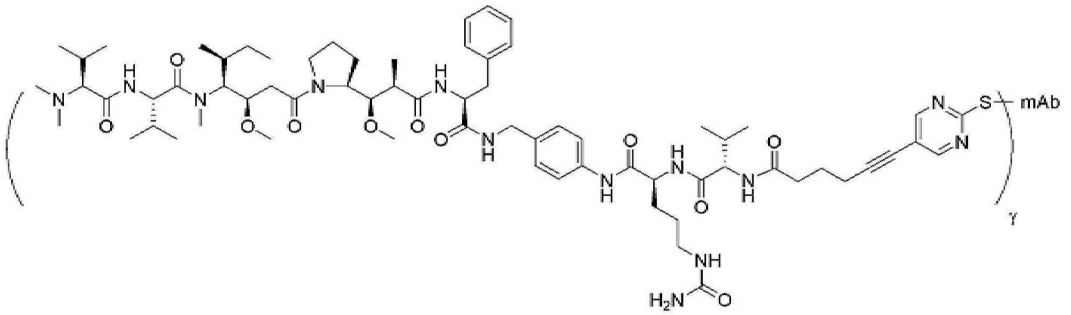
[0274] 
또는

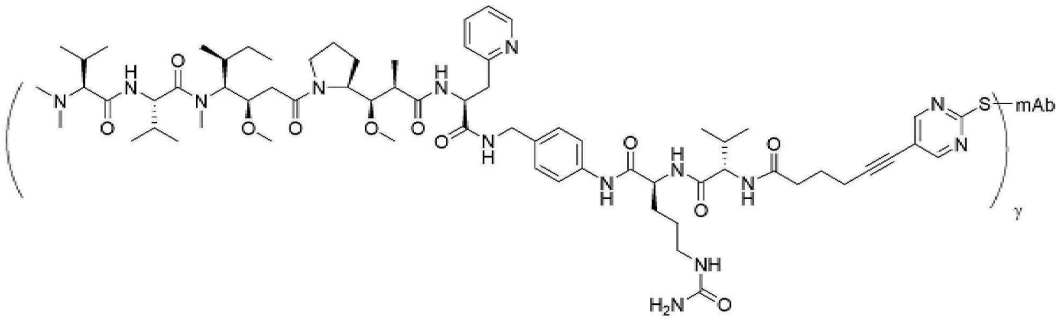
[0275] 
으로부터 선택되고,

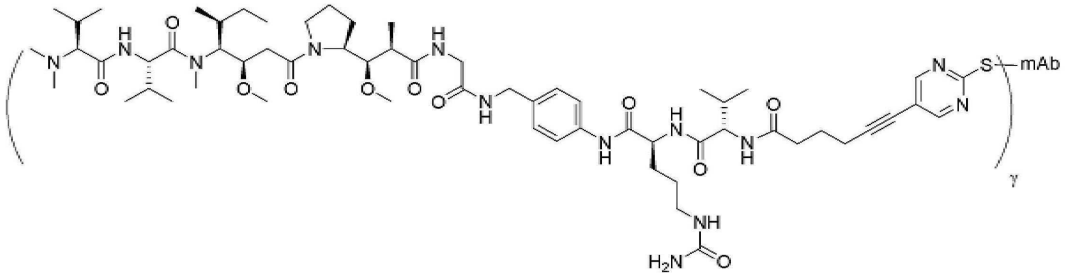
[0276] 여기서, y 은 1부터 10까지의 정수 또는 소수이며, mAb은 항-Trop-2 단일클론항체 또는 항-Her 2 단일클론항체이고; 바람직하게는, 상기 항-Trop-2 단일클론항체는 삭시투주맙, M1, M2 또는 M3의 항체로부터 선택되며, 상기 항-Her 2 단일클론항체는 트라스투주맙 또는 퍼투주맙이고; 바람직하게는, y 은 5부터 8까지의 정수 또는 소수이다(예: 5, 6, 7 또는 8).

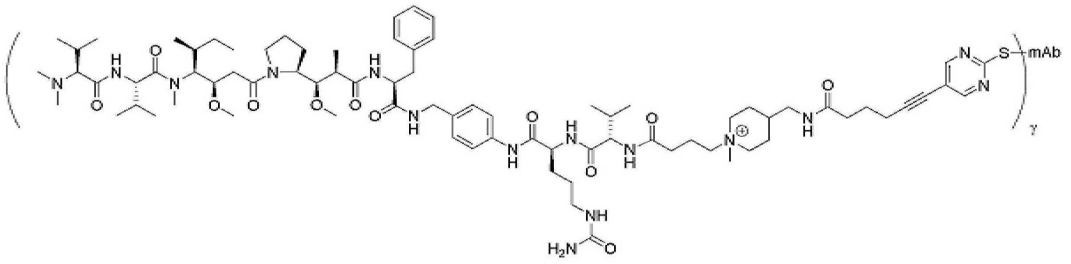
[0277] 일부 바람직한 구현예에서, 상기 접합체는:

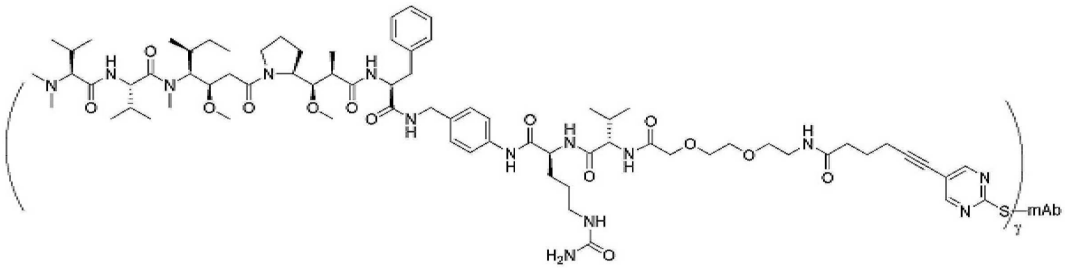
[0278] 
,

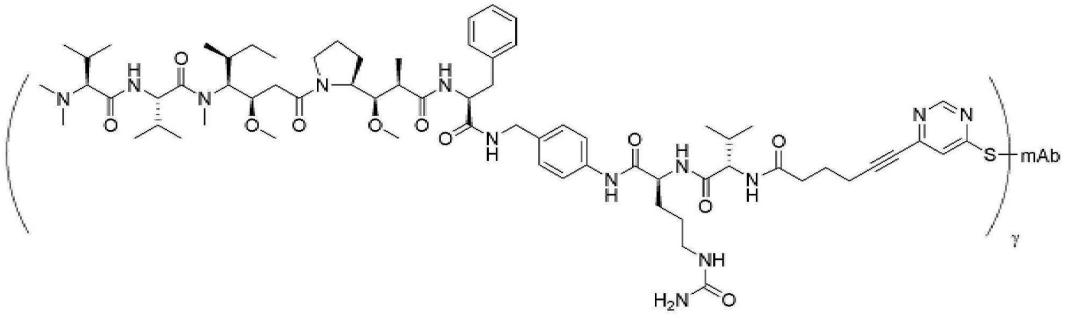
[0279] 

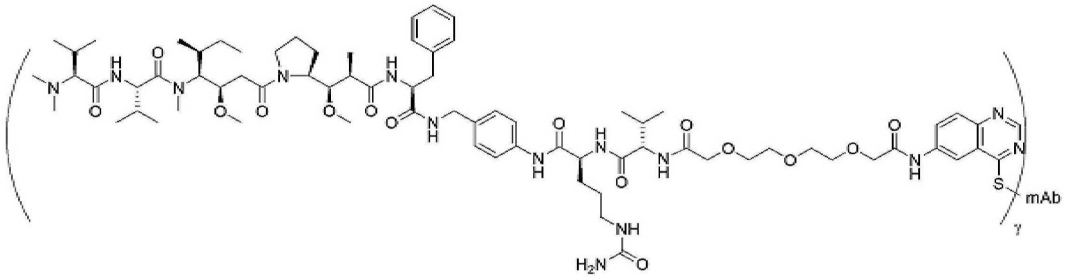
[0280] 

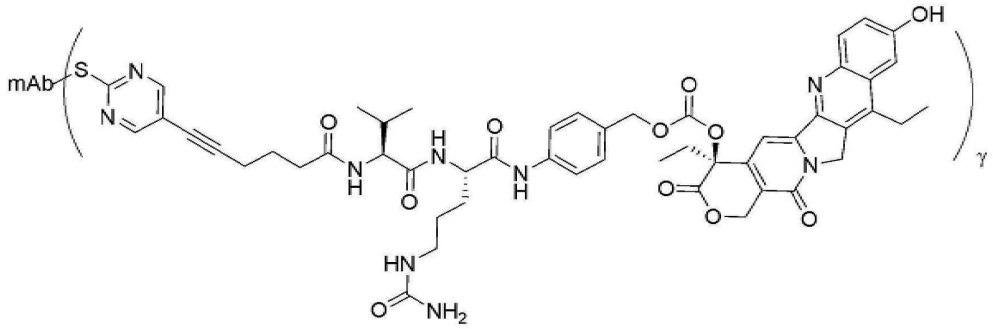
[0281] 

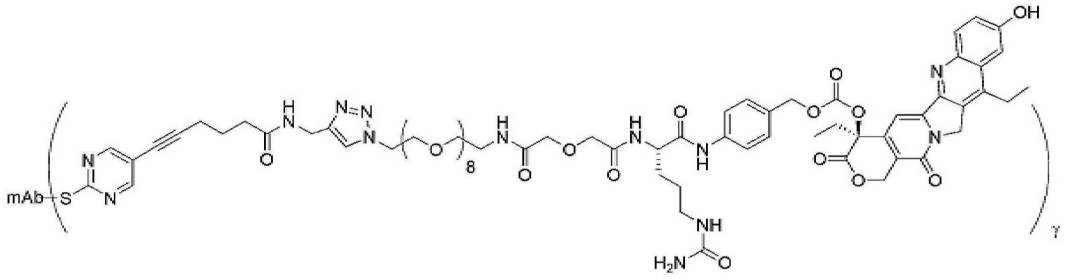
[0282] 

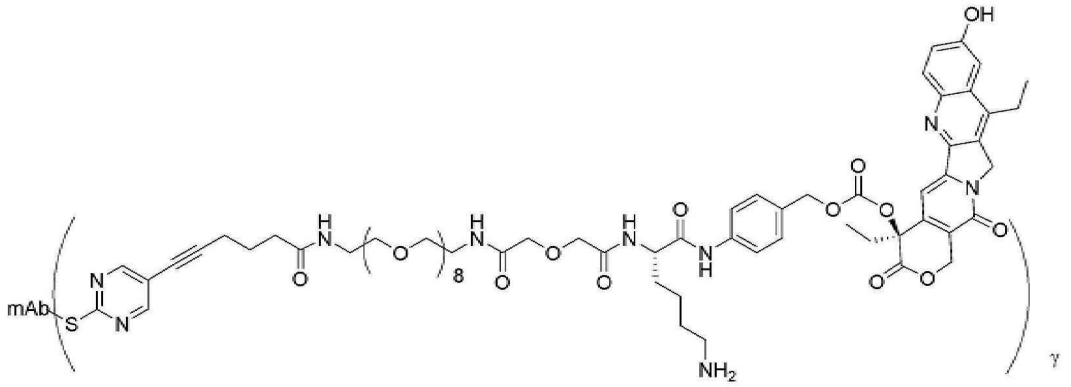
[0283] 

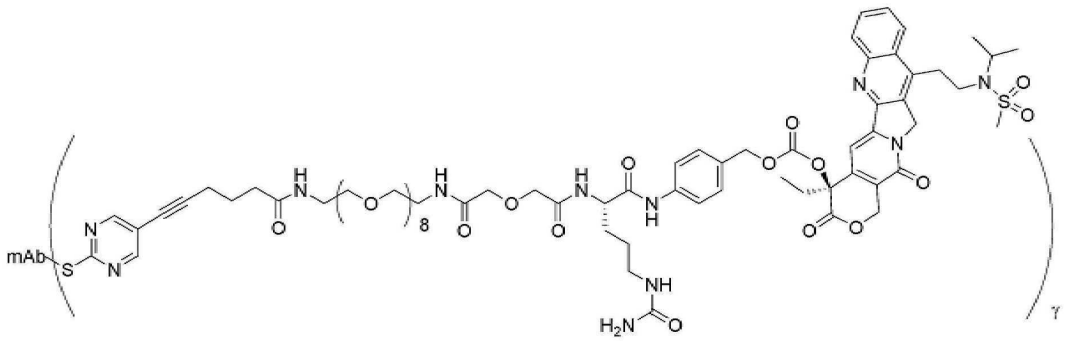
[0284] 

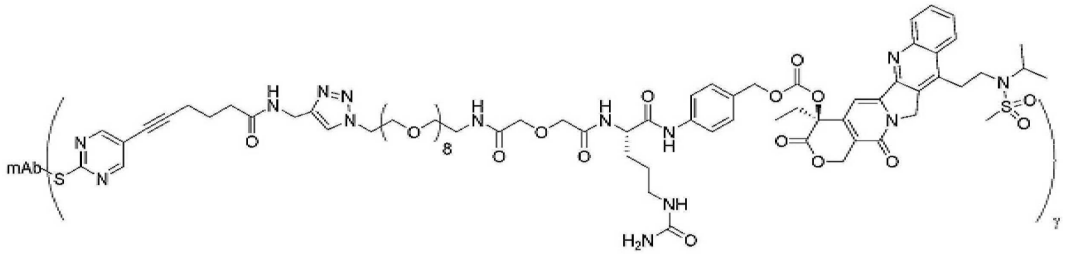
[0285] 

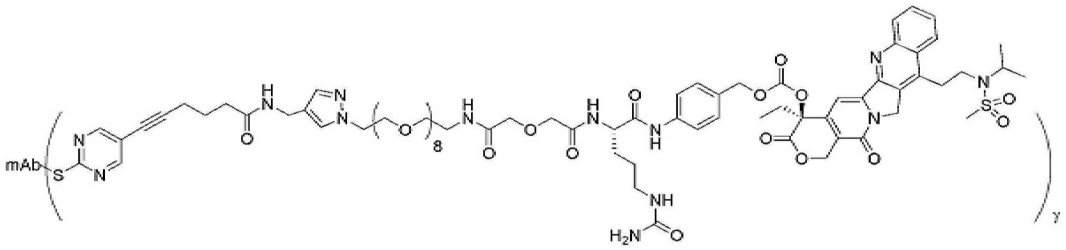
[0286] 

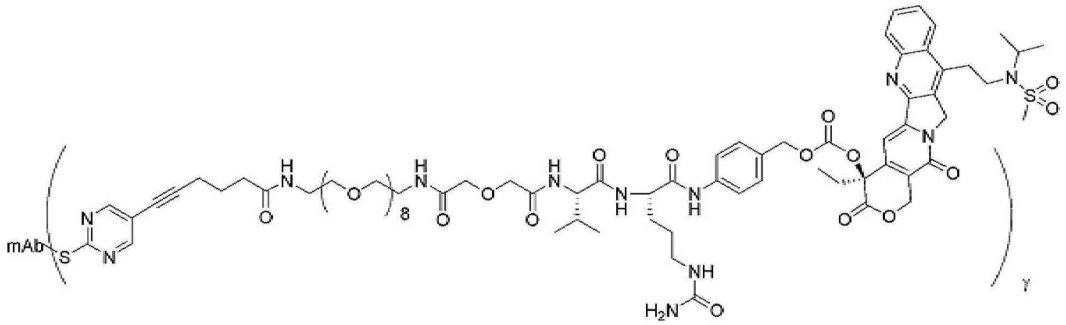
[0287] 

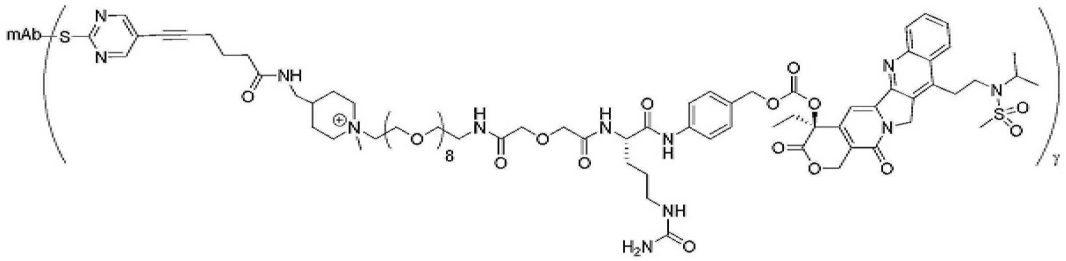
[0288] 

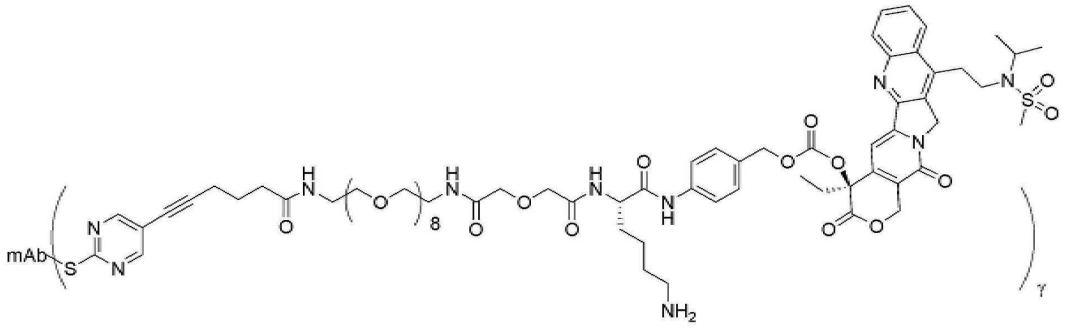
[0289] 

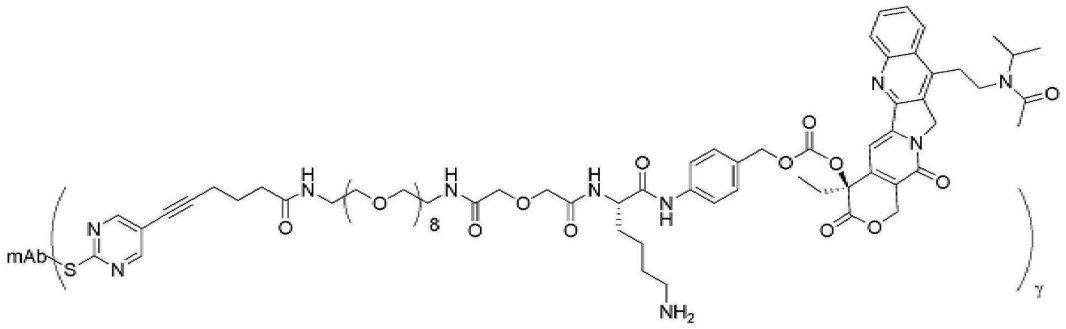
[0290] 

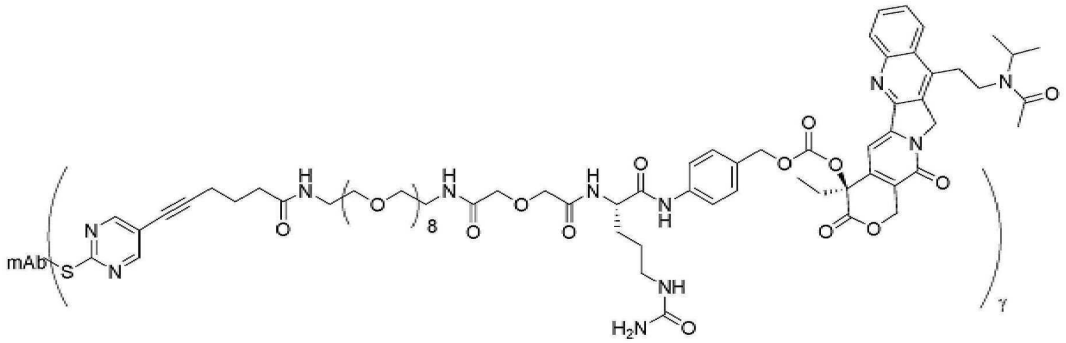
[0291] 

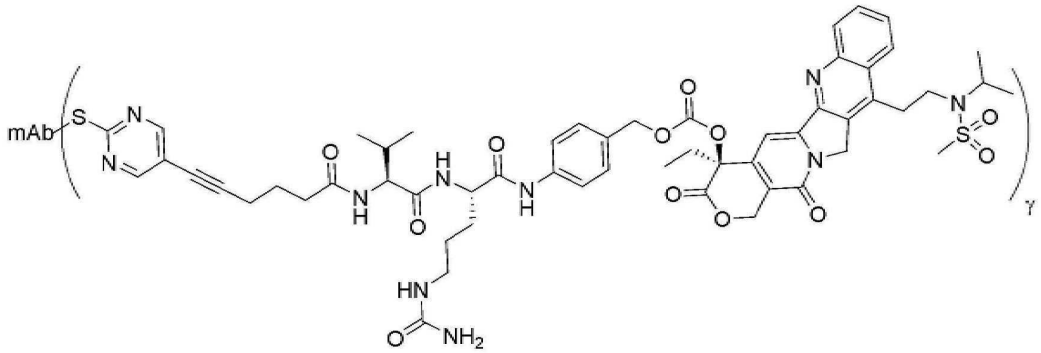
[0292] 

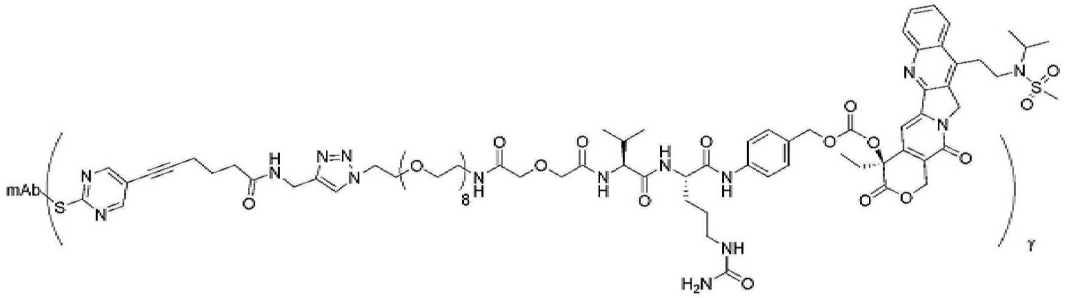
[0293] 

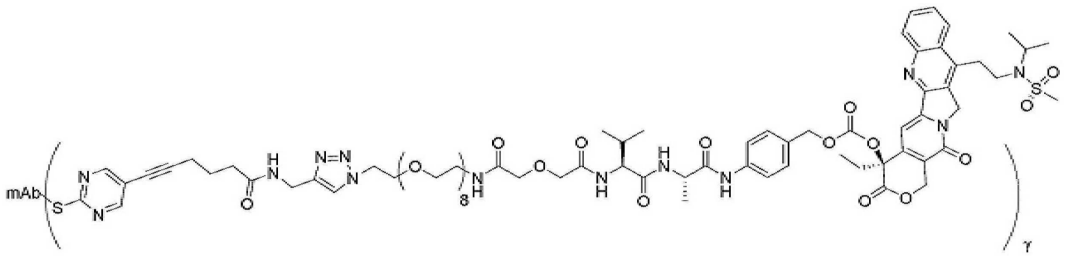
[0294] 

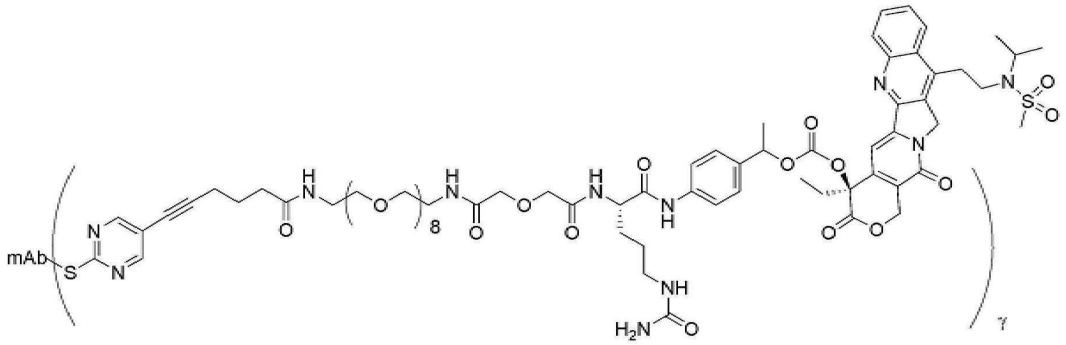
[0295] 

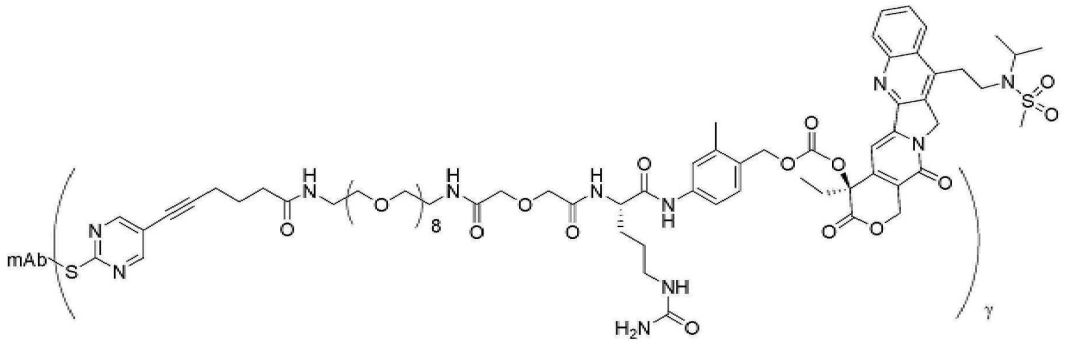
[0296] 

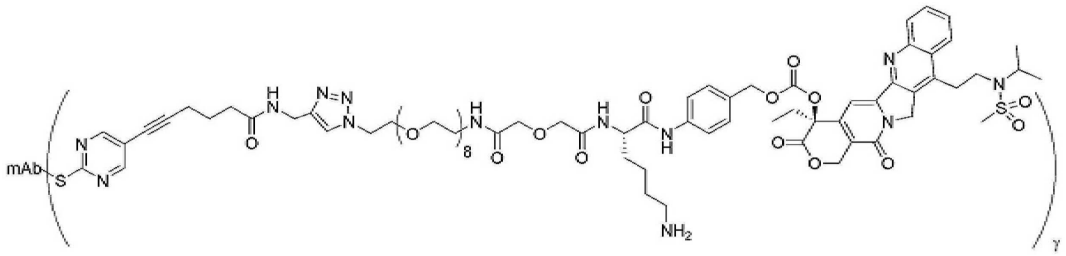
[0297] 

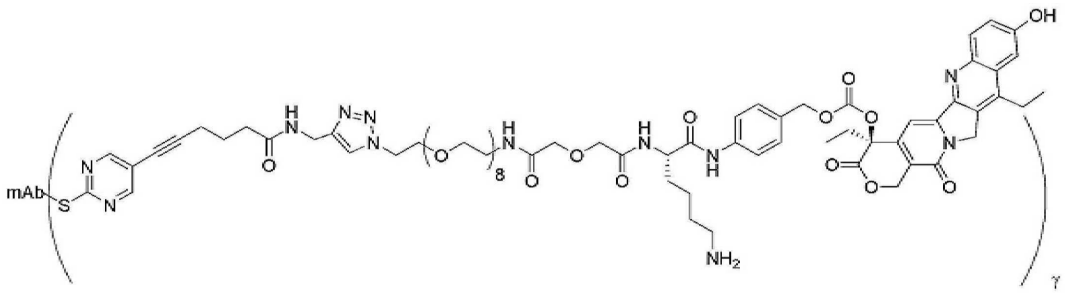
[0298] 

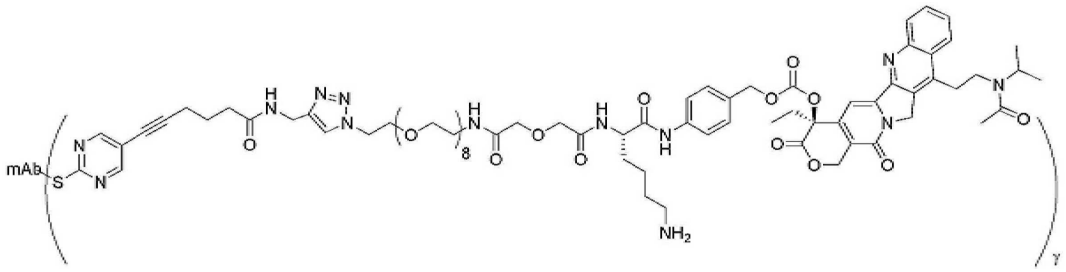
[0299] 

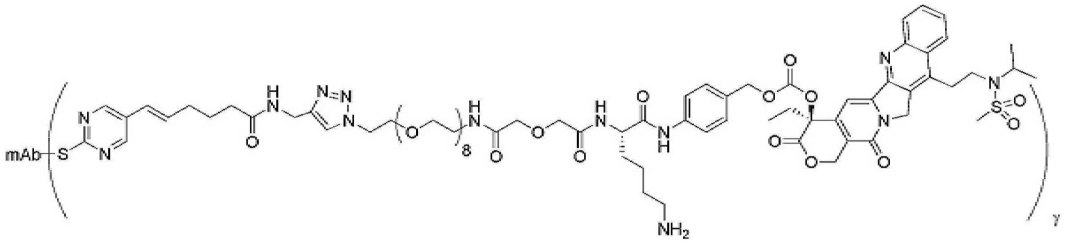
[0300] 

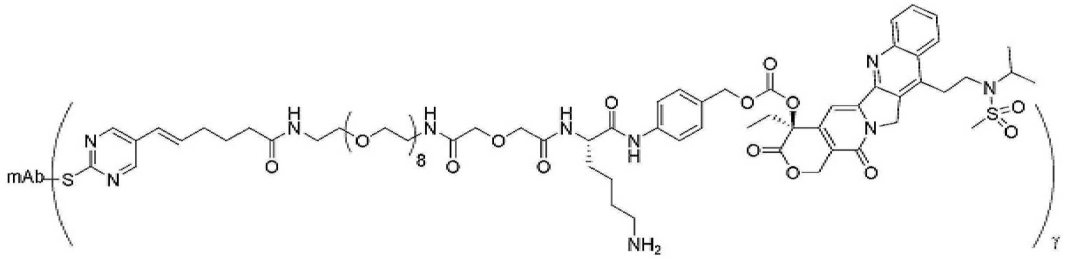
[0301] 

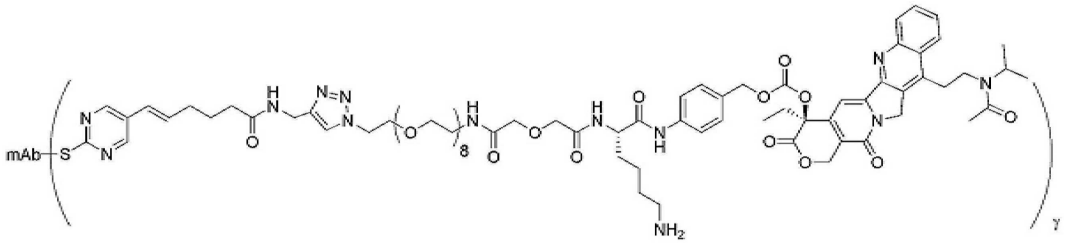
[0302] 

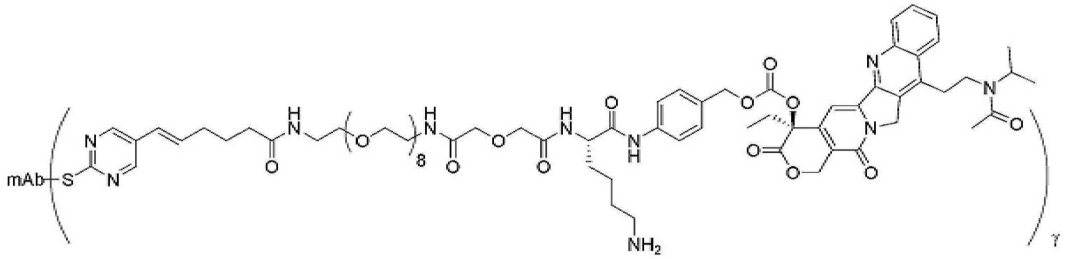
[0303] 

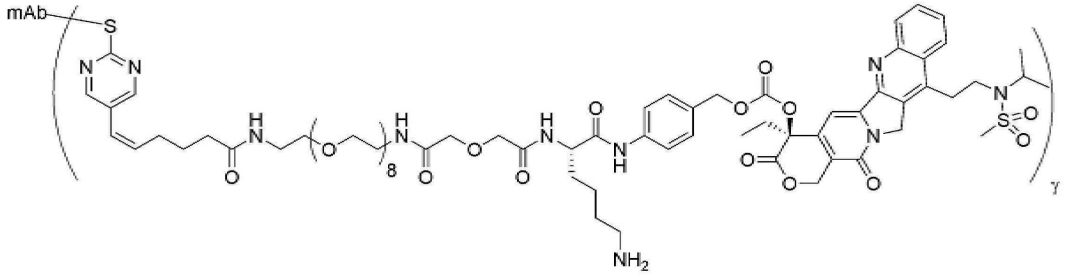
[0304] 

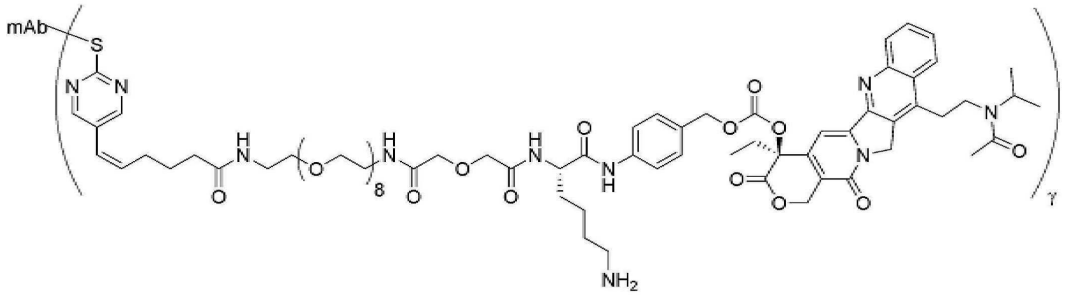
[0305] 

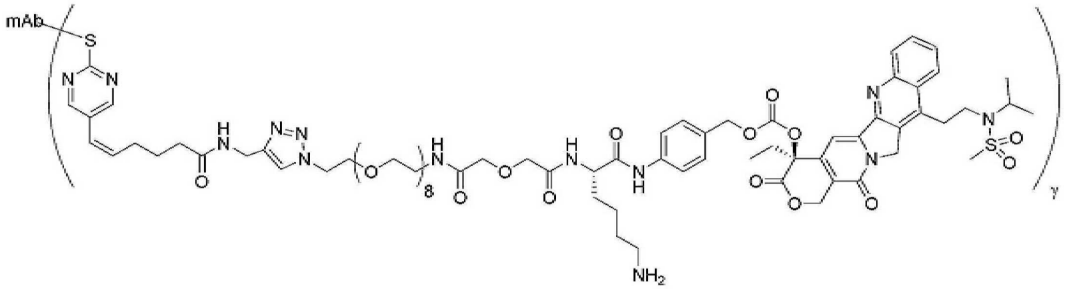
[0306] 

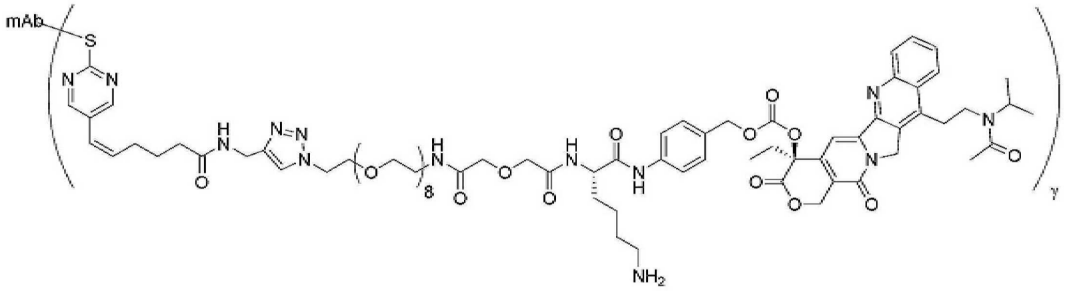
[0307] 
,

[0308] 
,

[0309] 
,

[0310] 
,

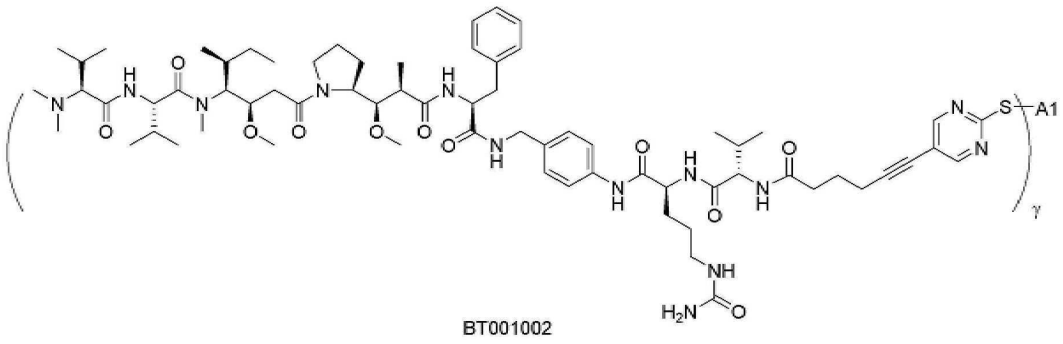

또는

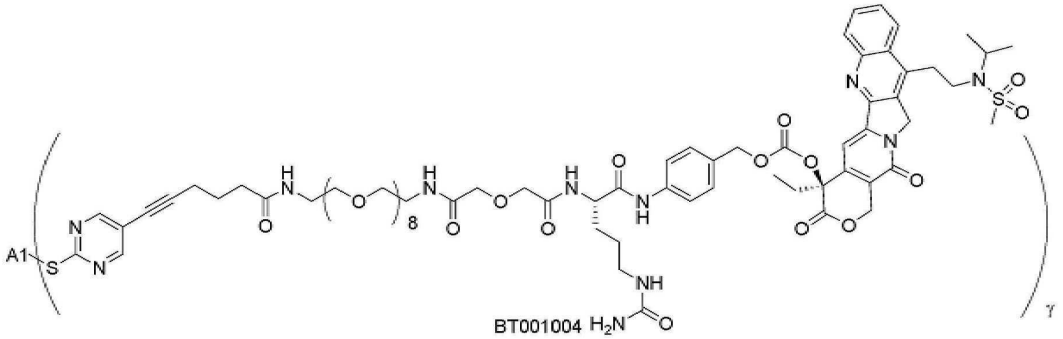

으로부터 선택되고,

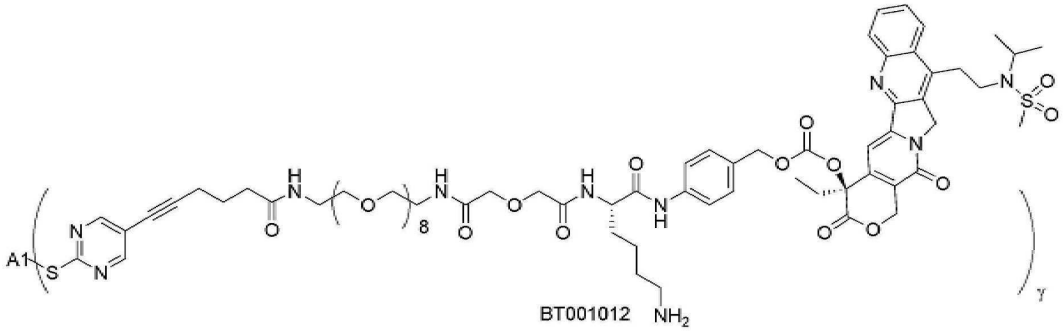
[0311] 여기서, γ은 1부터 10까지의 정수 또는 소수이며, mAb은 항-Trop-2 단일클론항체 또는 항-Her 2 단일클론항체이며; 바람직하게는, 상기 항-Trop-2 단일클론항체는 삭시투주맙으로부터 선택되고, 상기 항-Her 2 단일클론항

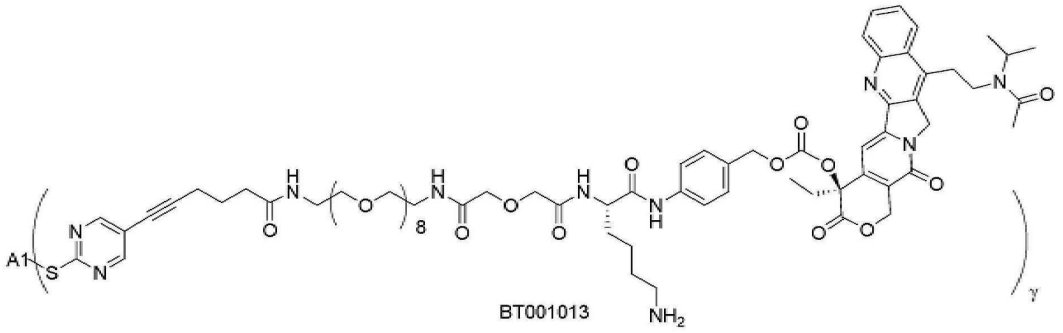
체는 트라스투주맙 또는 퍼투주맙으로부터 선택되며; 바람직하게는, γ은 5부터 8까지의 정수 또는 소수이다(예: 5, 6, 7 또는 8).

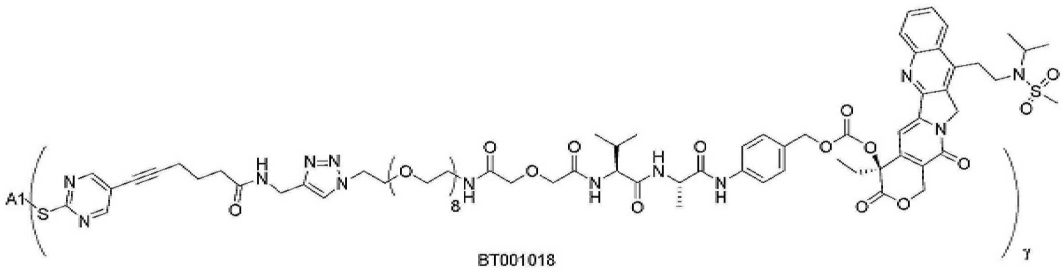
[0312] 일부 바람직한 구현예에서, 상기 접합체는:

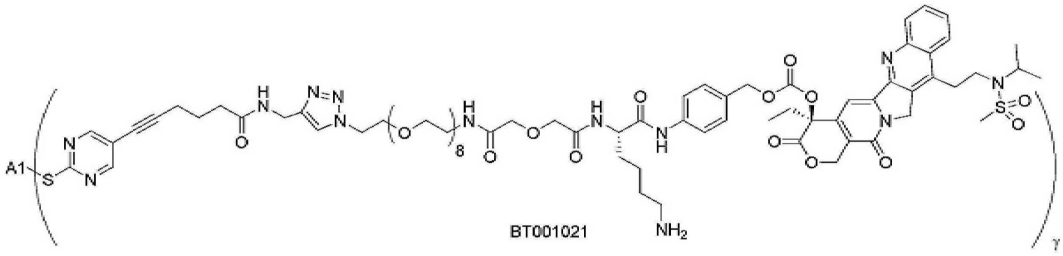
[0313] 
BT001002 ,

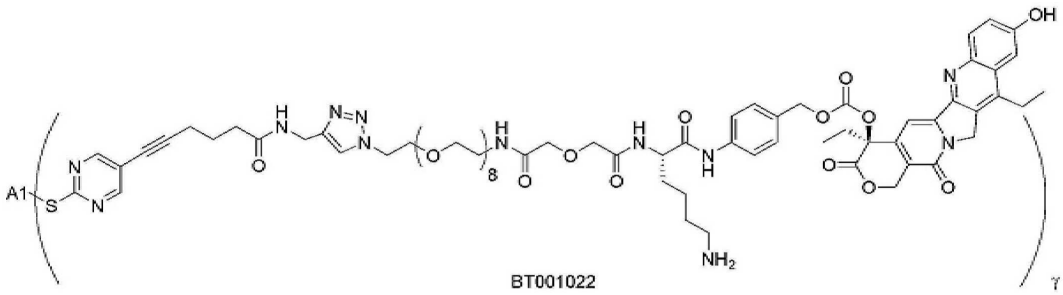
[0314] 
BT001004 ,

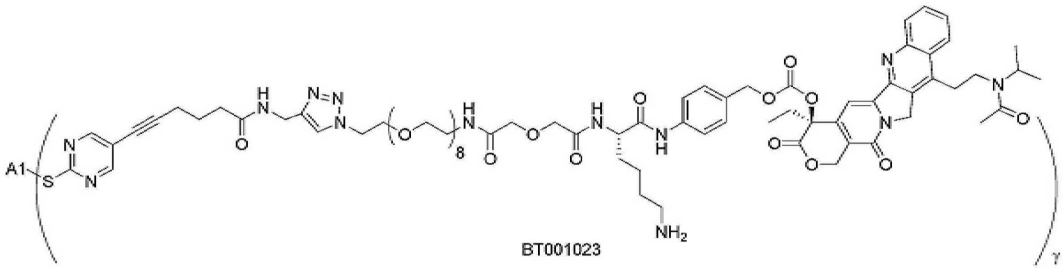
[0315] 
BT001012 ,

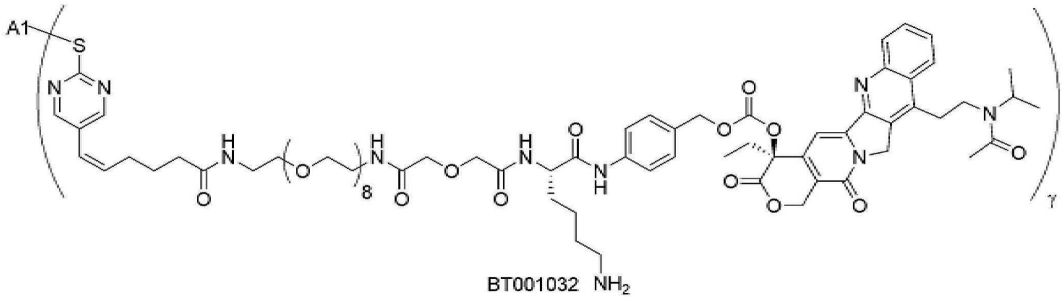
[0316] 
BT001013 ,

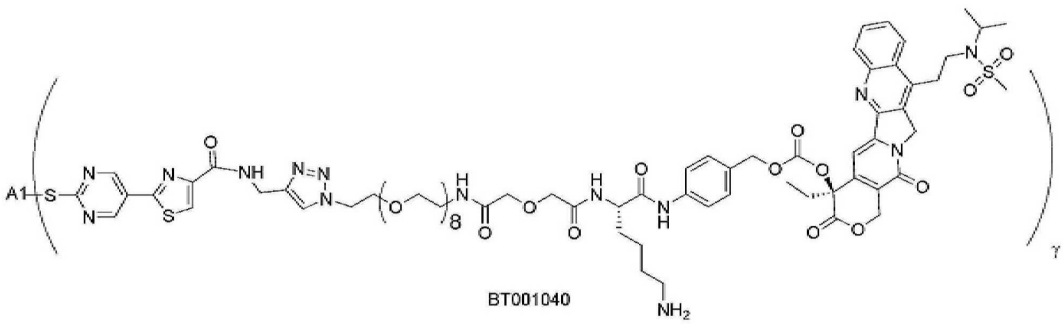
[0317] 
BT001018 ,

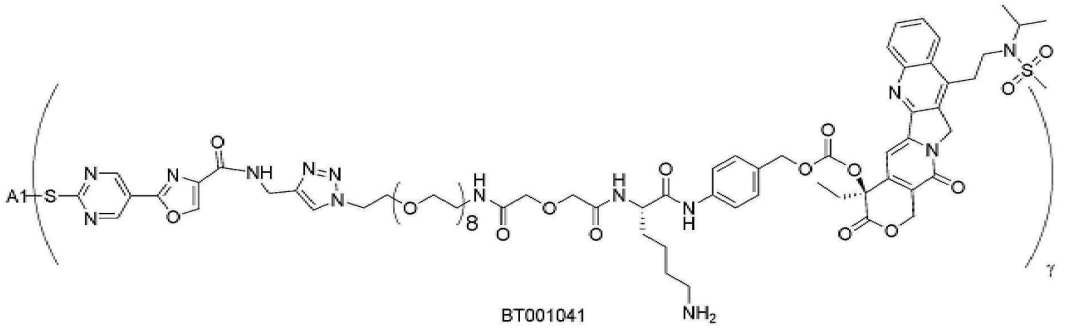
[0318] 

[0319] 

[0320] 

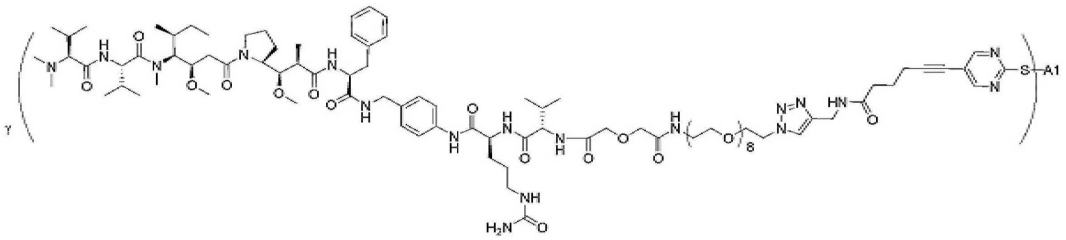
[0321] 

[0322] 



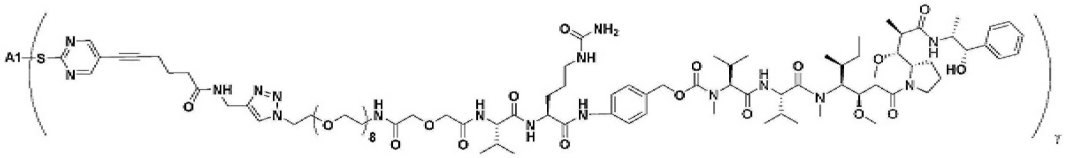
BT001041

[0323] ,



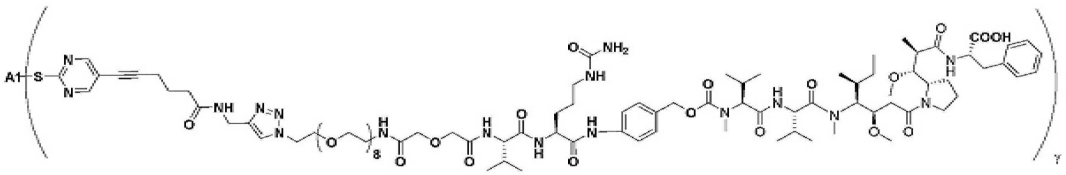
BT001042

[0324] ,



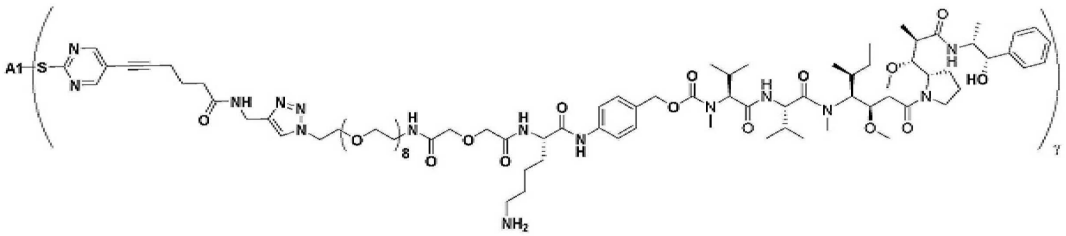
BT001043

[0325] ,



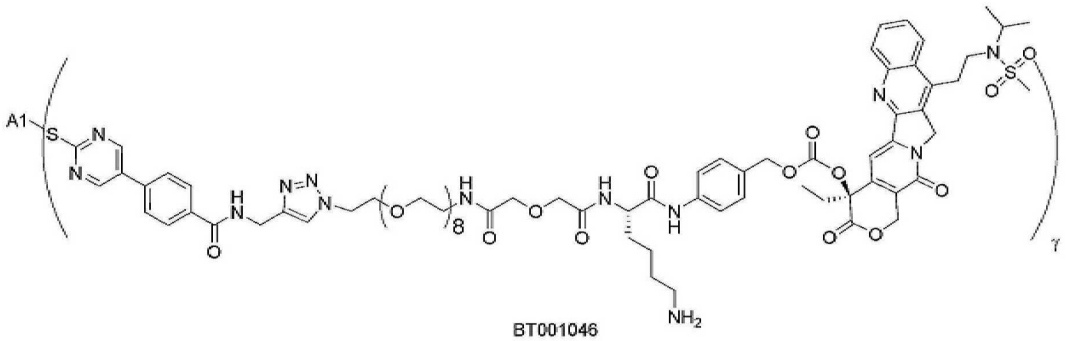
BT001044

[0326] ,



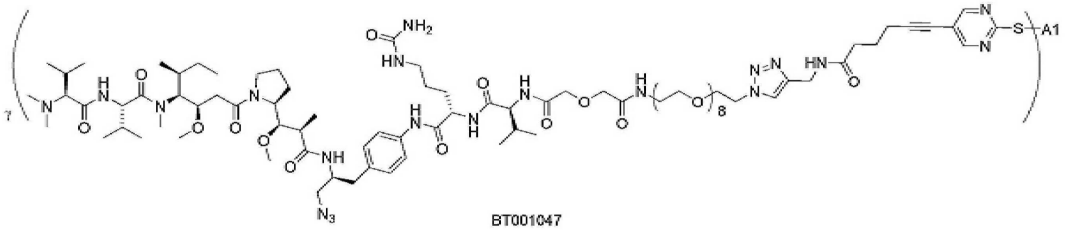
BT001045

[0327] ,



BT001046

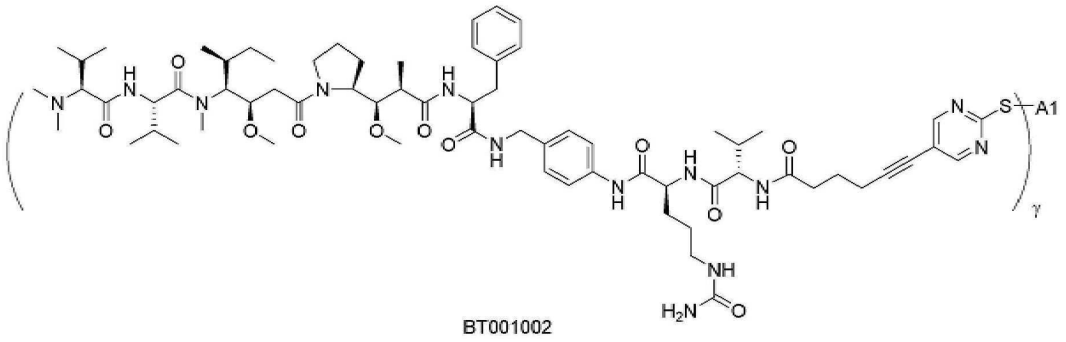
[0328] 또는



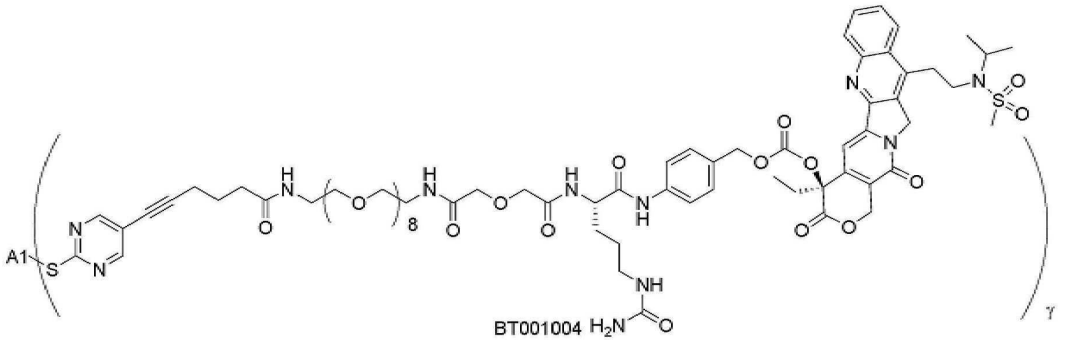
[0329] 이며 ;

[0330] 여기서, A1은 삭시투주맙이고, γ은 1부터 10까지의 정수 또는 소수이며; 바람직하게는, γ은 5부터 8까지의 정수 또는 소수, 예를 들어, 6-7, 6-7.5, 6-8, 6.5-7, 6.5-7.5, 6.5-8, 7-8 또는 7.5-8로부터의 정수 또는 소수이다.

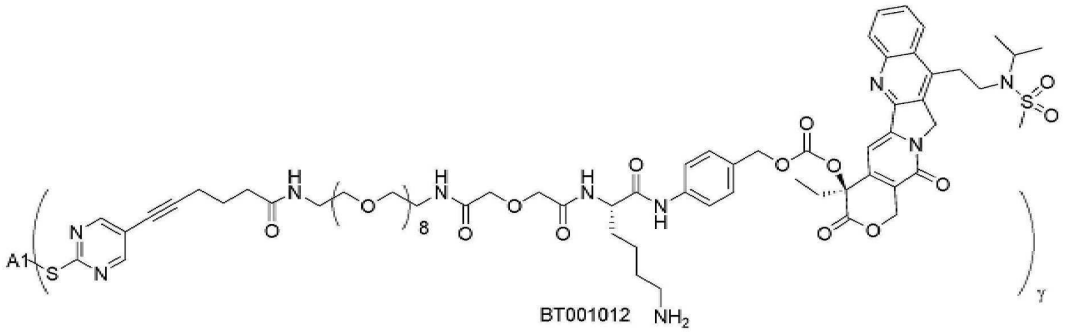
[0331] 일부 바람직한 구현예에서, 상기 접합체는:

[0332] 

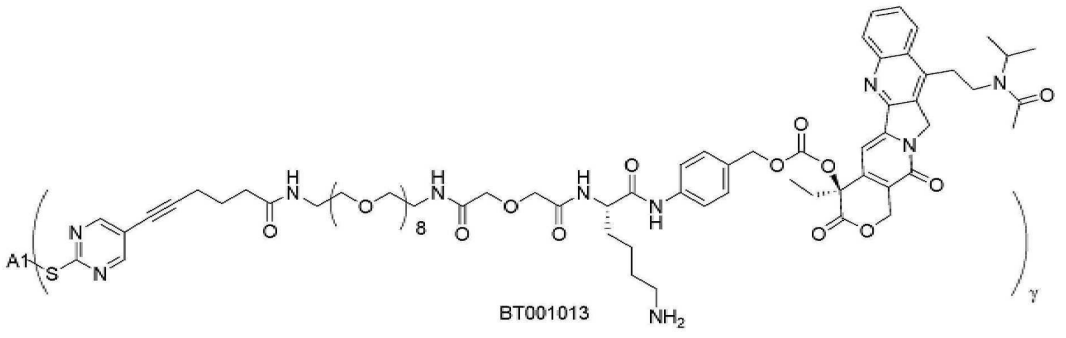
,

[0333] 

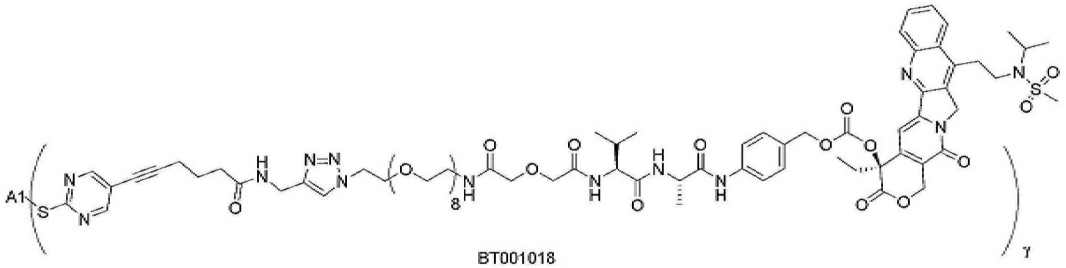
,

[0334] 

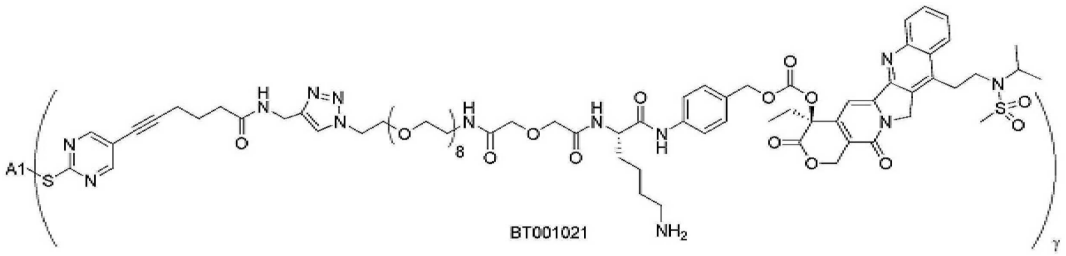
,

[0335] 

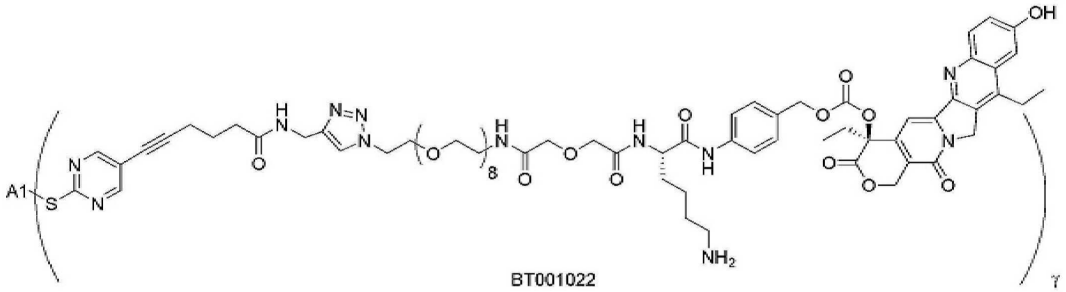
,

[0336] 

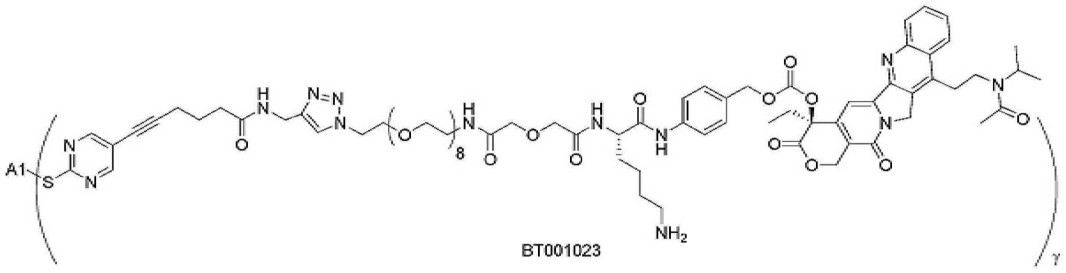
,

[0337] 

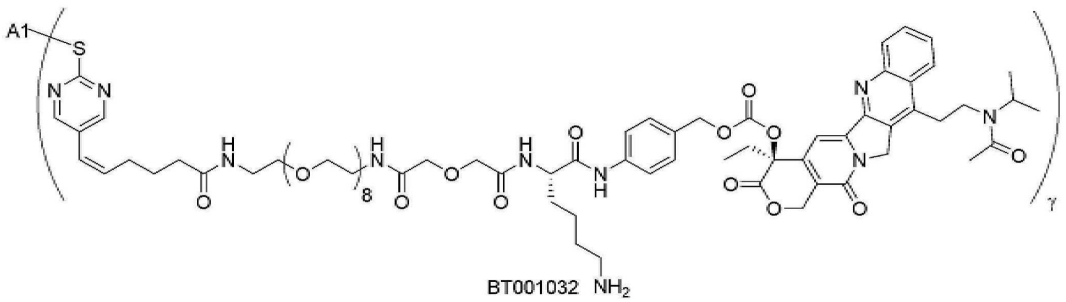
,

[0338] 

,

[0339] 

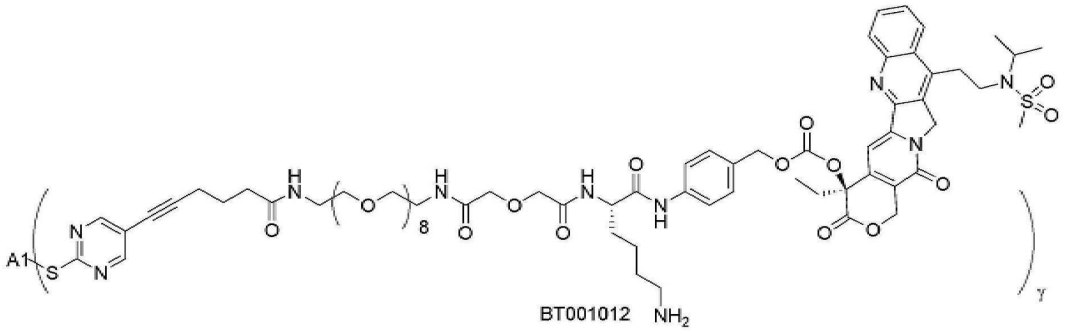
또는

[0340] 

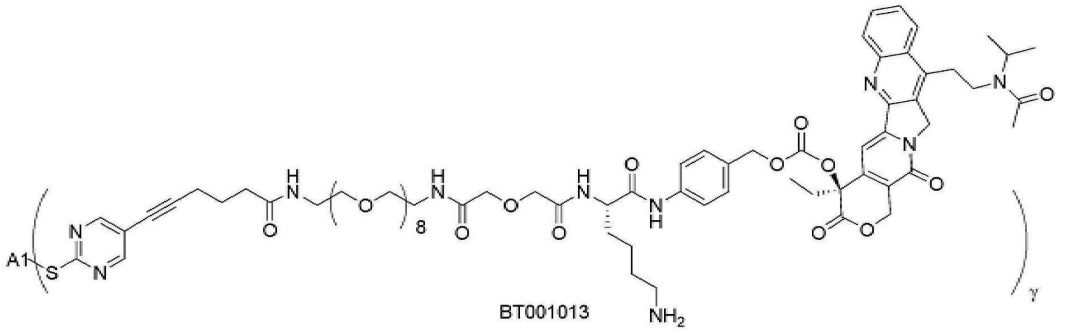
이며;

[0341] 여기서, A1은 삭시투주맙이고, ɣ은 1부터 10까지의 정수 또는 소수이며; 바람직하게는, ɣ은 5부터 8까지의 정수 또는 소수, 예를 들어, 6-7, 6-7.5, 6-8, 6.5-7, 6.5-7.5, 6.5-8, 7-8 또는 7.5-8의 정수 또는 소수이다.

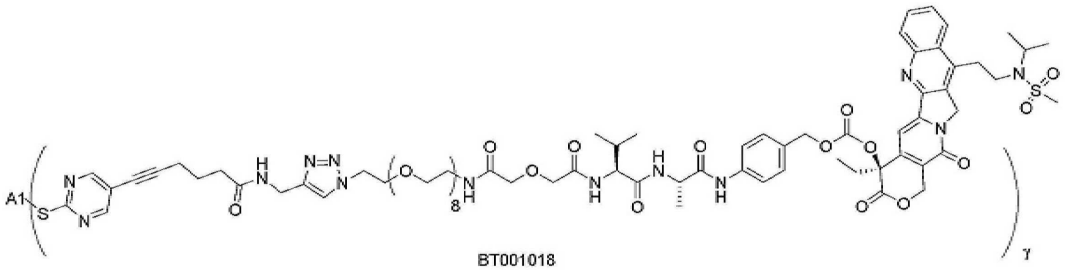
[0342] 일부 바람직한 구현예에서, 상기 접합체는:

[0343] 

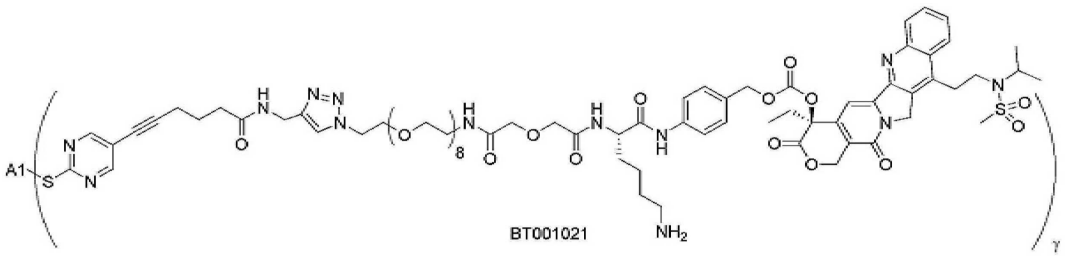
,



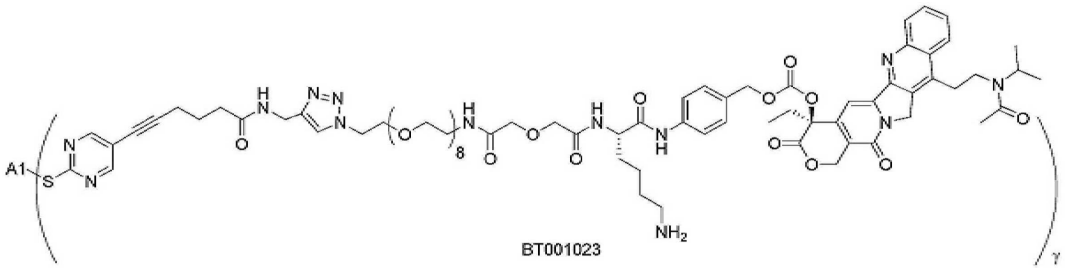
,

[0344] 

,

[0345] 

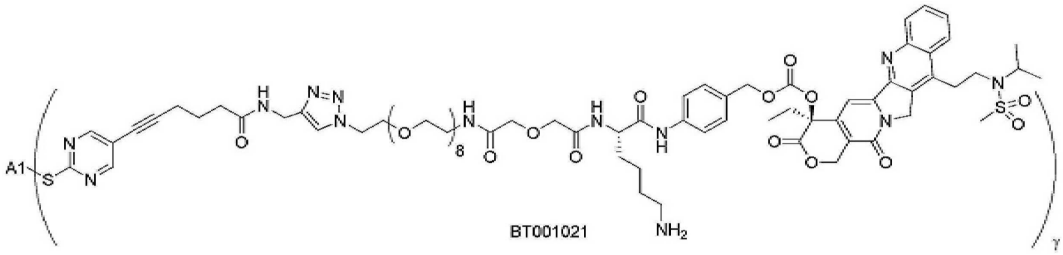
또는

[0346] 

이며;

[0347] 여기서, A1은 삭시투주맙이고, γ은 1부터 10까지의 정수 또는 소수이며; 바람직하게는, γ은 5부터 8까지의 정수 또는 소수, 예를 들어, 6-7, 6-7.5, 6-8, 6.5-7, 6.5-7.5, 6.5-8, 7-8 또는 7.5-8의 정수 또는 소수이다.

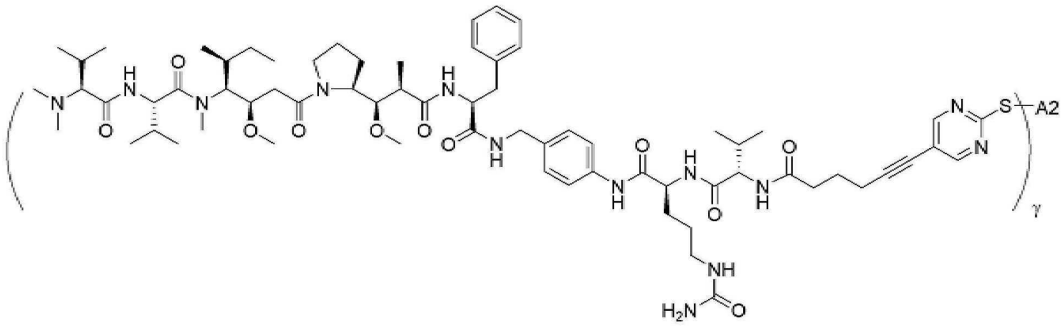
[0348] 일부 바람직한 구현예에서, 상기 접합체는:

[0349] 

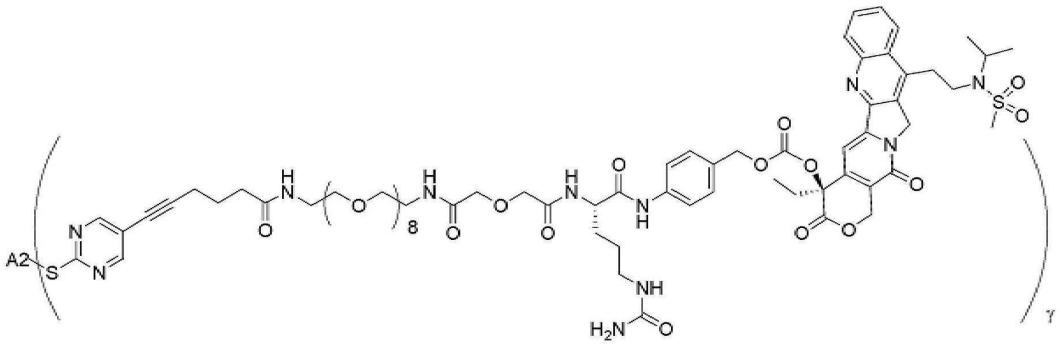
γ 이며 ;

[0350] 여기서, A1은 삭시투주맙의 단편이고, γ은 1부터 10까지의 정수 또는 소수이며; 바람직하게는, γ은 5부터 8까지의 정수 또는 소수, 예를 들어, 6-7, 6-7.5, 6-8, 6.5-7, 6.5-7.5, 6.5-8, 7-8 또는 7.5-8의 정수 또는 소수이다.

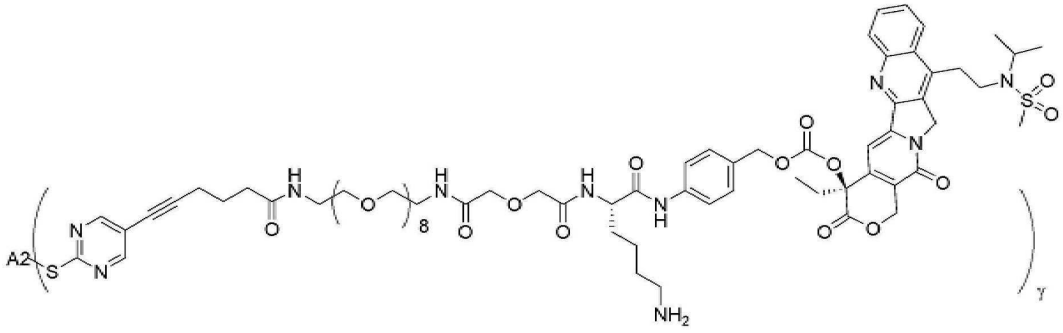
[0351] 일부 바람직한 구현예에서, 상기 접합체는:

[0352] 

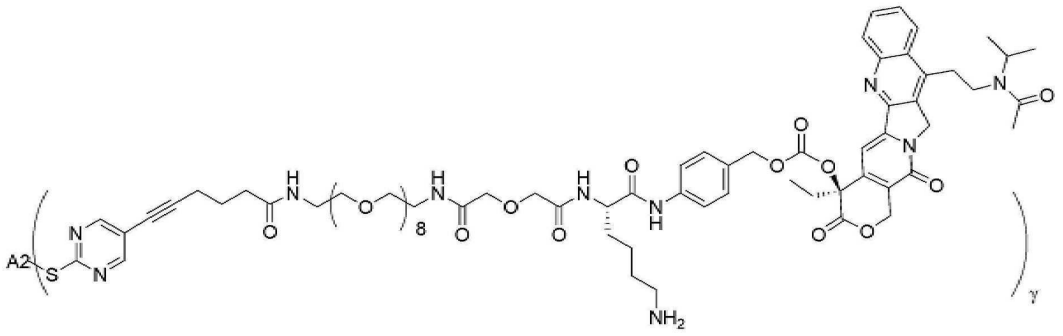
,

[0353] 

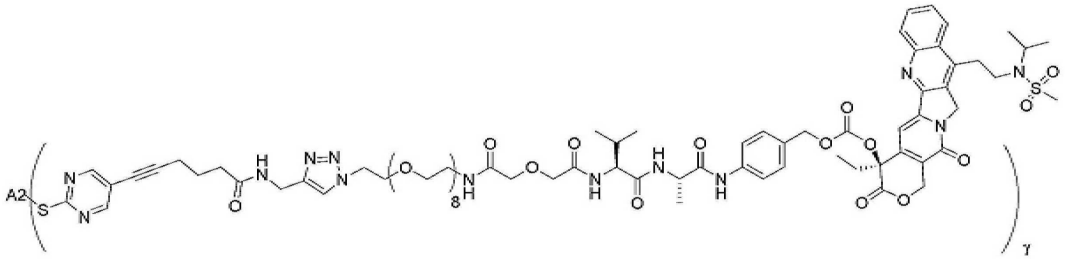
,

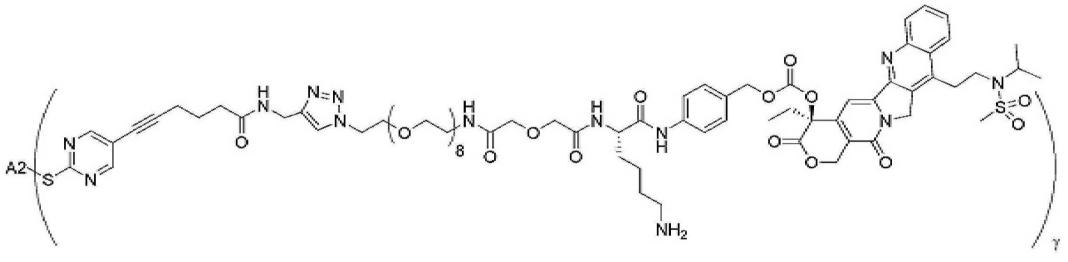
[0354] 

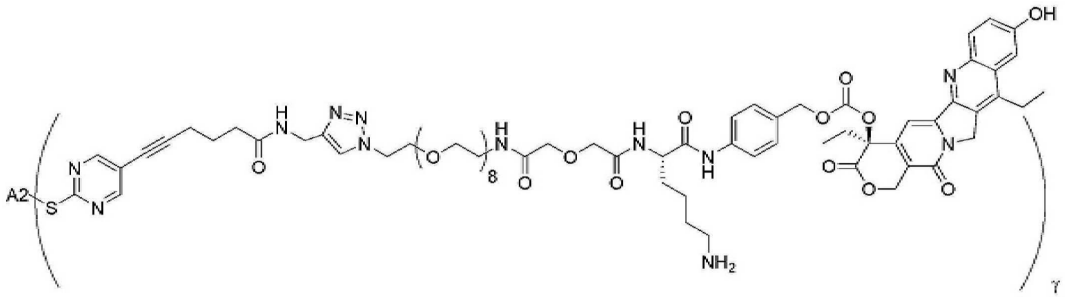
,

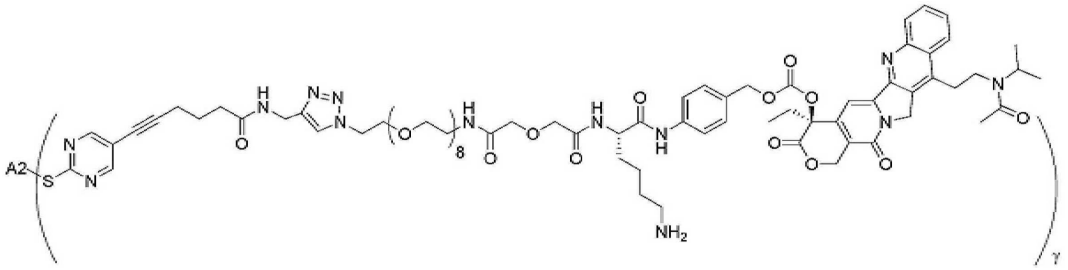
[0355] 

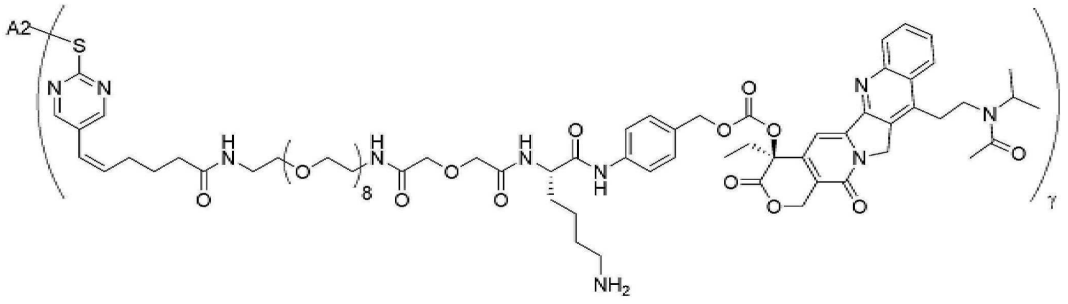
,

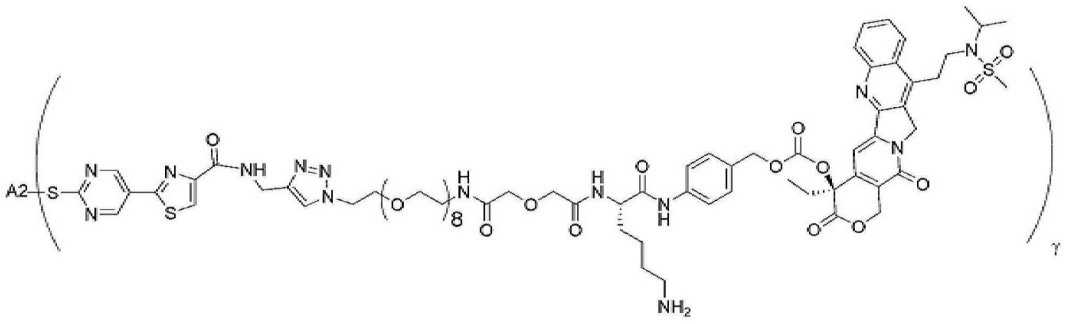
[0356] ,

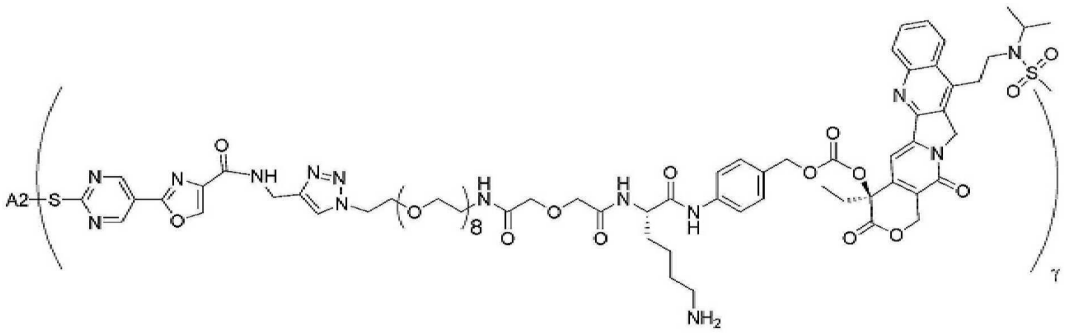
[0357] ,

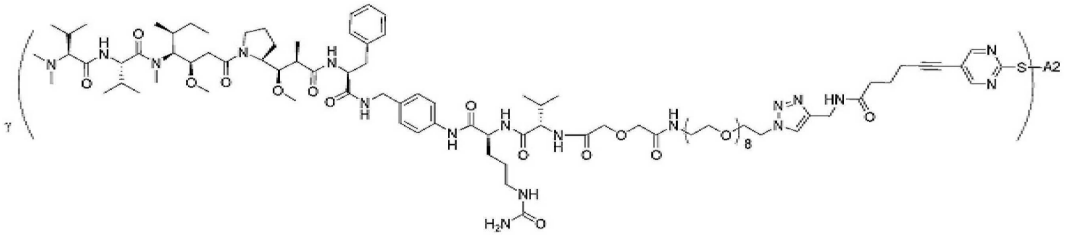
[0358] ,

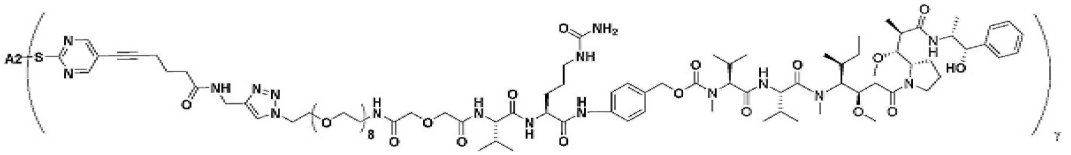
[0359] ,

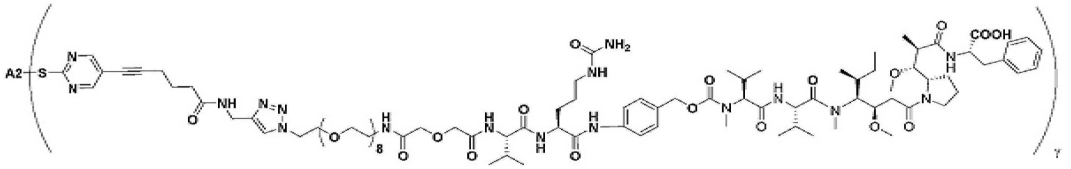
[0360] ,

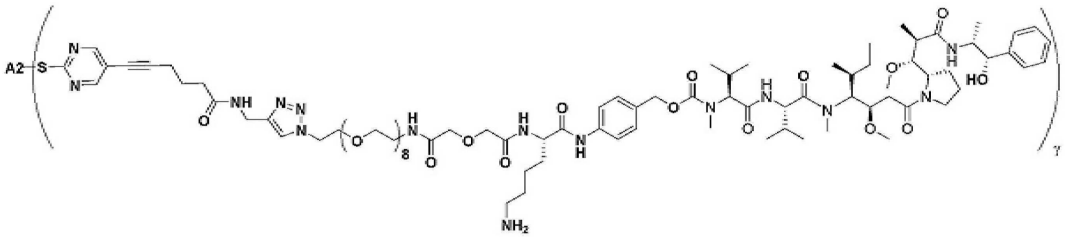
[0361] ,

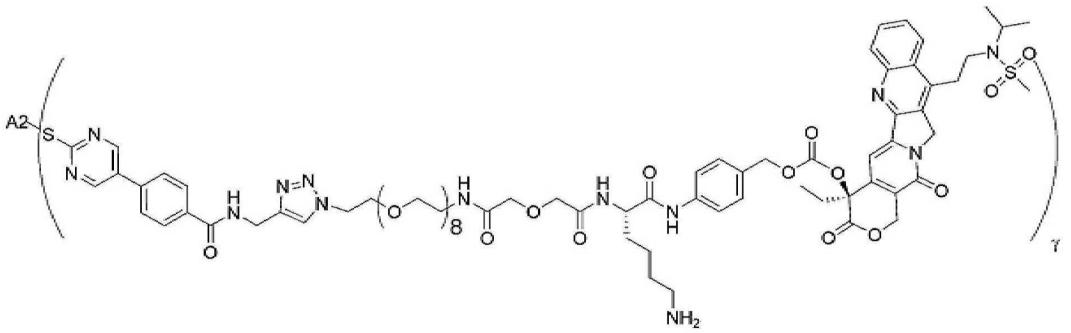
[0362] ,

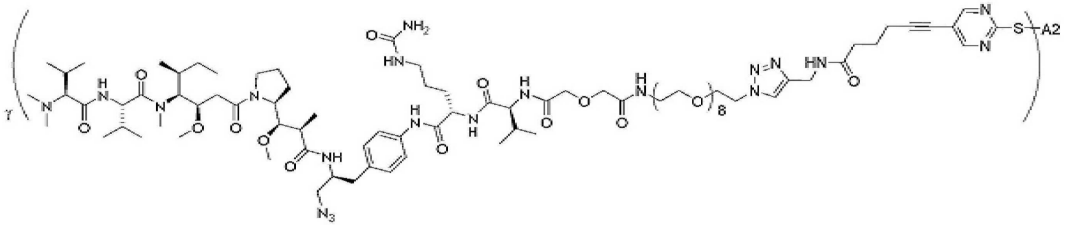
[0363] ,

[0364] ,

[0365] ,

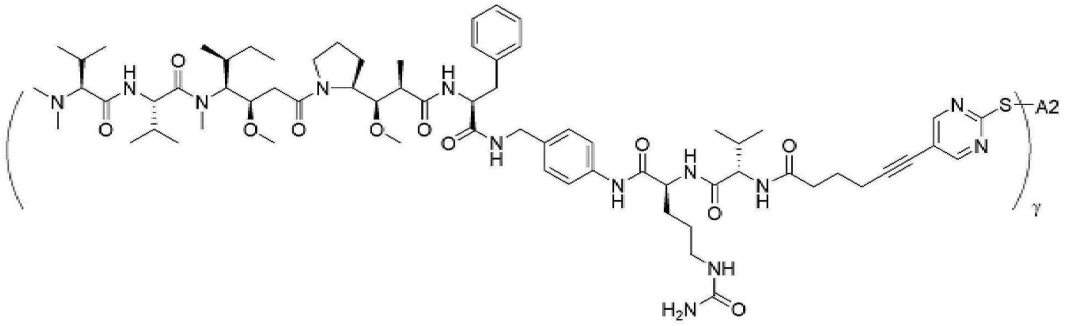
[0366] ,

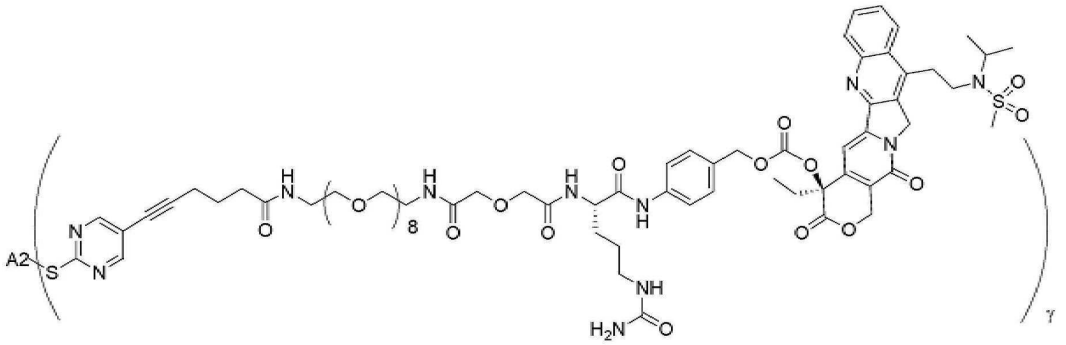
[0367]  또는

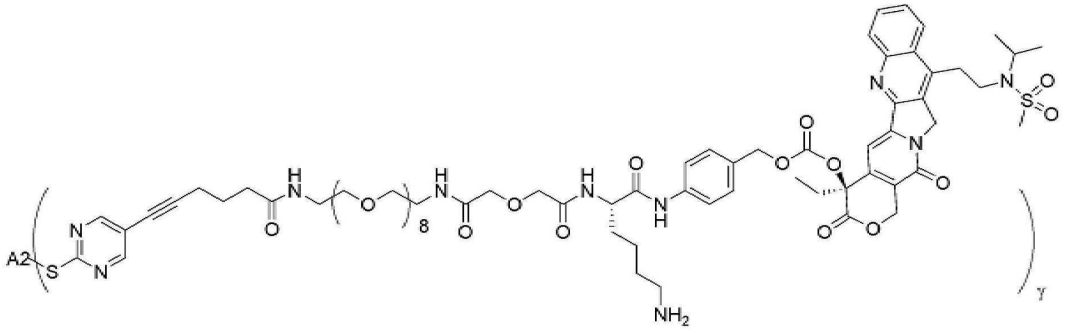
[0368]  이며,

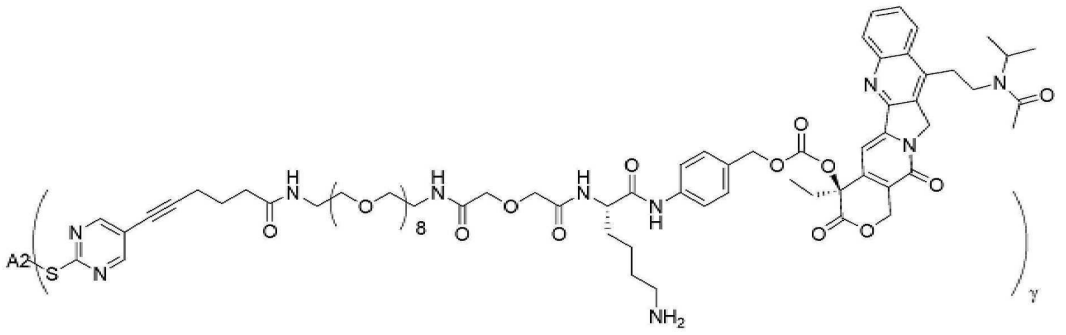
[0369] 여기서, A2는 트라스투주맙이고, γ은 1부터 10까지의 정수 또는 소수이며; 바람직하게는, γ은 5부터 8까지의 정수 또는 소수, 예를 들어, 6-7, 6-7.5, 6-8, 6.5-7, 6.5-7.5, 6.5-8, 7-8 또는 7.5-8의 정수 또는 소수이다.

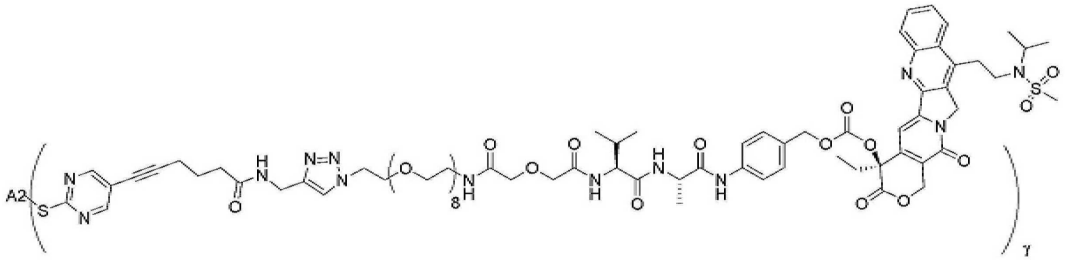
[0370] 일부 바람직한 구현예에서, 상기 접합체는:

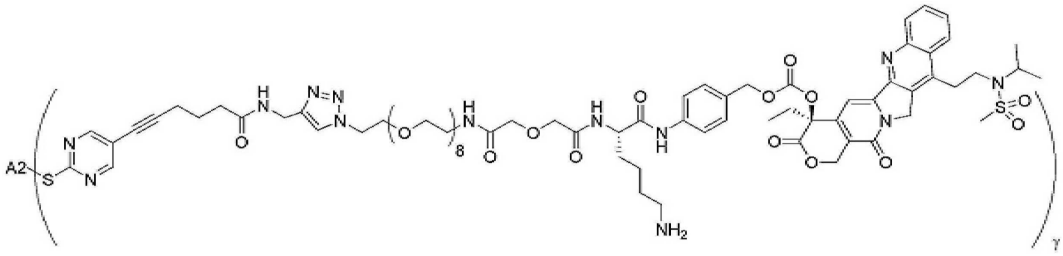
[0371] ,

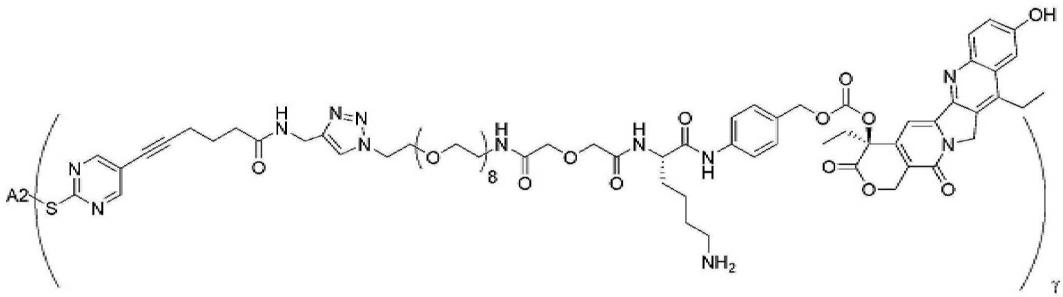
[0372] ,

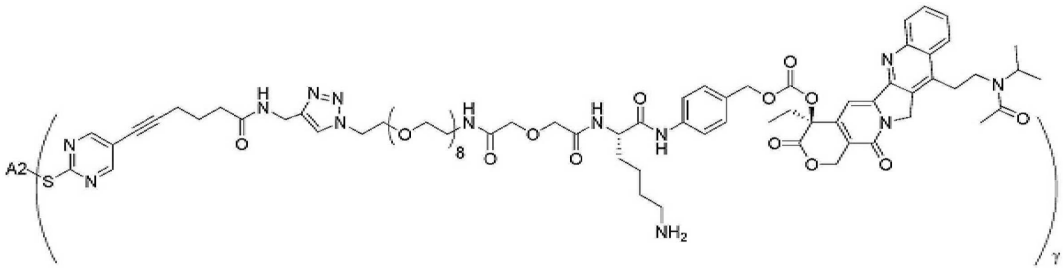
[0373] ,

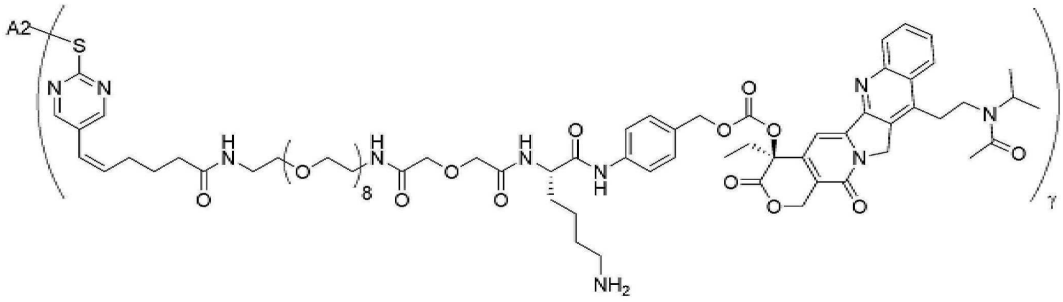
[0374] ,

[0375] ,

[0376] ,

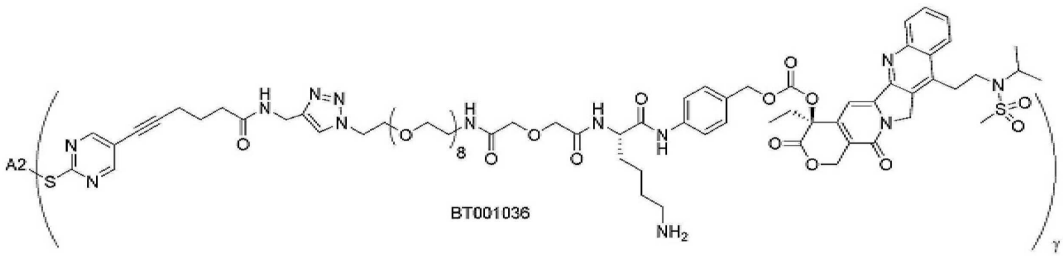
[0377] ,

[0378]  또는

[0379]  이며;

[0380] 여기서, A2는 트라스투주맙이고, ɣ은 1부터 10까지의 정수 또는 소수이며; 바람직하게는, ɣ은 5부터 8까지의 정수 또는 소수, 예를 들어, 6-7, 6-7.5, 6-8, 6.5-7, 6.5-7.5, 6.5-8, 7-8 또는 7.5-8의 정수 또는 소수이다.

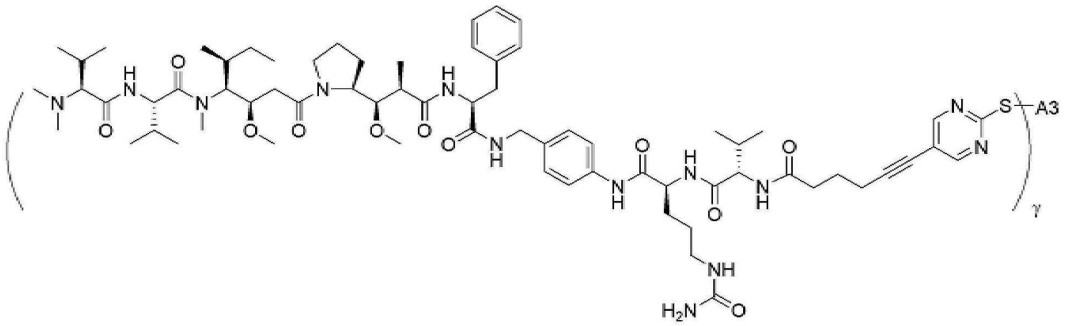
[0381] 일부 바람직한 구현예에서, 상기 접합체는:

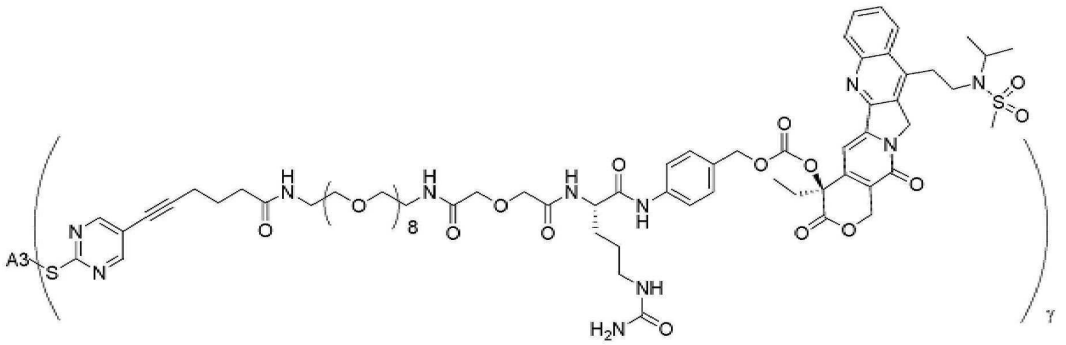
[0382] 

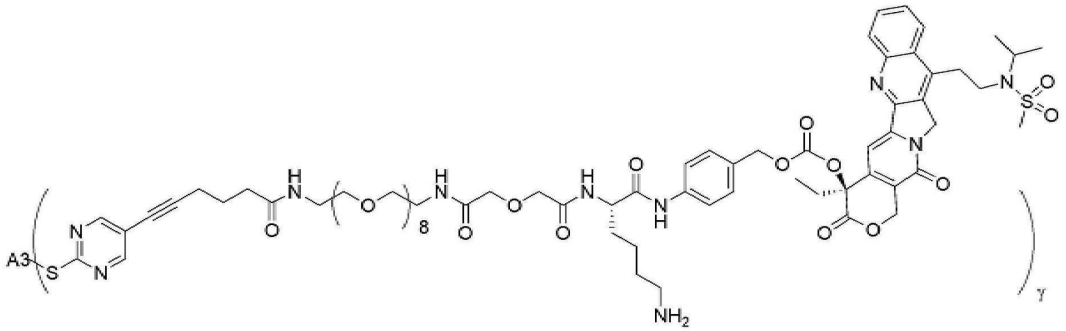
ɣ 이며,

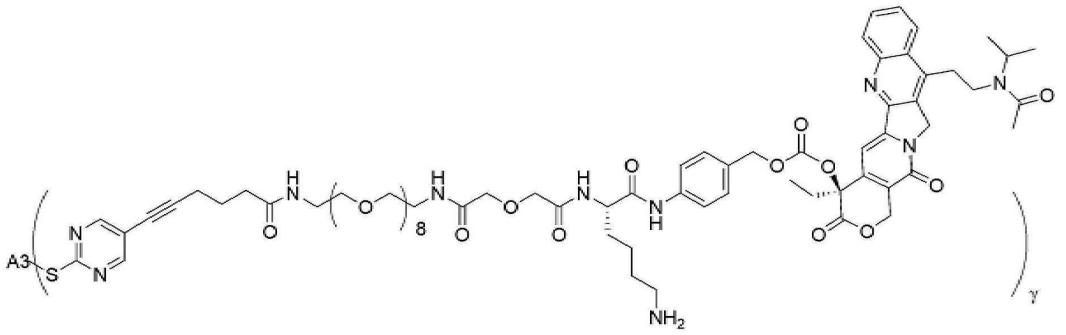
[0383] 여기서, A2는 트라스투주맙이고, ɣ은 1부터 10까지의 정수 또는 소수이며; 바람직하게는, ɣ은 5부터 8까지의 정수 또는 소수, 예를 들어, 6-7, 6-7.5, 6-8, 6.5-7, 6.5-7.5, 6.5-8, 7-8 또는 7.5-8의 정수 또는 소수이다.

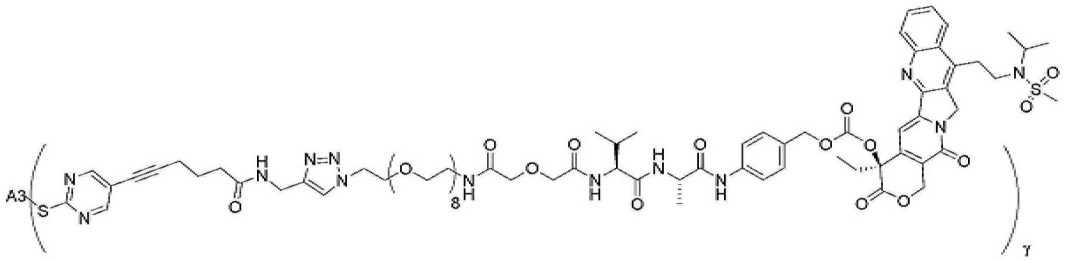
[0384] 일부 바람직한 구현예에서, 상기 접합체는:

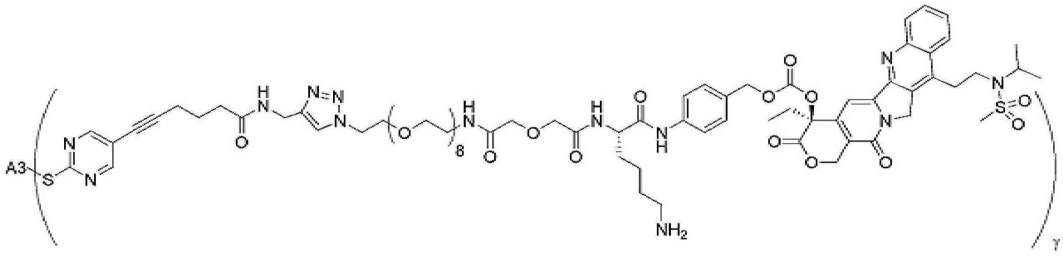
[0385] 

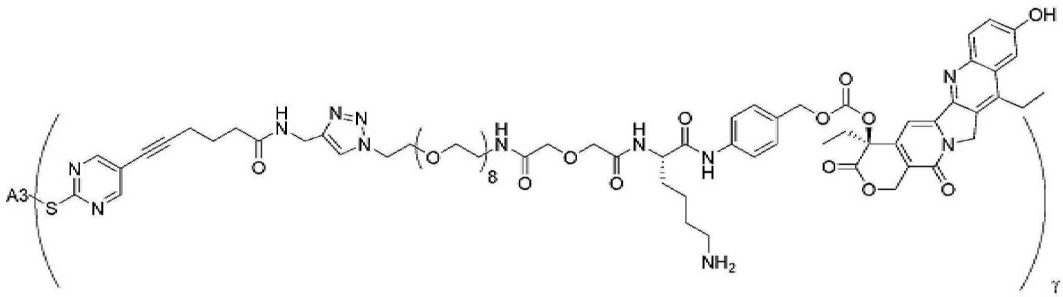
[0386] 

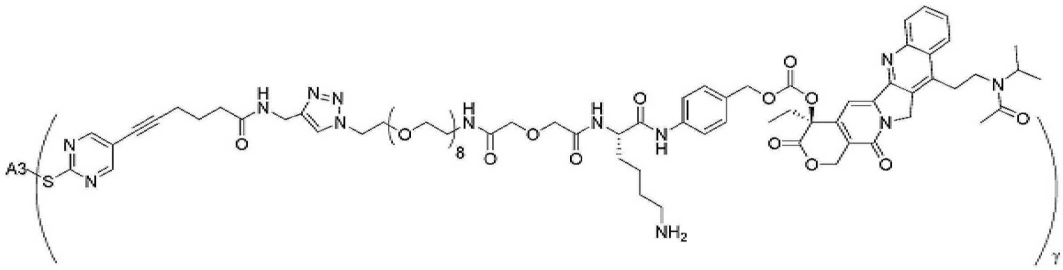
[0387] 

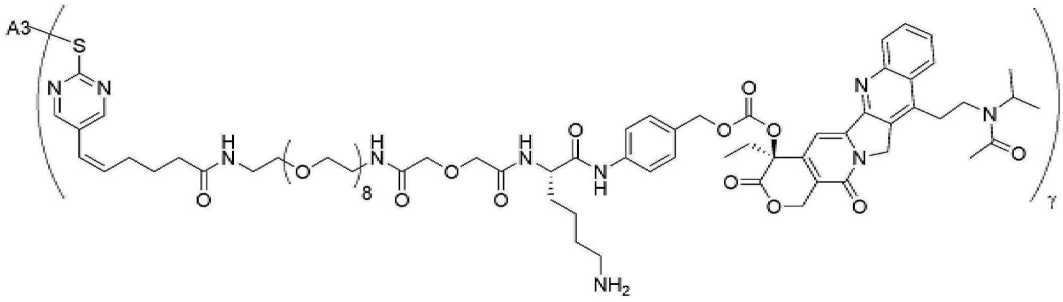
[0388] 

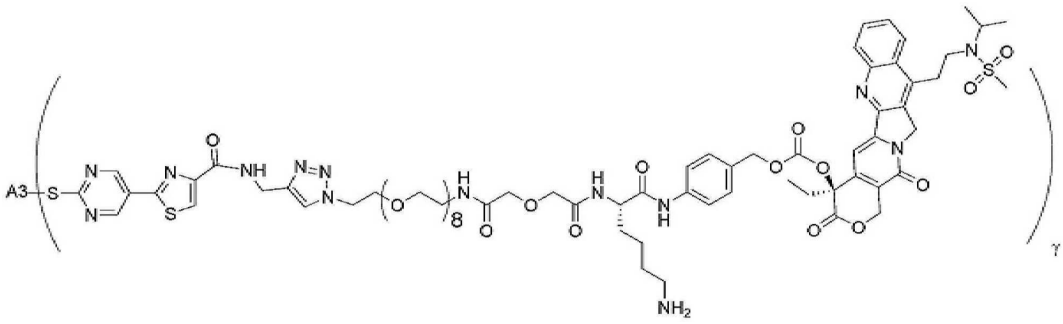
[0389] 

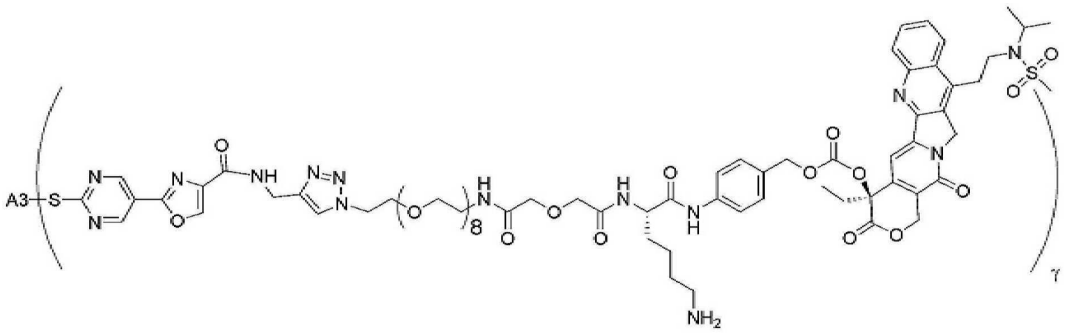
[0390] 

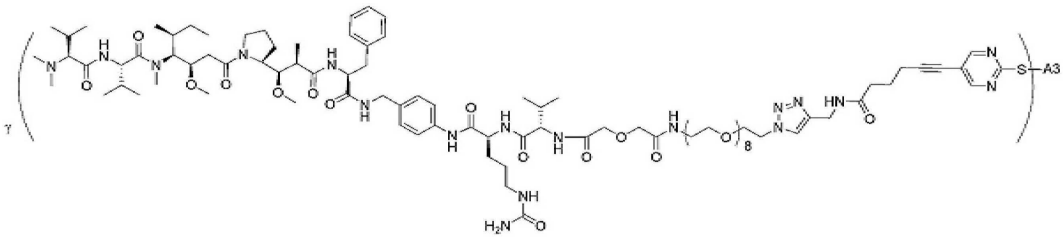
[0391] 

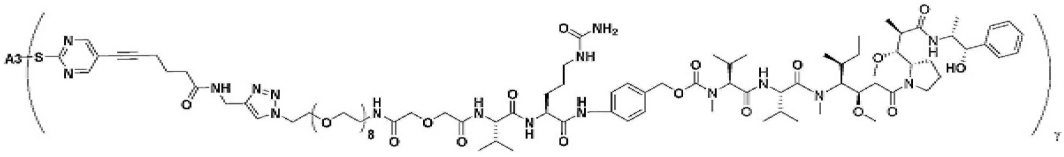
[0392] 

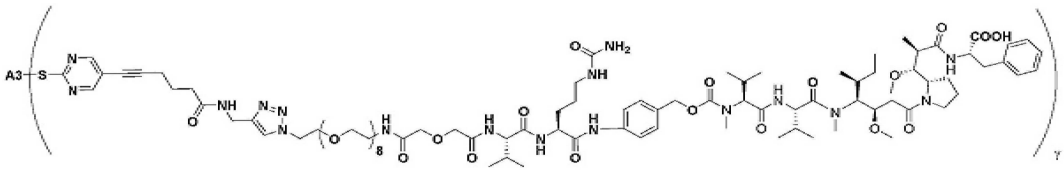
[0393] 

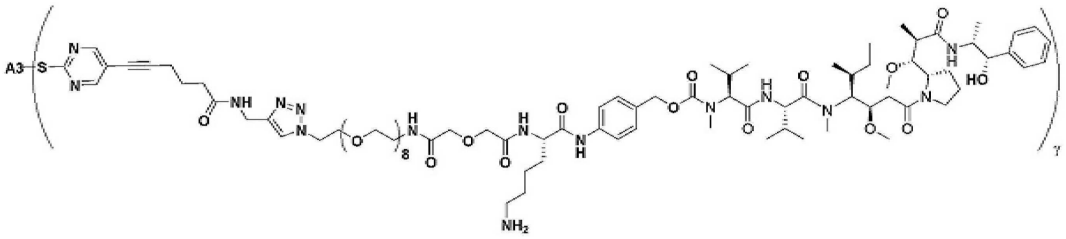
[0394] 

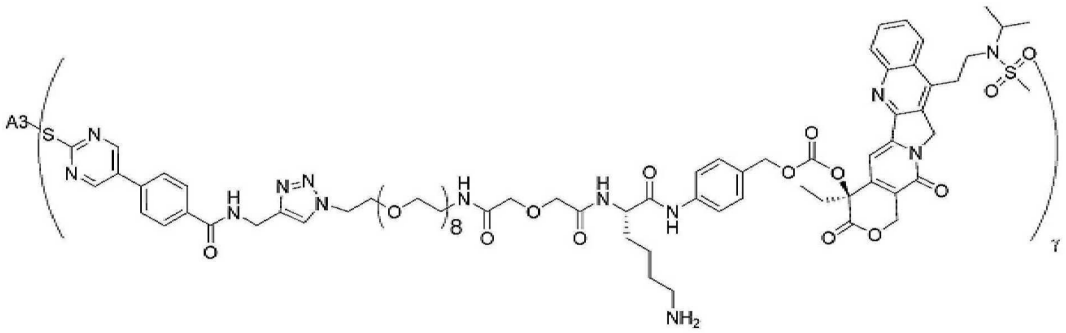
[0395] ,

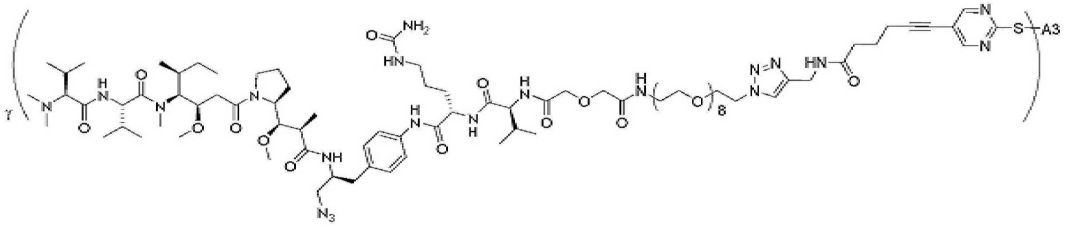
[0396] ,

[0397] ,

[0398] ,

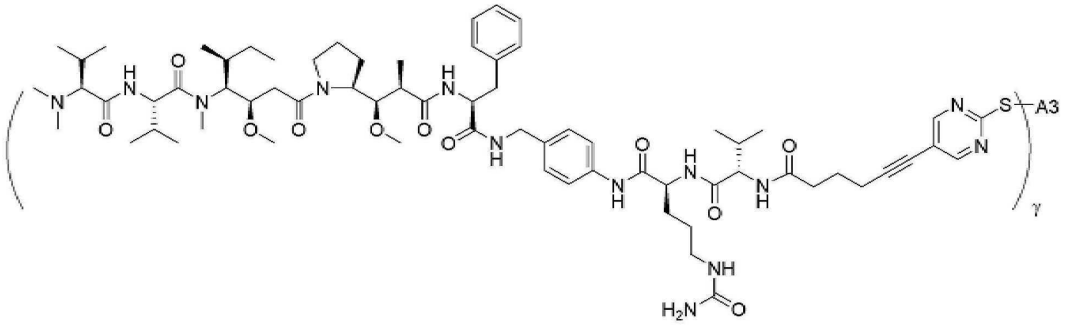
[0399] ,

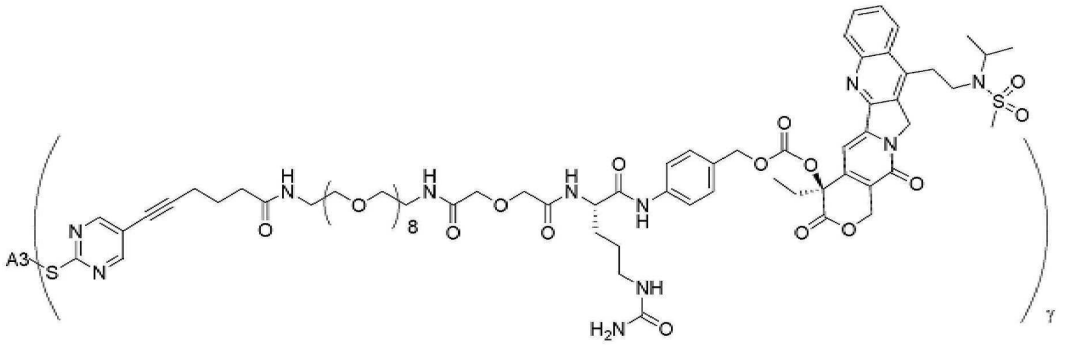
[0400]  또는

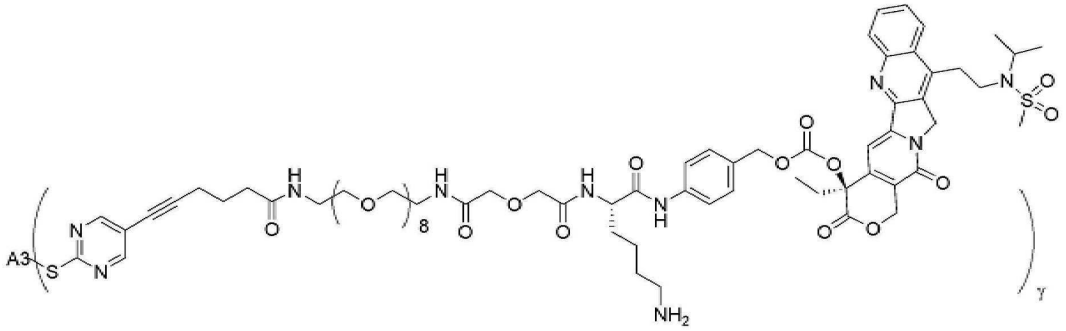
[0401]  이며;

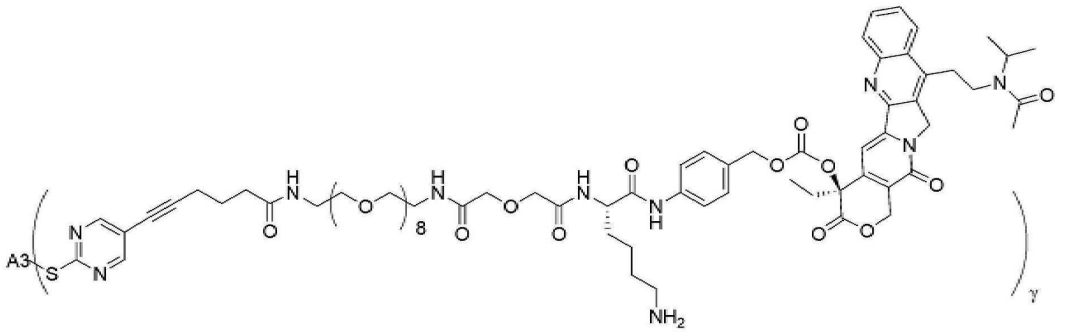
[0402] 여기서, A3은 퍼투주맙이고, y 은 1부터 10까지의 정수 또는 소수이며; 바람직하게는, y 은 5부터 8까지의 정수 또는 소수, 예를 들어, 6-7, 6-7.5, 6-8, 6.5-7, 6.5-7.5, 6.5-8, 7-8 또는 7.5-8의 정수 또는 소수이다.

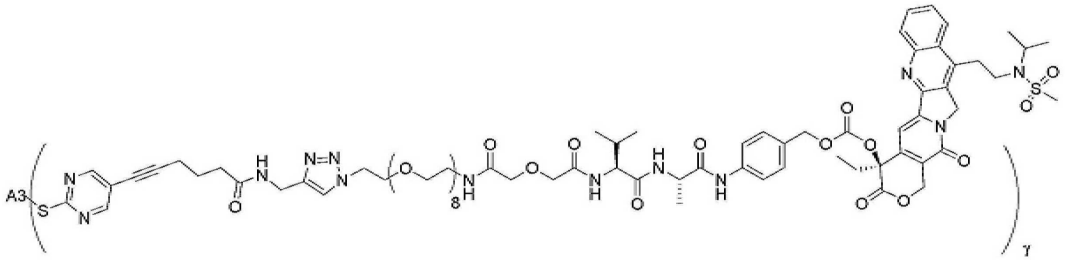
[0403] 일부 바람직한 구현예에서, 상기 접합체는:

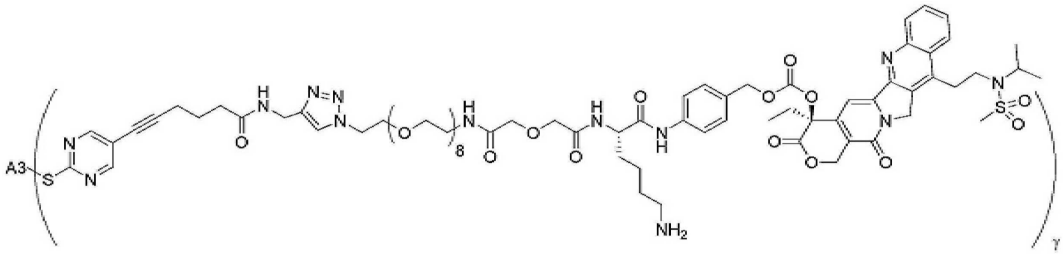
[0404] ,

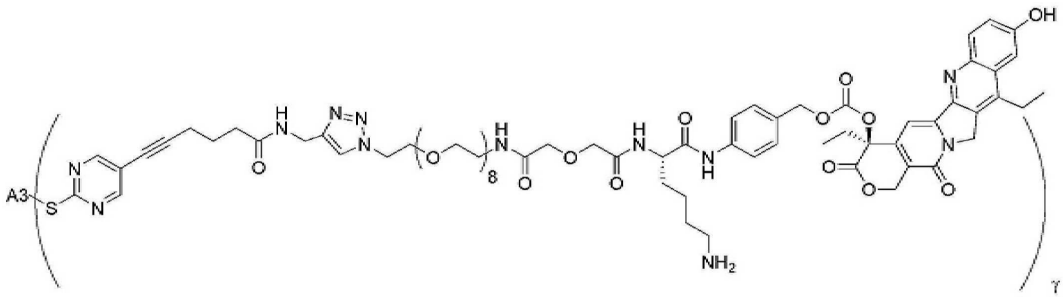
[0405] ,

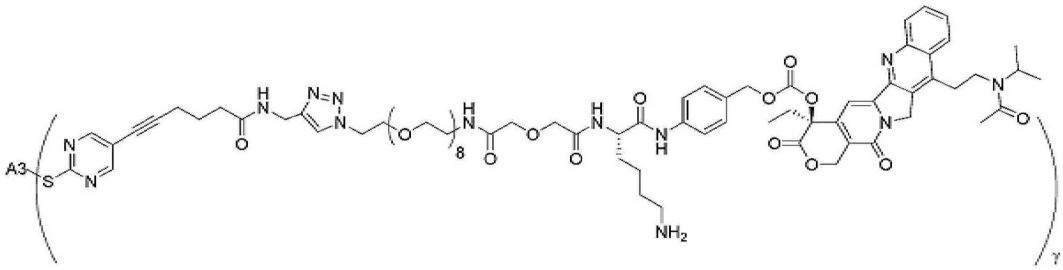
[0406] ,

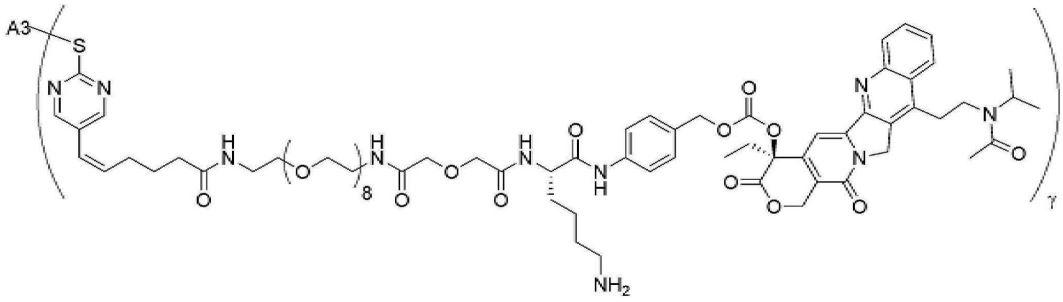
[0407] ,

[0408] ,

[0409] ,

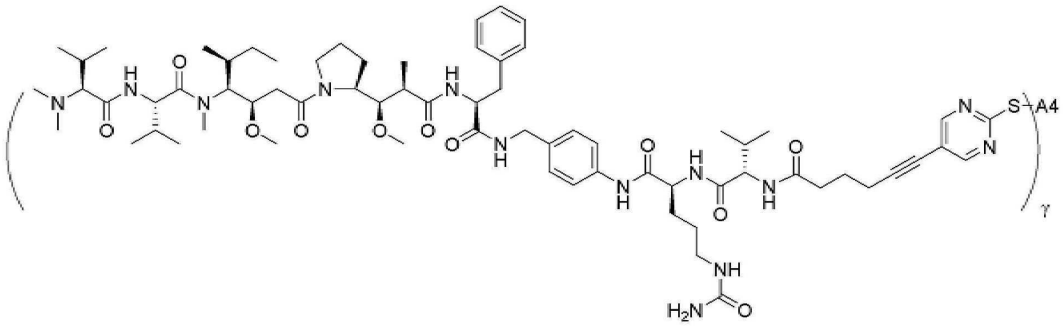
[0410] ,

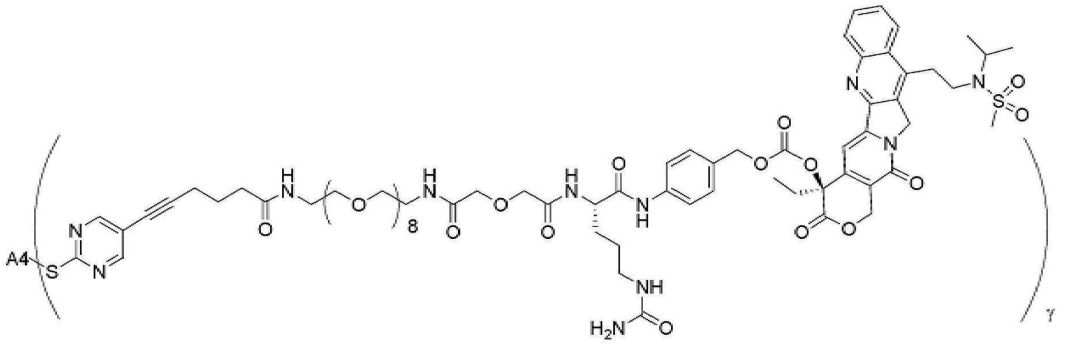
[0411]  또는

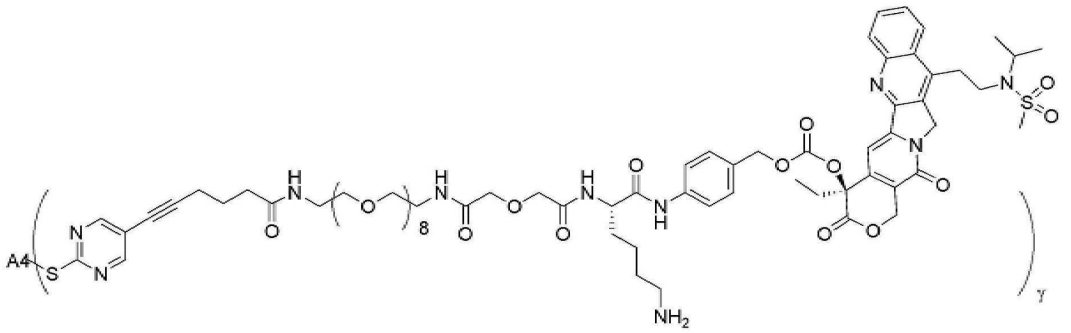
[0412]  이며;

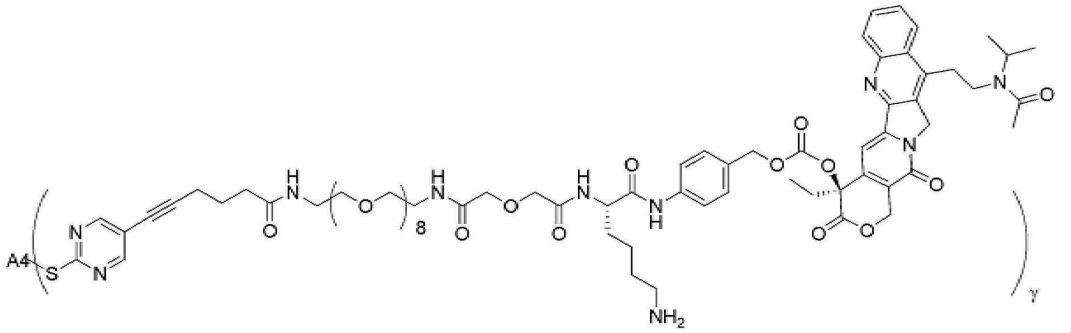
[0413] 여기서, A3은 퍼투주맙이고, y 은 1부터 10까지의 정수 또는 소수이며; 바람직하게는, y 은 5부터 8까지의 정수 또는 소수, 예를 들어, 6-7, 6-7.5, 6-8, 6.5-7, 6.5-7.5, 6.5-8, 7-8 또는 7.5-8의 정수 또는 소수이다.

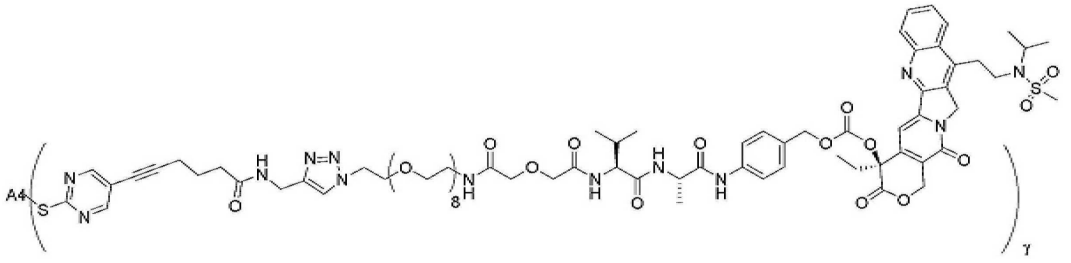
[0414] 일부 바람직한 구현예에서, 상기 접합체는:

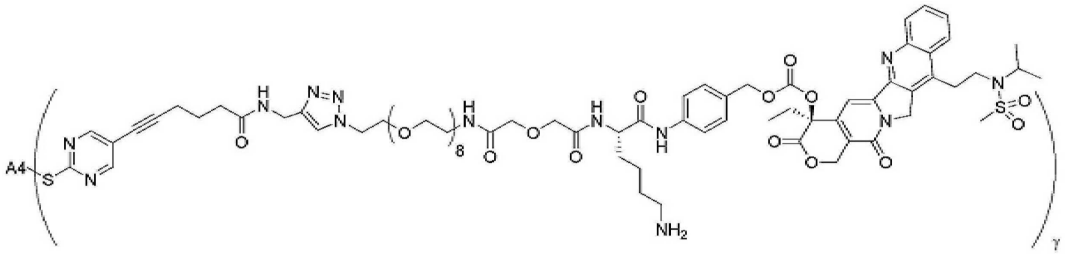
[0415] ,

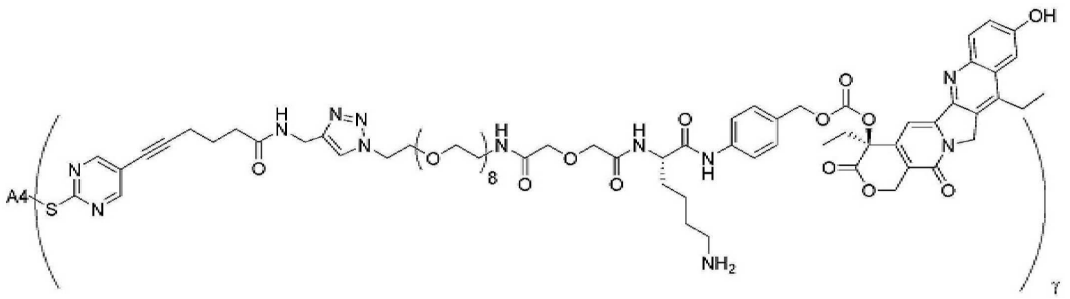
[0416] 

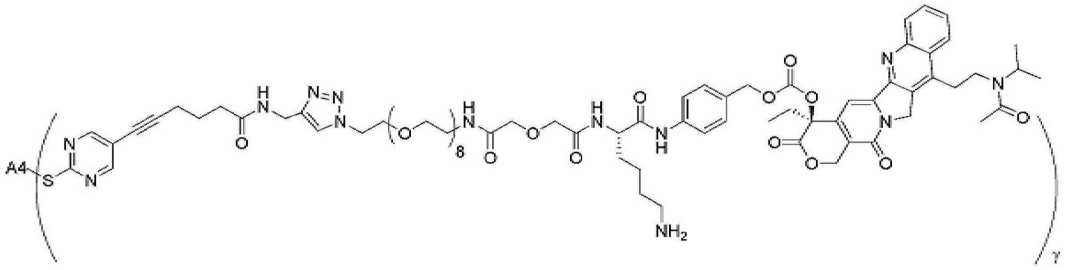
[0417] 

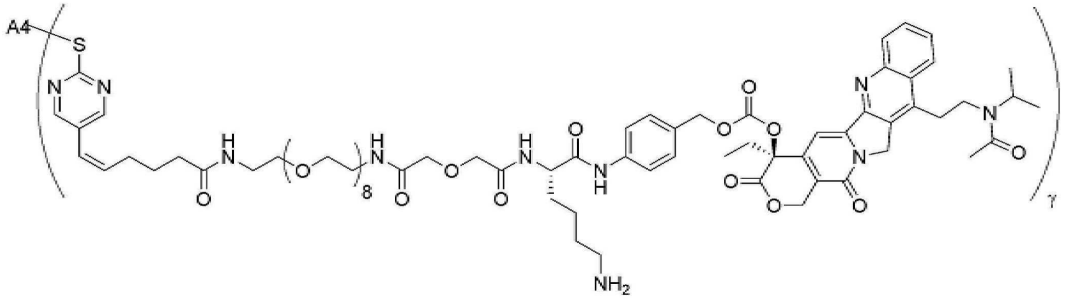
[0418] 

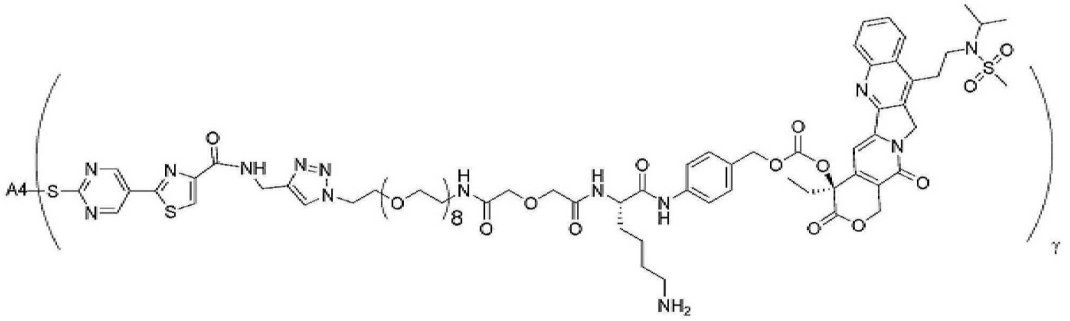
[0419] 

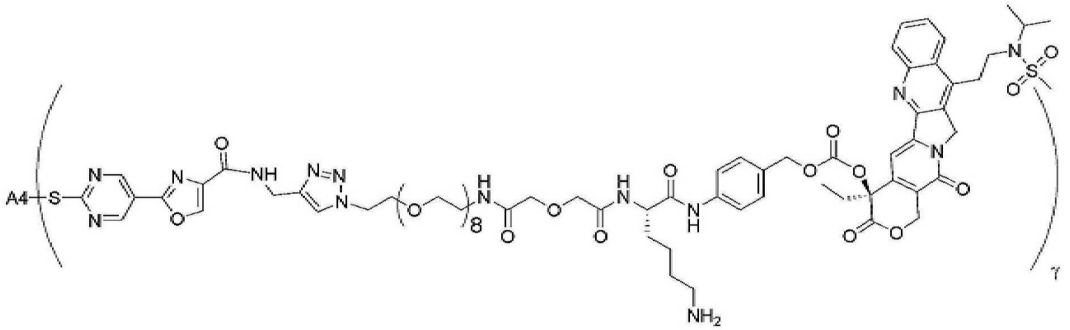
[0420] 

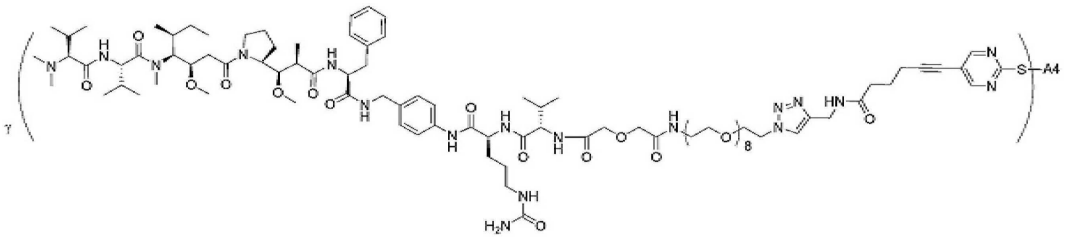
[0421] ,

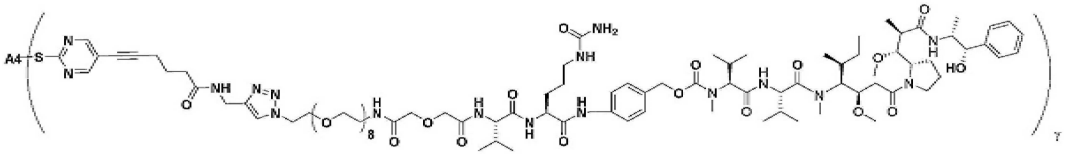
[0422] ,

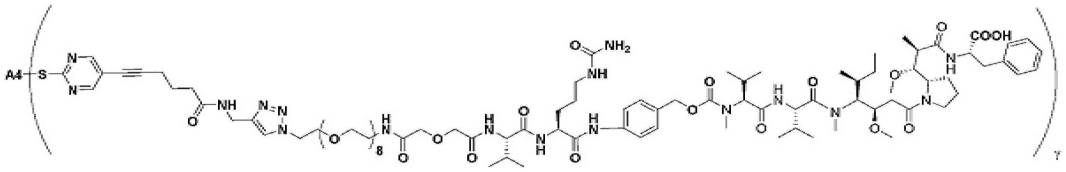
[0423] ,

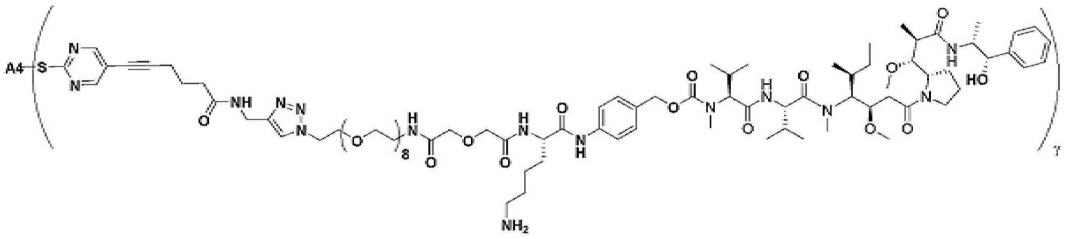
[0424] ,

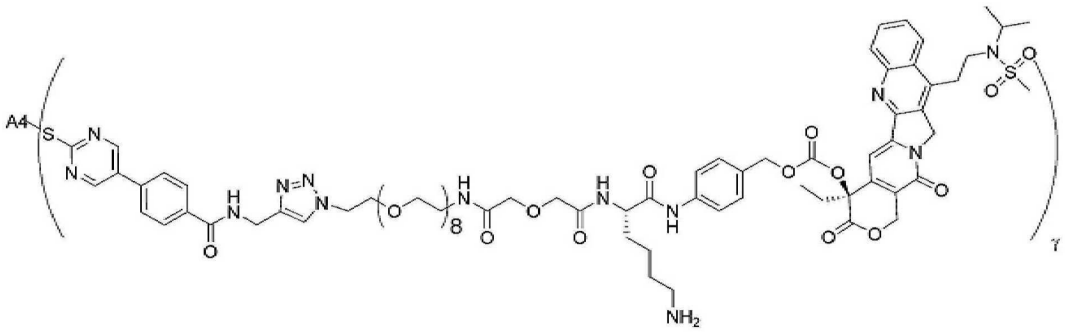
[0425] ,

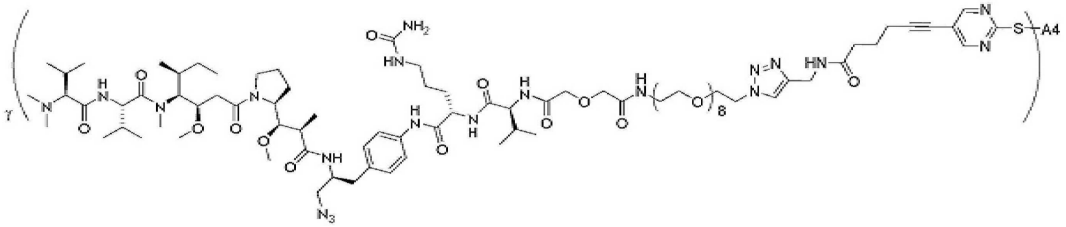
[0426] ,

[0427] ,

[0428] ,

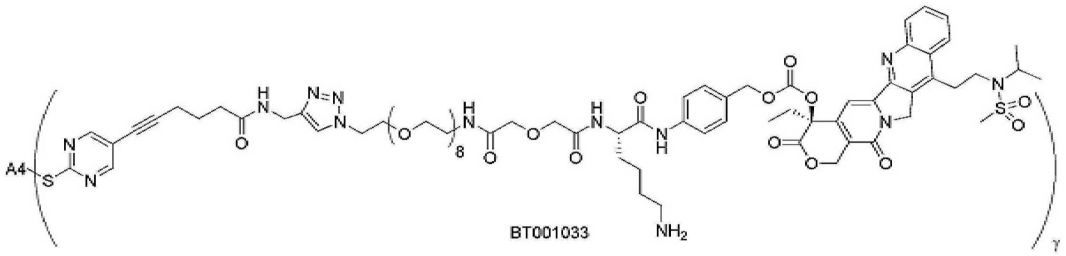
[0429] ,

[0430]  또는

[0431]  이며,

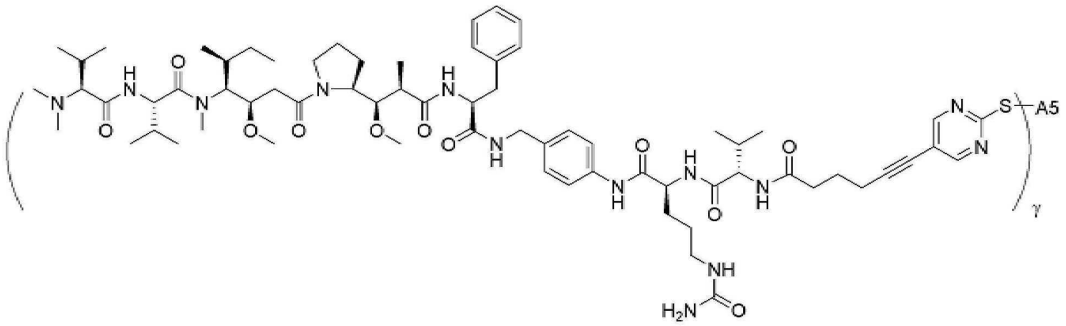
[0432] 여기서, A4는 항체 M1이고, y은 1부터 10까지의 정수 또는 소수이며; 바람직하게는, y은 5부터 8까지의 정수 또는 소수, 예를 들어, 6-7, 6-7.5, 6-8, 6.5-7, 6.5-7.5, 6.5-8, 7-8 또는 7.5-8의 정수 또는 소수이다.

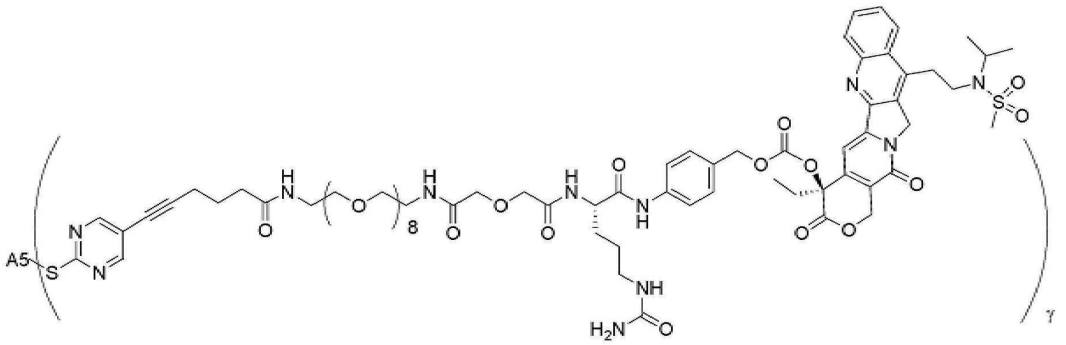
[0433] 일부 바람직한 구현예에서, 상기 접합체는:

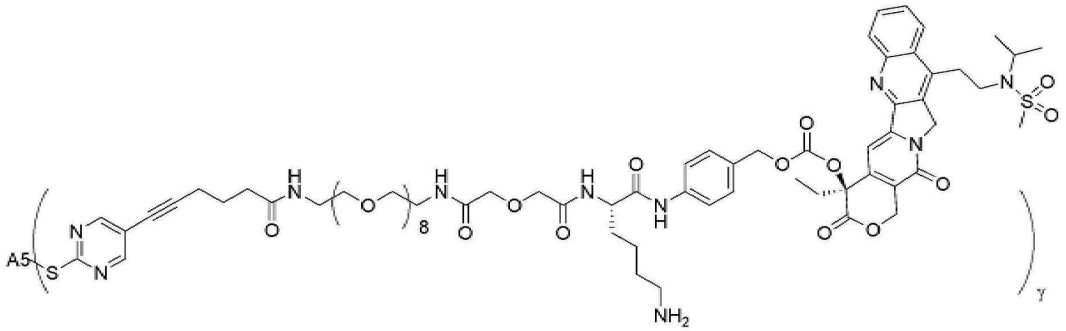
[0434] 

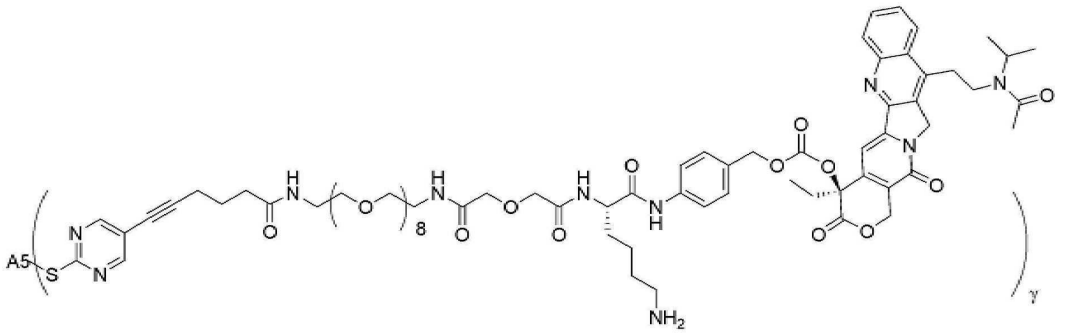
[0435] 여기서, A4는 항체 M1이고, y은 1부터 10까지의 정수 또는 소수이며; 바람직하게는, y은 5부터 8까지의 정수 또는 소수, 예를 들어, 6-7, 6-7.5, 6-8, 6.5-7, 6.5-7.5, 6.5-8, 7-8 또는 7.5-8의 정수 또는 소수이다.

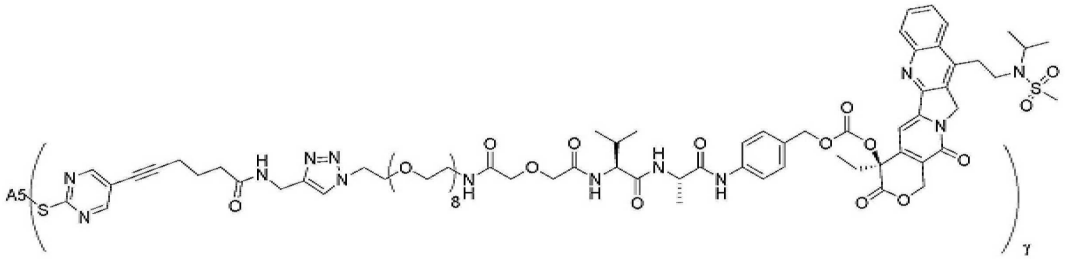
[0436] 일부 바람직한 구현예에서, 상기 접합체는:

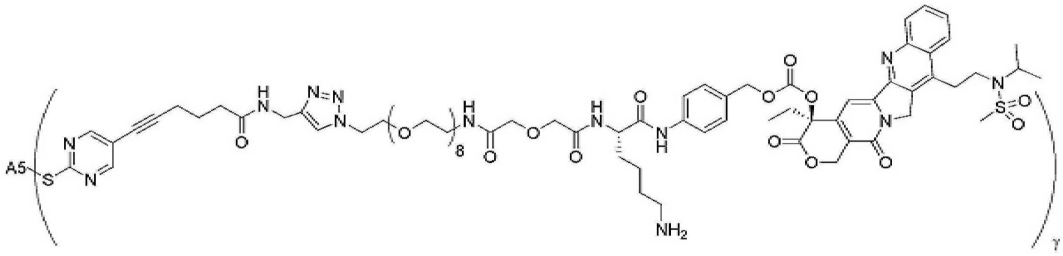
[0437] 

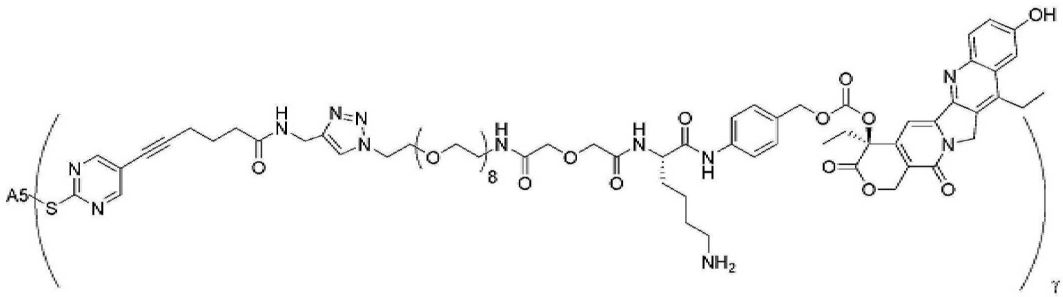
[0438] 

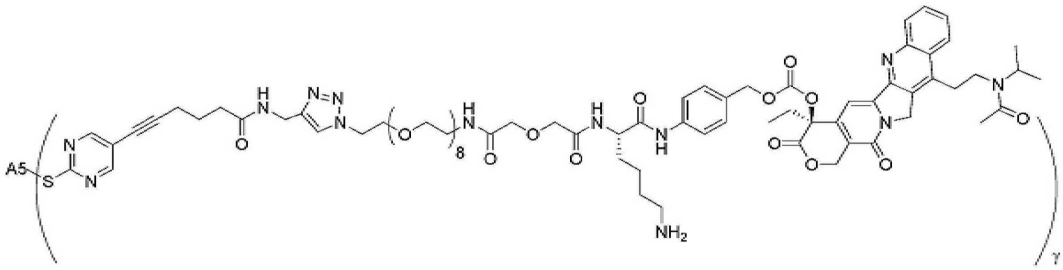
[0439] 

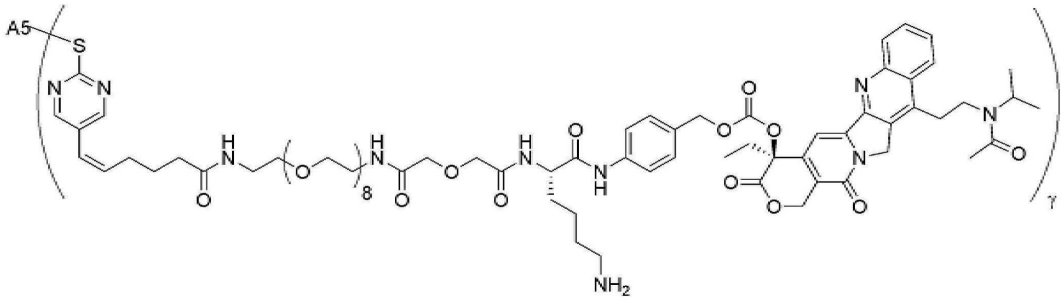
[0440] 

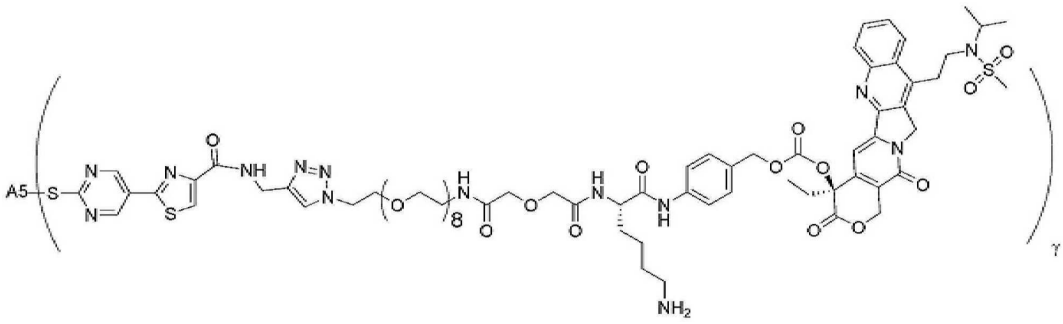
[0441] 

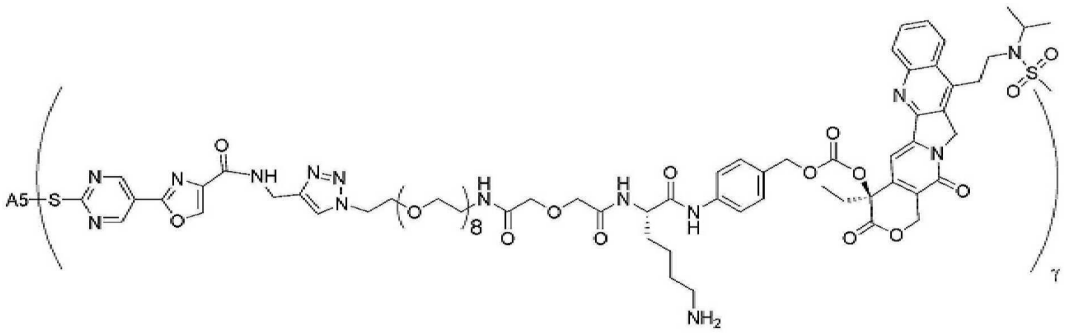
[0442] 

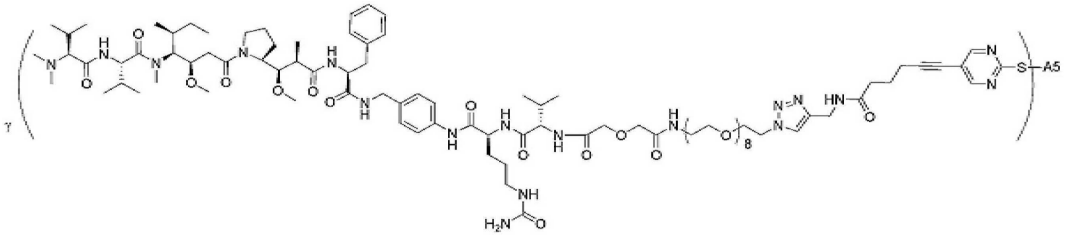
[0443] 

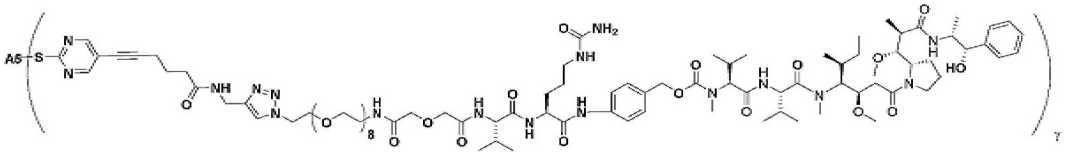
[0444] 

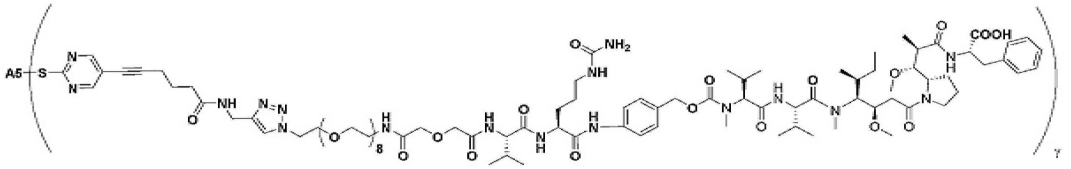
[0445] 

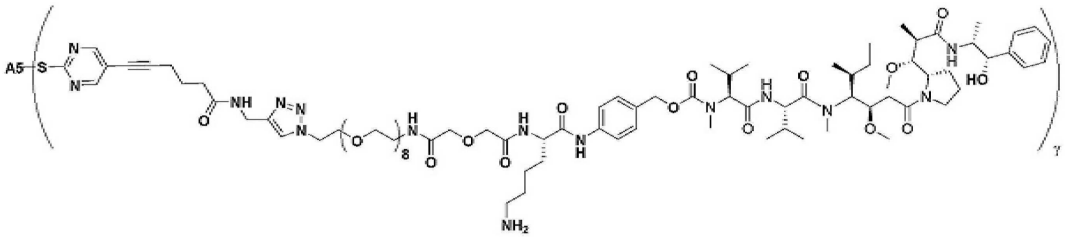
[0446] 

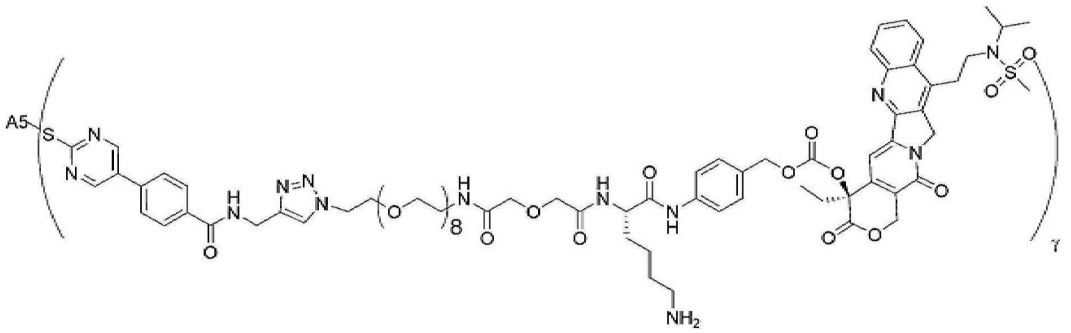
[0447] ,

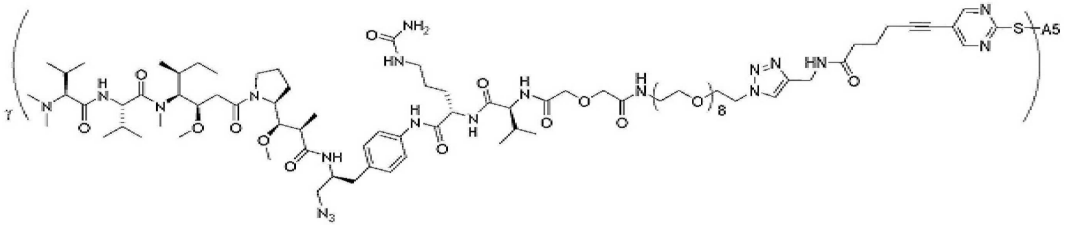
[0448] ,

[0449] ,

[0450] ,

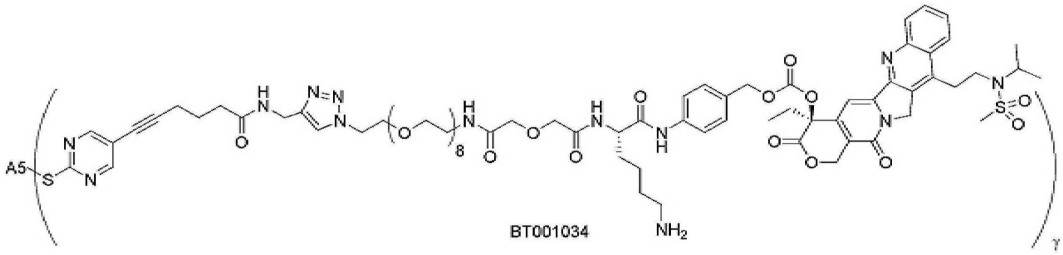
[0451] ,

[0452]  또는

[0453]  이며,

[0454] 여기서, A5는 항체 M2이고, γ은 1부터 10까지의 정수 또는 소수이며; 바람직하게는, γ은 5부터 8까지의 정수 또는 소수, 예를 들어, 6-7, 6-7.5, 6-8, 6.5-7, 6.5-7.5, 6.5-8, 7-8 또는 7.5-8의 정수 또는 소수이다.

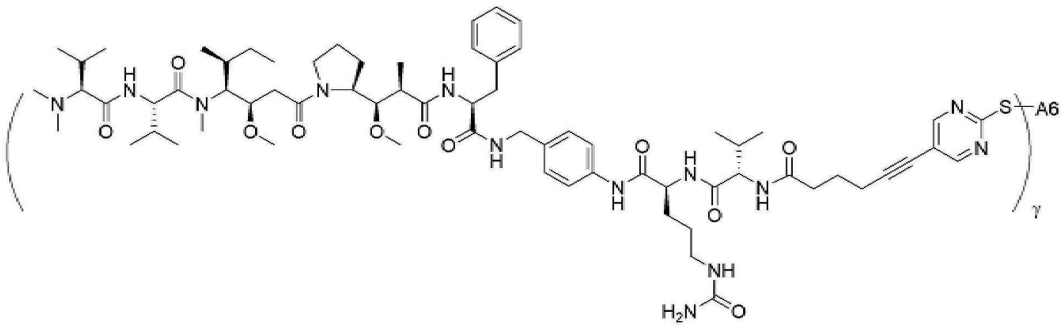
[0455] 일부 바람직한 구현예에서, 상기 접합체는:

[0456] 

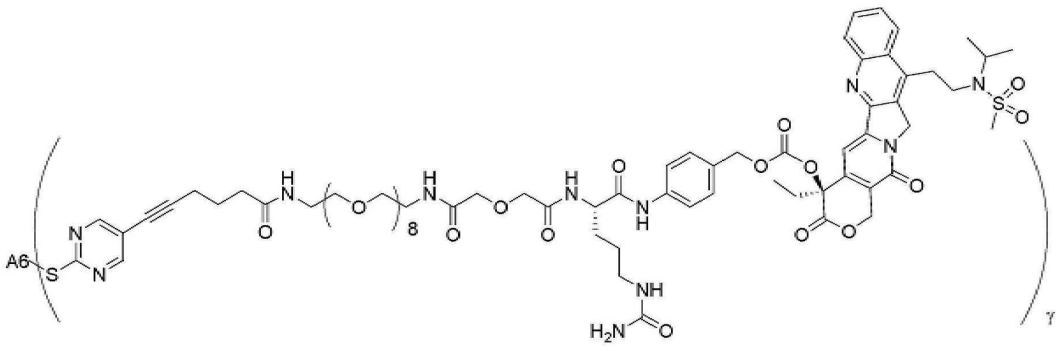
이며,

[0457] 여기서, A5는 항체 M2이고, γ은 1부터 10까지의 정수 또는 소수이며; 바람직하게는, γ은 5부터 8까지의 정수 또는 소수, 예를 들어, 6-7, 6-7.5, 6-8, 6.5-7, 6.5-7.5, 6.5-8, 7-8 또는 7.5-8의 정수 또는 소수이다.

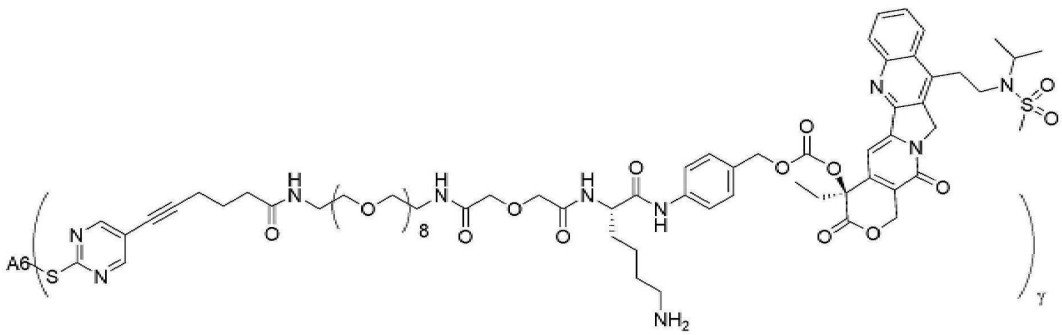
[0458] 일부 바람직한 구현예에서, 상기 접합체는:

[0459] 

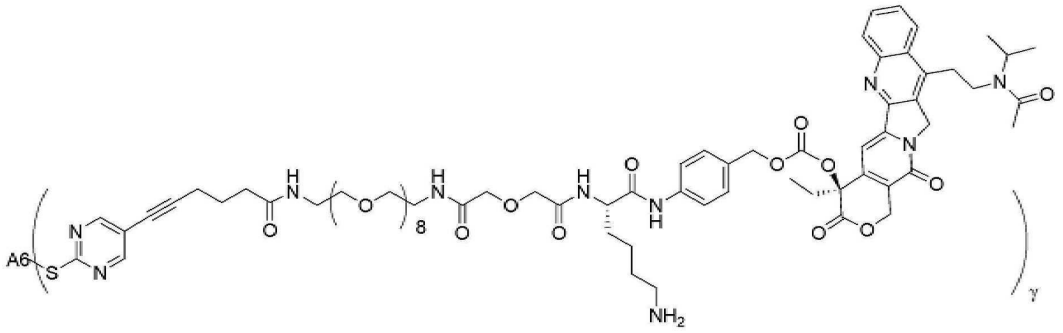
,

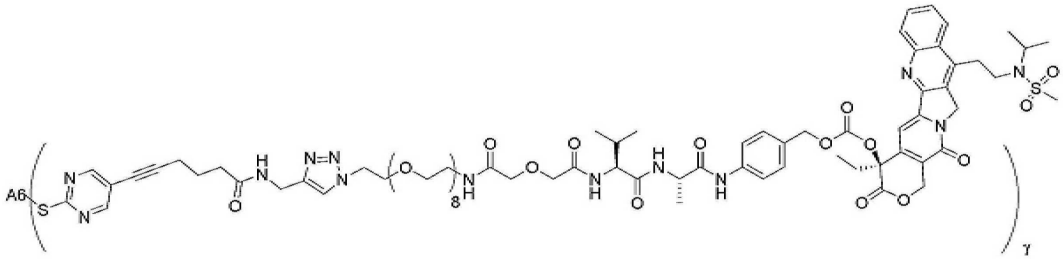
[0460] 

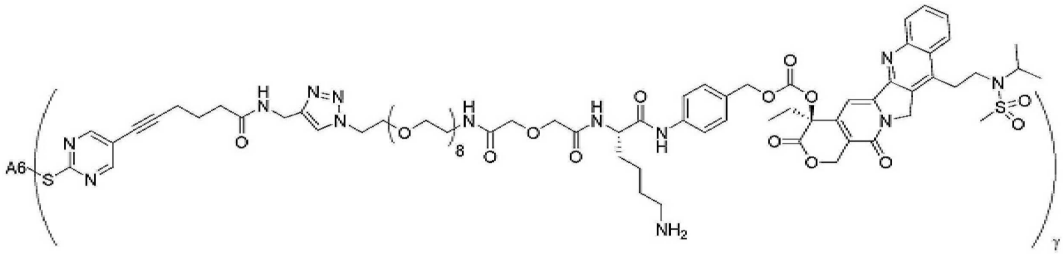
,

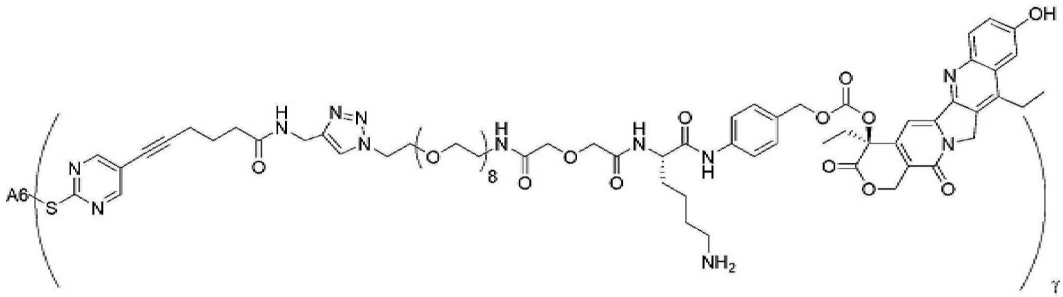
[0461] 

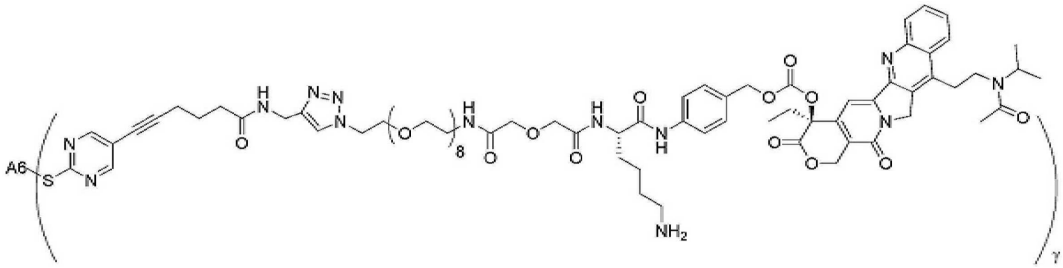
,

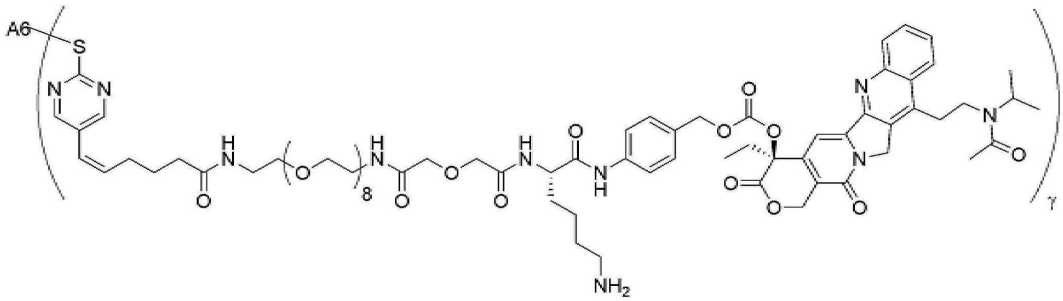
[0462] 

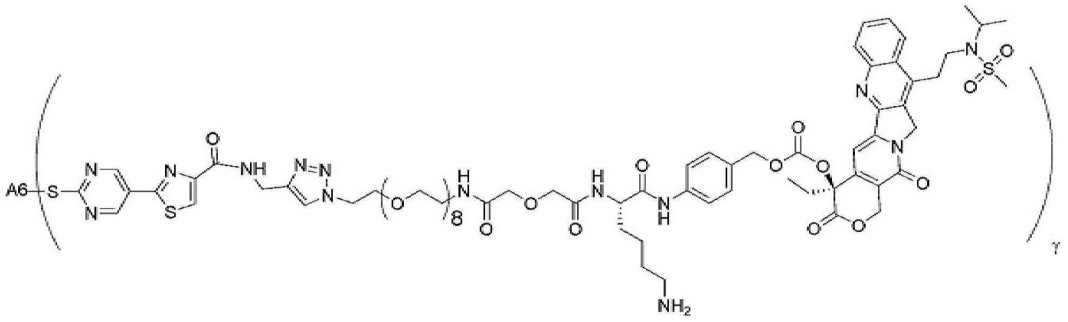
[0463] 

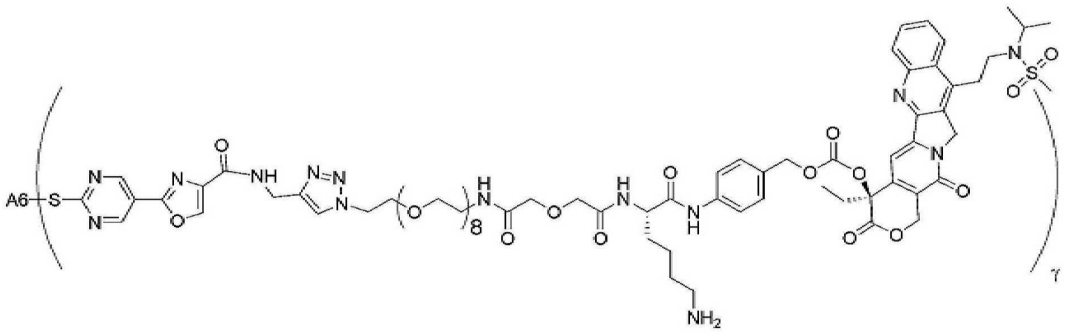
[0464] 

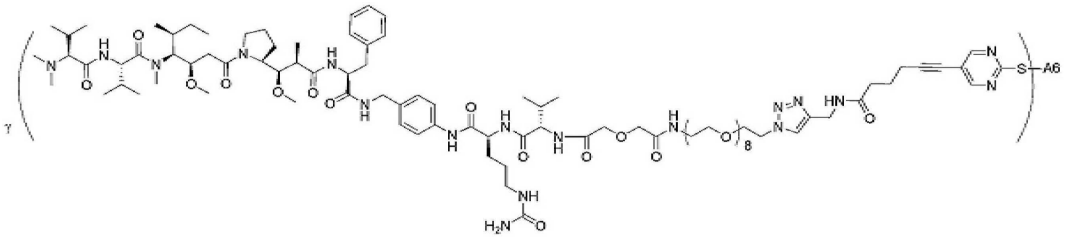
[0465] 

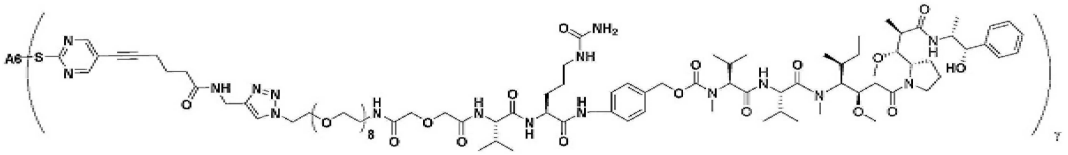
[0466] 

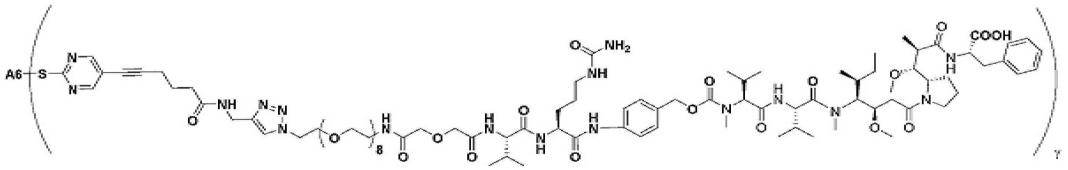
[0467] 

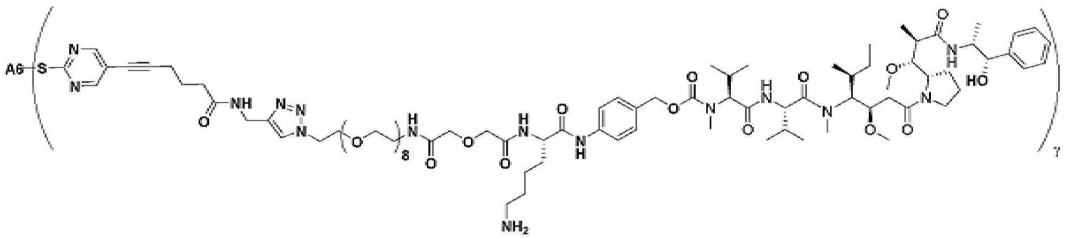
[0468] ,

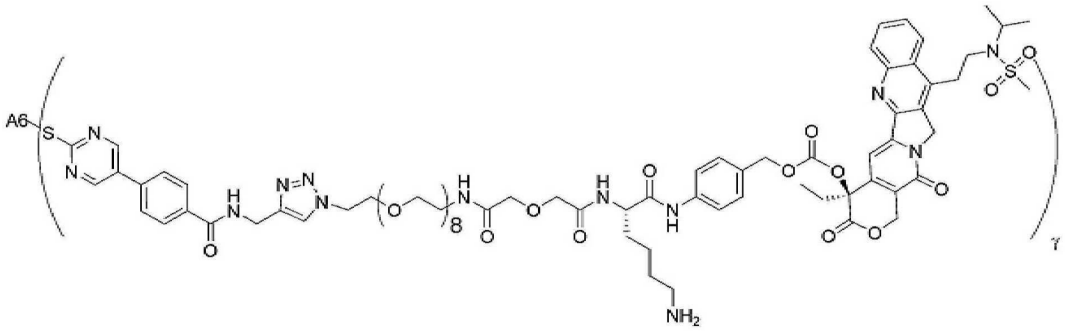
[0469] ,

[0470] ,

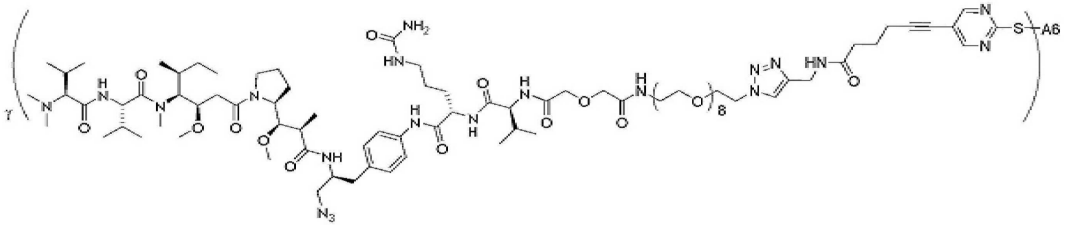
[0471] ,

[0472] ,

[0473] ,



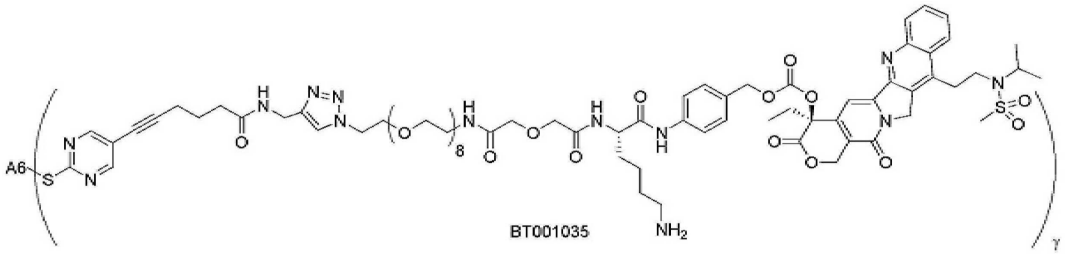
[0474] 또는



[0475] 이며 ;

[0476] 여기서 A6는 항체 M3이고, ɣ은 1부터 10까지의 정수 또는 소수이며; 바람직하게는, ɣ은 5부터 8까지의 정수 또는 소수, 예를 들어, 6-7, 6-7.5, 6-8, 6.5-7, 6.5-7.5, 6.5-8, 7-8 또는 7.5-8의 정수 또는 소수이다.

[0477] 일부 바람직한 구현예에서, 상기 접합체는:



[0478] 이며;

[0479] 여기서 A6는 항체 M3이고, ɣ은 1부터 10까지의 정수 또는 소수이며; 바람직하게는, ɣ은 5부터 8까지의 정수 또는 소수, 예를 들어, 6-7, 6-7.5, 6-8, 6.5-7, 6.5-7.5, 6.5-8, 7-8 또는 7.5-8의 정수 또는 소수이다.

[0480] 또 다른 측면에서, 본 개시는 식 (I) 화합물의 링커를 표적화 부분의 활성기와 커플링하는 단계를 포함하는, 제2 측면의 접합체의 제조방법을 제공한다.

[0481] 일부 바람직한 구현예에서, 상기 방법은 환원제(예: TCEP)에 의해 표적화 부분의 이황화 결합을 개방시켜 설피드릴기(sulfydryl group)를 얻는 단계를 포함한다.

[0482] 일부 바람직한 구현예에서, 상기 방법은 식 (I) 화합물의 링커와 표적화 부분의 설피드릴기 사이에 C-S 결합을 형성하는 단계를 포함한다.

[0483] 일부 바람직한 구현예에서, 상기 표적화 부분은 항-Her 2 단일클론항체(예: 트라스투주맙, 퍼투주맙) 또는 항-Trop-2 단일클론항체(예: 삭시투주맙, M1, M2 또는 M3), 또는 활성 단편 또는 이의 돌연 변이이다.

[0484] 일부 바람직한 구현예에서, 표적화 부분 대 식 (I) 화합물의 몰비는 1:(1-20)이고; 바람직하게는, 상기 커플링은 물 및/또는 유기 용매 안에서 수행되며; 바람직하게는, 상기 유기 용매는 N,N-디메틸포름아미드, 디메틸설폭시드, N-메틸피롤리돈, 니트릴(예: 아세토니트릴), 알코올(예: 메탄올, 에탄올) 또는 이들의 임의의 조합으로부터 선택된다.

[0485] 일부 바람직한 구현예에서, 상기 방법은 커플링 생성물을 정제하는 단계를 더 포함하고; 바람직하게는, 상기 커플링 생성물은 크로마토그래피(예: 이온 교환 크로마토그래피, 소수성 크로마토그래피, 역상 크로마토그래피 또는 친화성 크로마토그래피 중 하나 이상)에 의해 정제된다.

[0486] 또 다른 측면에서, 본 개시는 본 개시의 제1 측면의 화합물 또는 이의 약제학적으로 허용 가능한 염, 또는 제2 측면의 접합체(conjugate), 및 하나 이상의 제약 부형제를 포함하는 약제학적 조성물을 제공한다.

[0487] 또 다른 측면에서, 본 개시는 비정상 세포 활성과 관련된 질환(예: 암)의 치료를 위한 의약의 제조업자의 제1 측면의 화합물 또는 이의 약제학적으로 허용 가능한 염 또는 제2 측면의 접합체의 용도를 제공한다.

[0488] 일부 바람직한 구현예에서, 암은 식도암(예: 식도 선암종, 식도 편평세포 암종), 뇌종양, 폐암(예: 소세포 폐암, 비-소세포 폐암) 편평 세포 암종, 방광암, 위암, 난소암, 복막암, 췌장암, 유방암, 두경부암, 자궁경부암, 자궁내막암, 결장직장암, 간암, 신장암, 비 호지킨 림프종, 중추 신경계 종양(예: 신경아교종, 다형성 교아종(glioblastoma multiforme), 신경교종 또는 육종), 전립선암 및 갑상선암과 같은, 고형 종양 또는 비-고형 종양이다.

[0489] 또 다른 측면에서, 본 개시는 비정상 세포 활성과 관련된 질환(예: 암)의 치료하는 제1 측면의 화합물 또는 이의 약제학적으로 허용 가능한 염 또는 제2 측면의 접합체 또는 이의 약제학적 조성물의 용도를 제공한다.

[0490] 또 다른 측면에서, 본 개시는 이를 필요로 하는 개인에게 제1 측면의 화합물또는 제2 측면의 이의 약제학적으로 허용 가능한 염 또는 접합체 또는 이의 약제학적 조성물의 유효량을 투여하는 단계를 포함하는, 비정상적 세포 활성(예: 암)과 관련된 질환의 치료 방법을 제공한다.

[0491] 달리 특정되지 않는 한, 본 개시에 사용되는 모든 과학 용어 및 기술 용어는 통상의 기술자에게 일반적으로 이해되는 의미를 갖는다. 또한, 본원에 사용되는 세포 배양, 분자 유전학, 핵산 화학 및 면역학 실험 절차는 모두 해당 기술 분야에서 널리 사용되는 일상적 단계이다. 또한, 본 개시의 보다 나은 이해를 위해 관련 용어의 정의 및 설명이 아래에 제공된다.

[0492] 본 개시에서, 약제학적 부형제는 약물 제조 및 약물 제제화에 사용되는 부형제 및 첨가제를 지칭하며, 안전성 측면에서 합리적으로 평가되고 활성 성분 외에 약제학적 제조에 함유되는 물질이다. 부형제, 담체 및 안정성 증강제로서 사용되는 것 외에도, 약제학적 부형제는 또한 가용화, 서방형(sustained release)과 같은 중요한 기능을 가지며, 약물의 품질, 안전성 및 효능에 영향을 미칠 수 있는 중요한 성분이다. 약제학적 부형제는 공급원별로 천연 물질, 반-합성 물질 및 완전-합성 물질로 나뉠 수 있고; 효과와 용도별로 용매, 추진제, 가용화제, 공용매(cosolvents), 유화제, 착색제, 결합제, 붕괴제(disintegrants), 충전제, 윤활제, 습윤제(wetting agents), 삼투압 조절제, 안정제, 조류제(glidant), 착향료, 방부제, 현탁제, 코팅제, 방향족, 접착 방지제, 산화 방지제, 킬레이팅제, 침투 강화제, pH 조절제, 완충제, 가소제, 계면 활성제, 발포제, 소포제, 증점제, 내포제(inclusion agents), 습윤제(humectants), 흡수제, 희석제, 응집제 및 해교제(deflocculants), 필터 보조제 및 방출 지연제로 나뉠 수 있으며; 투여 경로별로 경구 투여, 주사, 점막, 경피 또는 국소 투여, 코 또는 구강 흡입 및 안과 투여로 나뉠 수 있다. 동일한 약제학적 부형제는 상이한 투여 경로를 갖는 약제학적 제조에 사용될 수 있으며, 상이한 효과 및 용도를 갖는다.

[0493] 약제학적 조성물은, 타블렛, 캡슐, 과립제, 경구 액제, 경구 현탁액제, 경구 유화제, 분말제, 팅크제, 시럽제, 주사제, 좌제, 연고제, 크림제, 페이스트제, 안과제, 알약, 피하(subdermals), 에어로졸, 분말 및 스프레이와 같이, 투여 경로에 따라 다양한 적합한 투여 형태로 제제화될 수 있다. 약제학적 조성물 또는 적합한 복용 형태는 본 개시의 화합물 또는 이의 약제학적으로 허용 가능한 염 또는 접합체의 0.01mg 내지 1000mg, 적합하게는 0.1mg 내지 800mg, 바람직하게는 0.5 내지 500mg, 바람직하게는 0.5 내지 350mg, 특히 바람직하게는 1 내지 1-250mg을 함유할 수 있다.

[0494] 약제학적 조성물은 주사용 액체, 주사용 멸균 분말 및 주사용 농축 액을 포함하여 주사 형태로 투여될 수 있다. 허용 가능한 담체 및 용매는 물, 링거액 및 등장성 염화나트륨 용액을 포함한다. 또한, 멸균된 비-휘발성 오일은 또한 용매 또는 현탁 매질, 예컨대 모노 글리세리드 또는 디글리세리드로서 사용될 수 있다.

[0495] 본 개시에서, "개인(individual)"은 인간 또는 인간을 제외한 동물(non-human animal)을 포함한다. 예시적인 인간 개인은, 질환(본원에 언급된 질환)을 앓고 있는 인간 개인(환자로 지칭됨) 또는 정상적인 개인을 포함한다. 본 개시에서, "인간을 제외한 동물"은 모든 척추동물, 예컨대 비-포유류(예: 조류, 양서류, 파충류) 및 포유류, 예컨대 인간을 제외한 영장류, 축산 동물 및/또는 가축(예: 양, 개, 고양이, 소, 돼지 등)을 포함한다.

[0496] 본 개시에서, 용어 "유효량(effective amount)"은, 치료 중인 병태의 하나 이상의 증상을 투여 후 어느 정도까지 완화하는 화합물의 양을 지칭한다.

[0497] 본 개시에서, 용어 "접합체(conjugate)"는 생체활성 분자를 표적화 부분과 연결함으로써 얻은 물질을 지칭한다. 본 개시의 일부 구현예에서, 상기 생체활성 분자는 링커를 통해 표적화 부분에 연결된다. 링커는 특정 환경(예: 세포 내 낮은 pH 환경) 또는 특정 작용(예: 리소좀 프로테아제의 작용) 하에서 절단되어, 생체활성 분자를 표적

화 부분으로부터 분리시킬 수 있다. 본 개시의 일부 구현예에서, 상기 링커는 펩티드 또는 이황화 결합과 같이, 절단성 또는 비-절단성 단위를 포함한다. 본 개시의 일부 구현예에서, 상기 생체활성 분자는 특정 환경 또는 작용 하에서 절단될 수 있는 공유 결합을 통해 표적화 부분에 직접 연결되어, 생체활성 분자를 표적화 부분으로부터 분리시킨다.

[0498] 본 개시에서, 용어 "생체활성 물질(bioactive substance)" 및 "생체활성 분자"는 세포 기능을 억제 또는 예방하는 물질 및/또는 세포 사멸 또는 파괴를 유발하는 물질을 지칭한다. 본 개시의 일부 구현예에서, 접합체의 생체활성 물질 또는 생체활성 분자는 항-종양 생체활성을 갖는 분자이다. 예를 들면: 방사성 동위원소, 예컨대 At^{211}, I^{131}, I^{125}, Y^{90}, Re^{186}, Re^{188}, Sm^{153}, Bi^{212}, P^{32}, Pb^{212} 또는 Lu 방사성 동위원소; 금속 착물, 예컨대 백금 금속 착물, 금 금속 착물 또는 옥살리플라틴(oxaliplatin); 글리코펩티드 항생물질, 예컨대 블레오마이신(bleomycin) 또는 핑양마이신(pingyangmycin); DNA 국소이성질화효소 억제제, 예컨대 국소이성질화효소 I 억제제(예: 캠프토테신(camptothecin), 히드록시캠프토테신, 9-아미노캠프토테신, SN-38, 이리노테칸(irinotecan), 토포테칸(topotecan), 벨로테칸 또는 루비테칸(rubitecan)) 또는 국소이성질화효소 II 억제제(예: 악티노마이신(actinomycin D), 톡신루비신(doxorubicin), 듀오카르마이신(duocarmycin), 다우노루비신(daunorubicin), 미톡산트론(mitoxantrone), 포도필로톡신(podophyllotoxin) 또는 에토포시드(etoposide) 등); DNA 합성을 방해하는 약물, 예컨대 메토트렉세이트(methotrexate), 5-플루오로우라실(5-fluorouracil), 사이타라빈(cytarabine), 젬시타빈(gemcitabine), 메르캅토퓨린(mercaptopurine), 펜토스타틴(pentostatin), 플루다라빈 (fludarabine), 클라드리빈(cladribine) 또는 넬라라빈(nelarabine) 등; 구조 단백질에 작용하는 약물, 예컨대 튜불린 억제제, 빈블라스틴 알칼로이드(vinblastine alkaloid), 빈크리스틴(vincristine), 빈블라스틴(vinblastine), 파클리탁셀(paclitaxel), 도세탁셀(docetaxel) 또는 카바지탁셀(cabazitaxel) 등; 종양 세포 신호전달 경로 억제제(tumor cell signaling pathway inhibitor), 예컨대 세린/트레오닌 키나아제 억제제, 티로신 키나아제 억제제, 아스파르토키나아제 억제제 또는 히스티딘 키나아제 억제제 등이고; 프로테아좀 억제제; 히스톤탈아세틸화효소 억제제(histone deaceylase inhibitor); 종양 혈관 생성(tumor giogenesis); 사이클린 억제제; 메이탄신 유도체(maytansine derivative); 칼리키아마이신 유도체(calicheamicin derivative); 아우리스타틴 유도체(auristatin derivative); 피롤로벤조디아제핀 이합체(Pyrrolobenzodiazepine dimers, (PBD)) 유도체; 멜팔란(melphalan); 미토마이신 C(mitomycin C); 클로람부실(chlorambucil); 및 종양 세포의 성장을 억제하고, 종양 세포의 아팝토시스 또는 괴사를 촉진하는 다른 활성 물질; 효소 및 이의 단편, 예컨대 세포핵융해 효소(karyolytic enzyme); 항생물질; 톡신, 예컨대 균, 곰팡이, 식물 또는 동물에서 기원되는, 소분자 톡신 또는 효소 활성 톡신(단편 및/또는 이의 변이(variant)를 포함); 성장 억제제; 및 약물 모듈을 또한 포함한다. 용어 "톡신(toxin)"은 세포의 성장 또는 증식에 유해한 영향을 미치는 물질을 지칭한다.

[0499] 본 개시에서, 용어 "소분자(small molecule)"는 생체활성을 갖는 소분자 약물을 지칭한다.

[0500] 본 개시에서, 용어 "링커(linker)"는 생체활성 분자를 표적화 부분과 연결한 단편을 지칭한다.

[0501] 본 개시에서, 용어 "표적화 부분(targeting moiety)"은 세포 표면상의 표적(또는 표적의 일부)에 특이적으로 결합할 수 있는 접합체 부분을 지칭한다. 상기 접합체는 표적화 부분과 표적 사이의 상호 작용에 의해 특정 세포 집단으로 전달될 수 있다.

[0502] 본 개시에서, 상기 접합체의 표적화 부분이 항체일 경우, 접합체는 "약물-항체 접합체(drug-antibody conjugate)"으로 지칭될 수 있다. 본 개시에서, 상기 "약물-항체 접합체" 및 "면역 접합체(immune conjugate)"은 상호 교환 가능하다.

[0503] 본 개시에서, 용어 "항체"는 완전 단일클론항체(monoclonal antibody), 다클론항체(polyclonal antibody), 및 적어도 2개의 완전 항체로부터 형성된 다중 특이적 항체(예: 이중 특이적 항체)를 포함하여, 가장 넓은 의미로 해석된다(단, 항체가 생체활성을 요구하는 경우에 한함). 본 개시에서, 용어 "항체" 및 "면역 글로불린(immunoglobulin)"은 상호 교환 가능하다.

[0504] 본 개시에서, 용어 "단일클론항체"는 실질적으로 균일한 항체 군으로부터의 항체를 지칭하는데, 즉 군을 이루는 항체는 소수의 가능한 자연 돌연변이를 제외하고는 동일한 항체를 지칭한다. 단일클론항체는 항원의 하나의 결정 인자(determinant)(에피토프)에 대해 높은 특이성을 갖는 반면, 상보적 다클론항체는 다른 결정 인자들(에피토프들)에 대해 다른 항체들을 함유한다. 특이성 외에, 단일클론항체는 합성 동안에 다른 항체에 의한 오염이 없다는 이점을 갖는다. 본원의 수식어 "단일클론(monoclonal)"은 항체가 실질적으로 균일한 항체 군으로부터 유래되는 것을 특징으로 하며 특별한 방법에 의해 구축되는 것으로 해석되어서는 안된다는 것을 시사한다.

[0505] 본 개시의 일부 구현예에서, 단일클론항체는 또한 키메라항체를 명백하게 포함하는데, 즉 중사슬 및/또는 경사슬의 일부는 항체들의 유형(type), 형(class), 또는 아형(subclass)과 동일하거나 유사한 반면, 나머지는 항체들의 또 다른 유형, 또 다른 형, 또는 또 다른 아형과 동일하거나 유사하다(단, 상기 항체가 생체활성을 요구하는 경우에 한함)(예: US 4, 816, 567; 및 Morrison et al., 1984, PNAS, 81: 6851-6855 참조). 본 개시에 이용 가능한 키메라항체는 인간을 제외한 영장류(예: 고대 원숭이 또는 오랑우탄)로부터 가변 영역 항원 결합 서열 및 인간 불변 영역 서열을 포함하는 영장류화된 항체(primatized antibody)를 포함한다.

[0506] 용어 "항체 단편"은 항체의 일부, 바람직하게는 항원 결합 영역 또는 가변 영역을 지칭한다. 항체 단편의 예로는 includes Fab, Fab', $F(ab')_2$, Fd, Fv, dAb 및 상보성 결정 단편(complementary determinant fragment), 이중체(diabody), 선형 항체 및 단일 사슬 항체 분자를 포함한다.

[0507] "이중 기능적 항체 접합체(bifunctional 항체 conjugate)"으로도 알려진, 용어 "이중 특이적 항체(bispecific antiboody)"는 커플링 암(coupling arm)을 통해 제1 항체(단편) 및 제2 항체(단편)에 의해 형성된 접합체를 지칭한다. 상기 접합체는 각각의 항체의 활성을 보유하여, 이중 기능성 및 이중 특이적 성질을 갖는다.

[0508] 용어 "다중 특이적 항체(multispecific antiboody)"는, 예를 들어, 3개의 서로 다른 항원 결합 특이성을 갖는 항체인, 삼중 특이적 항체, 및 4개의 서로 다른 항원 결합 특이성을 갖는 항체인, 사중 특이적 항체를 포함한다.

[0509] 용어 "완전 항체(complete antibody)"는 항원 결합 가변 영역, 경사슬 불변 영역(CL) 및 중사슬 불변 영역(CH1, CH2 및 CH3)을 포함하는 항체를 지칭한다. 상기 불변 영역은 자연 서열(예: 인간 자연 불변 영역 서열) 또는 이의 아미노산 서열 변이일 수 있다. 상기 완전 항체는 바람직하게는 하나 이상의 작동체 기능(effector function)을 갖는 완전 항체이다.

[0510] 용어 "프로바디(probody)"는 이의 표적에 특이적으로 결합할 수 있고 마스킹된 군(masked group)과 커플링될 수 있는 항체 또는 항체 단편을 포함하는 개질된 항체이며, 여기서 마스킹된 기는, 표적에 대한 항체 또는 항체 단편의 결합 능력에 대한 절단 상수(cleavage constant)가, 표적에 대한 마스킹된 기와 결합되지 않은 항체 또는 항체 단편의 결합 능력에 대해 적어도 100 배 또는 1000 배 또는 10000 배 더 큰 것을 지칭한다.

[0511] 본 개시에서, 인간을 제외(예: 마우스)한 항체의 "인간화된(humanized)" 형태는 최소량의 인간을 제외한 면역글로불린 서열을 포함한 키메라항체를 지칭한다. 대부분의 인간화항체는 인간 수용 면역글로불린의 초가변 영역의 잔기는, 인간을 제외한 동물(예: 마우스, 랫트, 토끼 또는 인간을 제외한 영장류)의 초가변 영역(공여자 항체)의 잔기로 치환되어, 요구되는 특이성, 친화도 및 기능을 갖는 항체이다. 일부 구현예에서, 인간 면역글로불린의 프레임 영역(FR)의 잔기는 또한 인간을 제외한 동물의 잔기로 치환된다. 게다가, 인간화항체는 또한 수용 항체 또는 공여자 항체에 존재하지 않는 잔기를 함유 할 수 있다. 이러한 개질은 항체 성능을 더 최적화하기 위해 이루어진다. 인간화항체는 일반적으로 적어도 하나의 가변 영역, 전형적으로 2개의 가변 영역을 함유하며, 이중 전부 또는 거의 전부의 초 변이 가능한 루프(hypervanable loops)는 인간을 제외한 동물의 면역 글로불린에 상응하는 반면, 전부 또는 거의 전부의 FR은 인간 면역글로불린 서열의 것들이다. 인간화항체는 또한 면역글로불린 불변 영역(Fc, 일반적으로 인간 면역글로불린 Fc)의 적어도 일부를 함유할 수 있다(자세한 내용은, 예를 들어 Jones et al., 1986, Nature, 321 : 522-525; Riechmann et al., 1988, Nature, 332 : 323-329; 및 Presta, 1992, Curr Op Struct Bwl 2 : 593-596를 참조)

[0512] 완전 항체는 중사슬 불변 영역의 아미노산 서열에 따라 서로 다른 "형(class)"들로 분류될 수 있다. 주요 5가지 집단은 IgA, IgD, IgE, IgG 및 IgM이고, 이 중 몇몇은 또한, 예컨대 IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1 및 IgA2인, "아형(sublass, isotype)"들로 더 분류될 수 있다. 항체의 중사슬 불변 영역의 서로 다른 형은 각각 α, β, ε, γ 및 μ라고 한다. 면역글로불린의 서브유닛 구조 및 3D 배열은 당 업계에 잘 공지되어 있다.

[0513] 본 개시에서, 대부분의 경우에서 항체의 아미노산 치환은 L-아미노산으로 치환되더라도, 본 구현예는 이에 제한되지 않는다. 일부 구현예에서, 항체 펩티드 사슬은 하나 이상의 D-아미노산을 함유할 수 있다. D-아미노산을 함유하는 펩티드는, L-아미노산만 함유하는 펩티드보다 구강, 장 또는 혈장에서 보다 안정적이며 보다 낮은 분해성을 가질 수 있다.

[0514] 본 개시에 사용되는 단일클론항체는 다수의 방법에 의해 제조될 수 있다. 예를 들어, 본 개시에 사용되는 단일클론항체는 많은 종(마우스, 햄스터, 랫트 및 인간을 포함)에 사용하는 hybridoma 법(예를 들어, Kohler et al., 1975, Nature, 256: 495 참조), 또는 재조합 DNA 기술(예를 들어, US 4, 816, 567 참조)에 의해 수득될 수 있거나, 또는 파지 항체의 라이브러리로 분리(예를 들어, Clackson et al., 1991, Nature, 352: 624-628;

및 Marks et al., 1991, Journal of Molecular Biology, 222: 581-597 참조)될 수 있다. 본 개시에 사용되는 단일클론항체는 항-Her 2 단일클론항체, 예컨대 트라스투주맙 및 퍼투주맙, 또는 항-Trop-2 단일클론항체, 예컨대 삭시투주맙(즉, 이삭투주맙(Isactuzumab) 또는 hRS7 antibody), M1, M2 또는 M33을 포함하지만, 이에 한정되지 않는다.

[0515] 일부 바람직한 구현예에서, A의 표적은 표피생장인자(epidermal growth factor), Trop-2, CD37, HER2, CD70, EGFRvIII, 메소텔린(Mesothelin), 엽산 수용체1(Folate Receptor1), 뮤신 1, CD138, CD20, CD19, CD30, SLTRK6, 넥틴4, 조직인자(Tissue factor), 뮤신 16, 엔도텔린 수용체(Endothelin receptor), STEAP1, SLC39A6, 구아닐산 고리화 효소 C(Guanylyl cyclase C), PSMA, CCD79b, CD22, 인산 나트륨 공동수송체 2B, GPNMB, 세포영양막 당단백질(Trophoblast glycoprotein), AGS-16, EGFR, CD33, CD66e, CD74, CD56, PD-L1, TACSTD2, DR5, E16, 0772P, MPF, Napi3b, Sema 5b, PSCA hlg, ETBR, MSG783, STEAP2, TrpM4, CRIPTO, CD21, CD79b, FcRH2, NCA, MDP, IL20Rα, 브레비칸(Brevican), EphB2R, ASLG659, PSCA, GEDA, BAFF-R, CD79a, CXCR5, HLA-DOB, P2X5, CD72, LY64, FcRH1, IRTA2, TENB2, 인테그린 α5β6, α4β7, FGF2, FGFR2, Her3, CA6, DLL3, DLL4, P-캐드헤린, EpCAM, pCAD, CD223, LYPD3, LY6E, EFNA4, ROR1, SLITRK6, 5T4, ENPP3, 클라우딘 18.2, BMPR1B, Tyro7, c-Met, ApoE, CD1 lc, CD40, CD45(PTPRC), CD49D(ITGA4), CD80, CSF1R, CTSD, GZMB, Ly86, MS4A7, PIK3AP1, PIK3CD, CCR5, IFNG, IL10RA1, IL-6, ACTA2, COL7A1, LOX, LRRC15, MCPT8, MMP10, NOG, SERPINE1, STAT1, TGFBR1, CTSS, PGF, VEGFA, C1QA, C1QB, ANGPTL4, EGLN, EGLN3, BNIP3, AIF1, CCL5, CXCL10, CXCL11, IFI6, PLOD2, KISS1R, STC2, DDIT4, PFKFB3, PGK1, PDK1, AKR1C1, AKR1C2, CADM1, CDH11, COL6A3, CTGF, HMOX1, KRT33A, LUM, WNT5A, IGFBP3, MMP14, CDCP1, PDGFRA, TCF4, TGF, TGFB1, TGFB2, CD1 lb, ADGRE1, EMR2, TNFRSF21, UPK1B, TNFSF9, MMP16, MFI2, IGF-1R, RNF43, NaPi2b, 또는 BCMA로부터 선택된다.

[0516] 본 개시의 일부 구현예에서, 표적화 부분 A의 표적은 세포 표면 인테그린 수용체를 인식하는 RGD 펩티드; 세포 표면 성장 인자 수용체를 인식하는 성장 인자, 예컨대 EGF, PDGF 또는 VEGF; 및 기능적 세포 표면 플라스미노겐 활성화제, 봄베신(bombesin), 브래디키닌(bradykinin), 소마토스타틴(somatostatin) 또는 전립선-특이적 막 항원 수용체를 인식할 수 있는 펩티드로부터 선택된다.

[0517] 본 개시의 일부 구현예에서, 상기 표적화 부분 A의 표적은 CD40 리간드, CD30 리간드, OX40 리간드, PD-1 리간드, ErbB 리간드, Her2 리간드, TACSTD2 리간드 및 DR5 리간드로부터 선택된다.

[0518] 본 개시의 일부 구현예에서, 상기 표적화 부분 A는 트라스투주맙 또는 퍼투주맙과 같이, 항-Her 2 단일클론항체; 또는 삭시투주맙, M1, M2 또는 M3과 같이, 항-Trop-2 단일클론항체이다.

[0519] 본 개시의 일부 구현예에서, 상기 표적화 부분은 트라스투주맙이고 또는 퍼투주맙이다. 트라스투주맙은 항-Her 2 단일클론항체이고, 이의 아미노산 서열은 당해 기술 분야의 통상의 기술자에 공지되어 있고, 이의 계통학적 서열은 예를 들어, CN103319599를 참고한다.

[0520] 본 개시의 일부 구현예에서, 상기 표적화 부분의 중사슬의 말단 Lys가 쉽게 결실되지만, 이런 결실은 생체활성에 영향을 미치지 않는다(Dick, L.W. et al., Biotechnol. Bioeng., 100: 1132-1143 참조). 예를 들어, 상기 표적화 부분은 중사슬의 말단 Lys이 결실된, 항-Trop-2 단일클론항체, 예컨대 중사슬의 말단 Lys이 결실된 삭시투주맙, M1, M2 또는 M3이고, 예를 들어, 상기 표적화 부분은 중사슬의 말단 Lys이 결실된, 항-Her 2 단일클론항체, 예컨대 중사슬의 말단 Lys이 결실된 트라스투주맙 또는 퍼투주맙이다.

[0521] 트라스투주맙의 중사슬 및 경사슬의 예시적인 서열은, SEQ ID No.: 17 및 SEQ ID No.:18을 지칭한다. 본 개시에 지칭 또는 관련된 트라스투주맙의 중사슬 및 경사슬 서열은 SEQ ID No.: 17 및 SEQ ID No.: 18에 각각 나타낸 서열을 사용하여 기술한다. 퍼투주맙의 중사슬 및 경사슬 예시적인 서열은, US7560111의 SEQ ID No.: 16 및 SEQ ID No.: 15를 참조한다.

[0522] SEQ ID No.:17(중사슬 서열)

[0523] EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFNIKDTYIHWVRQAPGKGLEWVARIYPTNGYTRYADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCSRWGGD
GFYAMDYWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICN
VNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVV
SVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFF
LYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG(K)

[0524] SEQ ID No.:18(경사슬 서열)

[0525] DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDVNTAVAWYQQKPGKAPKLLIYSASFLYSGVPSRFSGSRSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQHYTTPPTFGQGT
KVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSP
VTKSFNRGEC

[0526] 본 개시의 일부 구현예에서, 상기 표적화 부분의 항-Trop-2 항체는, U.S. 특허 7, 517, 964에 기술된 RS7(즉, 본 개시의 삭시투주맙)이고; US2012/0237518에 기술된 hRS7(즉, 본 개시의 삭시투주맙)이다. 본 개시에 이용 가능한 항-Trop-2 항체는 담체는 또한 CN103476941A에 개시된 바와 같이 담체설계, 구축 및 항체를 진열한 항체 라이브러리의 구축을 통해 스크리닝함으로써 얻을 수 있거나 또는, Sorrento Therapeutics, Inc.의 G-MAB® 라이브러리를 스크링함으로써 얻을 수 있다.

[0527] 단일클론항체 삭시투주맙의 중사슬 및 경사슬 아미노산 서열에 대해서는, 예를 들어, SEQ ID No.: 19 및 SEQ ID No.:20를 각각 참조한다.

[0528] SEQ ID No.:19(중사슬 서열)

[0529] QVQLQQSGSELKKPGASVKVSCKASGYTFTNYGMNWVKQAPGQGLKWMGWINTYTGEPTYTDDFKGRFAFSLDTSVSTAYLQISSLKADDTAVYFCARGGFG
SSYWYFDVWGQGSLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYIC
NVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRV
VSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSF
FLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG(K)

[0530] 중사슬의 말단K(또는 lys)가 쉽게 결실되지만, 이런 결실은 생체활성에 영향을 미치지 않는다(Dick, L.W. et al., Biotechnol. Bioeng., 100: 1132-1143 참조).

[0531] SEQ ID No.:20(경사슬 서열)

[0532] DIQLTQSPSSLSASVGDRVSITCKASQDVSIAVAWYQQKPGKAPKLLIYSASYRYTGVPDRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFAVYYCQQHYITPLTFGAGT
KVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSP
VTKSFNRGEC

[0533] 본 개시에서, ErbB2 및 Her2/neu는 상호 교환 가능하며, 이 둘 모두 자연 서열의 인간 Her2 단백질(Genebank CAS No.: X03363, 예를 들어, Semba et al., 1985, PNAS, 82: 6497-6501; 및 Yamamoto et al., 1986, Nature, 319: 230-234 참조) 이의 기능적 유도체, 예컨대 아미노산 서열 변이를 나타낸다. ErbB2는 인간 Her2를 인코딩하는 유전자를 나타내고 neu는 랫트 p185neu를 인코딩한 유전자를 나타낸다. 일부 구현예에서, 본 개시의 화합물 또는 접합체는 수용체를 발현하는 세포, 예컨대 예컨대 유방암 세포, 난소암 세포, 위암 세포, 자궁내막암 세포, 침샘암 세포, 폐암 세포, 신장암 세포, 결장암 세포, 갑상선암 세포, 췌장암 세포, 방광암 세포 또는 간암 세포를 억제하거나 사멸할 수 있다.

[0534] 본 개시에서, Trop-2 또는 TROP2는 많은 인간 종양(예: 유방암, 결장 직장암, 폐암, 췌장암, 난소암, 전립선암 및 자궁경부암)에서 발현되는 세포 표면 수용체인, TACSTD2, M1S1, GA733-1, EGP-1로도 알려져 있는, 인간 영양막 세포 표면 항원 2(human trophoblast cell-surface antigen 2)를 지칭한다. 일부 구현예에서, 본 개시의 화합물 또는 접합체는 TROP2 수용체를 발현하는 세포, 예컨대 유방암 세포, 결장 직장암 세포, 폐암 세포, 췌장암 세포, 난소암 세포, 전립선암 세포 또는 자궁경부암 세포를 억제 또는 사멸시킬 수 있다.

[0535] 본원에 사용된 바와 같이, 본 발명의 접합체에 함유된  또는  는, 표적화 부분이 항체일 경우, 상기 항체의 설피드릴 기 및 링커의 특이적 결합 모드를 나타낸다.

[0536] 본원에 사용된 바와 같이, 용어 "C_{1-6} 알킬"은 1-6 탄소 원자 함유의 선형 또는 분지형 알킬을 지칭하며, 예를 들어, "C_{1-4} 알킬" 및 "C_{1-3} 알킬"을 포함한다. 구체적인 예로는 메틸, 에틸, n-프로필, 이소프로필, n-부틸, 이소부틸, sec-부틸, tert-부틸, n-펜틸, 이소-펜틸, 2-메틸 부틸, 네오펜틸, 1-에틸 프로필, n-헥실, 이소헥실, 3-메틸 펜틸, 2-메틸 펜틸, 1-메틸 펜틸, 3, 3-디메틸 부틸, 2, 2-디메틸 부틸, 1, 1-디메틸 부틸, 1,2-디메틸 부틸, 1,3-디메틸 부틸, 2, 3-디메틸 부틸, 2-에틸 부틸 및 1,2-디메틸 프로필을 포함하지만, 이에 한정되지 않는다.

[0537] 본원에 사용된 바와 같이, 용어 "C_{2-6} 알케닐"은 적어도 하나의 이중 결합 및 2-6 탄소 원자 함유의 선형, 분지

형 또는 고리형 알케닐을 지칭하며, 예를 들어, "C_{2-4} 알케닐"을 포함한다. 이들의 예로는 비닐, 1-프로페닐, 2-프로페닐, 1-부테닐, 2-부테닐, 1,3-부타디에닐, 1-펜테닐, 2-펜테닐, 3-펜테닐, 1,3-펜타디에닐, 1,4-펜타디에닐, 1-헥세닐, 2-헥세닐, 3-헥세닐, 1,4-헥사디에닐, 시클로펜테닐, 1,3-시클로펜타디에닐, 시클로헥세닐 및 1,4-시클로헥사디에닐을 포함하지만, 이에 제한되지 않는다.

[0538] 본원에 사용된 바와 같이, 용어 "C_{2-6} 알키닐"은 적어도 하나의 삼중 결합을 함유하고, 2-6개의 탄소 원자를 함유하는, 선형 또는 분지형 알키닐을 지칭하며, 예를 들어, "C_{2-4} 알키닐"을 포함한다. 이들의 예로는 에티닐, 프로피닐, 2-부티닐, 2-펜티닐, 3-펜티닐, 4-메틸-2-펜티닐, 2-헥시닐, 3-헥시닐, 및 5-메틸-2-헥시닐을 포함하지만, 이에 한정되지 않는다.

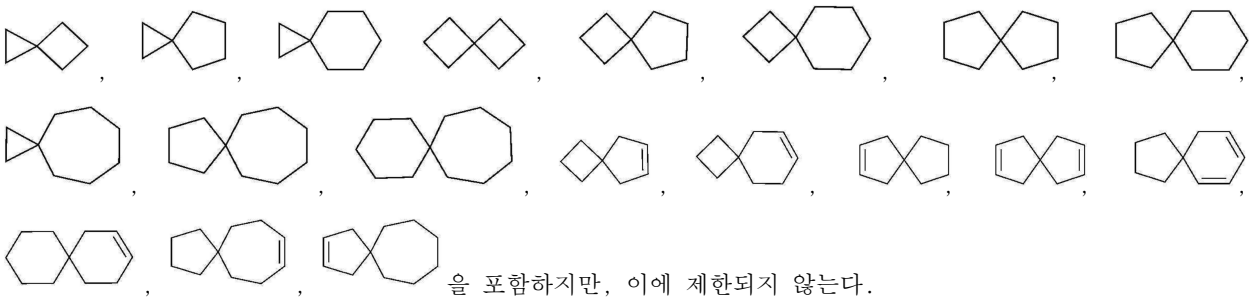
[0539] 본원에 사용된 바와 같이, 용어 "할로겐"은 불소, 염소, 브롬 및 요오드를 포함한다.

[0540] 본원에 사용된 바와 같이, 용어 "3-8 원 시클로알킬" 또는 "C_{3-8} 시클로알킬"은 3-8 탄소 원자 함유 포화 고리형 알킬을 지칭하며, 예를 들어, "3-6 원 시클로알킬", "4-6 원 시클로알킬", "5-7 원 시클로알킬" 또는 "5-6 원 시클로알킬"을 포함한다. 구체적인 예로는 시클로프로파닐, 시클로부틸알킬, 시클로펜타닐, 시클로헥실, 시클로헵틸 및 시클로옥타데실을 포함하지만, 이에 한정되지 않는다.

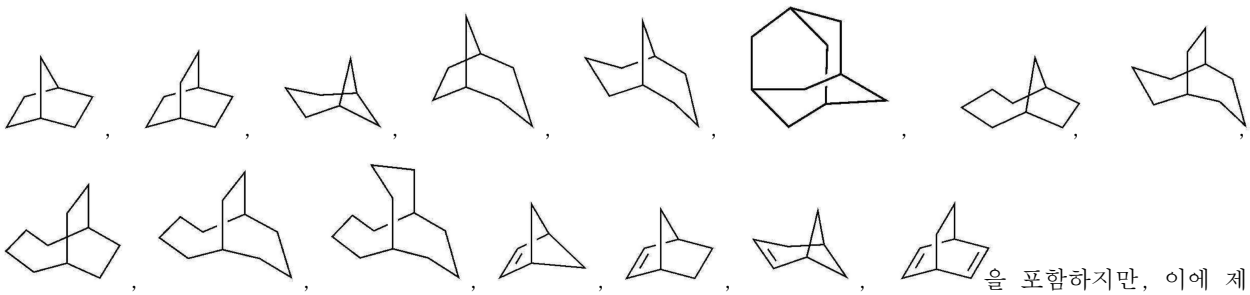
[0541] 본원에 사용된 바와 같이, 용어 "C_{1-6} 알콕시"는 C_{1-6} 알킬-O- 구조를 갖는 기를 지칭하며, 여기서 C_{1-6} 알킬은 이전에 정의된 바와 같다. 구체적인 예로는 메톡시, 에톡시, 프로폭시, 이소프로폭시, n-프로폭시, 이소프로폭시, n-부톡시, 이소부톡시, tert-부톡시, 펜톡시 및 헥실옥시를 포함하지만, 이에 한정되지 않는다.

[0542] 본원에 사용된 바와 같이, 용어 "3-8 원 지방족 헤테로시클릴"은 3-8 고리-형성 원자 함유 고리-형성 기(이 중 적어도 하나는 헤테로 원자, 예컨대 질소 원자, 산소 원자 또는 황 원자임)를 지칭한다. 선택적으로, 상기 고리형 구조의 고리-형성 원자(예: 탄소 원자, 질소 원자 또는 황 원자)는 산소로 치환될 수 있다. 상기 "3-8 원 지방족 헤테로시클릴"은, 예를 들어, "3-8 원 질소-함유 지방족 헤테로시클릴, " "3-8 원 산소-함유 지방족 헤테로시클릴, " "3-6 원 지방족 헤테로시클릴, " "3-6 원 산소-함유 지방족 헤테로시클릴, " "4-7 원 지방족 헤테로시클릴, " "4-6 원 지방족 헤테로시클릴, " "5-7 원 지방족 헤테로시클릴, " "5-6 원 지방족 헤테로시클릴, " "5-6 원 질소-함유 지방족 헤테로시클릴, "을 포함하고, 옥시라닐, 옥소시클로부틸, 피롤리디닐, 테트라히드로푸라닐, 피페리디닐, 피페라지닐, 테트라히드로피라닐 및 호모피페라지닐을 포함하지만, 이에 제한되지는 않는다.

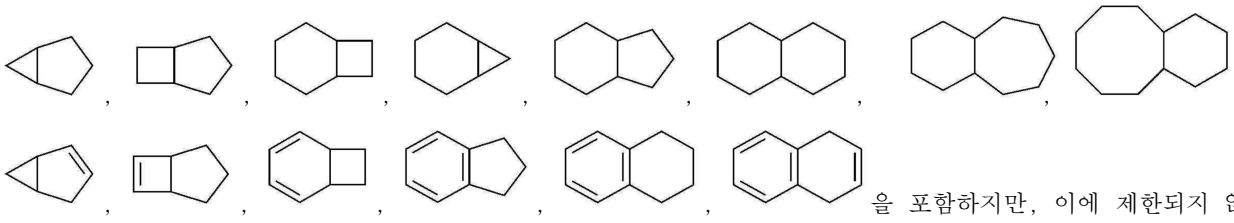
[0543] 본원에 사용된 바와 같이, 용어 "6-12 원 스피로시클릴"은 6-12개의 고리-형성 탄소 원자를 함유하고 하나의 탄소 원자를 공유하는 2개 이상의 고리 구조에 의해 형성된 고리 구조를 지칭한다. 선택적으로, 고리형 구조의 탄소 원자는 산소로 치환될 수 있다. 예를 들어, "6-12 원 스피로시클릴"은 예를 들어 "6-11 원 스피로시클릴", "6-10 원 스피로시클릴", "7-10 원 스피로시클릴", "7-9 원 스피로시클릴", "7-8 원 스피로시클릴", "9-10 원 스피로시클릴" 및 "3-10 원 스피로시클릴"을 포함한다. 구체적인 예로는

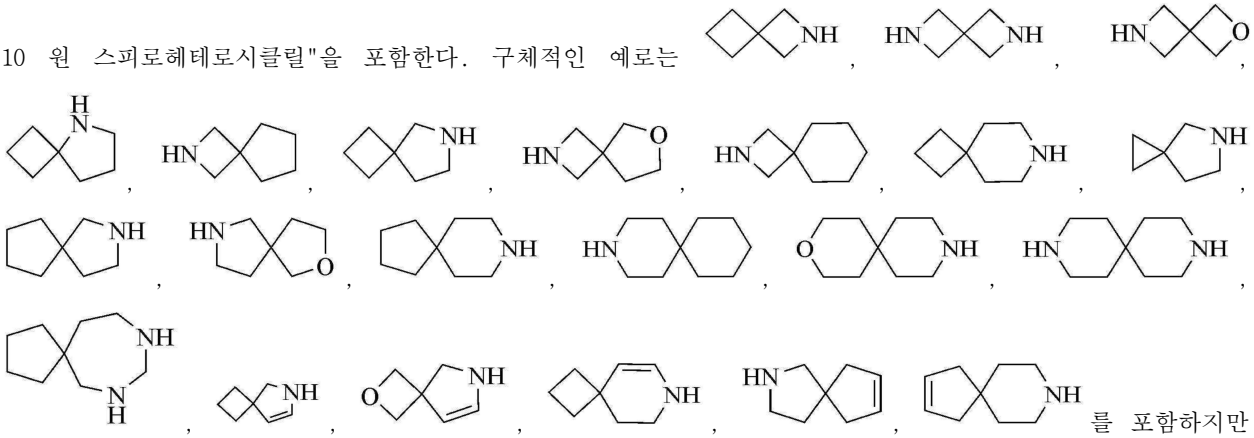
[0544] 
을 포함하지만, 이에 제한되지 않는다.

[0545] 본원에 사용된 바와 같이, 용어 "6-12 원 브릿지 시클릴"은 6-12개의 고리-형성 탄소 원자를 함유하고 2개의 비인접 탄소 원자를 공유하는 2개 이상의 고리형 구조에 의해 형성된 고리형 구조를 지칭하며, 선택적으로, 고리형 구조의 탄소 원자는 산소로 치환될 수 있다. 예를 들어, "6-12 원 브릿지 시클릴"은 예를 들어 "6-11 원 브릿지 시클릴", "5-10 원 브릿지 시클릴", "7-10 원 브릿지 시클릴", "7-9 원 브릿지 시클릴", "7-8 원 브릿지 시클릴", "9-10 원 브릿지 시클릴"및 "3-10 원 브릿지 시클릴"을 포함한다. 구체적인 예로는 ,

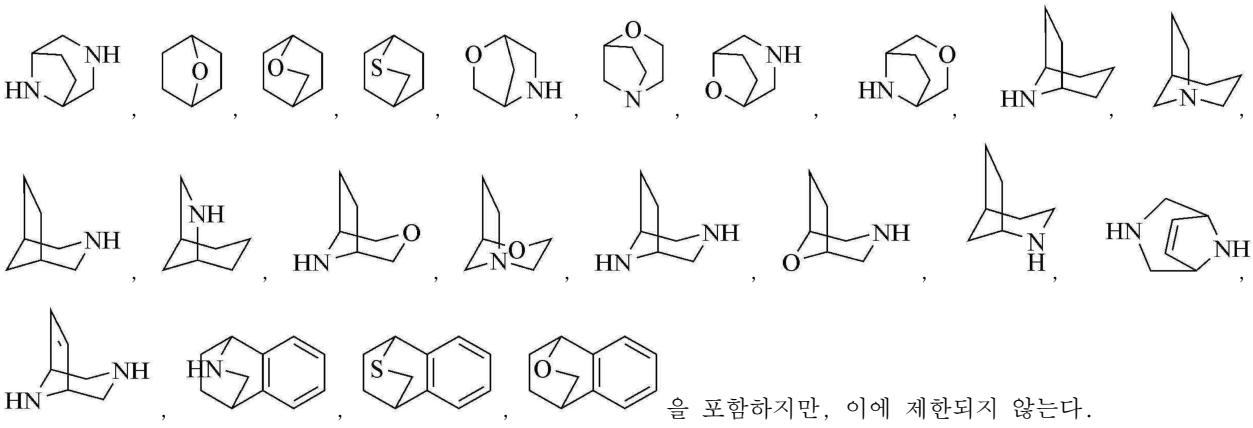

을 포함하지만, 이에 제한되지 않는다.

[0546] 본원에 사용된 바와 같이, 용어 "6-12 원 융합 시클릴"은 6-12개의 고리-형성 탄소 원자를 함유하고 2개의 인접한 원자를 공유하는 2개 이상의 고리형 구조에 의해 형성된 고리형 구조를 지칭하며, "6-11 원 융합 시클릴", "6-10 원 융합 시클릴", "6-8 원 융합 시클릴", "10-12 원 융합 시클릴", "7-10 원 융합 시클릴"을 포함한다. 이들의 예로는

[0547] 
을 포함하지만, 이에 제한되지 않는다.

[0548] 본원에 사용된 바와 같이, 용어 "6-12 원 스피로헤테로시클릴"은 6-12개의 고리-형성 원자(적어도 하나는 질소 원자, 산소 원자 또는 황 원자와 같은 헤테로 원자임)를 함유하고 하나의 고리-형성 원자를 공유하는 2개 이상의 고리형 구조에 의해 형성된 고리형 구조를 지칭한다. 선택적으로, 고리형 구조에서 고리-형성 원자(예: 탄소 원자, 질소 원자 또는 황 원자)는 산소로 치환될 수 있다. 예를 들어, "6-12 원 스피로헤테로시클릴"은 "6-11 원 스피로헤테로시클릴", "5-10 원 스피로헤테로시클릴", "7-11 원 스피로헤테로시클릴", "7-10 원 스피로헤테로시클릴", "7-9 원 스피로헤테로시클릴", "7-8 원 스피로헤테로시클릴", "9-10 원 스피로헤테로시클릴" 및 "3-10 원 스피로헤테로시클릴"을 포함한다. 구체적인 예로는 
를 포함하지만 이에 제한되지 않는다.

[0549] 본원에 사용된 바와 같이, 용어 "6-12 원 브릿지 헤테로시클릴"은 6-12개의 고리-형성 원자(적어도 하나는 질소 원자, 산소 원자 또는 황 원자와 같은 헤테로 원자임)를 함유하고 2개의 비 인접 고리-형성 원자를 공유하는 2개 이상의 고리형 구조에 의해 형성되는 고리형 구조를 지칭한다. 선택적으로, 고리형 구조에서 고리-형성 원자(예를 들어, 탄소 원자, 질소 원자 또는 황 원자)는 산소로 치환될 수 있다. 예를 들어, "6-12 원 브릿지 헤테로시클릴"은 "6-11 원 브릿지 헤테로시클릴", "6-9 원 브릿지 헤테로시클릴", "6-10 원 브릿지 헤테로시클릴", "7-10 원 브릿지 헤테로시클릴", "7-9 원 브릿지 헤테로시클릴", "7-8 원 브릿지 헤테로 시클릴", "8 원 브릿지 헤테로시클릴", "9-10 원 브릿지 헤테로시클릴" 및 "3-10 원 브릿지 헤테로시클릴"을 포함한다. 구체적인 예로는, 



을 포함하지만, 이에 제한되지 않는다.

[0550] 본원에 사용된 바와 같이, 용어 "6-12 원 융합 헤테로시클릴"은 6-12개의 고리-형성 원자(적어도 하나는 질소 원자, 산소 원자 또는 황 원자와 같은 헤테로 원자임)를 함유하고 2개의 인접한 원자를 공유하는 2개 이상의 고리형 구조에 의해 형성된 고리형 구조를 지칭한다. 선택적으로, 고리형 구조의 고리-형성 원자(예를 들어, 탄소 원자, 질소 원자 또는 황 원자)는 산소로 치환될 수 있다. 예를 들어, "6-12 원 융합 헤테로시클릴"은 "6-11 원 융합 헤테로시클릴", "5-10 원 융합 헤테로시클릴", "7-10 원 융합 헤테로시클릴", "3-10 원 융합 헤테로시클릴", "9-10 원 융합 헤테로시클릴", "9-10 원 질소-함유 융합 헤테로 시클릴", "9-10 원 산소-함유 융합 융합 헤테로시클릴"을 포함한다. 구체적인 예로는 테트라히드로이미다조[4,5-c]피리딜, 3,4-디히드로퀴나졸리닐, 1,2- 디히드로퀴녹살리닐, 벤조[d] [1,3]디옥솔릴, 1,3-디히드로이소벤조푸라닐, 4H-1,3-벤조옥사지닐, 4,6-디히드로-1H-푸로[3,4-d]이미다졸릴, 3a,4,6,6a-테트라히드로-1H-푸로[3,4-d]이미다졸릴, 4,6-디히드로-1H-티에노[3,4-d]이미다졸릴, 4,6-디히드로-1H-피롤로[3,4-d]이미다졸릴, 벤조이미다졸리디닐, 옥타히드로-벤조[d]이미다졸릴, 데카히드로퀴놀릴, 헥사히드로티에노이미다졸릴, 헥사히드로푸로이미다졸릴, 4,5,6,7-테트라히드로-1H-벤조[d]이미다졸릴, 옥타히드로 시클로펜테노[c]피롤릴, 디히드로인돌릴, 디히드로이소인돌릴, 벤조 옥사졸리디닐, 벤조티아졸리디닐, 1,2,3,4-테트라히드로이소퀴놀리닐, 1,2,3,4-테트라히드로퀴놀리닐 및 4H-1,3-벤조옥사지닐을 포함하지만, 이에 한정되지 않는다.

[0551] 본원에 사용된 바와 같이, 용어 "아릴"은, 6-20 원 아릴, 6-10 원 아릴 및 5-8 원 아릴과 같이, 방향족성을 갖는 모노시클릭 또는 폴리시클릭 히드로카르보닐을 지칭한다. 구체적인 예로는 페닐, 나프틸, 안트라세닐 및 페난트릴을 포함하지만, 이에 한정되지 않는다. 상기 "6-20 원 아릴"은 6-20 고리-형성 원자를 포함하는 아릴을 지칭한다.

[0552] 본원에 사용된 바와 같이, 용어 "헤테로아릴"은 방향족성을 갖는 시클릭기를 지칭하는데, 여기서 적어도 하나의 고리-형성 원자는 질소 원자, 산소 원자 또는 황 원자와 같이, 헤테로원자이다. 선택적으로, 시클릭 구조의 고리-형성 원자(예: 탄소 원자, 질소 원자 또는 황 원자)는 산소로 치환될 수 있다. 구체적인 예로는 5-10 원 헤테로아릴, 5-10 원 질소-함유 헤테로아릴, 6-10 원 산소-함유 헤테로아릴, 6-8 원 질소-함유 헤테로아릴 및 5-8 원 산소-함유 헤테로아릴이고, 예컨대 푸릴, 티에닐, 피롤릴, 티아졸릴, 이소티아졸릴, 티아디아졸릴, 옥사졸릴, 이소옥사졸릴, 옥사디아졸릴, 이미다졸릴, 피라졸릴, 1,2,3-트리아졸릴, 1,2,4-트리아졸릴, 1,2,3-옥사디아졸릴, 1,2,4-옥사디아졸릴, 1,2,5-옥사디아졸릴, 1, 3,4-옥사디아졸릴, 피리딜, 2-피리돈, 4-피리돈, 피리미디닐, 1,4-디디옥사시클로헥사디에닐, 2*H*-1,2-옥사지닐, 4*H*-1,2-옥사지닐, 6*H*-1,2-옥사지닐, 4*H*-1,3-옥사지닐, 6*H*-1,3-옥사지닐, 4*H*-1,4-옥사지닐, 피리다지닐, 피라지닐, 1,2,3-트리아지닐, 1,3,5-트리아지닐, 1,2,4,5- 테트라지닐, 아자시클로헵타트리에닐, 1,3-디아자시클로헵타트리에닐 및 아자시클로옥테트라에닐을 포함하지만, 이에 한정되지 않는다.

[0553] **<u>본 발명의 유리한 효과</u>**

[0554] 본 개시는 ADC 또는 SMDC에서 약물의 커플링 방식 및 표적화 부분을 개선함으로써 일종의 신규한 생체활성 분자 접합체를 수득한다. 본 개시의 일부 구현예에서, 생체활성 분자 접합체는 항체의 유리-설프히드릴에 의한 ADC 링커 상의 헤테로아릴 고리의 친핵성 치환을 통해 수득된다. 커플링에 의해 얻어진 접합체는 다음의 기술적 효과 중 적어도 하나를 달성할 수 있다:

[0555] (1) 높은 안정성;

[0556] (2) 본원의 접합체의 DAR 값은 일부 구현예에서 5-8에 도달할 수 있는, 높은 DAR;

[0557] (3) 일부 구현예에서, 커플링 효율은 90 %에 도달할 수 있는, 매우 높은 커플링 효율;

[0558] (4) 커플링에 의해 수득된 접합체는 순환에서 약물의 안정성을 효과적으로 개선하고 비표적 세포에서 예상치 못한 약물의 해리를 감소시킬 수 있다;

[0559] (5) 본원의 접합체는 또한 독성 감소 및 효능 증가의 목적을 달성하기 위해 세포에서 생체활성 분자의 유효 방출을 증가시킬 수 있다;

[0560] (6) 본원 접합체는 우수한 종양 조직 표적성을 갖는다; 및

[0561] (7) 본원 접합체는 동물 모델의 종양에서 우수한 효능을 갖는다.

[0562] 또한, 본 개시에 기재된 커플링 방법은 광범위한 적용 범위를 가지며 생체활성 분자를 항체 또는 표적화된 소분자 리간드와 커플링하는데 널리 사용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0563] 도 1은 BT001002의 TIC(총 이온 크로마토그램, *total ion chromatogram*)를 나타낸 것이다.

도 2는 BT001002 커플링된 경사슬의 디컨볼루션 다이어그램(deconvolution diagram)을 나타낸 것이다.

도 3은 BT001002 커플링된 중사슬의 디컨볼루션 다이어그램을 나타낸 것이다.

도 4는 BT001004의 TIC를 나타낸 것이다.

도 5는 BT001004 커플링된 경사슬의 디컨볼루션 다이어그램을 나타낸 것이다.

도 6은 BT001004 커플링된 중사슬의 디컨볼루션 다이어그램을 나타낸 것이다.

도 7은 BT001002의 SEC 크로마토그램을 나타낸 것이다.

도 8은 BT001002의 분자량 마커(molecular weight Marker)의 SEC 크로마토그램을 나타낸 것이다.

도 9는 BT001004의 SEC 크로마토그램을 나타낸 것이다.

도 10은 BT001012의 커플링된 경사슬의 디컨볼루션 다이어그램을 나타낸 것이다.

도 11은 BT001012의 커플링된 중사슬의 디컨볼루션 다이어그램을 나타낸 것이다.

도 12은 BT001013의 커플링된 경사슬의 디컨볼루션 다이어그램을 나타낸 것이다.

도 13은 BT001013의 커플링된 중사슬의 디컨볼루션 다이어그램을 나타낸 것이다.

도 14는 BT001018의 커플링된 경사슬의 디컨볼루션 다이어그램을 나타낸 것이다.

도 15는 BT001018의 커플링된 중사슬의 디컨볼루션 다이어그램을 나타낸 것이다.

도 16은 BT001021의 커플링된 경사슬의 디컨볼루션 다이어그램을 나타낸 것이다.

도 17은 BT001021의 커플링된 중사슬의 디컨볼루션 다이어그램을 나타낸 것이다.

도 18은 BT001023의 커플링된 경사슬의 디컨볼루션 다이어그램을 나타낸 것이다.

도 19는 BT001023의 커플링된 중사슬의 디컨볼루션 다이어그램을 나타낸 것이다.

도 20은 BT001040의 커플링된 경사슬의 디컨볼루션 다이어그램을 나타낸 것이다.

도 21은 BT001040의 커플링된 중사슬의 디컨볼루션 다이어그램을 나타낸 것이다.

도 22는 BT001041의 커플링된 경사슬의 디컨볼루션 다이어그램을 나타낸 것이다.

도 23은 BT001041의 커플링된 중사슬의 디컨볼루션 다이어그램을 나타낸 것이다.

도 24는 BT001042의 커플링된 경사슬의 디컨볼루션 다이어그램을 나타낸 것이다.

도 25는 BT001042의 커플링된 중사슬의 디컨볼루션 다이어그램을 나타낸 것이다.

도 26은 BT001043의 커플링된 경사슬의 디컨볼루션 다이어그램을 나타낸 것이다.

도 27은 BT001043의 커플링된 중사슬의 디컨볼루션 다이어그램을 나타낸 것이다.

도 28은 BT001044의 커플링된 경사슬의 디컨볼루션 다이어그램을 나타낸 것이다.

도 29는 BT001044의 커플링된 중사슬의 디컨볼루션 다이어그램을 나타낸 것이다.

도 30은 BT001046의 커플링된 경사슬의 디컨볼루션 다이어그램을 나타낸 것이다.

도 31은 BT001046의 커플링된 중사슬의 디컨볼루션 다이어그램을 나타낸 것이다.

도 32은 BT001047의 커플링된 경사슬의 디컨볼루션 다이어그램을 나타낸 것이다.

도 33은 BT001047의 커플링된 중사슬의 디컨볼루션 다이어그램을 나타낸 것이다.

도 34는 BT001012의 SEC 크로마토그램을 나타낸 것이다.

도 35는 BT001013의 SEC 크로마토그램을 나타낸 것이다.

도 36은 BT001018의 SEC 크로마토그램을 나타낸 것이다.

도 37은 BT001021의 SEC 크로마토그램을 나타낸 것이다.

도 38은 BT001023의 SEC 크로마토그램을 나타낸 것이다.

도 39는 BT001042의 SEC 크로마토그램을 나타낸 것이다.

도 40은 BT001043의 SEC 크로마토그램을 나타낸 것이다.

도 41은 BT001044의 SEC 크로마토그램을 나타낸 것이다.

도 42은 BT001046의 SEC 크로마토그램을 나타낸 것이다.

도 43은 BT001047의 SEC 크로마토그램을 나타낸 것이다.

도 44는 NCI-N87 인간 위암 모델에서 마우스의 각 군의 종양 부피의 성장 변화를 나타낸 것이다.

도 45는 NCI-N87 인간 위암 모델에서 마우스의 각 군의 체중 변화를 나타낸 것이다.

도 46는 HCC1806 인간 유방암 모델에서 마우스의 각 군의 종양 부피의 성장 변화를 나타낸 것이다.

도 47a는 HCC827 인간 비-소세포 폐암의 이종 이식(xenograft) 모델에서 마우스의 각 군의 종양 부피의 성장 변화를 나타낸 것이다.

도 47b는 HCC827 인간 비-소세포 폐암의 이종 이식 모델에서 마우스의 각 군의 체중 변화를 나타낸 것이다.

도 48a는 NCI-N87 인간 위암의 이종 이식 모델에서 마우스의 각 군의 종양 부피의 성장 변화를 나타낸 것이다.

도 48b는 NCI-N87 인간 위암의 이종 이식 모델에서 마우스의 각 군의 체중 변화를 나타낸 것이다.

도 49a는 MDA-MB-231 인간 유방암의 종양-보유 마우스 모델의 각 군의 종양 부피의 성장 변화를 나타낸 것이다.

도 49b는 MDA-MB-231 인간 유방암의 종양-보유 마우스 모델의 각 군의 체중 변화를 나타낸 것이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0564] 본 개시는 특정 구현예들과 조합하여 더 설명될 것이지만, 본 개시는 이에 제한되지 않는다. 통상의 기술자는 본 개시의 기본적인 사상 및 범위를 벗어나지 않고 본 개시의 교시에 따라 다양한 변형 또는 개선이 이루어질 수 있음을 이해해야 한다.

[0565] 본 발명에서의 약어는 다음의 의미를 갖는다.

OMs	메틸설포닐옥시	PA	포름산
OTs	트리플루오로메틸설포닐옥시	ACN	아세토니트릴
OTf	p-톨루엔설포닐옥시	CCK8 시약	2-(2-메톡시-4-니트로페닐)-3-(4-니트로페닐)-5-(2,4-디설포페닐)-2H-테트라졸 모노소듐 염
TBS	Tert-부틸디메틸실릴	PBS	소 태아 혈청
MMT	p-메톡시트리페닐메틸	DMSO	디메틸 설폭시드
PB/PBS	새인산완충식염수		

[0566]

[0567] **용매 제조**

[0568] 하기 실시예에 기재된 화합물의 구조는 핵 자기 공명(^{1}H NMR) 또는 질량 분석법(MS, 질량 분석)에 의해 결정되었다. Bruker 400 MHz NMR 분광계를 사용하여 핵 자기 공명(^{1}H NMR)을 결정하였다. 중수소화 메탄올(CD_3OD), 중수소화 클로로포름($CDCl_3$) 또는 중수소화 디메틸설폭시드(DMSO-D_6)는 측정용 용매이고, 테트라 메틸실란(TMS)은 내부 표준 물질이었다.

[0569] 실시예에서 사용된 핵 자기 공명(NMR) 스펙트럼의 약어가 아래에 제시되어 있다.

[0570] s : 싱글렛, d : 더블렛, t : 트리플렛, q : 쿼텟, dd : 더블 더블렛, qd : 쿼텟 더블렛, ddd : 더블 더블 더블렛, ddt : 더블 더블 트리플렛, dddd : 더블 더블 더블 더블렛, m : 멀티플렛, br : 넓은, J : 커플링 상수, Hz : 헤르츠, DMSO-D_6 : 중수소화 디메틸 설폭시드. δ 값은 ppm으로 표현되었다.

[0571] 질량 분석(MS)은 Agilent(ESI) 질량 분석계(모델: Agilent 6120B)를 사용하여 결정되었다.

[0572] 예비 액체 크로마토그래피:

[0573] 방법 A:

[0574] 크로마토그래피 컬럼: 다이소겔(Daisogel) C18 10μm 100x250mm

[0575] 이동상 A: 물; 이동상 B: 아세토니트릴

시간 [분]	이동상 A [%]	이동상 B [%]	유속 [mL/분]
0.00	70.0	30.0	300.0
8.00	70.0	30.0	
50.00	20.0	80.0	

[0576]

[0577] 방법 B:

[0578] 크로마토그래피 컬럼: 다이소겔 C18 10μm 50x250mm

[0579] 이동상 A: 물; 이동상 B: 아세토니트릴

시간 [분]	이동상 A [%]	이동상 B [%]	유속 [mL/분]
0.00	70.0	30.0	80.0
8.00	70.0	30.0	
50.00	20.0	80.0	

[0580]

[0581] 방법 C:

[0582] 크로마토그래피 컬럼: 다이소겔 C18 10μm 50x250mm

[0583] 이동상 A: 0.1% 트리플루오로아세트산-함유 물; 이동상 B: 아세토니트릴

시간 [분]	이동상 A [%]	이동상 B [%]	유속 [mL/분]
0.00	90.0	10.0	80.0
10.00	90.0	10.0	
50.00	60.0	40.0	

[0584]

[0585] 방법 D:

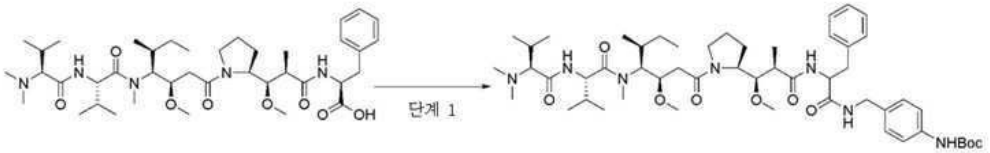
[0586] 크로마토그래피 컬럼: Waters SunFire C18 5μm 19x250mm

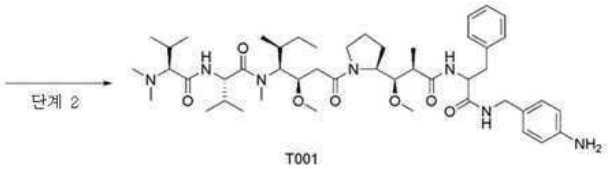
[0587] 이동상 A: 아세토니트릴; 이동상 B: 0.05% 포름산-함유 물

[0588] 시간: 0 분-16 분; 이동상 A: 10%-90%; 유속: 28 mL/분

[0589] **I. 생체활성 분자의 합성**

[0590] **실시예 1**: (2S)-N-((3R,4S,5S)-1-((2S)-2-((1R,2R)-3-((1-((4-아미노벤질)아미노)-1-옥소-3-페닐프로판-2-일)아미노)-1-메톡시-2-메틸-3-프로피오닐)피롤리딘-1-일)-3-메톡시-5-메틸-1-헵타노일-4-일)-2-((S)-2-(디메틸아미노)-3-메틸부티릴아미노)-N, 3-디메틸부티르아미드(**T001**)의 합성





T001

[0591]

[0592] **단계 1**: tert-부틸(4-((2-((2R,3R)-3-((S)-1-((3R,4S,5S)-4-((S)-2-((S)-2-(디메틸아미노)-3-메틸부티릴아미노)-N,3-디메틸부티릴아미노)-3-메톡시-5 메틸헵타노일)피롤리딘-2-일)-3-메톡시-2-메틸프로피온아미도)-3-페닐프로피온아미도)메틸)페닐) 카바메이트의 합성

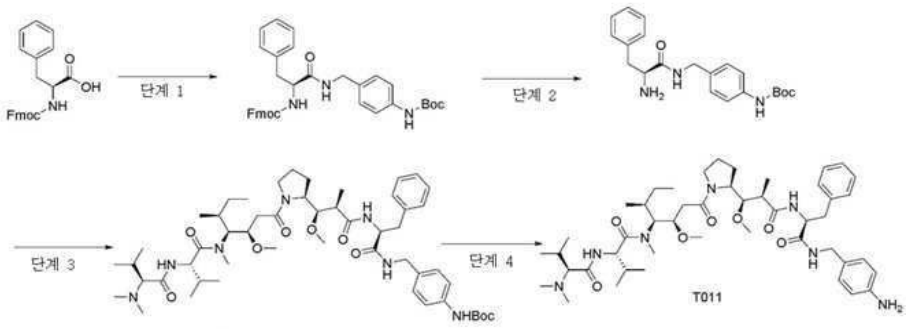
[0593] 실온에서, 1-히드록시벤조트리아졸(2.0 mg, 14.74 μmol)N,N-디메틸포름아미드(4 mL) 중에 용해시키고, 0 ℃까지 냉각시키며, 그런 다음 tert-부틸 4-메틸아미노벤질 카바메이트(4.0 mg, 16.1 μmol), N,N-디이소프로필에틸아민(8.5 mg, 66.8 μmol), ((2R,3R)-3-((S)-1-((3R,4S,5S)-4-((S)-2-((S)-2-(디메틸아미노)-3-메틸부티릴아미노)-N,3-디메틸부티릴아미노)-3-메톡시-5-메틸헵타노일)피롤리딘-2-일)-3-메톡시-2-메틸프로피오닐)-L-페닐알라닌(10.0 mg, 13.5 μmol, 시판)을 연속적으로 첨가하였다. 5 분 동안 교반시킨 다음, 1H-벤조트리아졸-1-일-옥시트리피롤리디노포스포늄 헥사플루오로포스페이트(10.0 mg, 20.1 μmol)를 이에 첨가하고, 0 ℃에서 1 시간 동안 교반하였다. 원료의 반응을 고성능 액체 크로마토그래피-질량 분석으로 모니터링하였다. 원료가 소진된 다음, 반응 용액을 예비 액체 크로마토그래피(방법 D)로 정제하여 표제화합물(9.0 mg의 흰색 고체)을 수득하였다. ESI-MS(m/z): 950.5 $[M + H]^+$.

[0594] **단계 2**: (2S)-N-((3R,4S,5S)-1-((2S)-2-((1R,2R)-3-((1-((4-아미노벤질)아미노)-1-옥소-3-페닐프로판-2-일)아미노)-1-메톡시-2-메틸-3-프로피오닐)피롤리딘-1-일)-3-메톡시-5-메틸-1-헵타노일-4-일)-2-((S)-2-(디메틸아미노)-3-메틸부티릴아미노)-N,3-디메틸부탄아미드의 합성

[0595] 실온에서, tert-부틸(4-((2-((2R,3R)-3-((S)-1-((3R,4S,5S)-4-((S)-2-((S)-2-(디메틸아미노)-3-메틸부티릴아미노)-N,3-디메틸부티릴)-3-메톡시-5-메틸헵타노일)피롤리딘-2-일)-3-메톡시-2-메틸프로피오닐)-3-페닐프로판아미드)메틸)페닐) 카바메이트(9.0 mg, 0.02 mmol)를 1,4-디옥산(0.5 mL)중에 용해시키고, 0 ℃까지 냉각시키며, 그런 다음 교반 하에 실온에서 3 시간 동안 디옥산 중의 염화 수소 용액(1 mL, 4.0 M)을 첨가하고 반응시켰다.

원료의 반응을 고성능 액체 크로마토그래피-질량 분석으로 모니터링하였다. 원료가 소진된 다음, 용매를 감압 하에 증발시키고, 원 생성물(crude product)을 예비 액체 크로마토그래피(방법 C)로 정제하여 트리플루오로아세테이트인 표제화합물(5.0 mg의 흰색 고체)을 수득하였다. ESI-MS(m/z): 850.5 $[M + H]^+$.

[0596] **실시예 2**: (S)-N-((3R,4S,5S)-1-((S)-2-((1R,2R)-3-((S)-1-((4-아미노벤질)아미노)1-옥소-3-페닐프로프-2-일)아미노)-1-메톡시-2-메틸-3-옥소프로필) 피롤리딘-1-일)-3-메톡시-5-메틸-1-옥소헵틸-4-일)-2-((S)-2-(디메틸아미노)-3-메틸부티릴아미노)-N,3-디메틸부티르아미드(T011)의 합성

[0597] 

[0598] **단계 1**: tert-부틸(S)-(4-((2-(((((9H-플루오렌-9-일)메톡시)카르보닐)아미노)-3-페닐프로피온아미도) 메틸)페닐)카바메이트의 합성

[0599] 0 ℃에서, 4-아미노벤질아민(222 mg, 1.0 mmol) 및 N-메틸모르폴린(306 mg, 1.5 mmol)을 용액 N,N-디메틸포름아미드(5 mL) 중의 (S)-2-((((9H-플루오렌-9-일)메톡시)카르보닐)아미노)-3-페닐프로피온산(387 mg, 1.0 mmol)에 첨가한 다음, 1-히드록시벤조트리아졸(203 mg, 1.5 mmol) 및 1-(3-디메틸아미노프로필)-3-에틸카보디이미드 염산(288 mg, 1.5 mmol)을 연속적으로 첨가하였다. 결과 혼합물을 밤새 0 ℃에서 반응시켰다. 반응 용액을 물(50 mL)에 부었고, 흰색 고체를 침전시켰다. 고체를 여과하고, 필터 케이크를 물(20 mL×3)로 세척하였다. 고체를 실리카겔 컬럼 크로마토그래피로 정제하여 표제화합물(380 mg 흰색 고체)을 수득하였다. ESI-MS(m/z): 592.3 $[M + H]^+$.

[0600] **단계 2**: tert-부틸(S)-(4-((2-아미노-3-페닐프로피온아미도) 메틸)페닐) 카바메이트의 합성

[0601] 리튬 히드록시드 1수화물(21 mg, 0.51 mmol)을 물(1 mL)중에 용해시키고 테트라히드로푸란(2 mL) 중의 tert-부틸(S)-(4-((2-((((9H-플루오렌-9-일)메톡시)카르보닐)아미노)-3-페닐프로피온아미도)메틸)페닐) 카바메이트(102 mg, 0.17 mmol)용액에 첨가하였다. 결과 혼합물을 실온에서 2 시간 동안 반응시켰다. 반응 용액 에 물(20 mL)을 첨가하였고 에틸 아세테이트(30 mL×4) 로 추출하였다. 유기상을 합쳤으며, 포화 식염수(30 mL×2)로 세척하였고 무수 황산나트륨으로 건조하였다. 이어, 건조제를 여과에 의해 제거하고, 용매를 감압 하에 증발시키고, 잔여물을 예비 액체 크로마토그래피(방법 D)로 정제하여 표제화합물(65 mg의 흰색 고체)을 수득하였다. ESI-MS(m/z): 370.2 $[M + H]^+$.

[0602] **단계 3**: (4-((S)-2-((2R,3R)-3-((S)-1-((3R,4S,5S)-4-((S)-3-((메틸아미노)-3-메틸부티릴아미노)-N,3-디메틸부티릴아미노)-3-메톡시 -5-메틸헵타노일)피롤리딘-2-일)-3-메톡시-2-메틸프로피온아미도)-3-페닐프로피온아미도)메틸)페닐)카바메이트의 합성

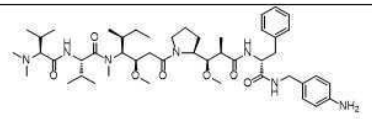
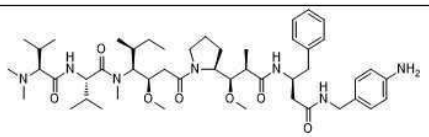
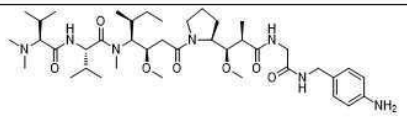
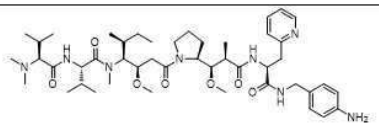
[0603] 0 ℃에서, tert-부틸(S)-(4-((2-아미노-3-페닐프로피온아미도)메틸)페닐) 카바메이트(15 mg, 0.04mmol) 및 N-메틸모르폴린(12 mg, 0.12 mmol)을 N,N-디메틸포름아미드(2 mL) 중의 용액(2R,3R)-3-((S)-1-((3R,4S,5S)-4-((S)-2-((S)-2-(디메틸아미노)-3-메틸부티릴아미노)-N,3-디메틸부티릴아미노)-3-메톡시-5-메틸헵타노일)피롤리딘-2-일-3-메톡시-2-메틸프로피온산(24 mg, 0.04 mmol)에 첨가하였고, 그런 다음 1- 히드록시벤조트리아졸(8 mg, 0.06 mmol) 및 1-(3-디메틸아미노프로필)-3-에틸카보디이미드 염산(12 mg, 0.06 mmol)을 연속적으로 첨가하였다. 결과 혼합물을 밤새 0 ℃에서 반응시켰다. 반응 용액을 예비 액체 크로마토그래피(방법 D)로 정제하여 표제화합물(24 mg의 흰색 고체)을 수득하였다. ESI-MS(m/z): 950.6 $[M + H]^+$.

[0604] **단계 4**: (S)-N-((3R,4S,5S)-1-((S)-2-((1R,2R)-3-((S)-1-((4-아미노벤질)아미노)-1-옥소-3-페닐프로프-2-일)아미노)-1-메톡시-2-메틸-3-옥소프로필)피롤리딘-1-일)-3-메톡시-5-메틸-1-옥소헵틸-4-일)-2-((S)-2-(디메틸아미노)-3-메틸부티릴아미노)-N,3-디메틸부티르아미드의 합성

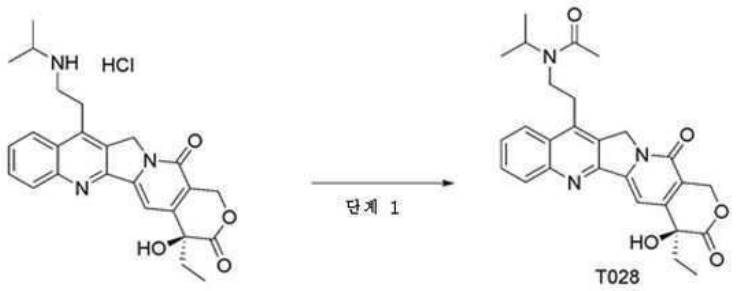
[0605] 트리플루오로아세트산(0.5 mL)을 디클로로메탄(1.5 mL) 중의 용액(4-((S)-2-((2R,3R)-3-((S)-1-(3R,4S,5S)-4-((S)-3-(메틸아미노)-3-메틸부티릴아미노)-N,3-디메틸부티릴아미노)-3-메톡시-5-메틸헵타노일)피롤리딘-2-일)-3-메톡시-2-메틸프로판아미도)-3-페닐프로피온아미도)메틸)페닐) 카바메이트(14.0 mg, 0.015 mmol)에 첨가하였다. 결과 혼합물을 실온에서 1 시간 동안 반응시켰다. 그런 다음 용매를 감압 하에 증발시키고, 잔여물을 예비 액체 크로마토그래피(방법 C)로 정제하여 트리플루오로아세테이트인 표제화합물(4.2 mg의 흰색 고체)을 수득하였다. ESI-MS(m/z): 850.6 $[M + H]^+$.

[0606] 유사 합성법으로 다음의 분자들을 합성할 수 있다:

[0607]

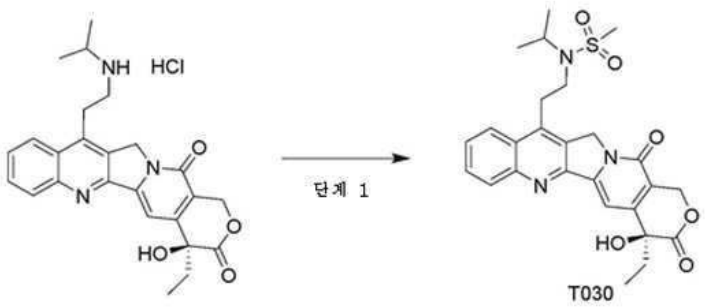
이름	구조	ESI-MS
T012		850.6
T013		864.6
T015		760.6
T021		851.6

[0608] **실시예 3:** (S)-N-(2-(4-에틸-4-히드록실-3,14-디온-3,4,12,14-테트라히드로-1H-피라노[3',4',6,7]인돌리지노[1,2-b]퀴놀린-11-일)에틸)-N-이소프로필아세트아미드의 합성

[0609] 

[0610] 실온에서 벨로테칸 염산(1.0g, 2.13mmol) 및 트리에틸아민(0.65g, 0.9 mL)을 디클로로메탄(50 mL)중에 용해시키고, 아세트산 무수물(0.22g, 2.13mmol)을 천천히 적가하였다. 결과 혼합물을 실온에서 1 시간 동안 반응시켰다. 유기상을 물(10 mL×2)로 세척하고 무수 황산나트륨으로 건조하였다. 불용성 물질을 여과에 의해 제거하고, 용매를 증발시키며, 잔여물을 실리카 겔 컬럼 크로마토그래피(디클로로메탄/메탄올=50/1)로 정제하여 표제화합물(1g)을 수득하였다. ESI-MS(m/z): 476.2$[M+H]^+$.

[0611] **실시예 4:** (S)-N-(2-(4-에틸-4-히드록실-3,14-디온-3,4,12,14-테트라히드로-1H-피라노[3',4',6,7]인돌리지노[1,2-b]퀴놀린-11-일)에틸)-N-이소프로필메탄설폰아미드의 합성



[0612]

[0613] 메틸설포닐 클로라이드(462 mg, 12.77 mmol, 순도: 약 70%)를 디클로로메탄(40 mL) 중의 벨로테칸 염산(3 g, 6.38 mmol) 및 트리에틸아민(2.58 g, 25.54 mmol) 용액에 적가하였다. 결과 혼합물을 실온에서 2 시간 동안 반응시켰다. 흡입 여과(Suction filtration)를 수행하였으며, 필터 케이크를 디클로로메탄(3 mL)으로 3회 세척하여 표제화합물(2.2 g)을 수득하였다.

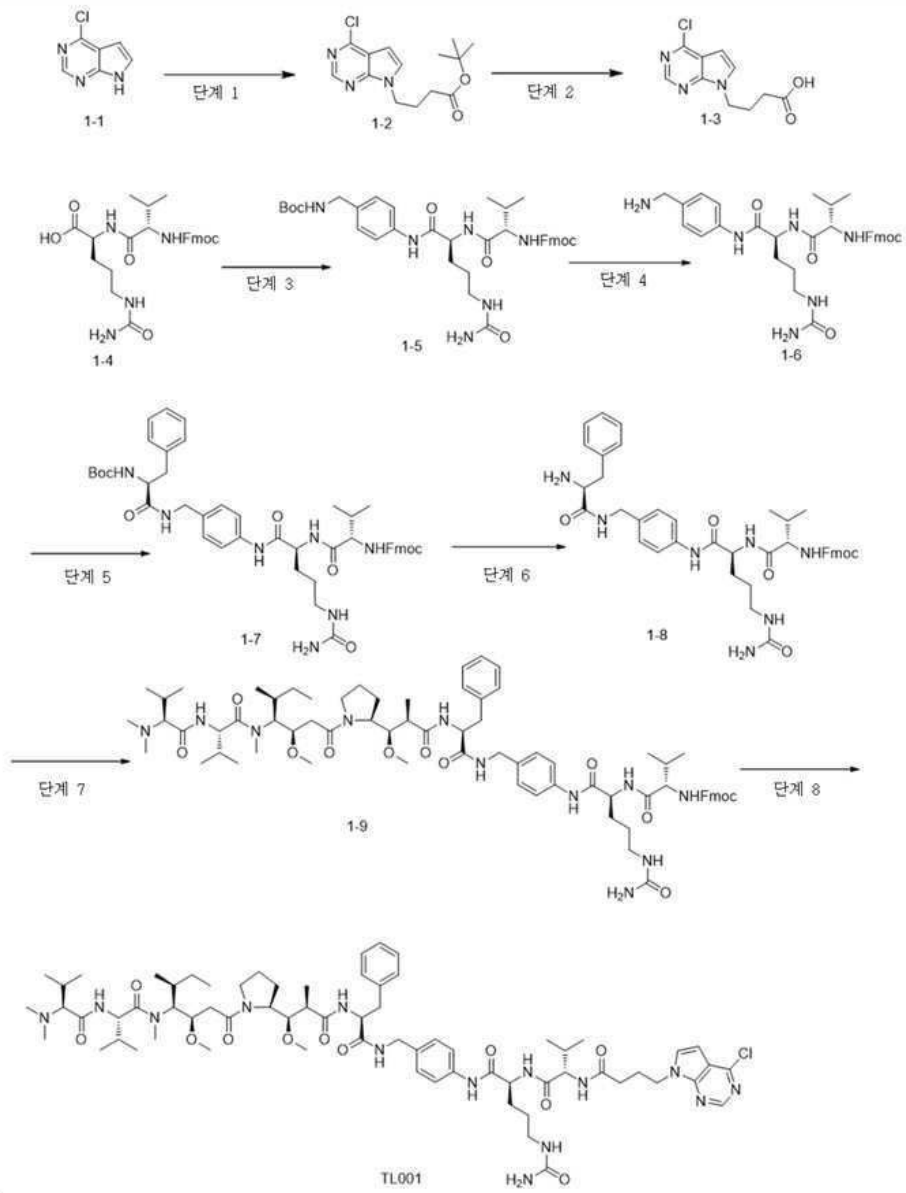
[0614] 구조적인 특성 데이터는 다음과 같다:

[0615] ^{1}H NMR(400 MHz, DMSO-d_6) δ 8.32(d, J = 8.4 Hz, 1H), 8.20(dd, J = 8.4, 1.2 Hz, 1H), 7.93-7.84(m, 1H), 7.79(t, J = 7.6 Hz, 1H), 7.35(s, 1H), 6.56(s, 1H), 5.44(d, J = 9.2 Hz, 4H), 3.98(p, J = 6.7 Hz, 1H), 3.50(t, J = 8.0 Hz, 2H), 3.42-3.35(m, 2H), 3.00(s, 3H), 1.93-1.82(m, 2H), 1.15(d, J = 6.7 Hz, 6H), 0.88(t, J = 7.3 Hz, 3H). ESI-MS(m/z): 512.2 $[M+H]^+$. $[\alpha]_D^{20}$ 은 +28.19° (c =0.101g/100 mL, CH_3CN)이다.

[0616] 합성 방법의 예시가 없는 나머지 생체활성 분자는 시판되거나 종래 기술에 개시된 방법에 의해 제조될 수 있다.

[0617] **II. 생체활성 분자 및 링커 함유 화합물의 합성**

[0618] **실시예 5:** (S)-2-((S)-2-(4-(4-클로로-7H-피롤로[2,3-d]피리미딘-7-일)부티릴아미도)-3-메틸부티릴아미도)-N-(4-(((S)-2-((2R,3R)-3-((S)-1-((3R,4S,5S)-4-((S)-2-((S)-2-(디메틸아미노)-3-메틸부티릴아미노)-N,3-디메틸부티릴아미노)-3-메톡시-5-메틸헵타노일)피롤리딘-2-일)-3-메톡시-2-메틸프로피온아미도)-3-페닐프로피온아미도)메틸)페닐)-5-우레이도발레르아미드의 합성



[0619]

[0620] **단계 1:** tert-부틸 4-(4-클로로-7H-피롤로[2,3-d]피리미딘-7-일) 부티레이트**(화합물 1-2)**의 합성

[0621] **단계 1:** tert-부틸 4-(4-클로로-7H-피롤로[2,3-d]피리미딘-7-일) 부티레이트**(화합물 1-2)**의 합성

[0622] 실온에서, 화합물 1-1(500 mg, 3.27 mmol)을 N,N-디메틸포름아미드(10 mL)중에 용해시키고, 이에 배치(batch)에서 수소화 나트륨(130 mg, 3.27 mmol)을 천천히 첨가하였다. 결과 혼합물을 실온에서 10 분 동안 교반하였고, 이어 t-부틸 4-브로모부티레이트(725mg, 3.27 mmol)의 적가하며, 그런 다음 실온에서 2 시간 동안 반응시켰다. 반응을 포화 암모늄 클로라이드 수용액으로 퀀칭하고, 에틸 아세테이트(50 mL×3)로 추출하였다. 그런 다음, 유기상을 합쳤으며, 포화 식염수 용액(50 mL×3)으로 세척하고, 무수 황산나트륨으로 건조하였다. 건조제를 여과에 의해 제거하고, 용매를 감압 하에 증발시키고 표제화합물(500 mg)을 수득하였다. ESI-MS(*m/z*): 296.1 [M + H]$^+$.

[0623] **단계 2:** 4-(4-클로로-7H-피롤로[2,3-d]피리미딘-7-일)부티르산**(화합물 1-3)**의 합성

[0624] 실온에서, 화합물 1-2(500 mg, 1.69 mmol)을 디클로로메탄(6 mL)중에 용해시키고, 트리플루오로아세트산(3 mL)을 실온에서 4 시간 동안 첨가하고 반응시켰다. 이어, 용매를 감압 하에 증발시키고 표제화합물(400 mg)을 수득하였다. ESI-MS(*m/z*): 240.1 [M + H]$^+$.

[0625] **단계 3:** (9H-플루오렌-9-일)-메틸-((S)-1-(((S)-1-((4-(((tert-부톡시카르보닐)아미노)메틸)페닐)아미노)-1-옥소-5-우레이도펜틸-2-일)아미노)-3-메틸-1-옥소부틸-2-일)-카바메이트**(화합물 1-5)**의 합성

[0626] 실온에서, 4-(N-Boc-아미노메틸)-아닐린(6.0 g, 27 mmol), 화합물 1-4(3.35 g, 6.75 mmol), 및 2-에티옥실-1-에톡시카르복실-1,2-디히드로퀴놀린(3.34 g, 13.5 mmol) 디클로로메탄(140 mL) 및 메탄올(70 mL)의 혼합 용매 중에 용해시키고 나서, 45 ℃로 가온하고 그 온도에서 8.0 시간 동안 반응시켰다. 실온까지 냉각시킨 다음, 다량의 고체를 침전시키는데, 이를 흡입 여과시켜 표제화합물(3.65 g)을 수득하였다. ESI-MS(m/z): 701.4 $[M + H]^+$.

[0627] **단계 4:** (9H-플루오렌-9-일)-메틸-((S)-1-(((S)-1-((4-(아미노메틸)페닐))아미노)-1-옥소-5-5-우레이도펜틸-2-일)아미노)-3-메틸-1-옥소부틸-2-일)-카바메이트**(화합물 1-6)**의 합성

[0628] 실온에서, 트리플루오로아세트산(15 mL)을 화합물 1-5(3.0 g, 4.29 mmol)에 첨가하였고, 실온에서 1.0 시간 동안 교반하였다. 그런 다음, 용매를 감압 하에 증발시켜 황색 오일을 수득하였다. 무수 디에틸 에테르(20 mL)를 첨가하였고, 다량의 고체를 침전시켰다. 0.5 시간 동안 격렬하게 교반시킨 후, 흡입 여과를 수행하여 트리플루오로아세테이트인 표제화합물(3.06 g)을 수득하였다. ESI-MS(m/z): 601.3 $[M + H]^+$.

[0629] **단계 5:** (9H-플루오렌-9-일)-메틸-((S)-1-(((S)-1-((4-(((R)-2-((t-부틸옥시카르보릴)아미노)-3-페닐프로피온아미도)메틸)페닐)아미노-1-옥소-5-우레이도펜틸-2-일)아미노)-3-메틸-1-옥소부틸-2-일)-카바메이트**(화합물 1-7)**의 합성

[0630] 실온에서, Boc-D-페닐알라닌(1.1 g, 4.2 mmol) 및 트리플루오로아세테이트인 화합물 1-6(3.0 g, 4.2 mmol)을 N,N-디메틸포름아미드(40 mL)중에 용해시키고, 0 ℃까지 냉각시키며, 그런 다음 1-(3-디메틸아미노프로필)-3-에틸카보디이미드 염산(1.2 g, 6.3 mmol), 1-히드록시벤조트리아졸(0.9 g, 6.3 mmol) 및 N-메틸모르폴린(1.7 g, 16.8 mmol)을 연속적으로 첨가하였다. 반응계를 1.0 시간 동안 그 온도에서 교반하였다. 그런 다음 반응 용액을 얼음 물(400 mL)에 적가하여 0.5 시간 동안 격렬하게 교반하였고, 다량의 고체를 침전시켰으며, 흡입 여과를 수행하여 표제화합물(3.3 g)을 수득하였다. ESI-MS(m/z): 848.4 $[M + H]^+$.

[0631] **단계 6:** (9H-플루오렌-9-일)-메틸-((S)-1-(((S)-1-((4-(((R)-2-아미노-3-페닐프로피온아미도)메틸)페닐)아미노)-1-옥소-5-우레이도펜틸-2-일)아미노)-3-메틸-1-옥소부틸-2-일)-카바메이트**(화합물 1-8)**의 합성

[0632] 실온에서, 화합물 1-7(3.0 g, 3.3 mmol)을 트리플루오로아세트산(30 mL)중에 용해시키고 실온에서 1.0 시간 동안 교반하였다. 용매를 감압 하에 증발시키고 황색 오일을 수득하였다. 무수 디에틸 에테르(100 mL)를 첨가하고 0.5 시간 동안 격렬하게 교반하며, 다량의 고체를 침전시켰다. 흡입 여과를 수행하여 트리플루오로아세테이트인 표제화합물(2.1 g)을 수득하였다. ESI-MS(m/z): 748.4 $[M + H]^+$.

[0633] **단계 7:** (9H-플루오렌-9-일)-메틸-((S)-1-(((S)-1-((4-(((S)-2-((2R,3R)-3-((S)-1-((3R,4S,5S)-4-((S)-2-((S)-2-(디메틸아미노)-3-부티릴아미도)-N,3-디메틸아미노)-3-메톡시-5-메틸헵타노일)피로-2-일)-3-메톡시-2-메틸프로피온아미도)-3-페닐프로피온아미도)메틸)페닐)아미노)-1-옥소-5-우레이도pent-2-일)아미노)-3-메틸-1-옥소부탄-2-일)카바메이트**(화합물 1-9)**의 합성

[0634] 실온에서, (2R,3R)-3-((S)-1-((3R,4S,5S)-4-((S)-2-((S)-(디메틸아미노)-3-부티릴아미노)-N,3-디메틸부티릴아미노)-3-메톡시-5-메틸헵타노일)피로-2-일)-3-메톡시-2-메틸프로피온산(1.3 g, 2.17 mmol) 및 트리플루오로아세테이트인 화합물 1-8(1.8 g, 2.17 mmol) 을 N,N-디메틸포름아미드(20 mL)중에 용해시키고, 0 ℃까지 냉각시키며, 그런 다음 1-히드록시벤조트리아졸(440 mg, 3.26 mmol) 및 N-메틸모르폴린(658 mg, 6.51 mmol)이 연속적으로 첨가되었고, 마지막에 1-(3-디메틸아미노프로필)-3-에틸카보디이미드 염산(624 mg, 1.38 mmol)을 첨가하고, 반응 용액을 0 ℃에서 5 시간 동안 교반하였고, 예비 액체 크로마토그래피(방법 D)로 정제하여 표제화합물(1.8 g)을 수득하였다. ESI-MS(m/z): 1329.2 $[M + H]^+$.

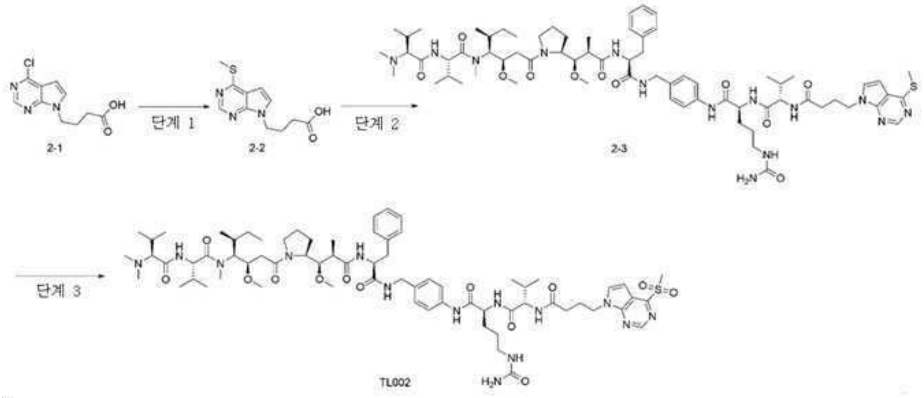
[0635] **단계 8:** (S)-2-((S)-2-아미노-3-부티릴아미노)-N-(4-(((S)-2-((2R,3R)-3-((S)-1-((3R,4S,5S)-4-((S)-2-((S)-2-(디메틸아미노)-3-부티릴아미노)-N,3-디메틸부티릴아미노)-3-메톡시-5-메틸헵타노일)피로-2-일)-3-메톡시-2-메틸프로피온아미도)-3-페닐프로피온아미도)메틸)페닐)-5-우레이도발레르아미드**(화합물 1-10)**의 합성

[0636] 실온에서, 화합물 1-9(500 mg, 0.38 mmol)을 N,N-디메틸포름아미드(5 mL)중에 용해시키고, 피페리딘(324 mg, 3.8 mmol)을 첨가하고 실온에서 3 시간 동안 교반하였다. 그런 다음, 예비 액체 크로마토그래피(방법 D) 상에서 정제를 수행하여 표제화합물(350 mg)을 수득하였다. ESI-MS(m/z): 1107.2 $[M + H]^+$.

[0637] **단계 9:** (S)-2-((S)-2-(4-(4-클로로-7H-피롤로[2,3-d]피리미딘-7-일)부티릴아미도)-3-메틸부티릴아미도)-N-(4-(((S)-2-((2R,3R)-3-((S)-1-((3R,4S,5S)-4-((S)-2-((S)-2-(디메틸아미노)-3-메틸부티릴아미노)-N,3-디메틸부티릴아미노)-3-메톡시-5-메틸헵타노일)피롤리딘-2-일)-3-메톡시-2-메틸프로피온아미도)-3-페닐프로피온아미도)메틸)페닐)-5-우레이도발레르아미드**(화합물 TL001)**의 합성

[0638] 실온에서, 화합물 1-10(60 mg, 0.054 mmol) 및 4-(4-클로로-7H-피롤로[2,3-d]피리미딘-7-일)부티르산(26 mg, 0.066 mmol)을 N,N-디메틸포름아미드(3 mL)중에 용해시키고, 0 ℃까지 냉각시키며, N,N-디이소프로필에틸아민(105 mg, 0.81 mmol) 및 1H-벤조트리아졸-1-옥시트리피롤리디노포스포늄 헥사플루오로포스페이트(281 mg, 0.54 mmol)을 연속적으로 첨가하였다. 반응계를 실온에서 3 시간 동안 교반하였다. 그런 다음, 예비 액체 크로마토그래피(방법 D)상에서 정제를 수행하여 표제화합물(30 mg)을 수득하였다. ESI-MS(*m/z*): 664.5 $[M/2 + H]^+$.

[0639] **실시예 6:** (S)-N-(4-(((S)-2-((2R,3R)-3-((S)-1-((3R,4S,5S)-4-((S)-2-((S)-2-(디메틸아미노)-3-메틸부티릴아미노)-N,3-디메틸부티릴아미노)-3-메톡시-5-메틸헵타노일)피롤리딘-2-일)-3-메톡시-2-메틸프로피온아미도)-3-페닐프로피온아미도)메틸)페닐)-2-((S)-3-메틸-2-(4-(4-(메틸설포닐)-7H-피롤로[2,3-d]피리미딘-7-일)-부티릴아미도)-부티릴아미도)-5-우레이도발레르아미드

[0640] 

[0641] **단계 1:** 4-(4-(메틸티오)-7H-피롤로[2,3-d]피리미딘-7-일)부티르산**(화합물 2-2)**의 합성

[0642] 실온에서, 4-(4-클로로-7H-피롤로[2,3-d]피리미딘-7-일) 부티르산(300 mg, 1.25 mmol)을 메탄올(8 mL)중에 용해시키고, 소듐 메탄티올(351 mg, 5.02 mmol)을 하나의 배치에 첨가하고, 그런 다음 50 ℃로 가온하며 밤새 반응시켰다. 예비 액체 크로마토그래피(방법 D)상에서 정제를 수행하여 표제화합물(120 mg)을 수득하였다. ESI-MS(*m/z*): 252.1 $[M + H]^+$.

[0643] **단계 2:** (S)-N-(4-(((S)-2-((2R,3R)-3-((S)-1-((3R,4S,5S)-4-((S)-2-((S)-2-(디메틸아미노)-3-메틸부티릴아미노)-N,3-디메틸부티릴아미노)-3-메톡시-5-메틸헵타노일)피롤리딘-2-일)-3-메톡시-2-메틸프로피온아미도)-3-페닐프로피온아미도)메틸)페닐)-2-((S)-3-메틸-2-(4-(4-(메틸티오)-7H-피롤로[2,3-d]피리미딘-7-일)-부티릴아미도)-부티릴아미도)-5-우레이도발레르아미드**(화합물 2-3)**의 합성

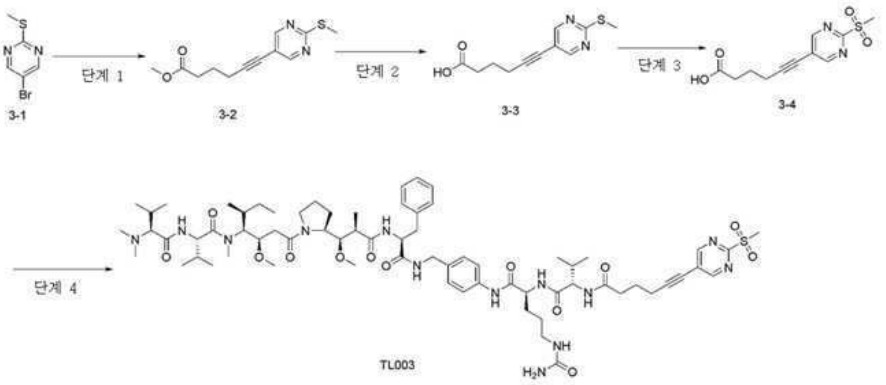
[0644] 4-(4-클로로-7H-피롤로[2,3-d]피리미딘-7-일) 부티르산이 4-(4-(메틸티오)-7H-피롤로[2,3-d]피리미딘-7-일) 부티르산으로 대체된 점을 제외하고는, 실시예 5의 단계 9에서 기술된 것과 유사한 조작이 수행되었고, 예비 액체 크로마토그래피(방법 D)을 사용하여 정제를 수행하여 표제화합물(20 mg)을 수득하였다. ESI-MS(*m/z*): 670.5 $[M/2 + H]^+$.

[0645] **단계 3:** (S)-N-(4-(((S)-2-((2R,3R)-3-((S)-1-((3R,4S,5S)-4-((S)-2-((S)-2-(디메틸아미노)-3-메틸부티릴아미노)-N,3-디메틸부티릴아미노)-3-메톡시-5-메틸헵타노일)피롤리딘-2-일)-3-메톡시-2-메틸프로피온아미도)-3-페닐프로피온아미도)메틸)페닐)-2-((S)-3-메틸-2-(4-(4-(메틸설포닐)-7H-피롤로[2,3-d]피리미딘-7-일)-부티릴아미도)-부티릴아미도)-5-우레이도발레르아미드**(화합물 TL002)**의 합성

[0646] 실온에서, 화합물 2-3(20 mg, 0.015 mmol)을 디클로로메탄(2 mL)중에 용해시키고, m-클로로퍼옥시벤조산(4.0 mg, 0.022 mmol)를 첨가하고. 결과 혼합물을 실온에서 2 시간 동안 반응시켰다. 예비 액체 크로마토그래피(방법 D) 상에서 정제를 수행하여 표제화합물(5.0 mg)을 수득하였다. ESI-MS(*m/z*): 686.5 $[M/2 + H]^+$.

[0647] **실시예 7:** N-((S)-1-(((S)-1-((4-(((S)-2-((2R,3R)-3-((S)-1-((3R,4S,5S)-4-((S)-2-((S)-2-(디메틸아미노)-3-

메틸부티릴아미노)-N,3-디메틸부티릴아미노)-3-메톡시-5-메틸헵타노일)피롤리딘-2-일)-3-메톡시-2-메틸프로피온아미도-3-페닐프로피온아미도)메틸)페닐)아미노)-1-옥소-5-우레이도-2-일)아미노)-3-메틸-1-옥시부탄-2-일)-6-(2-(메틸설포닐)피리미딘-5-일)-5-헥신아미드



[0648]

[0649] **단계 1:** 메틸 6-(2-(메틸티오)피리미딘-5-일)-5-헥시노에이트**(화합물 3-2)**의 합성

[0650] 실온에서, 메틸 5-헥시노에이트(500 mg, 3.97 mmol) 및 5-브로모-2-메틸티오피리미딘을 N,N-디메틸포름아미드(3 mL)중에 용해시키고 나서, 트리에틸아민(3 mL), 요오드화구리(I)(cuprous iodide, 75 mg, 0.4 mmol) 및 Bis(트리페닐포스핀) 팔라듐(II) 디클로라이드(279 mg, 0.4 mmol)를 연속적으로 첨가하였다. 결과 혼합물을 질소 보호하에서 95 ℃로 가열하였고 6 시간 동안 교반 하에 반응시켰으며, 물로 퀀칭하였고, 에틸 아세테이트(20 mL×3)로 추출하였다. 유기상을 합쳤으며, 포화 식염수(20 mL×2)로 세척하였고, 무수 황산나트륨으로 건조하였다. 건조제를 여과에 의해 제거하고, 용매를 감압 하에 증발시키고. 예비 액체 크로마토그래피(방법 D) 상에서 정제를 수행하여 표제화합물(300 mg)을 수득하였다. ESI-MS(*m/z*): 251.3 $[M + H]^+$.

[0651] **단계 2:** 6-(2-(메틸티오)피리미딘-5-일)-5-헥신산**(화합물 3-3)**의 합성

[0652] 실온에서, 화합물 3-2(200 mg, 0.8 mmol)를 테트라히드로푸란 및 물(4 mL/4 mL)의 혼합 용액 중에 용해시키고, 리튬 히드록시드 1수화물(235 mg, 5.6 mmol)을 첨가하였으며, 실온에서 교반 하에 4 시간 동안 반응시킨 다음, 물로 희석시켰으며 에틸 아세테이트(20 mLx2)로 추출하였다. 수성상(aqueous phase)을 1N 염산으로 pH=3으로 조정하고, 에틸 아세테이트(20 mL×3)로 추출한 다음, 유기상을 합쳤으며, 포화 식염수(20 mL×2)로 세척하고 무수 황산나트륨으로 건조하였다. 건조제를 여과에 의해 제거하고, 용매를 감압 하에 증발시키고 표제화합물(120 mg)을 수득하였다.

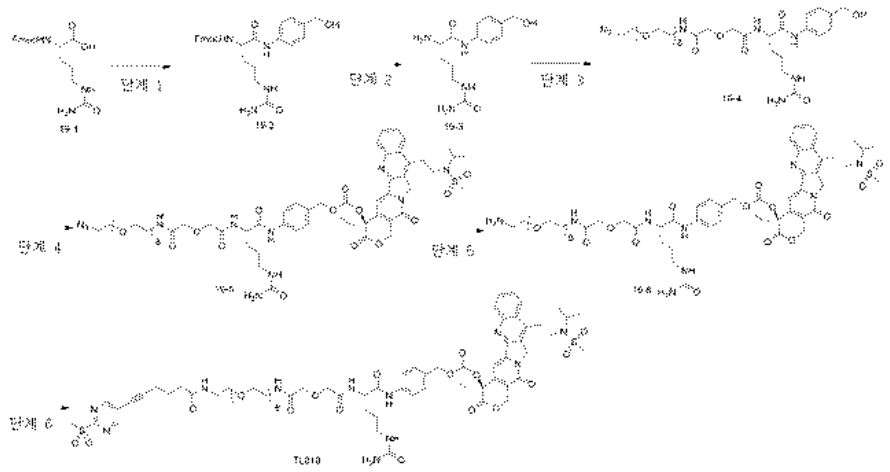
[0653] **단계 3:** 6-(2-(메틸설포닐)피리미딘-5-일)-5-헥신산**(화합물 3-4)**의 합성

[0654] 실온에서, 화합물 3-3(20 mg, 0.085 mmol)을 디클로로메탄(4 mL)중에 용해시키고, 반응을 위해 밤새 교반 하에, m-클로로퍼옥시벤조산(22 mg, 0.127 mmol)을 첨가하였다. 예비 액체 크로마토그래피(방법 D) 상에서 정제를 수행하여 표제화합물(20 mg)을 수득하였다. ESI-MS(*m/z*): 269.1 $[M + H]^+$.

[0655] **단계 4:** N-((S)-1-(((S)-1-((4-(((S)-2-((2R,3R)-3-((S)-1-((3R,4S,5S)-4-((S)-2-((S)-2-(디메틸아미노)-3-메틸부티릴아미노)-N,3-디메틸부티릴아미노)-3-메톡시-5-메틸헵타노일)피롤리딘-2-일)-3-메톡시-2-메틸프로피온아미도)-3-페닐프로피온아미도)메틸)페닐)아미노)-1-옥소-5-우레이도-2-일)아미노)-3-메틸-1-옥시부탄-2-일)-6-(2-(메틸설포닐)피리미딘-5-일)-5-헥신아미드**(화합물 TL003)**

[0656] 4-(4-클로로-7H-피롤로[2,3-d]피리미딘-7-일) 부티르산이 6-(2-(메틸설포닐)피리미딘-5-일)-5-헥신산으로 대체되는 것을 제외하고, 실시예 5의 단계 9에 기재된 것과 유사한 조작을 수행하였고, 예비 액체 크로마토그래피(방법 D)을 사용하여 정제를 수행하여 표제화합물(14 mg)을 수득하였다. ESI-MS(*m/z*): 679.0 $[M/2 + H]^+$.

[0657] **실시예 8:** (S)-4-에틸-11-(2-(N-이소프로필메틸설폰아미드)-에틸)-3,14-디옥소-3,4,12,14-테트라히드로-1H-피라노[3',4',6,7]-인돌리지노[1,2-b]-퀴놀린-4-일(4-((S)-42-(2-(메틸설포닐)아실)피리미딘-5-일)-4,8,37-트리옥소-2-(3-우레이도프로필)-6,12,15,18,21,24,27,30,33-노녹시-3,9,36-아자테트라코산-41-아미도)벤질)카보네이트



[0658]

[0659] **단계 1:** 메틸(S)-(1-((4-(히드록시메틸)페닐)아미노)-1-옥소-5-우레이도펜탄-2-일)-(9H-플루오레닐) 카바메이트**(화합물 19-2)**의 합성

[0660] 실온에서, Fmoc-L-시트룰린(5.0 g, 12.58 mmol), p-아미노벤질 알코올(6.20 g, 50.32 mmol) 및 2-에톡시-1-에톡시카르복실-1,2-디히드로퀴놀린(6.22 g, 25.16 mmol)을 디클로로메탄(100 mL)중에 용해시키고, 45 ℃로 가열하였고 6 시간 동안 반응시켰다. 반응 용액을 감압 하에 농축시켰고, 무수 디에틸 에테르(100 mL)로 비팅(beating)하여 표제화합물(6.0 g)을 수득하였다. ESI-MS(m/z): 503.3$[M+H]^+$.

[0661] **단계 2:** (S)-2-아미노-N-(4-(히드록시메틸)페닐)-5-우레이도발레르아미드**(화합물 19-3)**의 합성

[0662] 실온에서, 화합물 19-2(1.0g, 1.99 mmol)을 N,N-디메틸포름아미드(8 mL)중에 용해시키고, 반응을 위해 실온에서 30 분 동안 피페리딘(339 mg, 3.98 mmol)을 적가하고 나서, 디클로로메탄(10 mL)을 첨가하였고, 이어서 10 분 동안 교반하였다. 반응 용액을 감압 하에 농축시켰고, 플래시 컬럼 크로마토그래피(flash column chromatography)로 정제하여 표제화합물(400 mg)을 수득하였다. ESI-MS(m/z): 281.2$[M+H]^+$.

[0663] **단계 3:** (S)-2-(32-아지도-5-옥소-3,9,12,15,18,21,24,27,30-노닐옥사-6-아자트리아세트아미도)-N-(4-(히드록시메틸)페닐)-5-우레이도발레르아미드**(화합물 19-4)**의 합성

[0664] 화합물 19-3(150 mg, 0.54 mmol) 및 32-아지도-5-옥소-3,9,12,15,18,21,24,27,30-노녹시-6-아자트리시클로운데칸산(296 mg, 0.54 mmol)을 디클로로메탄(10 mL)중에 용해시키고 0 ℃까지 냉각시키고 나서, 2-에톡시-1-에톡시카르복실-1,2-디히드로퀴놀린(145 mg, 0.58 mmol)을 첨가하였다. 결과 혼합물을 실온에 옮겨 밤새 반응시켰다. 반응 용액을 감압 하에 농축시켰고, 플래시 컬럼 크로마토그래피로 정제하여 표제화합물(200 mg)을 수득하였다. ESI-MS(m/z): 817.5$[M+H]^+$.

[0665] **단계 4:** 4-((S)-35-아지도-4,8-디옥소-2-(3-우레이도프로필)-6,12,15,18,21,24,27,30,33-노녹시-3,9-아자테트라코산)벤질((S)-4-에틸-11-(2-(N-이소프로필메틸설포닐아미노)에틸)-3,14-디옥소-3,4,12,14-테트라히드로-1H-피라노[3',4',6,7]인돌리지노[1,2-b]퀴놀린-4-일)카보네이트**(화합물 19-5)**의 합성

[0666] 실온에서, (S)-N-(2-(4-에틸-4-히드록시-3,14-디온-3,4,12,14-테트라히드로-1H-피라노[3',4',6,7]인돌리지노[1,2-b]퀴놀린-11-일)에틸)-N-이소프로필메탄설폰아미드(200 mg, 0.39 mmol)를 디클로로메탄(10 mL)중에 용해시키고 0 ℃까지 냉각시키며, 디클로로메탄(1.0 mL) 중의 4-디메틸아미노피리딘(573 mg, 4.69 mmol) 용액을 첨가하였고, 그런 다음 디클로로메탄(1.0 mL) 중의 트리포스겐(116 mg, 0.39 mmol) 용액을 천천히 적가하였다. 교반하에, 0 ℃에서 1 시간 동안 결과 혼합물을 반응시켰다. 디클로로메탄(2.0 mL) 중의 화합물 19-4(159 mg, 0.18 mmol)용액을 반응 용액에 첨가하였고 실온에서 1 시간 동안 반응시켰다. 예비 고성능 액체 크로마토그래피(방법 D) 상에서 정제를 수행하여 표제화합물(160 mg)을 수득하였다. ESI-MS(m/z): 678.0$[M/2+H]^+$.

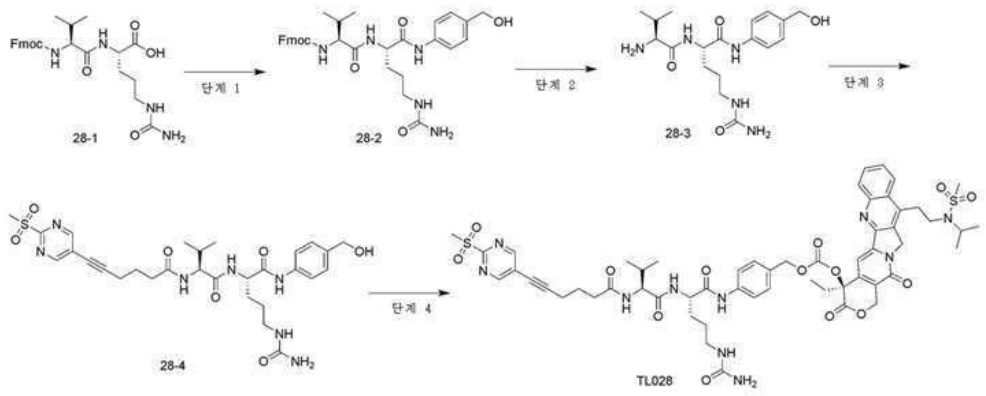
[0667] **단계 5:** 4-((S)-35-아미노-4,8-디옥소-2-(3-우레이도프로필)-6,12,15,18,21,24,27,30,33-노녹시-3,9-아자테트라코산)벤질((S)-4-에틸-11-(2-(N-이소프로필메틸설포닐아미노)에틸)-3,14-디옥소-3,4,12,14-테트라히드로-1H-피라노[3',4',6,7]인돌리지노[1,2-b]퀴놀린-4-일)카보네이트**(화합물 19-6)**의 합성

[0668] 실온에서, 화합물 19-5(80 mg, 0.059 mmol)을 테트라히드로푸란(1.0 mL)중에 용해시키고 0 ℃까지 냉각시킨 다음, 디클로로메탄(1.0 mL) 중의 4-디메틸아미노피리딘(573 mg, 4.69 mmol) 용액을 첨가하였고, 하나의 배치에서 질소 보호 하에 이산화 백금(15 mg, 0.059 mmol)을 첨가하고 나서, 공기를 3회 동안 수소로 대체시키고 실온에서 6 시간 동안 반응시켰다. 반응 용액을 여과하였고, 여과물을 농축시켜 원 생성물을 얻었으며, 이를 예비 고성능 액체 크로마토그래피(방법 D)로 정제하여 표제화합물(40 mg)을 수득하였다. ESI-MS(m/z): 665.0[M/2+H]$^+$.

[0669] **단계 6:** (S)-4-에틸-11-(2-(N-이소프로필메틸설폰아미드)에틸)-3,14-디옥소-3,4,12,14-테트라히드로-1H-피라노[3',4',6,7]인돌리지노[1,2-b]퀴놀린-4-일(4-((S)-42-(2-(메틸설포닐)피리미딘-5-일)-4,8,37-트리옥소-2-(3-우레이도프로필)-6,12,15,18,21,24,27,30,33-노녹시-3,9,36-아자테트라코산-41-아미도)벤질)카보네이트**(화합물 TL019)**의 합성

[0670] 화합물 19-6(30 mg, 0.016 mmol) 및 6-(2-메틸설포닐피리미딘-5-일)-5-헥신산(6.4 mg, 0.024 mmol)을 N,N-디메틸포름아미드(1 mL)중에 용해시키고 0 ℃까지 냉각시킨 다음, 벤조트리아졸-1-일-옥시트리피롤리디닐 헥사플루오로포스페이트(16.5 mg, 0.032 mmol), N,N-디이소프로필에틸아민(6.2 mg, 0.047 mmol)을 연속적으로 첨가하였다. 결과 혼합물을 실온에서 2 시간 동안 반응시켰다. 예비 고성능 액체 크로마토그래피(방법 D)상에서 정제를 수행하여 표제화합물(10 mg)을 수득하였다. ESI-MS(m/z): 790.0[M/2+H]$^+$.

[0671] **실시예 9:** (S)-4-에틸-11-(2-(N-이소프로필메탄설폰아미드)에틸)-3,14-디옥소-3,4,12,14-테트라히드로-1H-피라노[3',4',6,7]인돌리지노[1,2-b]퀴놀린-4-일-(4-((S)-2-((S)-3-메틸-2-(6-(2-(메틸설포닐)피리미딘-5-일))-5-헥신아미도)부티르아미도-5-우레이도발레릴아미도)벤질)카보네이트

[0672] 

[0673] **단계 1:** 메틸((S)-1-(((S)-1-((4-(히드록시메틸)페닐)아미노)-1-옥소-5-우레이도발레릴아미도-2-일)아미노))-3-메틸-부티르아미도-2-일)-(9H-플루오레닐) 카바메이트

[0674] 화합물 19-1이 화합물 28-1로 대체되는 것을 제외하고, 실시예 8의 단계 1에 기재된 것과 유사한 조작을 수행하여 표제화합물(310 mg)을 수득하였다. ESI-MS(m/z):602.3[M+H]$^+$.

[0675] **단계 2:** (S)-2-((S)-2-아미노-3-메틸부티르아미도)-N-(4-(히드록시메틸)페닐)-5-우레이도발레르아미드**(화합물 28-2)**의 합성

[0676] 화합물 19-2이 화합물 28-2로 대체되는 것을 제외하고, 실시예 8의 단계 2에 기재된 것과 유사한 조작을 수행하여 표제화합물(150 mg)을 수득하였다. ESI-MS(m/z): 380.3[M+H]$^+$.

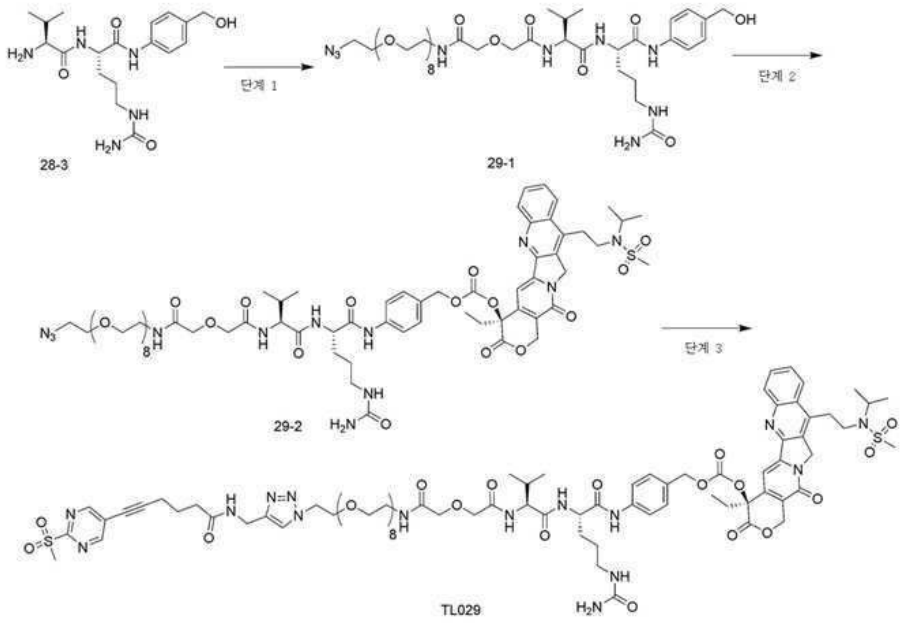
[0677] **단계 3:** N-((S)-1-(((S)-1-((4-히드록시메틸)페닐)아미노)-1-옥소-5-우레이도펜트-2-일)아미노)-3-메틸-1-옥소부탄-2-일)-6-(2-(메틸설포닐)피리미딘-5-일)-5-헥신아미드**(화합물 28-4)**의 합성

[0678] 실온에서, 벤조트리아졸-1-일-옥시트리피롤리디닐 헥사플루오로포스페이트(313 mg, 0.6 mmol) 및 N,N-디이소프로필에틸아민(194 mg, 1.50 mmol)을 N,N-디메틸포름아미드(10 mL) 중의 6-(2-메틸설포닐피리미딘-5-일)-5-헥신산(135 mg, 0.5 mmol) 및 (2S)-2-(((2S)-2-아미노-3-메틸-부티릴)아미노)-N-(4-(히드록시메틸)페닐)-5-우레이도-발레르아미드(190 mg, 0.5 mmol) 용액에 첨가하였고 교반 하에 실온에서 3 시간 동안 반응시켰다. 반응 용액을 예비 고성능 액체 크로마토그래피(방법 D)로 정제하여 표제화합물(78 mg)을 수득하였다. ESI-MS(m/z): 630.3 [M + H]$^+$.

[0679] **단계 4:** (S)-4-에틸-11-(2-(N-이소프로필메탄설폰아미드)에틸)-3,14-디옥소-3,4,12,14-테트라히드로-1H-피라노[3',4',6,7]인돌리지노[1,2-b]퀴놀린-4-일-(4-((S)-2-((S)-3-메틸-2-(6-(2-(메틸설포닐)피리미딘-5-일))-5-헥신아미도)부티르아미도-5-우레이도발레릴아미도)벤질)카보네이트**(화합물 TL028)**의 합성

[0680] 화합물 19-4가 화합물 28-4로 대체되는 것을 제외하고, 실시예 8의 단계 4에 기재된 것과 유사한 조작을 수행하여 표제화합물(1.76 mg)을 수득하였다. ESI-MS(m/z): 1167.4 $[M + H]^+$.

[0681] **실시예 10:** (S)-4-에틸-11-(2-(N-이소프로필메틸설폰아미드)에틸)-3,14-디옥소-3,4,12,14-테트라히드로-1H-피라노[3',4',6,7]인돌리지노[1,2-b]퀴놀린-4-일-(4-((2S,5S)-5-이소프로필-38-(4-((6-(2-(메틸설포닐)피리미딘-5-일)-5-헥신아미도)메틸)-1H-1,2,3-트리아졸-1-일)-4,7,11-트리옥소-2-(3-우레이도프로필)-9,15,18,21,24,27,30,33,36-노녹시-3,6,12-트리아조트리트리아콘틸아미도)벤질)카보네이트



[0682]

[0683] **단계 1:** (S)-2-((S)-35-아지도-2-이소프로필-4,8-디옥소-6,12,15,18,21,24,27,30,33-노녹시-3,9-아자테트라코실)-N-(4-(히드록시메틸)페닐)-5-우레이도발레르아미드**(화합물 29-1)**의 합성

[0684] 화합물 19-3이 화합물 28-3으로 대체되는 것을 제외하고, 실시예 8의 단계 3에 기재된 것과 유사한 조작을 수행하여 표제화합물(180 mg)을 수득하였다. ESI-MS(m/z): 916.5$[M+H]^+$.

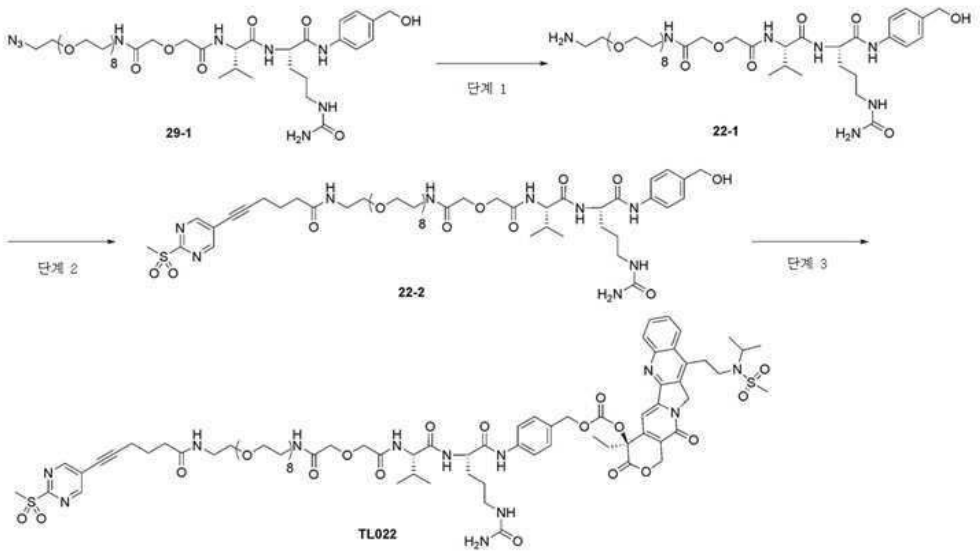
[0685] **단계 2:** 4-((2S,5S)-38-아지도-5-이소프로필-4,7,11-트리옥소-2-(3-우레이도프로필)-9,15,18,21,24,27,30,33,36-노녹시-3,6,12-트리아자트리트리아콘틸아미도)벤질((S)-4-에틸-11-(2-(N-이소프로필메틸설폰아미도)에틸)-3,14-디옥소-3,4,12,14-테트라히드로-1H-피라노[3',4',6,7]인돌리지노[1,2-b]퀴놀린-4-일)카보네이트**(화합물 29-2)**의 합성

[0686] 화합물 19-4가 화합물 29-1으로 대체되는 것을 제외하고, 실시예 8의 단계 4에 기재된 것과 유사한 조작을 수행하여 표제화합물(30 mg)을 수득하였다. ESI-MS(m/z): 727.5$[M/2+H]^+$.

[0687] 단계 3: (S)-4-에틸-11-(2-(N-이소프로필메틸설폰아미드)에틸)-3,14-디옥소-3,4,12,14-테트라히드로-1H-피라노[3',4',6,7]인돌리지노[1,2-b]퀴놀린-4-일-(4-((2S,5S)-5-이소프로필-38-(4-((6-(2-(메틸설포닐)피리미딘-5-일)-5-헥신아미도)메틸)-1H-1,2,3-트리아졸-1-일)-4,7,11-트리옥소-2-(3-우레이도프로필)-9,15,18,21,24,27,30,33,36-노녹시-3,6,12-트리아조트리트리아콘틸아미도)벤질)카보네이트**(화합물 TL029)**의 합성

[0688] 실온에서, 화합물 29-2(20 mg, 0.014 mmol) 및 6-(2-(메틸설포닐)피리미딘-5-일)-N-(2-프로핀-1-일)-5-헥신아미드(4.3 mg, 0.014 mmol)를 디메틸 설폭시드 및 물의 혼합 용매(1 mL/0.25 mL)중에 용해시키고 나서, 브롬화구리(I)(3.95 mg, 0.027 mmol)를 첨가하고 교반 하에 1 시간 동안 반응시켰다. 예비 고성능 액체 크로마토그래피(방법 D) 상에서 정제를 수행하여 표제화합물(15 mg)을 수득하였다. ESI-MS(m/z): 880.0$[M/2+H]^+$.

[0689] **실시예 11:** (S)-4-에틸-11-(2-(N-이소프로필메탄설폰아미도)에틸)-3,14-디옥소-3,4,12,14-테트라히드로-1H-피라노[3',4':6,7]인돌리지노[1,2-b]퀴놀린-4-일(4-((2S,5S)-5-이소프로필-45-(2-(메틸설포닐)피리미딘-5-일)-4,7,11,40-테트라옥소-2-(3-우레이도프로필)-9,15,18,21,24,27,30,33,36-노녹시-3,6,12, 39-테트라아자펜타테트라콘탄-44-카바모일)벤질)카보네이트



[0690]

[0691] **단계 1:** (S)-2-((S)-35-아미노-2-이소프로필-4,8-디옥소-6,12,15,18,21,24,27,30,33-노녹시-3,9-디아자펜타트리아콘트아미도)-N-(4-(히드록시메틸)페닐)-5-우레이도발레르아미드의 합성

[0692] 20 ℃에서, 화합물 29-1(400 mg, 0.44 mmol)를 메탄올 및 테트라히드로푸란(2.0 mL: 4.0 mL)중에 용해시켰다. 완전히 용해시킨 다음, 질소 보호 하에서 이산화 백금(40 mg)을 하나의 배치에 첨가하고 나서, 혼합 용액을 3회 수소로 대체시켰다. 수소화를 2 시간 동안 20 ℃에서 수행하였고, 반응 용액을 여과하였다. 필터 케이크를 메탄올로 세척하였다. 여과물을 감압 하에 농축시켰다. 잔여물을 예비 고성능 액체 크로마토그래피(방법 D)로 정제하여 표제화합물(200 mg)을 수득하였다. ESI-MS(m/z): 890.4[M+H]$^+$.

[0693] **단계 2:** N-((6S,9S)-1-아미노-6-((4-(히드록시메틸)페닐)카바모일)-9-이소프로필-1,8,11,15-테트라옥소-13,19,22,25,28,31,34,37,40-노녹시-2,7,10,16-테트라아자도테트라콘트-42-일)-6-(2-(메틸설포닐)피리미딘-5-일)헥스-5-이닐아미드의 합성

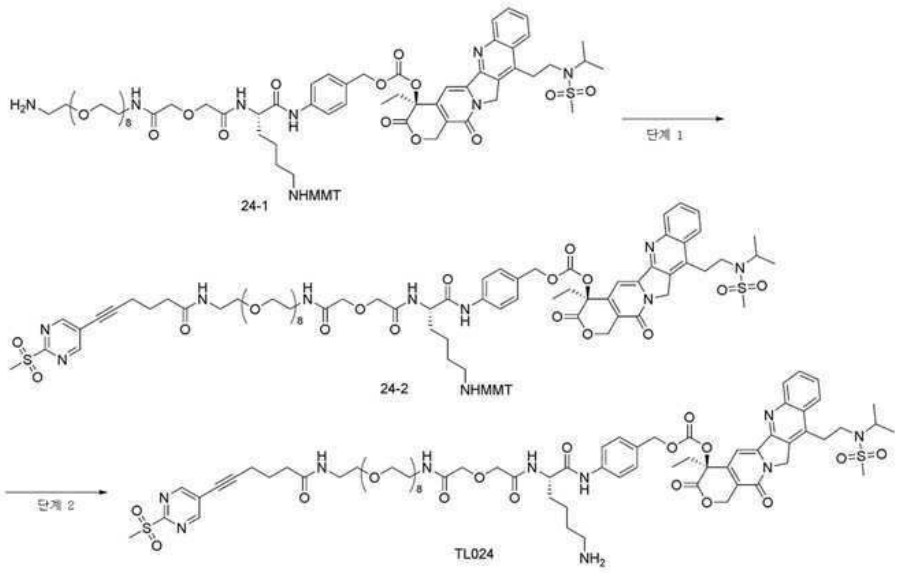
[0694] 20 ℃에서, 화합물 22-1(250 mg, 0.28 mmol)을 N,N-디메틸포름아미드(1.0 mL)중에 용해시키고 나서, HATU(160 mg, 0.42 mmol) 및 N,N-디이소프로필에틸아민(109 mg, 0.84 mmol)을 연속적으로 첨가하였으며, 이어 실온에서 밤새 교반시켰다. 예비 고성능 액체 크로마토그래피(방법 D) 상에서 정제를 수행하여 표제화합물(250 mg)을 수득하였다.

[0695] **단계 3:** (S)-4-에틸-11-(2-(N-이소프로필메탄설폰아미도)에틸)-3,14-디옥소-3,4,12,14-테트라히드로-1H-피라노[3',4':6,7]인돌리지노[1,2-b]퀴놀린-4-일(4-((2S,5S)-5-이소프로필-45-(2-(메틸설포닐)피리미딘-5-일)-4,7,11,40-테트라옥소-2-(3-우레이도프로필)-9,15,18,21,24,27,30,33,36-노녹시-3,6,12, 39-테트라아자펜타테트라콘탄-44-카바모일)벤질)카보네이트**(화합물 TL022)**의 합성

[0696] 20 ℃에서, (S)-N-(2-(4-에틸-4-히드록시-3,14-디온-3,4,12,14-테트라히드로-1H-피라노[3',4':6,7]인돌리지노[1,2-b]퀴놀린-11-일)에틸)-N-이소프로필메탄설폰아미드(70 mg, 0.14 mmol)을 디클로로메탄(4.0 mL)중에 용해시키고 0 ℃까지 냉각시킨 다음, 디클로로메탄(1.0 mL) 중의 p-디메틸아미노피리딘(200 mg, 1.64 mmol) 용액을 첨가하였고, 디클로로메탄(1.0 mL) 중의 트리포스겐(40.6 mg, 0.14 mmol) 용액을 천천히 적가하였다. 교반 하에 결과 혼합물을 0 ℃에서 1 시간 동안 반응시켰다. 반응되지 않은 트리포스겐은 질소로 날려버리고, 디클로로메탄(2.0 mL) 중의 화합물 22-2(139 mg, 012 mmol) 용액을 반응 용액에 첨가하였고 교반 하에 0 ℃에서 1 시간 동안 반응시켰다. 예비 고성능 액체 크로마토그래피(방법 D) 상에서 정제를 수행하여 표제화합물(1.5mg)을 수득하였다. ESI-MS(m/z): 839.5[M/2+H]$^+$.

[0697] **실시예 12:** 4-((S)-2-(4-아미노부틸)-42-(2-(메틸설포닐)피리미딘-5-일)-4,8,37-트리옥소-

6,12,15,18,21,24,27,30,33-노나옥사-3,9,36-트리아자데도테트라콘틸-41-알킨아미도)벤질-((S)-4-에틸-11-(2-(N-이소프로필메틸설포닐)에틸)-3,14-디옥소-3,4,12,14-테트라히드로-1H-피론[3',4':6,7]인돌리지노[1,2-b]퀴놀린-4-일)카보네이트



[0698]

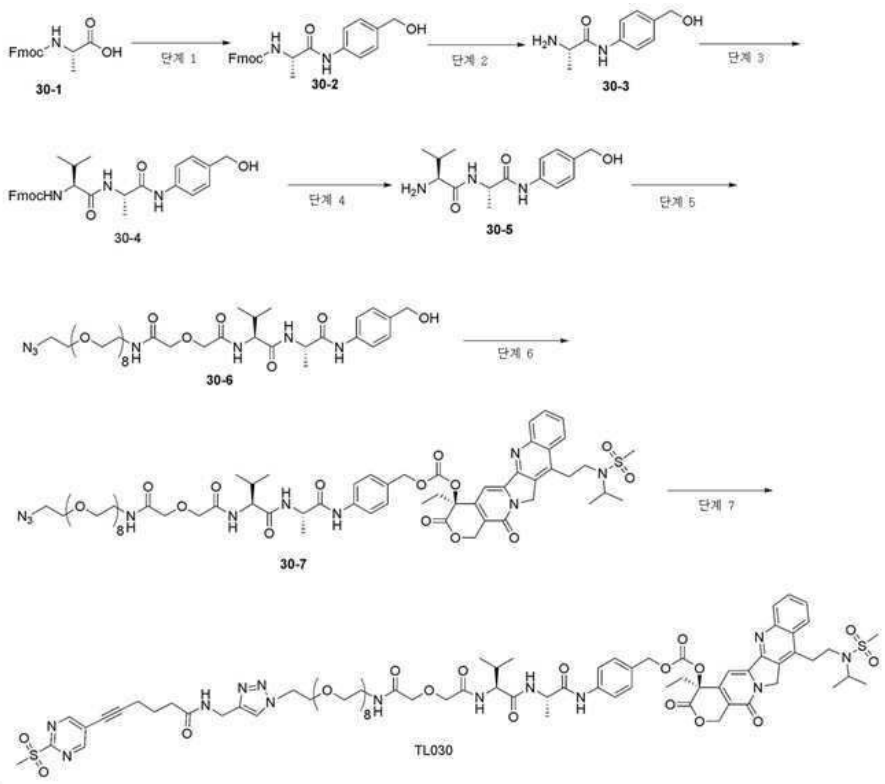
[0699] **단계 1:** (S)-4-에틸-11-(2-(N-이소프로필메탄설폰아미도)에틸)-3,14-디옥소-3,4,12,14-테트라히드로-1H-피론[3',4':6,7]인돌리지노[1,2-b]퀴놀린-4-일(4-((S)-2-(4-(((4-메톡시페닐)벤즈히드릴)아미노)부틸)-42-(2-(메틸설포닐)피리미딘-5-일)-4,8,37-트리옥소-6,12,15,18,21,24,27,30,33-노나옥사-3,9,36-트리아자도테트라콘틸-41-알킨아미도)벤질카보네이트의 합성

[0700] 실온에서, 6-(-2-(메틸설포닐)피리미딘-5-일)헥스-5-인산(12 mg, 0.045 mmol)을 디클로로메탄(2 mL)중에 용해시키고 나서, 2-(7-아조벤조트리아졸)-N,N,N',N'-테트라메틸우레아헥사플루오로포스페이트(21.2 mg, 0.056 mmol) 및 N,N-디이소프로필에틸아민(8.6 mg, 0.067 mmol)을 첨가하였고 10 분 동안 교반하였으며, 화합물 24-1(35 mg, 0.022 mmol)을 첨가하고 교반 하에 1 시간 동안 반응시켰다. 예비 고성능 액체 크로마토그래피(방법 B) 상에서 정제를 수행하여 표제화합물(20 mg)을 수득하였다. ESI-MS(m/z): 1821.8$[M+H]^+$.

[0701] **단계 2:** 4-((S)-2-(4-아미노부틸)-42-(2-(메틸설포닐)피리미딘-5-일)-4,8,37-트리옥소-6,12,15,18,21,24,27,30,33-노나옥사-3,9,36-트리아자데도테트라콘틸-41-알킨아미도)벤질-((S)-4-에틸-11-(2-(N-이소프로필메틸설포닐)에틸)-3,14-디옥소-3,4,12,14-테트라히드로-1H-피론[3',4':6,7]인돌리지노[1,2-b]퀴놀린-4-일)카보네이트**(화합물 TL024)**의 합성

[0702] 실온에서, 화합물 24-2(20 mg, 0.011 mmol)을 아세토니트릴(1 mL)중에 용해시키고, 아세토니트릴(0.5 mL) 중의 트리플루오로아세트산(0.5 mL) 용액을 적가하고 20 분 동안 교반하였다. 예비 고성능 액체 크로마토그래피(방법 C) 상에서 수행하여 트리플루오로아세테이트인 표제화합물(12 mg)을 수득하였다. ESI-MS(m/z): 1549.6$[M+H]^+$.

[0703] **실시예 13:** (S)-4-에틸-11-(2-(N-이소프로필메틸설폰아미드)에틸)-3,14-디옥소-3,4,12,14-테트라히드로-1H-피라노[3',4':6,7]인돌리지노[1,2-b]퀴놀린-4-일-4-((2S,5S)-5-이소프로필-2-메틸-38-(4-((6-(2-(메틸설포닐)피리미딘-5-일)일)헥스-5-인아미도)메틸)-1H-1,2,3-트리아졸-1-일)-4,7,11-트리옥소-9,15,18,21,24,27,30,33,36-노녹시-3,6,12-트리아자트리아콘트아잔아미도)벤질)카보네이트의 합성



[0704]

[0705] **단계 1:** (S)-(9H-플루오렌-9-일)-메틸(1-((4-(히드록시메틸)페닐)아미노)-1-옥소프로필-2-일)카바메이트의 제조

[0706] 실온에서, 2-에톡시-1-에톡시카르복실-1,2-디히드로퀴놀린(1.31 g, 5.30 mmol) 및 p-아미노벤질 알코올(593 mg, 4.82 mmol)을 디클로로메탄(35 mL) 중의 화합물 30-1(1.5 g, 4.82 mmol) 용액에 첨가하였고 교반 하에 3 시간 동안 반응시켰다. 실리카겔 컬럼 크로마토그래피 상에서 정제를 수행하여 표제화합물(1.8 g)을 수득하였다. ESI-MS(m/z): 417.2 $[M+H]^+$

[0707] **단계 2:** (S)-2-아미노-N-(4-(히드록시메틸)페닐)프로피온아미드의 제조

[0708] 실온에서, 에틸렌디아민(5 mL)을 디클로로메탄(20 mL) 중의 화합물 30-2(1.8 g, 4.32 mmol) 용액에 첨가하였고 2 시간 동안 반응시켰다. 실리카겔 컬럼 크로마토그래피 상에서 정제를 수행하여 표제화합물(820 mg)을 수득하였다. ESI-MS(m/z): 195.1 [M+H]+

[0709] **단계 3:** (9H-플루오렌-9-일)-메틸((S)-1-(((S)-1-((4-(히드록시메틸)페닐)아미노)-1-옥소프로판-2-일)아미노)-3-메틸-1-옥소부탄-2-일)-카바메이트의 제조

[0710] 실온에서, (2S)-2-(9H-플루오렌-9-일메톡시카르보닐아미노)-3-메틸-부티르산(875 mg, 2.58 mmol), O-벤조트리아졸릴-테트라메틸우로늄 헥사플루오로포스페이트(1.45 g, 3.83 mmol), N,N-디이소프로필에틸아민(1.00 g, 7.74 mmol) 및 1-히드록시벤조트리아졸(525 mg, 3.89 mmol)을 디클로로메탄(2 mL) 중의 화합물 30-3(503 mg, 2.58 mmol) 용액에 연속적으로 첨가하였고 교반 하에 4 시간 동안 반응시켰다. 실리카겔 컬럼 크로마토그래피 상에서 정제를 수행하여 표제화합물(1.1g)을 수득하였다. ESI-MS(m/z): 516.2 [M+H]+

[0711] **단계 4:** (S)-2-아미노-N-((S)-1-((4-(히드록시메틸)페닐)아미노)-1-옥소프로프-2-일)-3-메틸부탄아미드의 제조

[0712] 실온에서, 에틸렌디아민(2 mL)을 디클로로메탄(8 mL) 중의 화합물 30-4(1.1 g, 2.13 mmol) 용액에 첨가하였고 교반 하에 1 시간 동안 반응시켰다. 실리카겔 컬럼 크로마토그래피 상에서 정제를 수행하여 표제화합물(610 mg)을 수득하였다. ESI-MS(m/z): 294.2 $[M+H]^+$

[0713] **단계 5:** (S)-2-(32-아지도-5-옥소-3,9,12,15,18,21,24,27,30-노녹시-6-디아자펜타트리아콘트아미도)-N-((S)-1-((4-(히드록시메틸)페닐)아미노)-1-옥소프로판-2-일)-3-메틸부티르아미드의 제조

[0714] 실온에서, O-벤조트리아졸릴-테트라메틸우로늄헥사플루오로포스페이트(160 mg, 0.42 mmol), 1-히드록시벤조트리아졸(57 mg, 0.42 mmol), N,N-디이소프로필에틸아민(109 mg, 0.84 mmol) 및 32-아지도-5-옥소-

3,9,12,15,18,21,24,27,30-노녹시-6-아자트리시클로데칸-1-산(156 mg, 0.28 mmol)을 디클로로메탄(3 mL) 중의 화합물 30-5(84 mg, 0.28 mmol) 용액에 첨가하였고 교반 하에 4 시간 동안 반응시켰다. 실리카겔 컬럼 크로마토그래피 상에서 정제를 수행하여 표제화합물(163 mg)을 수득하였다. ESI-MS(m/z): 830.4 $[M+H]^+$

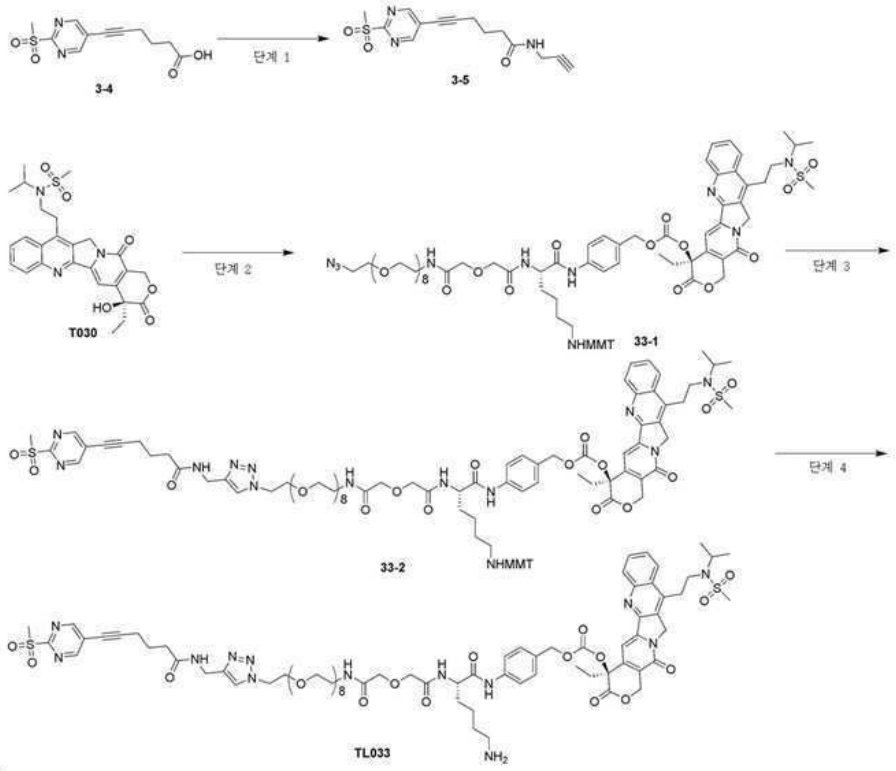
[0715] **단계 6:** 4-((2S,5S)-38 아지도-5-이소프로필-2-메틸-4,7,11-트리옥소-9,15,18,21,24,27,30,33,36-노녹시-3,6,12-트리아자트리아콘트아미노)벤질((S)-4-에틸-11-(2-(N-이소프로필메틸설포닐아미노)에틸)-3,14-디옥소-3,4,12,14-테트라히드로-1H-피라노[3',4':6,7]인돌리지노[1,2-b]퀴놀린-4-일)카보네이트의 제조

[0716] 질소 보호 하에서 및 0 ℃에서, 디클로로메탄(0.3 mL) 중의 트리포스겐(16 mg, 0.05 mmol) 용액을 디클로로메탄(0.7 mL) 중의 4-디메틸아미노피리딘(65 mg, 0.53 mmol) 및(S)-N-(2-(4-에틸-4-히드록시-3,14-디옥소-3,4,12,14-테트라히드로-1H-피라노[3',4':6,7]인돌리지노[1,2-b]퀴놀린-11-일)에틸)-N-이소프로필메탄설폰아미드(45 mg, 0.09 mmol)의 혼합 용액에 적가하였고 0 ℃에서 1 시간 동안 반응시켰다. 그런 다음, 디클로로메탄(1 mL) 중의 화합물 30-6(73 mg, 0.09 mmol) 용액을 반응 용액에 적가하고 0 ℃에서 1 시간 동안 반응시켰다. 실리카겔 컬럼 크로마토그래피 상에서 정제를 수행하여 표제화합물(33 mg)을 수득하였다. ESI-MS(m/z): 1367.6 $[M+H]^+$

[0717] **단계 7:** (S)-4-에틸-11-(2-(N-이소프로필메틸설폰아미드)에틸)-3,14-디옥소-3,4,12,14-테트라히드로-1H-피라노[3',4':6,7]인돌리지노[1,2-b]퀴놀린-4-일-4-((2S,5S)-5-이소프로필-2-메틸-38-(4-((6-(2-(메틸설포닐)피리미딘-5-일)일)헥스-5-인아미도)메틸)-1H-1,2,3-트리아졸-1-일)-4,7,11-트리옥소-9,15,18,21,24,27,30,33,36-노녹시-3,6,12-트리아자트리아콘트아잔아미도)벤질카보네이트**(화합물 TL030)**의 제조

[0718] 실온에서, 브롬화 구리(I)(5 mg, 0.04 mmol) 및 화합물 30-7(20 mg, 15 umol)을 물 및 N,N-디메틸포름아미드(0.2 mL: 0.8 mL) 중의 6-(2-(메틸설포닐)피리미딘-5-일)-N-(프로프-2-인-1-일)-헥스-5-이닐아미드(9 mg, 0.007 mmol) 용액에 적가하였고 교반 하에 4 시간 동안 반응시켰다. 예비 고성능 액체 크로마토그래피(방법 D) 상에서 정제를 수행하여 표제화합물(4.15 mg)을 수득하였다. ESI-MS(m/z): 1672.7 $[M+H]^+$

[0719] **실시예 14:** 4-((S)-2-(4-아미노부틸)-35-(4-((6-(2-(메틸설포닐)피리미딘-5-일)헥스-5-인아미도)메틸)-1H-1,2,3-트리아졸-1-일)-4,8-디옥소-6,12,15,18,21,24,27,30,33-노나옥사-3,9-디아자펜타트리아콘트아미도)벤질((S)-4-에틸-11-(2-(N-이소프로필메틸설폰아미도)에틸)-3,14-디옥소-3,4,12,14-테트라히드로-1H-피라노[3',4':6,7]인돌리지노[1,2-b]퀴놀린-4-일)카보네이트



[0720]

[0721] **단계 1:** 6-(2-(메틸설포닐)피리미딘-5-일)-N-(프로프-2-인-1-일)헥스-5-인아미드의 합성

[0722] 25 ℃에서, 프로프-2-인yl-1-아민(189 mg, 3.4 mmol) 및 화합물 3-4(800 mg, 2.83 mmol)을 디클로로메탄(10 mL)중에 용해시키고 나서, N,N-디이소프로필에틸아민(738 mg, 5.67 mmol) 및 O-(7-아자벤조트리아졸-1-일)-N,N,N',N'-테트라메틸우로늄 헥사플루오로포스페이트(1.63 g, 4.25 mmol)를 연속적으로 첨가하였고 교반 하에 2 시간 동안 반응시켰다. 반응 용액을 감압 하에 농축시켰고, 잔여물을 플래시 실리카겔 컬럼 크로마토그래피(에틸 아세테이트/페트롤륨 에테르 =3/1)로 정제하여 표제화합물(700 mg)을 수득하였다. ESI-MS(m/z): 306.1[M+H]$^+$.

[0723] **단계 2:** 4-((S)-35-아지도-2-(4-(((4-메톡시페닐)벤즈히드릴)아미노)부틸)-4,8-디옥소-6,12,15,18,21,24,27,30,33-논아조-3,9-디아자펜타트리아콘트아미노)벤질((S)-4-에틸-11-(2-(N-이소프로필메탄설폰아미드)에틸)-3,14-디옥소-3,4,12,14-테트라히드로-2H-피라노[2,3-b]-1H-피라노[3',4':6,7]인돌리지노[1,2-b]퀴놀린-4-일)카보네이트의 합성

[0724] 25 ℃에서 및 질소 보호 하에서, T-030(250 mg, 0.49 mmol)을 디클로로메탄(10 mL)중에 용해시키고 0 ℃까지 냉각시키고 나서, 디클로로메탄(3 mL) 중의 4-디메틸아미노피리딘(478 mg, 3.91 mmol) 용액을 첨가하였고, 이어서 용액 디클로로메탄(10 mL) 중의 트리포스겐(72 mg, 0.24 mmol) 용액을 천천히 적가하여 교반 하에 0 ℃에서 20 분 동안 반응시키고, 반응 용액을 20 분 동안 질소로 버블링한 다음, 디클로로메탄(7 mL) 중의 (S)-2-(32-아지도-5-옥소-3,9,12,15,18,21,24,27,30-노나옥사-6-아자트리아세트아미도)-N-(4-(히드록시메틸)페닐)-6(((4-메톡시페닐)벤즈히드릴)아미노)아세트아미드(518 mg, 0.49 mmol)를 첨가하고, 교반 하에 0 ℃에서 1 시간 동안 반응시켰다. 반응 용액을 감압 하에 농축시켰고, 잔여물을 예비 고성능 액체 크로마토그래피(방법 A)로 정제하여 표제화합물(500 mg)을 수득하였다. ESI-MS(m/z): 1597.5[M+H]$^+$.

[0725] **단계 3:** (S)-4-에틸-11-(2-(N-이소프로필메탄설폰아미도)에틸)-3,14-디옥소-3,4,12,14-테트라히드로-1H-피라노[3',4':6,7]인돌리지노[1,2-b]퀴놀린-4-일(4-((S)-2-(4-(((4-메톡시페닐)디페닐메틸)아미노)부틸)-35-(4-((6-(2-(메틸설포닐)피리미딘-5-일)헥스-5-인아미도)메틸)-1H-1,2,3-트리아졸-1-일)-4,8-디옥소-6,12,15,18,21,24,27,30,33-노녹시-3,9-디아자펜타트리아콘트아미도)벤질)카보네이트의 합성

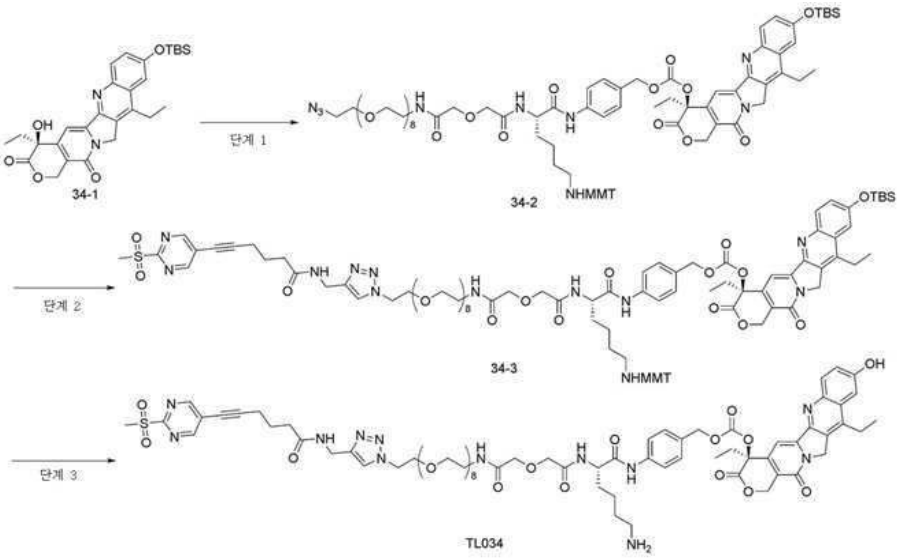
[0726] 실온에서, 화합물 33-1(14 mg, 0.05 mmol)을 디메틸 설폭시드 및 물(2.0 mL: 0.5 mL)중에 용해시켰고, 이어서 브롬화 구리(I)(11 mg, 0.08 mmol)를 첨가하였으며 교반하에 1 시간 동안 반응시켰다. 예비 고성능 액체 크로마토그래피(방법 B) 상에서 정제를 수행하여 표제화합물(30 mg)을 수득하였다. ESI-MS(m/z): 815.9[(M-273)/2+H]$^+$.

[0727] **단계 4:** 4-((S)-2-(4-아미노부틸)-35-(4-((6-(2-(메틸설포닐)피리미딘-5-일)헥스-5-인아미도)메틸)-1H-1,2,3-트리아졸-1-일)-4,8-디옥소-6,12,15,18,21,24,27,30,33-노나옥사-3,9-디아자펜타트리아콘트아미도)벤질((S)-4-에틸-11-(2-(N-이소프로필메틸설폰아미도)에틸)-3,14-디옥소-3,4,12,14-테트라히드로-1H-피라노[3',4':6,7]인돌리지노[1,2-b]퀴놀린-4-일)카보네이트**(화합물 TL033)**의 합성

[0728] 화합물 33-2(30 mg, 0.02 mmol)을 디클로로메탄(1.0 mL)중에 용해시키고, 트리플루오로아세트산(0.2 mL)을 반응 용액에 첨가하였으며 30 분 동안 실온에서 반응시켰다. 예비 고성능 액체 크로마토그래피(방법 C)상에서 정제를 수행하여 트리플루오로아세테이트인 표제화합물(20.0 mg)을 수득하였다. 표제화합물의 식별은 다음과 같다:

[0729] ^{1}H NMR(400 MHz, DMSO-d_6) δ 10.18(s, 1H), 9.10(s, 2H), 8.38(t, *J* = 5.56 Hz, 1H), 8.32(d, J = 8.40 Hz, 1H), 8.22 - 8.20(m, 2H), 8.09(t, *J* = 5.68 Hz, 1H), 7.91 - 7.87(m, 2H), 7.82 - 7.78(m, 1H), 7.69(brs, 3H), 7.61(d, *J* = 8.56 Hz, 2H), 7.32(d, *J* = 8.56 Hz, 2H), 7.06(s, 1H), 5.56(d, *J* = 16.96 Hz, 1H), 5.51(d, *J* = 16.96 Hz, 1H), 5.47(d, *J* = 19.28 Hz, 1H), 5.42(d, *J* = 19.28 Hz, 1H), 5.14(d, *J* = 12.20 Hz, 1H), 5.07(d, *J* = 12.16 Hz, 1H), 4.48(t, *J* = 5.24 Hz, 2H), 4.46 - 4.43(m, 1H), 4.29(d, *J* = 5.60 Hz, 2H), 4.08 - 3.95(m, 5H), 3.79(t, *J* = 5.28 Hz, 2H), 3.51 - 3.43(m, 32H), 3.40(s, 3H), 3.39 - 3.35(m, 2H), 3.30 - 3.26(m, 2H), 3.00(s, 3H), 2.82 - 2.74(m, 2H), 2.56(t, *J* = 7.08 Hz, 2H), 2.29(t, *J* = 7.36 Hz, 2H), 2.23 - 2.13(m, 2H), 1.82(p, *J* = 7.24 Hz, 2H), 1.78 - 1.63(m, 2H), 1.61 - 1.49(m, 2H), 1.42 - 1.27(m, 2H), 1.15(d, *J* = 6.80 Hz, 3H), 1.13(d, *J* = 6.76 Hz, 3H), 0.90(t, *J* = 7.32 Hz, 3H). ESI-MS(m/z): 816.0[M/2+H]$^+$. $[\alpha]_D^{20}$ 는 -19.55° (c =1.000g/100mL, CH_3CN)이다.

[0730] **실시예 15:** 4-((S)-2-(4-아미노부틸)-35-(4-((6-(2-(메틸설포닐)피리미딘-5-일)헥스-5-인아미도)메틸)-1H-1,2,3-트리아졸-1-일)-4,8-디옥소-6,12,15,18,21,24,27,30,33-노녹시-3,9-디아자펜타트리아콘트아미도)벤질 ((S)-11-디에틸-9-히드록시-3,14-디옥소-3,4,12,14-테트라히드로-1H-피라노[3',4':6,7]인돌리지노[1,2-b]퀴놀린-4-카보네이트



[0731]

[0732] **단계 1:** 4-((S)-35-아지도-2-(4-(((4-메톡시페닐)디페닐메틸)아미노)부틸)-4,8-디옥소-6,12,15,18,21,24,27-노녹시-((S)-9-((tert-부틸디메틸실릴)옥시)-4,11-디에틸-3,14-디옥소-3,4,12,14-테트라히드로-1,2,3,4-테트라히드로퀴놀린-1H-피라노[3',4':6,7]인돌리지노[1,2-b]퀴놀린-4-일)카보네이트의 합성

[0733] 실온에서, 질소 보호 하에서 화합물 34-1(100 mg, 0.2mmol)을 무수 디클로로메탄(2 mL)중에 용해시킨 다음, 0 ℃까지 냉각시키며, 이어서 무수 디클로로메탄(0.5 mL) 중의 4-디메틸아미노피리딘(144 mg, 1.18 mmol) 용액을 첨가한 다음, 건조 디클로로메탄(0.5 mL) 중의 트리포스겐(41 mg, 0.14 mmol) 용액을 천천히 적가하였다. 교반 하에 0 ℃에서 1 시간 동안 결과 혼합물을 반응시켰다. 그런 다음, 건조 디클로로메탄(0.5 mL) 중의 (S)-2-(32-아지도-5-옥소-3,9,12,15,18,21,24,27,30-노나옥사-6-아자트리아세트아미도)-N-(4-(히드록시메틸)페닐)-6(((4-메톡시페닐)벤즈히드릴)아미노)아세트아미드(160 mg, 0.15 μmol) 용액을 상기 반응 용액에 첨가하였고 실온에서 1 시간 동안 반응시켰다. 예비 고성능 액체 크로마토그래피(방법 B) 상에서 정제를 수행하여 표제화합물(60 mg)을 수득하였다. ESI-MS(*m/z*): 1592.7[M+H]$^+$.

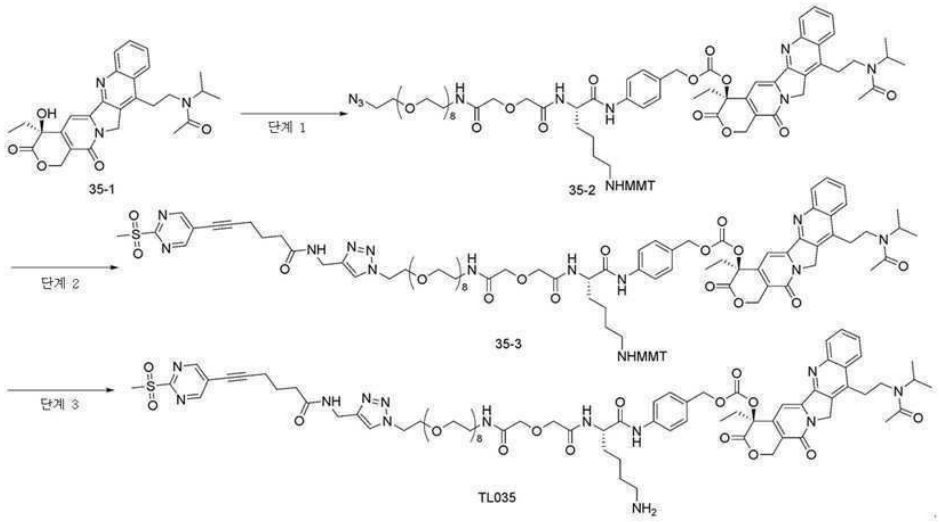
[0734] **단계 2:** (S)-9-(tert-부틸디메틸실릴)옥시)-4,11-디에틸-3,14-디옥소-3,4,12,14-테트라히드로-1H-피라노[3',4':6,7]인돌리지노[1,2-b]퀴놀린-4-일-4-((S)-2-(4-(((6-2-(메틸설포닐)피리미딘-5-일)-35-(4-((6-2-(메틸설포닐)피리미딘-5-일)헥스-5-인아미도)메틸)-1H-1,2,3-트리아졸-1-일)-디옥소-6,12,15,18,21,24,27,30,33-노녹시-3,9-디아자펜타트리아콘트아미도)카보네이트의 합성

[0735] 실온에서, 화합물 34-2(40 mg, 0.03 mmol) 및 6-(2-(메틸설포닐)피리미딘-5-일)-N-(프로프-2-인-1-일)헥스-5-이닐아미드(11.50 mg, 0.04 mmol)를 디메틸 설폭시드 및 물(0.5 mL: 0.1 mL)중에 용해시키고, 브롬화 구리(I)(9.01 mg, 0.06 mmol)를 첨가하고. 결과 혼합물을 교반 하에 1 시간 동안 반응시켰다. 예비 고성능 액체 크로마토그래피(방법 B) 상에서 정제를 수행하여 표제화합물(20 mg)을 수득하였다. ESI-MS(m/z): 1897.5[M+H].

[0736] **단계 3:** 4-((S)-2-(4-아미노부틸)-35-(4-((6-(2-(메틸설포닐)피리미딘-5-일)헥스-5-인아미도)메틸)-1H-1,2,3-트리아졸-1-일)-4,8-디옥소-6,12,15,18,21,24,27,30,33-노녹시-3,9-디아자펜타트리아콘트아미도)벤질 ((S)-11-디에틸-9-히드록시-3,14-디옥소-3,4,12,14-테트라히드로-1H-피라노[3',4':6,7]인돌리지노[1,2-b]퀴놀린-4-카보네이트**(화합물 TL034)**의 합성

[0737] 실온에서, 화합물 34-3(30 mg, 0.018 mmol)을 아세토니트릴 및 물(0.4 mL: 0.1 mL)중에 용해시키고 나서, 트리플루오로아세트산 및 아세토니트릴(0.5 mL: 0.5 mL)의 혼합 용액을 적가하였고, 실온에서 2 시간 동안 교반하였다. 예비 고성능 액체 크로마토그래피(방법 C)상에서 정제를 수행하여 트리플루오로아세테이트인 표제화합물(12 mg)을 수득하였다. ESI-MS(m/z): 1511.5[M+H]$^+$.

[0738] **실시예 16:** 4-((S)-2-(4-아미노부틸)-35-(4-((6-(2-(메틸설포닐)피리미딘-5-일)헥스-5-인아미도)메틸)-1H-1,2,3-트리아졸-1-일)-4,8-디옥소-6,12,15,18,21,24,27,30,33-노나옥사-3,9-디아자펜타트리아콘트아미도)벤질 ((S)-4-에틸-11-(2-(N-이소프로필메틸설폰아미도)에틸)-3,14-디옥소-3,4,12,14-테트라히드로-1H-피라노[3',4':6,7]인돌리지노[1,2-b]퀴놀린-4-일)카보네이트의 합성



[0739]

[0740] **단계 1:** ((S)-35-아지도-2-(4-(((4-메톡시페닐)디페닐메틸)아미노)부틸)-4,8-디옥소-6,12,15,18,21,24,27,30,33-노녹시-3,9-디아자펜타트리아콘트아미도)벤질((S)-4-에틸-11-(2-(N-이소프로필아세트아미도)에틸)-3,14-디옥소-3,4,12,14-테트라히드로-1,2,3,6-트리아자시클로헵탄-1H-피라노[3',4':6,7]인돌리지노[1,2-b]퀴놀린-4-일)카보네이트의 합성

[0741] 화합물 34-1이 화합물 25-1으로 대체되는 것을 제외하고, 실시예 15의 단계 1에 기재된 것과 유사한 조작을 수행하여 표제화합물(60 mg)을 수득하였다. ESI-MS(m/z): 1561.5[M+H]$^+$.

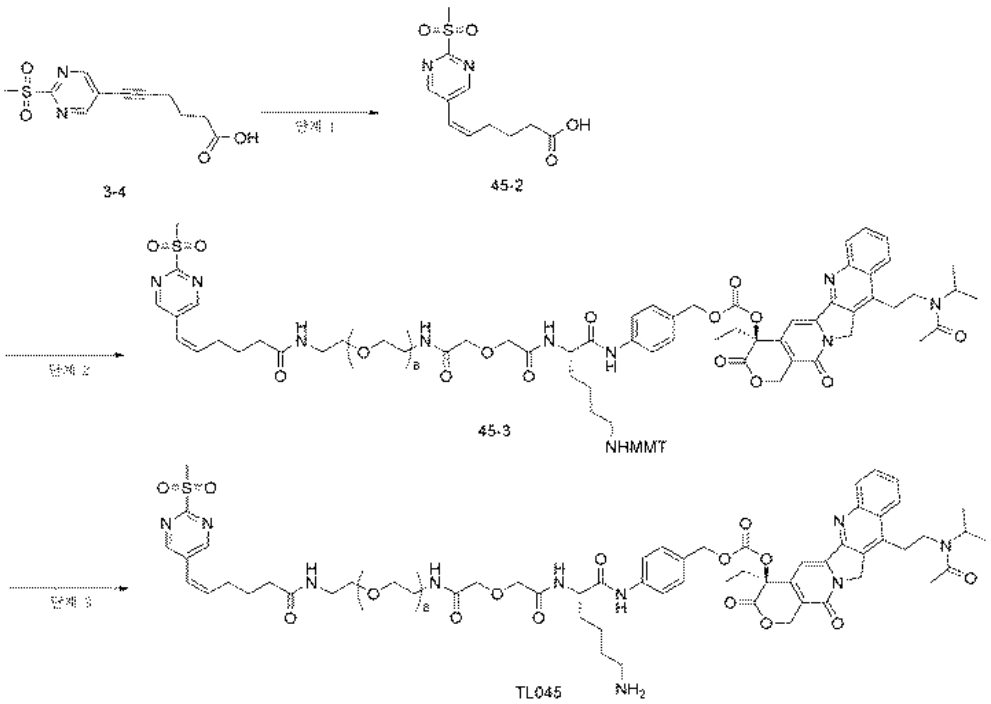
[0742] **단계 2:** (S)-4-에틸-11-(2-(N-이소프로필아세트아미도)에틸)-3,14-디옥소3,4,12,14-테트라히드로-1H-피라노[3',4':6,7]인돌리지노[1,2-b]퀴놀린-4-일)-4-((S)-2-(4-(((4-메톡시페닐)di페닐메틸)아미노)부틸)-35-(4-((6-2-(메틸설포닐)피리미딘-5-일)헥스-5-인아미도)메틸)-1H-1,2,3-트리아졸-1-일)-4,8-디옥소-6,12,15,18,21,24,27,30,33-노녹시-3,9-디아자펜타트리아콘트아미도]카보네이트의 합성

[0743] 화합물 34-2가 화합물 35-2으로 대체되는 것을 제외하고, 실시예 15의 단계 2에 기재된 것과 유사한 합성 방법을 수행하여 표제화합물(20 mg)을 수득하였다. ESI-MS(m/z): 1866.5[M+H].

[0744] **단계 3:** 4-((S)-2-(4-아미노부틸)-35-(4-((6-(2-(메틸설포닐)피리미딘-5-일)헥스-5-인아미도)메틸)-1H-1,2,3-트리아졸-1-일)-4,8-디옥소-6,12,15,18,21,24,27,30,33-노나옥사-3,9-디아자펜타트리아콘트아미도)벤질 ((S)-4-에틸-11-(2-(N-이소프로필아세트아미도)에틸)-3,14-디옥소-3,4,12,14-테트라히드로-1H-피라노[3',4':6,7]인돌리지노[1,2-b]퀴놀린-4-일)카보네이트**(화합물 TL035)**의 합성

[0745] 화합물 34-3이 화합물 35-3으로 대체되는 것을 제외하고, 실시예 15의 단계 3에 기재된 것과 유사한 합성 방법을 수행하여 표제화합물(4.9 mg)을 수득하였다. ESI-MS(m/z): 1594.5[M+H]$^+$.

[0746] **실시예 17:** 4-((S, Z)-2-(4-아미노부틸)-42-(2-(메틸설포닐)피리미딘-5-일)-4,8,37-트리옥소-6,12,15,18,21,24,27,30,33-노나옥사-3,9,36-트리아자도테트라콘틸-41-알켄아미도)벤질-((S)-4-에틸-11-(2-(N-이소프로필아세트아미도)에틸)-3,14-디옥소-3,4,12,14-테트라히드로-1H-피론[3',4':6,7]인돌리지노[1,2-b]퀴놀린-4-일)카보네이트의 합성

[0747] 

[0748] **단계 1:** (Z)-6-(2-(메틸설포닐)피리미딘-5-일)헥스-5-엔산의 합성

[0749] 20 ℃에서, 화합물 3-4(200 mg, 0.67 mmol)을 메탄올(8.0 mL)중에 용해시키고, 질소 보호 하에서 Lindlar 촉매(20 mg)를 첨가하고 나서, 용액을 3 회 수소로 대체시켰다. 수소화는 20 ℃에서 3 시간 동안 수행되었다. 여과 후, 여과물을 스핀 건조하여 표제화합물(150 mg)을 수득하였다. ESI-MS(m/z):271.1[M+H]$^+$.

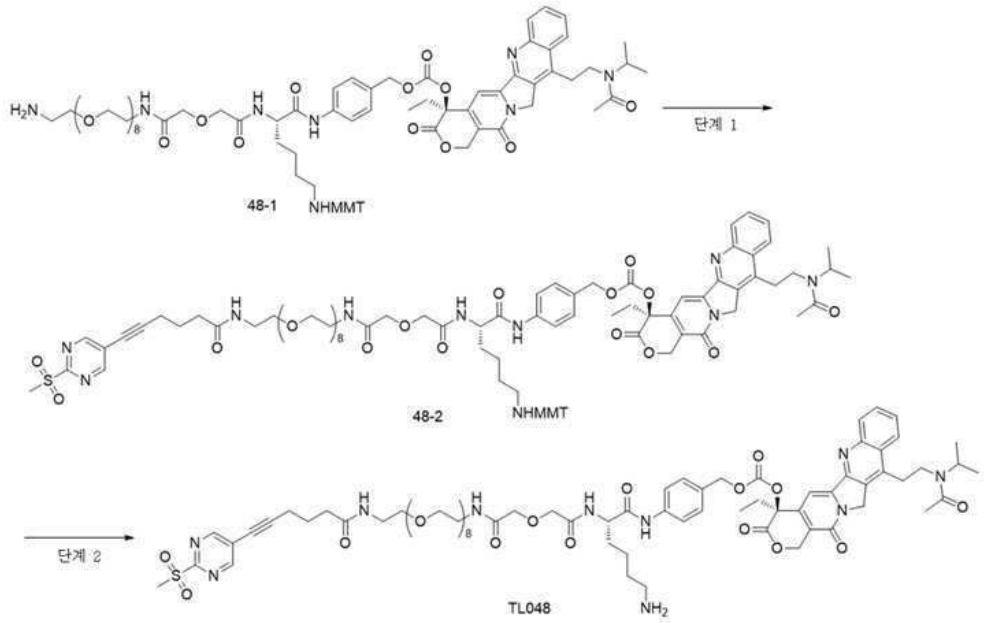
[0750] **단계 2:** (S)-4-에틸-11-(2-(N-이소프로필아세트아미도)에틸)-3,14-디옥소-3,4,12,14-테트라히드로-1H-피론[3',4':6,7]인돌리지노[1,2-b]퀴놀린-4-일(4-((S,Z)-2-(4-(((4-메톡시페닐)벤즈히드릴)아미노)부틸)-42-(2-(메틸설포닐)피리미딘-5-일)-4,8,37-트리옥소-6,12,15,18,21,24,27,30,33-노나옥사-3,9,36-트리아자도테트라콘틸-41-알켄아미도)벤질카보네이트의 합성

[0751] 실온에서, 화합물 45-2(8 mg, 0.030 mmol)를 디클로로메탄(2 mL)중에 용해시키고 나서, 2-(7-아조벤조트리아졸)-N,N,N',N'-테트라메틸우로늄 헥사플루오로포스페이트(14.9 mg, 0.039 mmol) 및 N,N-디이소프로필에틸아민(8.8 mg, 0.068 mmol)을 첨가하였다. 반응 용액을 실온에서 10 분 동안 교반한 다음, 화합물 48-1(30 mg, 0.020 mmol)을 첨가하고 교반 하에 실온에서 1 시간 동안 반응시켰다. 예비 고성능 액체 크로마토그래피(방법 B) 상에서 정제를 수행하여 표제화합물(30 mg)을 수득하였다. ESI-MS(m/z): 1787.8[M+H]$^+$.

[0752] **단계 3:** 4-((S, Z)-2-(4-아미노부틸)-42-(2-(메틸설포닐)피리미딘-5-일)-4,8,37-트리옥소-6,12,15,18,21,24,27,30,33-노나옥사-3,9,36-트리아자데도테트라콘틸-41-알켄아미도)벤질-((S)-4-에틸-11-(2-(N-이소프로필아세트아미도)에틸)-3,14-디옥소-3,4,12,14-테트라히드로-1H-피론[3',4':6,7]인돌리지노[1,2-b]퀴놀린-4-일)카보네이트**(화합물 TL045)**의 합성

[0753] 실온에서, 화합물 45-3(30 mg, 0.017 mmol)을 아세토니트릴(1 mL)중에 용해시키고, 아세토니트릴(0.5 mL) 중의 트리플루오로아세트산(0.5 mL) 용액을 적가하였다. 반응 용액을 실온에서 20 분 동안 교반하였다. 예비 고성능 액체 크로마토그래피(방법 C) 상에서 정제를 수행하여 트리플루오로아세테이트인 표제화합물(9 mg)을 수득하였다. ESI-MS(m/z): 1515.6[M+H]$^+$.

[0754] **실시예 18:** 4-((S)-2-(4-아미노부틸)-42-(2-(메틸설포닐)피리미딘-5-일)-4,8,37-트리옥소-6,12,15,18,21,24,27,30,33-노나옥사-3,9,36-트리아자데도테트라콘틸-41-알킨아미도)벤질-((S)-4-에틸-11-(2-(N-이소프로필아세트아미도)에틸)-3,14-디옥소-3,4,12,14-테트라히드로-1H-피론[3',4':6,7]인돌리지노[1,2-b]퀴놀린-4-일)카보네이트



[0755]

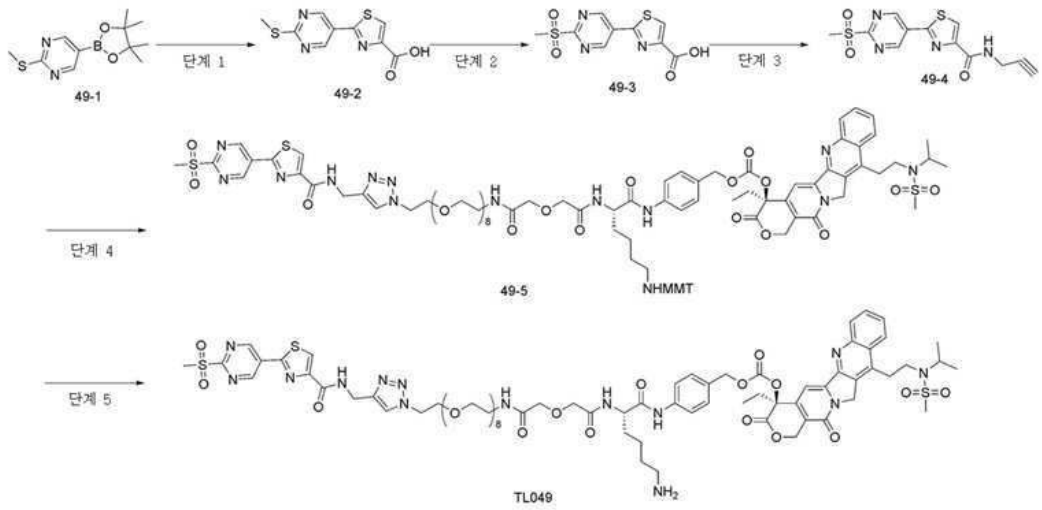
[0756] **단계 1:** (S)-4-에틸-11-(2-(N-이소프로필아세트아미도)에틸)-3,14-디옥소-3,4,12,14-테트라히드로-1H-피론[3',4':6,7]인돌리지노[1,2-b]퀴놀린-4-일(4-((S)-2-(4-(((4-메톡시페닐)벤즈히드릴)아미노)부틸)-42-(2-(메틸설포닐)피리미딘-5-일)-4,8,37-트리옥소-6,12,15,18,21,24,27,30,33-노나옥사-3,9,36-트리아자도테트라콘틸-41-알킨아미도)벤질카보네이트의 합성

[0757] 화합물 24-1이 화합물 48-1로 대체되는 것을 제외하고, 실시예 12의 단계 1에 기재된 것과 유사한 합성 방법을 수행하여 표제화합물(15 mg)을 수득하였다. ESI-MS(m/z): 1785.8[M+H]$^+$.

[0758] **단계 2:** 4-((S)-2-(4-아미노부틸)-42-(2-(메틸설포닐)피리미딘-5-일)-4,8,37-트리옥소-6,12,15,18,21,24,27,30,33-노나옥사-3,9,36-트리아자데도테트라콘틸-41-알킨아미도)벤질-((S)-4-에틸-11-(2-(N-이소프로필아세트아미도)에틸)-3,14-디옥소-3,4,12,14-테트라히드로-1H-피론[3',4':6,7]인돌리지노[1,2-b]퀴놀린-4-일)카보네이트**(화합물 TL048)**의 합성

[0759] 화합물 24-2이 화합물 48-2로 대체되는 것을 제외하고, 실시예 12의 단계 2에 기재된 것과 유사한 합성 방법을 수행하여 표제화합물(11.35 mg)을 수득하였다. ESI-MS(m/z): 1513.7[M+H]$^+$.

[0760] **실시예 19:** 4-((S)-2-(4-아미노부틸)-35-(4-((2-(2-((메틸설포닐)피리미딘-5-일)티아졸-4-카르복스아미도)메틸)-1H-1,2,3-트리아졸-1-일)-4,8-디옥소-6,12,15,18,21,24,27,30,33-노나옥사-3,9-디아자펜타트리아콘트아미노)벤질((S)-4-에틸-11-(2-(N-이소프로필메틸설폰아미도)에틸)-3,14-디옥소-3,4,12,14-테트라히드로-1H-피론[3',4':6,7]인돌리지노[1,2-b]퀴놀린-4-일)카보네이트



[0761]

[0762] **단계 1:** 2-(2-(메틸티오)피리미딘-5-일)티아졸-4-카르복실산 의 합성

[0763] 화합물 49-1(100 mg, 0.40 mmol), 2-브로모-4-티아졸카르복실산(99.01 mg, 0.48 mmol), 포타슘 카보네이트(137.03 mg, 0.99 mmol) 및 [1,1'- bis(디페닐포스피노)페로시닐]팔라듐 디클로라이드(29.02 mg, 0.04 mmol)를 N,N-디메틸포름아미드(4 mL) 및 물(1 ml)중에 용해시키고, 질소 보호 하에서, 반응계를 100 ℃로 가열시키고 4 시간 동안 교반하였다. 그런 다음 반응 용액을 실온까지 냉각시키며 물에 드롭핑하였다. 여과 후, 여과물을 수집하고 에틸 아세테이트(10 mL× 3)로 추출하였다. 수성상을 수집하고 묽은 염산으로 pH=3으로 조정하여 고체를 침전시키고, 여과하였다. 필터 케이크를 수집하여 표제화합물(70 mg)을 수득하였다. ESI-MS(m/z):254.0[M+H]$^+$.

[0764] **단계 2:** 2-(2-(메틸설포닐)피리미딘-5-일)티아졸-4-카르복실산의 합성

[0765] 화합물 49-2(73 mg, 0.29 mmol)을 디클로로메탄(15 mL)중에 용해시키고, 및 m-클로로퍼옥시벤조산(175.53 mg, 0.87 mmol, 85%)을 첨가하였다. 밤새 실온에서 반응계를 적가하였다. 상기 용매를 감압하에 농축하였다. 정제를 예비 고성능 액체 크로마토그래피(방법 D) 상에 수행하여 표제화합물(20 mg)을 수득하였다. ESI-MS(m/z):286.0[M+H]$^+$.

[0766] **단계 3:** 2-(2-(메틸설포닐)피리미딘-5-일)-N-(프로프-2-인-1-일)thi아조-4-카르복스아미드의 합성

[0767] 화합물 49-3(20 mg, 0.07 mmol)을 디클로로메탄(2 mL)중에 용해시키고, O-(7-벤조트리아졸)-N,N,N,N-테트라메틸우로늄 헥사플루오로포스페이트(39.98 mg, 0.11 mmol)를 첨가하였다. 수득된 반응계를 0 ℃ 까지 냉각시키고 나서, N, N-디이소프로필에틸아민(22.65 mg, 0.18 mmol) 및 프로파길아민(4.63 mg, 0.09 mmol) 을 그 안에 첨가하였다. 반응 용액을 실온에서 3 시간 동안 교반하였다. 정제를 예비 고성능 액체 크로마토그래피(방법 D) 상에서 수행하여 표제화합물(10 mg)을 수득하였다. ESI-MS(m/z):323.0[M+H]$^+$.

[0768] **단계 4:**(S)-4-에틸-11-(2-(N-이소프로필메탄설폰아미도)에틸)-3,14-디옥소-3,4,12,14-테트라히드로-1H-피론[3',4':6,7]인돌리지노[1,2-b]퀴놀린-4-일-(4-((S)-2-(4-(((4-메톡시페닐)벤즈히드릴)아미노)부틸)-35-(4-((2-(2-(메틸설포닐)피리미딘-5-일)티아졸-4-카르복스아미도)메틸)-1H-1,2,3-트리아졸-1-일)-4,8-디옥소-6,12,15,18,21,24,27,30,33-논아즈에자-3,9-디아자펜타트리아콘트아미노)벤질)카보네이트 의 합성

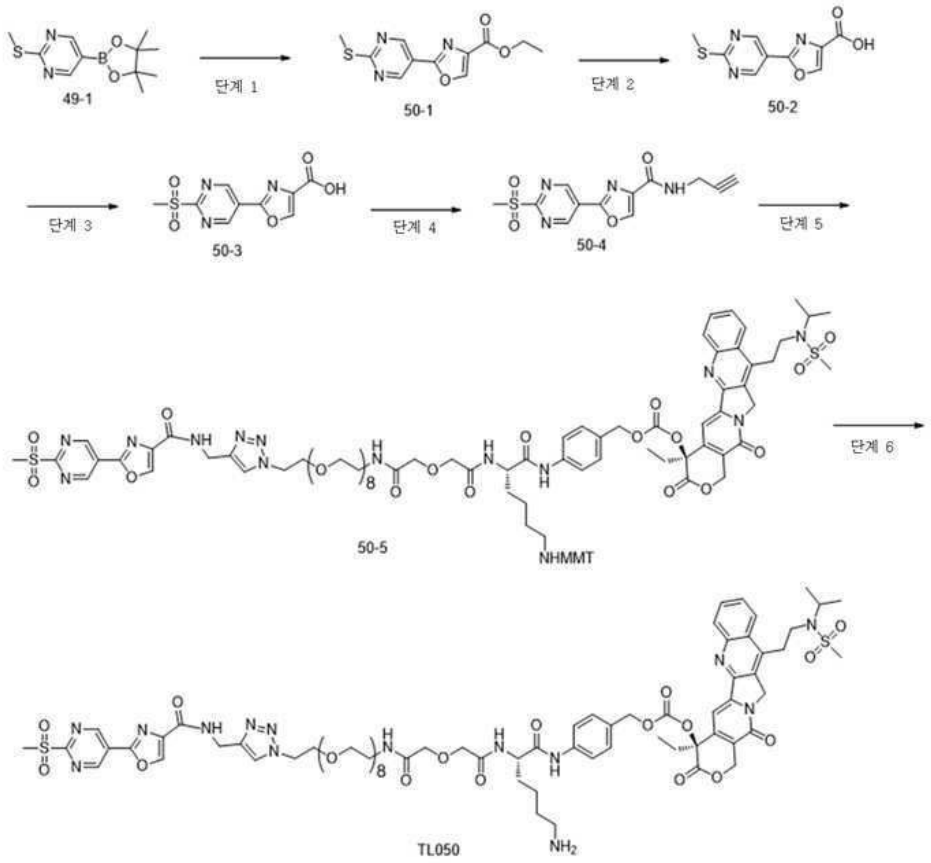
[0769] 실온에서, 화합물 33-1(30 mg, 0.02 mmol) 및 화합물 49-4(9.08 mg, 0.03 mmol)를 디메틸 설폭시드 및 물(2 mL/0.5 mL)중에 용해시키고, 브롬화 구리(I)(5.39 mg, 0.04 mmol)를 첨가하고 2 시간 동안 교반 하에 반응시켰다. 여과 후, 여과물을 예비 고성능 액체 크로마토그래피(방법 B)로 정제하여 표제화합물(20 mg)을 수득하였다. ESI-MS(m/z): 1647.3[M+H-273]$^+$.

[0770] **단계 5:** 4-((S)-2-(4-아미노부틸)-35-(4-((2-(2-((메틸설포닐)피리미딘-5-일)티아졸-4-카르복스아미도)메틸)-1H-1,2,3-트리아졸-1-일)-4,8-디옥소-6,12,15,18,21,24,27,30,33-노나옥사-3,9-디아자펜타트리아콘트아미노)벤질((S)-4-에틸-11-(2-(N-이소프로필메틸설폰아미도)에틸)-3,14-디옥소-3,4,12,14-테트라히드로-1H-피론

[3',4':6,7]인돌리지노[1,2-b]퀴놀린-4-일)카보네이트의 합성

[0771] 실온에서, 화합물 49-5(20 mg, 0.01 mmol)을 디클로로메탄(2 mL) 중에 용해시키고, 트리플루오로아세트산(0.2 mL)를 적가하였다. 수득된 반응 용액을 실온에서 20 분 동안 적가하였다. 그런 다음 반응 용액을 농축하였다. 잔여물을 예비 고성능 액체 크로마토그래피(방법 C)로 정제하여 트리플루오로아세테이트인 표제 화합물(8 mg)을 수득하였다. ESI-MS(m/z): 1647.9[M+H]$^+$.

[0772] **실시예 20:** 4-((S)-2-(4-아미노부티르산)-35-(4-((2-(2-(메틸설포닐)피리미딘-5-일)-옥스아졸-4-포르밀아미노)메틸)-1H-1,2,3-트리아졸-1-일)-4,8-디옥소-6,12,15,18,21,24,27,30,33-노녹시-3,9-디아자펜타트리아콘트아미도)벤질-((S)-4-에틸-11-(2-(N-이소프로필메틸설폰아미도)에틸)-3,14-디옥소-3,4,12,14-테트라히드로-1H-피라노[3',4':6,7]인돌리지노[1,2-b]퀴놀린-4-일)카보네이트



[0773]

[0774] **단계 1:** 에틸 2-(2-(메틸티오)피리미딘-5-일)옥사졸-4-카르복실레이트

[0775] 25 ℃에서, 에틸 2-브로모옥사졸-4-카르복실레이트(100 mg, 0.45 mmol) 및 화합물 49-1(126 mg, 0.50 mmol)을 1,4-디옥산 및 물(4 mL/2 mL)의 혼합 용매 중에 용해시킨 다음, 포타슘 카보네이트(125 mg, 0.9 mmol) 및 [1,1'-bis(디페닐포스피노)페로센]팔라듐 디클로라이드(33 mg, 0.05 mmol)을 연속적으로 첨가하였고, N_2 보호하에, 혼합물을 90 ℃로 가열시키고 3 시간 동안 반응시켰다. 반응 용액을 규조토(diatomite)로 여과하였다. 여과물을 물(50 mL)로 희석시켰으며 에틸 아세테이트(30 mL×3)로 추출하였다. 유기상을 합쳤으며 건조하였다. 건조제를 여과로 제거하였고, 여과물을 감압 하에 농축시켜 원 생성물을 수득하였으며, 이를 예비 박막 크로마토그래피(페트롤륨 에테르/에틸 아세테이트 =2/1)으로 정제하여 표제화합물(40 mg)을 수득하였다. ESI-MS(m/z):266.1[M+H]$^+$.

[0776] **단계 2:** 2-(2-(메틸티오)피리미딘-5-일)옥사졸-4-카르복실산의 합성

[0777] 25 ℃에서, 화합물 50-1(50 mg, 0.19 mmol)을 테트라히드로푸란 및 물(4 mL/2 mL)의 혼합 용매 중에 용해시키고, 완전히 용해시킨 다음, 리튬 히드록시드 1수화물(40 mg, 0.94 mmol)을 이에 첨가하고 25 ℃에서 1 시간 동안 반응시켰다. 반응 용액을 물(15 mL)로 희석시켰으며 에틸 아세테이트(20 mL×2)로 추출하였다. 수성상을 1N 묽은 염산으로 pH=2-3로 조정한 다음, 디클로로메탄/메탄올(v:v=10:1)(20 mL×3) 혼합 용매로 추출하였다. 유기

상을 합쳤으며, 포화 식염수(30 mL×1)로 세척하고, 무수 황산나트륨으로 건조하였다. 건조제를 여과로 제거하였고 여과물을 농축하여 표제화합물(40 mg)을 수득하였으며, 이를 정제없이 다음 반응에 직접 사용하였다. ESI-MS(m/z):238.1[M+H]$^+$.

[0778] **단계 3:** 2-(2-(메틸설포닐)피리미딘-5-일)옥사졸-4-카르복실산의 합성

[0779] 25 ℃에서, 화합물 50-2(40 mg, 0.17 mmol)를 디클로로메탄(6 mL)중에 용해시키고, 완전히 용해시킨 다음, m-클로로퍼옥시벤조산(29 mg, 0.17 mmol)을 이에 첨가하고 교반 하에 25 ℃에서 14 시간 동안 반응시켰다. 반응 용액을 농축시키고, 잔여물을 예비 고성능 액체 크로마토그래피(방법 D)로 정제하여 표제화합물(20 mg)을 수득하였다. ESI-MS(m/z):269.9[M+H]$^+$.

[0780] **단계 4:** 2-(2-(메틸설포닐)피리미딘-5-일)-N-(프로프-2-인-1-일)-옥사졸-4-포름아미드의 합성

[0781] 25 ℃에서, 화합물 50-3(20 mg, 0.07 mmol)을 디클로로메탄(4 mL)중에 용해시키고 나서, O-(7-아자벤조트리아졸-1-일)-N,N,N',N'-테트라메틸우로늄 헥사플루오로포스페이트(42 mg, 0.11 mmol) 및 N,N-디이소프로필에틸아민(19 mg, 0.15 mmol)을 연속적으로 첨가하였고, 5 분 동안 교반하였고, 이어 프로파길아민(5.0 mg, 0.09 mmol)을 첨가하고 나서 결과 혼합물을 실온에서 30 분 동안 교반하였다. 반응 용액을 농축시켰고, 잔여물을 예비 고성능 액체 크로마토그래피(방법 D)로 정제하여 표제화합물(5.0 mg)을 수득하였다. ESI-MS(m/z): 306.9 [M+H]$^+$.

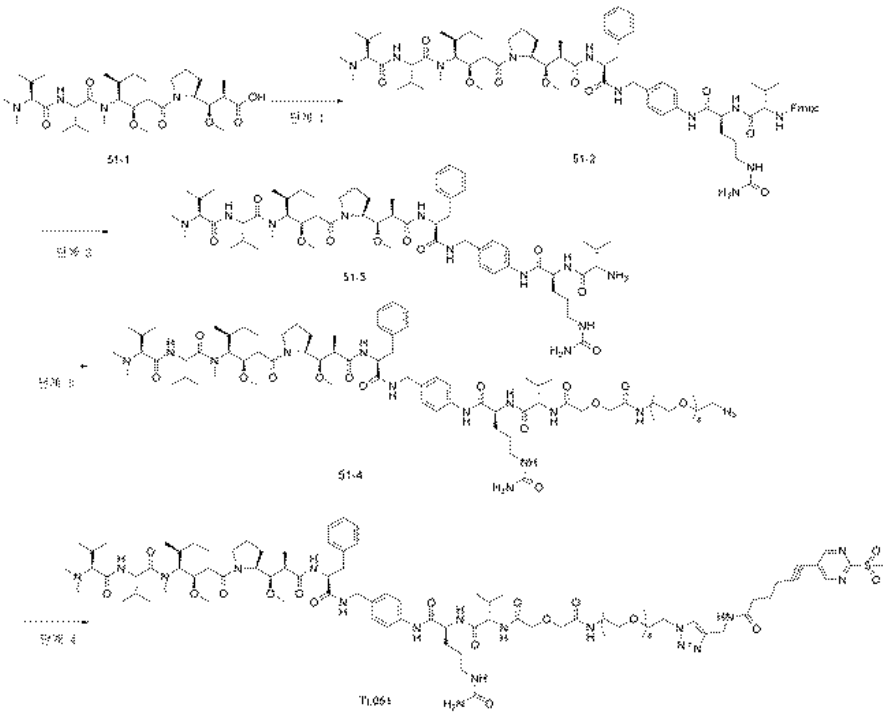
[0782] **단계 5:** (S)-4-에틸-11-(2-(N-이소프로필메탄설폰아미도)에틸)-3,14-디옥소-3,4,12,14-테트라히드로-1H-피라노[3',4':6,7]인돌리지노[1,2-b]퀴놀린-4-일4-((S)-2-(4-(((4-메톡시페닐)디페닐메틸)아미노)부틸)-35-(4-((2-(2-(메틸설포닐)피리미딘-5-일)옥사졸-4-포르밀아미노)메틸)-1H-1,2,3-트리아졸-1-일)-4,8-디옥소-6,12,15,18,21,24,27,30,33-노녹시-3,9-디아자펜타트리아콘트아미도)벤질)카보네이트의 합성

[0783] 25 ℃에서, 화합물 50-4(6.0 mg, 0.02 mmol) 및 화합물 33-1(30 mg, 0.02 mmol)을 디메틸 설폭시드 및 물의 혼합 용매(2 mL/0.5 mL 중에 용해시키고, 브롬화 구리(I)(5.0 mg, 0.04 mmol)를 하나의 배치에 첨가하였다. 결과 혼합물을 실온에서 2 시간 동안 반응시켰다. 반응 용액을 여과하였고 예비 고성능 액체 크로마토그래피(방법 B)로 정제하여 표제화합물(25 mg)을 수득하였다. ESI-MS(m/z): 1631.3[(M-273+H]$^+$.

[0784] **단계 6:** 4-((S)-2-(4-아미노부티르산)-35-(4-((2-(2-(메틸설포닐)피리미딘-5-일)옥사졸-4-포르밀아미노)메틸)-1H-1,2,3-트리아졸-1-일)-4,8-디옥소-6,12,15,18,21,24,27,30,33-노녹시-3,9-디아자펜타트리아콘트아미도)벤질-((S)-4-에틸-11-(2-(N-이소프로필메틸설폰아미도)에틸)-3,14-디옥소-3,4,12,14-테트라히드로-1H-피라노[3',4':6,7]인돌리지노[1,2-b]퀴놀린-4-일)카보네이트의 합성

[0785] 25 ℃에서, 화합물 50-5(20 mg, 0.01 mmol)를 디클로로메탄(2.0 mL)중에 용해시켰다. 완전히 용해시킨 다음, 반응 혼합물에 트리플루오로아세트산(0.2 mL) 을 첨가하고 25 ℃에서 10 분 동안 반응시켰다. 반응 용액을 농축시켰고, 잔여물을 예비 고성능 액체 크로마토그래피(방법 C)로 정제하여 트리플루오로아세테이트인 표제화합물(3.0 mg)을 수득하였다. ESI-MS(m/z):816.5[M/2 + H]$^+$.

[0786] **실시예 21:** N-((1-((6S,9S)-1-아미노-6-((4-(((S)-2-((2R,3R)-3-((S)-1-((3R,4S,5S)-4-((S)-2-((S)-2-(디메틸아미노)-3-메틸부탄아미도)-N,3-디메틸부탄아미도)-3-메톡시-5-메틸헵타노일)피롤리딘-2-일)-3-메톡시-2-메틸프로판아미도)-3-페닐프로판아미도)메틸)페닐)카바모일)-9-이소프로필-1,8,11,15-테트라옥시-13,19,22,25,28,31,34,37,40-노나옥사-2,7,10,16-테트라아자아느라센-42-일)-1H-1,2,3-트리아졸-4-일)메틸)-6-(2-(메틸설포닐)피리미딘-5-일)-5-헥신아미드



[0787]

[0788] **단계 1:** 9-플루오레닐메틸((S)-1-(((S)-1-((4-(((S)-2-((2R,3R)-3-((S)-1-((3R,4S,5S)-4-((S)-2-((S)-2-(디메틸아미노)-3-부티릴아미도)-N,3-디메틸부티릴아미도)-3-메톡시-5-메틸헵타노일)피로-2-일)-3-메톡시-2-메틸프로피온아미도)-3-페닐프로피온아미도)메틸)페닐)아미노)-1-옥소-5-우레이도펜트-2-일)아미노)-3-메틸-1-옥소부탄-2-일) 카바메이트의 합성

[0789] 실온에서, 화합물 51-1(100 mg, 0.17mmol) 및 9-플루오레닐메틸((S)-1-(((S)-1-((4-(((S)-2-아미노-3-페닐프로판아미도)메틸)페닐)아미노)-1-옥소-5-펜틸우레이도-2-일)아미노)-3-메틸-1-옥소부탄-2-일) 카바메이트 트리플루오로아세테이트(144 mg, 0.17 mmol)를 N,N-디메틸포름아미드(2 mL)중에 용해시키고 0 ℃까지 냉각시킨 다음, 1-히드록시벤조트리아졸(34 mg, 0.25 mmol), N-메틸모르폴린(51 mg, 0.51 mmol) 및 1-(3-디메틸아미노프로필)-3-에틸카보디이미드 염산(48 mg, 0.25 mmol)을 연속적으로 첨가하였다. 첨가 후, 반응 용액을 0 ℃에서 5 시간 동안 교반하였다. 반응 용액을 물(20 mL)로 부었고 흰색 고체를 침전시키고, 이어 흡입 여과를 하였다. 필터 케이크를 세척하고 건조하여 표제화합물(200 mg)을 수득하였다. ESI-MS(m/z): 1329.2 $[M + H]^+$.

[0790] **단계 2:** (S)-2-((S)-2-아미노-3-부티릴아미노)-N-(4-(((S)-2-((2R,3R)-3-((S)-1-((3R,4S,5S)-4-((S)-2-((S)-2-(디메틸아미노)-3-부티릴아미노)-N,3-디메틸부티릴아미노)-3-메톡시-5-메틸헵타노일)피로-2-일)-3-메톡시-2-메틸프로피온아미도)-3-페닐프로피온아미도)메틸)페닐)-5-우레이도발레르아미드의 합성

[0791] 실온에서, 화합물 51-2(200 mg, 0.12 mmol)를 N,N- 디메틸포름아미드(5 mL)중에 용해시키고, 피페리딘(0.5 mL)을 첨가하였다. 실온에서 2 시간 동안 반응 용액 교반하였고, 그런 다음 예비 고성능 액체 크로마토그래피(방법 D)로 정제하여 표제화합물(65 mg)을 수득하였다. ESI-MS(m/z): 1107.2 $[M + H]^+$.

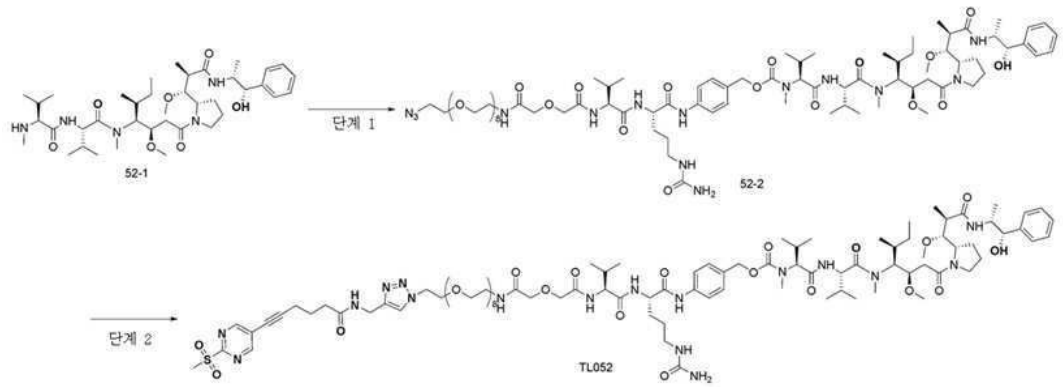
[0792] **단계 3:** (S)-2-((S)-35-아지도-2-이소프로필-4,8-디옥소-6,12,15,18,21,24,27,30,33-노나옥사-3,9-디아자펜타트리아콘트아미노)-N-(4-(((S)-2-((2R,3R)-3-((S)-1-((3R,4S,5S)-4-((S)-2-((S)-2-(디메틸아미노)-3-메틸부탄아미도)-N,3-디메틸부탄아미도)-3-메톡시-5-메틸헵타노일)피롤리딘-2-일)-3-메톡시-2-메틸프로판아미도)-3-페닐프로판아미도)메틸)페닐)-5-우레이도발레르아미드의 합성

[0793] 32-아지도-5-옥소-3,9,12,15,18,21,24,27,30-노나옥사-6-아자트리카르복실산(33.1 mg, 0.06 mmol)을 N,N-디메틸포름아미드(5 mL)중에 용해시키고 나서, O-(7-아자벤조트리아졸)-N,N,N,N-테트라메틸우로늄 헥사플루오로포스페이트(38 mg, 0.10 mmol) 및 N,N-디이소프로필에틸아민(26 mg, 0.20 mmol)을 첨가하였다. 반응 용액을 실온에서 10 분 동안 교반한 다음, 0 ℃까지 냉각시키고, 화합물 51-3(55 mg, 0.05 mmol)을 첨가하였다. 반응 용액을 실온에서 2 시간 동안 교반하였고, 예비 고성능 액체 크로마토그래피(방법 D)로 정제하여 표제화합물(56 mg)을 수득하였다. ESI-MS(*m/z*): 821.8 $[M/2 + H]^+$.

[0794] **단계 4:** N-((1-((6S,9S)-1-아미노-6-((4-(((S)-2-((2R,3R)-3-((S)-1-((3R,4S,5S)-4-((S)-2-((S)-2-(디메틸아미노)-3-메틸부탄아미도)-N,3-디메틸부탄아미도)-3-메톡시-5-메틸헵타노일)피롤리딘-2-일)-3-메톡시-2-메틸프로판아미도)-3-페닐프로판아미도)메틸)페닐)카바모일)-9-이소프로필-1,8,11,15-테트라옥시-13,19,22,25,28,31,34,37,40-노나옥사-2,7,10,16-테트라아자안트라센-42-일)-1H-1,2,3-트리아졸-4-일)메틸)-6-(2-(메틸설포닐)피리미딘-5-일)-5-헥신아미드의 합성

[0795] 실온에서, 화합물 51-4(56 mg, 0.04 mmol) 및 6-(2-(메틸설포닐)피리미딘-5-일)-N-(프로프-2-인-1-일)-5-헥신아미드(16 mg, 0.05 mmol)를 디메틸 설폭시드 및 물(2 mL/0.5 mL)의 혼합 용액 중에 용해시키고, 브롬화 구리(I)(10 mg, 68.17 umol)를 첨가하였다. 수득된 혼합물을 2 시간 동안 교반한 다음, 여과하였다. 여과물을 예비 고성능 액체 크로마토그래피(방법 D)로 정제하여 표제화합물(50 mg)을 수득하였다. ESI-MS(m/z): 974.3[M/2+H]$^+$.

[0796] **실시예 22:** 4-((2S,5S)-5-이소프로필-38-(4-((6-(2-(메틸설포닐)피리미딘-5-일)-5-헥신아미도)메틸)-1H-1,2,3-트리아졸-1-일)-4,7,11-트리옥소-2-(3-우레이도프로필)-9,15,18,21,24,27,30,33,36-노나옥사-3,6,12-트리아자도테트라콘틸)벤질-((S)-1-(((S)-1-(((3R,4S,5S)-1-((S)-2-((1R,2R)-3-(((1S,2R)-1-히드록시-1-페닐프로판-2-일)아미노)-1-메톡시-2-메틸-3-옥시프로필)피롤리딘-1-일)-3-메톡시-5-메틸-1-옥시헵탄-4-일)(메틸)아미노)-3-메틸-1-옥소부탄-2-일)(메틸)카바메이트

[0797] 

[0798] **단계 1:** 4-((2S,5S)-38-아지도-5-이소프로필-4,7,11-트리옥소-2-(3-우레이도프로필)-9,15,18,21,24,27,30,33,36-노나옥사-3,6,12-트리아자도테트라콘틸)벤질-((S)-1-(((S)-1-(((3R,4S,5S)-1-((S)-2-((1R,2R)-3-(((1S,2R)-1-히드록시-1-페닐프로판-2-일)아미노)-1-메톡시-2-메틸-3-옥시프로필)피롤리딘-1-일)-3-메톡시-5-메틸-1-옥시헵탄-4-일)(메틸)아미노)-3-메틸-1-옥소부탄-2-일)(메틸)카바메이트

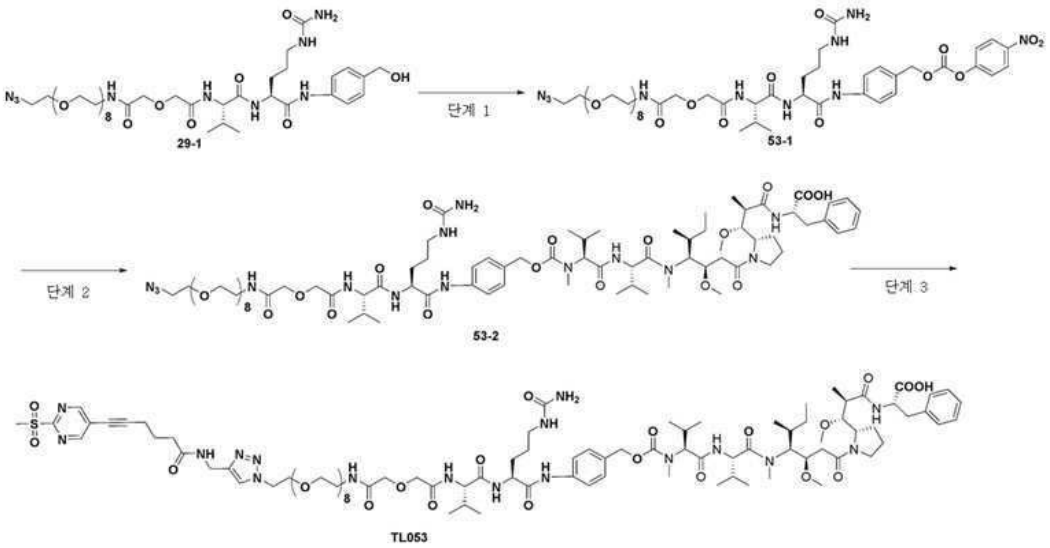
[0799] 실온에서, 화합물 53-1(100 mg, 0.09 mmol)을 N,N-디메틸포름아미드(3 mL)중에 용해시킨 다음, 1-히드록시벤조트리아졸(13 mg, 0.09 mmol), N,N-디이소프로필에틸아민(36 mg, 0.28 mmol) 및 화합물 52-1(67 mg, 0.09 mol)을 첨가하였다. 반응 용액을 실온에서 16 시간 동안 교반하고 나서, 예비 고성능 액체 크로마토그래피(방법 D)로 정제하여 표제화합물(120 mg)을 수득하였다. ESI-MS(m/z): 830.1[M/2+H]$^+$.

[0800] **단계 2:** 4-((2S,5S)-5-이소프로필-38-(4-((6-(2-(메틸설포닐)피리미딘-5-일)-5-헥신아미도)메틸)-1H-1,2,3-트리아졸-1-일)-4,7,11-트리옥소-2-(3-우레이도프로필)-9,15,18,21,24,27,30,33,36-노나옥사-3,6,12-트리아자도테트라콘틸)벤질-((S)-1-(((S)-1-(((3R,4S,5S)-1-((S)-2-((1R,2R)-3-(((1S,2R)-1-히드록시-1-페닐프로판-2-일)아미노)-1-메톡시-2-메틸-3-옥시프로필)피롤리딘-1-일)-3-메톡시-5-메틸-1-옥시헵탄-4-일)(메틸)아미노)-3-메틸-1-옥소부탄-2-일)(메틸)카바메이트의 합성

[0801] 실온에서, 화합물 52-2(22 mg, 0.07 mmol)를 디메틸 설폭시드 및 물(3 mL/0.3 mL)의 혼합 용액 중에 용해시키고, 브롬화 구리(I)(18 mg, 0.13 mmol)를 첨가하고 1 시간 동안 교반하였다. 반응 용액을 여과하였다. 여과물을 예비 고성능 액체 크로마토그래피(방법 D)로 정제하여 표제화합물(92 mg)을 수득하였다. ESI-MS(m/z): 982.8[M/2+H]$^+$.

[0802] **실시예 23:** (S)-2-((2R,3R)-3-((2S)-1-((3R,4S,5S)-4-((S)-N,3-디메틸-2-((S)-3-메틸2-(메틸(((4-((S)-2-((S)-3-메틸-2-(32-(4-((6-(2-(메틸설포닐)피리미딘-5-일)헥스-5-카바모일)메틸)-1H-1,2,3-트리아졸-1-일)-5-옥소-3,9,12,15,18,21,24,27,30-노녹시-6-아자트리아콘트아미노)부티릴아미노)-5-우레이도발레릴아미노)벤

질)옥시)카르보닐)아미노)부티릴아미노)-3-메톡시-5-메틸헵틸)피롤리딘-2-일)-3-메톡시-2-메틸프로피오닐)-L-페닐알라닌의 합성



[0803]

[0804] **단계 1:** 4-((2S,5S)-38-아지도-5-이소프로필-4,7,11-트리옥소-2-(3-우레이도프로필)-9,15,18,21,24,27,30,33,36-노녹시-3,6,12-트리아자옥타트리아콘트아미노)벤질-(4-니트로페닐)-카보네이트의 합성

[0805] 25 ℃에서, 화합물 29-1(500 mg, 0.55 mmol)을 N,N-디메틸포름아미드(10 mL)중에 용해시키고, N,N-디이소프로필에틸아민(141 mg, 1.09 mmol)을 첨가한 다음, 이어 디클로로메탄(1 mL) 중의 디(p-니트로벤졸)카보네이트(332 mg, 1.09 mmol) 용액을 적가하였다. 첨가 후, 교반 하에 혼합물을 25 ℃에서 3 시간 동안 반응시켰다. 반응 용액을 역 컬럼(C18) 크로마토그래피(아세토니트릴/물=1:2) 로 정제하여 표제화합물(400 mg)을 수득하였다. ESI-MS(m/z):1081.9[M+H]$^+$.

[0806] **단계 2:** (S)-2-((2R,3R)-3-((2S)-1-((3R,4S,5S)-4-((S)-2-((S)-2-((((4-((S)-2-((S)-2-(32-아지도-5-옥소-3,9,12,15,18,21,24,27,30-노녹시-6-아자트리아콘트아미도)-3-메틸부티릴아미노)-5-우레이도펜타노일아미노)벤질)옥시)카르보닐)(메틸)아미노)-3-메틸부티릴아미노)-N,3-디메틸부티릴아미노)-3-메톡시-5-메틸헵틸)피롤리딘-2-일)-3-메톡시-2-메틸프로피오닐)-L-페닐알라닌의 합성

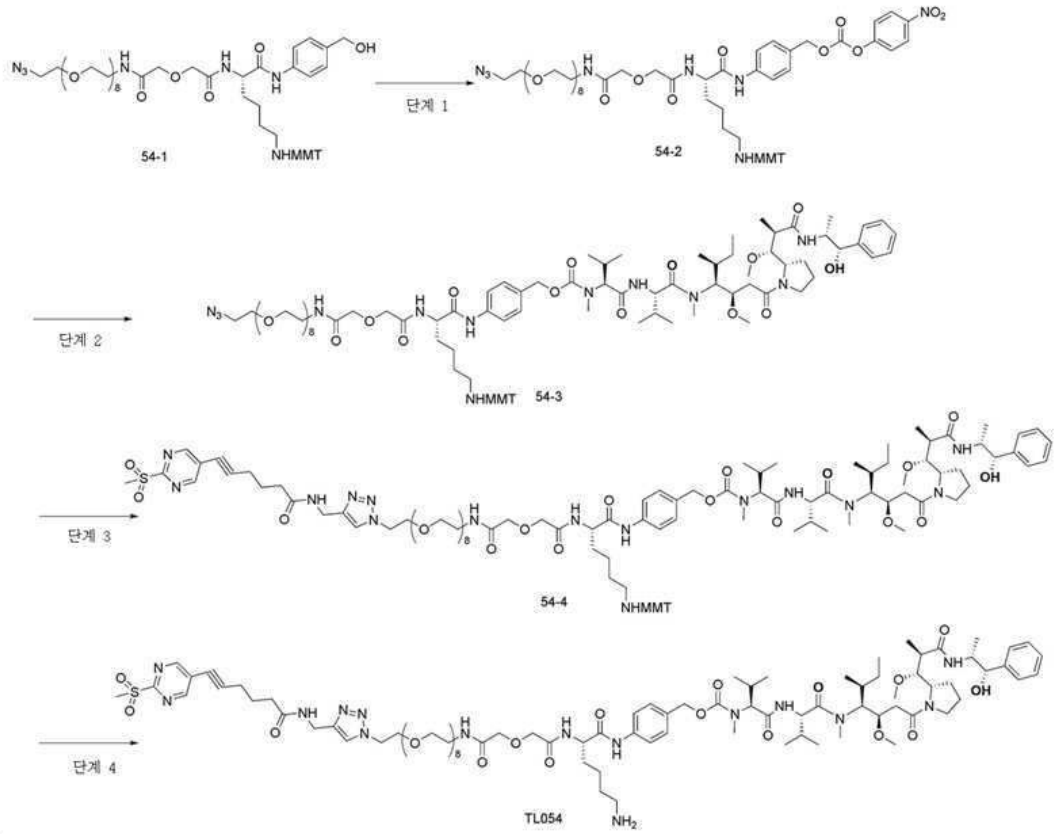
[0807] 25 ℃에서, 화합물 53-1(60 mg, 0.06 mmol) 및((2R)-3-((2S)-1-((3R, 5S)-4-((S)-N,3-디메틸-2-((S)-3-메틸-2-(메틸아미노)부티릴아미노)부티릴아미노)-3-메톡시-5-메틸헵틸)피롤리딘-2-일)-3-메톡시-2-메티프로피오닐)-L-페닐알라닌(41 mg, 0.06 mmol)을 N,N-디메틸포름아미드(2 mL)중에 용해시켰다. 완전히 용해시킨 다음, 1-히드록시벤조트리아졸(8 mg, 0.06 mmol)을 첨가하였다. 첨가 후에, 반응물을 25 ℃에서 16 시간 동안 교반하였다. 반응 용액을 예비 고성능 액체 크로마토그래피(방법 D)로 정제하여 표제화합물(38 mg)을 수득하였다. ESI-MS(m/z): 837.2[M/2+H]$^+$.

[0808] **단계 3:** (S)-2-((2R,3R)-3-((2S)-1-((3R,4S,5S)-4-((S)-N,3-디메틸-2-((S)-3-메틸2-(메틸(((4-((S)-2-((S)-3-메틸-2-(32-(4-((6-(2-(메틸설포닐)피리미딘-5-일)헥스-5-카바모일)메틸)-1H-1,2,3-트리아졸-1-일)-5-옥소-3,9,12,15,18,21,24,27,30-노녹시-6-아자트리아콘트아미노)부티릴아미노)-5-우레이도발레릴아미노)벤질)옥시)카르보닐)아미노)부티릴아미노)-3-메톡시-5-메틸헵틸)피롤리딘-2-일)-3-메톡시-2-메틸프로피오닐)-L-페닐알라닌의 합성

[0809] 25 ℃에서, 2-(2-(메틸설포닐)피리미딘-5-일)-N-(프로프-2-인-1-일)-올-4-포름아미드(9 mg, 0.03 mmol) 및 화합물 53-2(50 mg, 0.03 mmol)를 디메틸 설폭시드 및 물(1 mL/0.25 mL)의 혼합 용매 중에 용해시켰다. 완전히 용해시킨 다음, 브롬화 구리(I)(11 mg, 0.08 mmol)를 첨가하였다. 첨가 후에, 1 시간 동안 N_2 보호 하에 혼합물을 교반하였다. 그런 다음 여과를 수행하였고, 여과물을 예비 고성능 액체 크로마토그래피(방법 D)로 정제하여 표제화합물(25 mg)을 수득하였다. ESI-MS(m/z): 989.9[M/2+H]$^+$.

[0810] **실시예 24:** 4-((S)-2-(4-아미노부틸)-35-(4-((6-(2-(메틸설포닐)피리미딘-5-일)-5-헥신아미도)메틸)-1H-1,2,3-

트리아졸-1-일)-4,8-디옥소-6,12,15,18,21,24,27,30,33-노나옥사-3,9-디아자펜타트리아콘트아미노)벤질-((S)-1-(((S)-1-(((3R,4S,5S)-1-((S)-2-((1R,2R)-3-(((1S,2R)-1-히드록시-1-페닐프로판-2-일)아미노)-1-메톡시-2-메틸-3-옥시프로필)피롤리딘-1-일)-3-메톡시-5-메틸-1-옥시헵탄-4-일)(메틸)아미노)-3-메틸-1-옥소부탄-2-일)아미노)-3-메틸-1-옥소부탄-2-일)(메틸)카바메이트



[0811]

[0812] **단계 1:** (S)-4-(35-아지도-2-(4-(((4-메톡시페닐)벤즈히드릴)아미노)부티릴)-4,8-디옥소-6,12,15,18,21,24,27,30,33-노나옥사-3,9-디아자펜타트리아콘트아미노)벤질-(4-니트로페닐)-카보네이트의 합성

[0813] 실온에서, 화합물 54-1 1g, 0.95 mmol)을 디클로로메탄(20 mL)중에 용해시키고 나서, N,N-디이소프로필에틸아민(488 mg, 3.77 mmol)을 첨가하였고, 이어 디클로로메탄(10 mL) 중의 다-(p-니트로페닐)-카보네이트(860 mg, 2.83 mmol)을 적가하였다. 결과 반응 용액을 실온에서 6 시간 동안 교반하였고 실리카겔 컬럼 크로마토그래피(디클로로메탄/메탄올=40/1)로 정제하여 표제화합물(900 mg)을 수득하였다. ESI-MS(m/z): 953.0[M+H-273]$^+$.

[0814] **단계 2:** 4-((S)-35-아지드-2-(4-(((4-메톡시페닐) 벤즈히드릴)아미노)부티릴)-4,8-디옥소-6,12,15,18,21,24,27,30,33-노나옥사-3,9-디아자펜타트리아콘트아미노)벤질((S)-1-(((S)-1-(((3R,4S,5S)-1-((S)-2-((1R,2R)-3-(((1S,2R)-1-히드록시-1-페닐프로판-2-일)아미노)-1-메톡시-2-메틸-3-옥시프로필)피롤리딘-1-일)-3-메톡시-5-메틸-1-옥시헵탄-4-일)(메틸)아미노)-3-메틸-1-옥소부탄-2-일)아미노)-3-메틸-1-옥소부탄-2-일)(메틸)카바메이트의 합성

[0815] 실온에서, 화합물 54-2(2 mL)로 1-히드록시벤조트리아졸(33 mg, 0.25 mmol), N,N-디이소프로필에틸아민(48 mg, 0.37 mmol)을 첨가하였고, 그런 다음 화합물 52-1(88 mg, 0.12 mmol)을 첨가하였다. 수득된 반응 용액을 실온에서 16시간 동안 교반한 다음 예비 고성능 액체 크로마토그래피(방법 B)로 정제하여 표제화합물(150 mg)을 수득하였다. ESI-MS(m/z): 1803.6[M+H]$^+$.

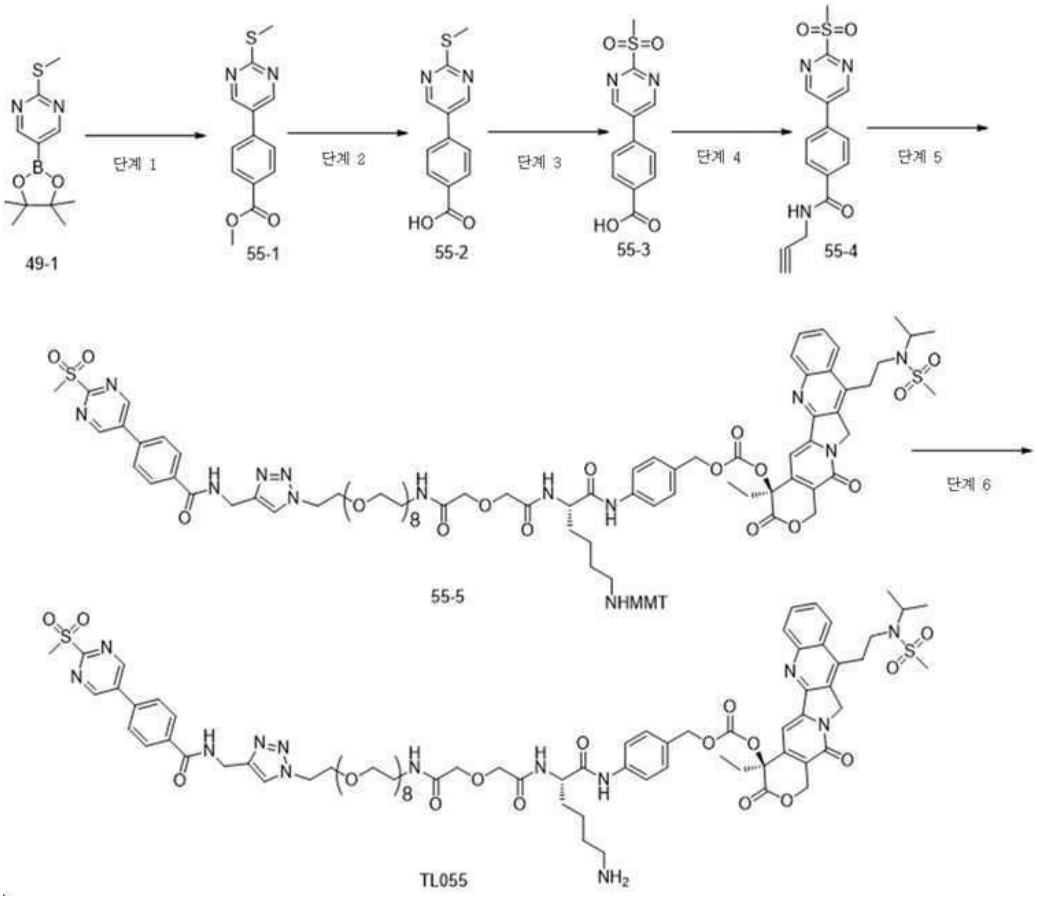
[0816] **단계 3:** 4-((S)-2-(4-(((4-메톡시페닐)벤즈히드릴)아미노)부티릴)-35-(4-((6-(2-(메틸설포닐)피리미딘-5-일)-5-헥신아미도)메틸)-1H-1,2,3-트리아졸-1-일)-4,8-디옥소-6,12,15,18,21,24,27,30,33-노나옥사-3,9-디아자펜타트리아콘트아미노)벤질((S)-1-(((S)-1-(((3R,4S,5S)-1-((S)-2-((1R,2R)-3-(((1S,2R)-1-히드록시-1-페닐프로판-2-일)아미노)-1-메톡시-2-메틸-3-옥시프로필)피롤리딘-1-일)-3-메톡시-5-메틸-1-옥시헵탄-4-일)(메틸)아미노)-3-메틸-1-옥소부탄-2-일)아미노)-3-메틸-1-옥소부탄-2-일)(메틸)카바메이트의 합성

[0817] 실온에서, 화합물 54-3(100 mg, 0.06 mmol) 및 6-(2-(메틸설포닐)피리미딘-5-일)-N-(프로프-2-인-1-일)-5-헥신아미드(26 mg, 0.08 mmol)를 디메틸 설폭시드(2 mL) 및 물(0.5 mL)중에 용해시키고, 브롬화 구리(I)(16 mg, 0.11 mmol)를 첨가하고 2 시간 동안 교반하였다. 그런 다음 여과를 수행하였고, 여과물을 예비 고성능 액체 크로마토그래피(방법 B)로 정제하여 표제화합물(70 mg)을 수득하였다. ESI-MS(m/z): 1936.6[M+H-273]$^+$.

[0818] **단계 4:** 4-((S)-2-(4-아미노부틸)-35-(4-((6-(2-(메틸설포닐)피리미딘-5-일)-5-헥신아미도)메틸)-1H-1,2,3-트리아졸-1-일)-4,8-디옥소-6,12,15,18,21,24,27,30,33-노나옥사-3,9-디아자펜타트리아콘트아미노)벤질-((S)-1-(((S)-1-(((3R,4S,5S)-1-((S)-2-((1R,2R)-3-(((1S,2R)-1-히드록시-1-페닐프로판-2-일)아미노)-1-메톡시-2-메틸-3-옥시프로필)피롤리딘-1-일)-3-메톡시-5-메틸-1-옥시헵탄-4-일)(메틸)아미노)-3-메틸-1-옥소부탄-2-일)아미노)-3-메틸-1-옥소부탄-2-일)(메틸)카바메이트의 합성

[0819] 실온에서, 화합물 54-4(70 mg, 0.04 mmol)를 디클로로메탄(2 mL)중에 용해시키고, 트리플루오로아세트산(0.2 mL)을 적가하였다. 실온에서 20분 동안 수득된 반응 용액을 교반하고 나서, 농축시키고, 잔여물을 예비 고성능 액체 크로마토그래피(방법 C)로 정제하여 트리플루오로아세테이트인 표제화합물(55 mg)을 수득하였다. ESI-MS(m/z): 918.8[M/2+H]$^+$.

[0820] **실시예 25:** 4-((S)-2-(4-아미노부틸)-35-(4-((4-(2-(메틸설포닐)피리미딘-5-일)벤즈아미도)메틸)-1H-1,2,3-트리아졸-1-일)-4,8-디옥소-6,12,15,18,21,24,27,30,33-노녹시-3,9-디아자펜타트리아콘트아미도)벤질((S)-4-에틸-11-(2-(N-이소프로필메틸설폰아미도)에틸)-3,14-디옥소-3,4,12,14-테트라히드로-1H-피라노[3',4':6,7]인돌리지노[1,2-b]퀴놀린-4-일)카보네이트의 합성



[0821]

[0822] **단계 1:** 메틸 4-(2-(메틸티오)피리미딘-5-일)벤조에이트의 합성

[0823] 25 ℃에서, 화합물 49-1(252 mg, 1.0 mmol), 물(3 mL), Pd(dppf)Cl_2(40 mg, 0.05 mmol) 및 포타슘 카보네이트(277 mg, 2.0 mmol)를 1,4-디옥산(5 mL) 중의 메틸 p-브로모벤조에이트(215 mg, 1.0 mmol) 용액에 연속적으로 첨가하고 80 ℃에서 4 시간 동안 교반하였다. 반응 용액을 에틸 아세테이트(30 mL×3)로 추출하였다. 유기상을 합쳤으며 건조시킨 다음, 불용성 물질을 여과에 의해 제거하고, 잔여물을 실리카 겔 컬럼 크로마토그래피로 정

제하여 표제화합물(220 mg)을 수득하였다. ESI-MS(m/z):261.0[M+H]$^+$.

[0824] **단계 2:** 4-(2-(메틸티오)피리미딘-5-일)벤조산의 합성

[0825] 25 ℃에서, 리튬 히드록시드 1수화물(322 mg, 7.68 mmol) 및 물(3 mL)을 테트라히드로푸란(3 mL) 중의 화합물 55-1(500 mg, 1.92 mmol) 용액에 각각 첨가하였고 4 시간 동안 교반하였다. 반응 용액을 1N 염산으로 pH=3-4로 조정하였고, 에틸 아세테이트(20 mL×3)로 추출하였다. 유기상을 합쳤으며 건조시켰다. 불용성 물질을 여과에 의해 제거하고, 잔여물을 예비 고성능 액체 크로마토그래피(방법 D)로 정제하여 표제화합물(430 mg)을 수득하였다. ESI-MS(m/z):246.9[M+H]$^+$.

[0826] **단계 3:** 4-(2-(메틸설포닐)피리미딘-5-일)벤조산의 합성

[0827] 25 ℃에서, m-클로로퍼옥시벤조산(420 mg, 2.44 mmol)을 디클로로메탄(5 mL) 중의 화합물 55-2(200 mg, 0.81 mmol) 용액에 첨가하였고, 5 시간 동안 교반한 다음, 실리카겔 컬럼 크로마토그래피로 정제하여 표제화합물(180 mg)을 수득하였다. ESI-MS(m/z):279.0[M+H]$^+$.

[0828] **단계 4:** 4-(2-(메틸설포닐)피리미딘-5-일)-N-(프로프-2-인-1-일)벤즈아미드의 합성

[0829] 25 ℃에서, 벤조트리아졸-N,N,N',N'-테트라메틸우로늄 헥사플루오로포스페이트(100 mg, 0.26 mmol)을 디클로로메탄(10 mL) 중의 화합물 55-3(50 mg, 0.18 mmol) 용액에 첨가하였고, 30 분 동안 교반한 다음, 프로피닐아민(10 mg, 0.2 mmol) 및 N,N-디이소프로필에틸아민(70 mg, 0.5 mmol)을 반응 용액에 첨가하였으며 교반 하에 2.5 시간 동안 반응시켰다. 반응 용액을 실리카 겔 컬럼 크로마토그래피로 정제하여 표제화합물(20 mg)을 수득하였다. ESI-MS(m/z):316.0[M+H]$^+$.

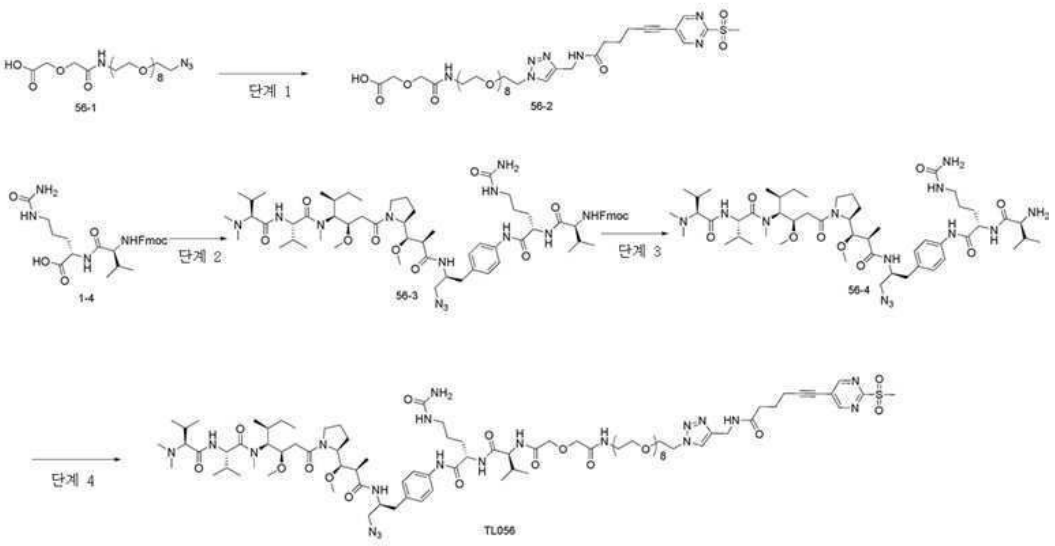
[0830] **단계 5:** (S)-4-에틸-11-(2-(N-이소프로필메탄설폰아미도)에틸)-3,14-디옥소-3,4,12,14-테트라히드로-1H-피라노[3',4':6,7]인돌리지노[1,2-b]퀴놀린-4-일(4-((S)-2-(4-(((4-메톡시페닐)디페닐메틸)아미노)부틸)-35-(4-((4-(2-(메틸설포닐)피리미딘-5-일)벤즈아미도)메틸)-1H-1,2,3-트리아졸-1-일)-4,8-디옥소-6,12,15,18,21,24,27,30,33-노녹시-3,9-디아자펜타트리아콘트아미도)벤질)카보네이트의 합성

[0831] 25 ℃에서 및 N_2 보호 하에서, 요오드화구리(I)(10 mg, 0.05 mmol) 및 물(2 mL)을 화합물 55-4(16 mg, 0.05 mmol) 및 화합물 33-1(80 mg, 0.05 mmol)의 디메틸 설폭시드 용액(2 mL)에 연속적으로 첨가하였고 교반 하에 1 시간 동안 반응시켰다. 정제(방법 B)를 수행하여 표제화합물(79 mg)을 수득하였다. ESI-MS(m/z): 1641.5[M-273+H]$^+$.

[0832] **단계 6:** 4-((S)-2-(4-아미노부틸)-35-(4-((4-(2-(메틸설포닐)피리미딘-5-일)벤즈아미도)메틸)-1H-1,2,3-트리아졸-1-일)-4,8-디옥소-6,12,15,18,21,24,27,30,33-노녹시-3,9-디아자펜타트리아콘트아미도)벤질((S)-4-에틸-11-(2-(N-이소프로필메틸설폰아미도)에틸)-3,14-디옥소-3,4,12,14-테트라히드로-1H-피라노[3',4':6,7]인돌리지노[1,2-b]퀴놀린-4-일)카보네이트의 합성

[0833] 25 ℃에서, 화합물 55-5(55 mg, 0.029 mmol)를 트리플루오로아세트산(0.5 mL)을 물/아세토니트릴(0.1 mL/0.5 mL) 혼합 용매에 첨가하였고, 교반 하에 15 분 동안 반응시켰다. 반응 용액을 예비 고성능 액체 크로마토그래피(방법 C)로 정제하여 트리플루오로아세테이트인 표제화합물(42 mg)을 수득하였다. ESI-MS(m/z):821.0[M/2+H]$^+$.

[0834] **실시예 26:** N-((1-((6S,9S)-1-아미노-6-((4-((S)-3-아지도-2-((2R,3R)-3-((S)-1-((3R,4S,5S)-4-((S)-2-((S)-2-(디메틸아미노)-3-메틸부티릴아미노)-N,3-디메틸부티릴아미노)-3-메톡시-5-메틸헵틸)피롤리딘-2-일)-3-메톡시-2-메틸프로피온아미도)프로필)페닐)카바모일)-9-이소프로필-1,8,11,15-테트라옥소-13,19,22,25,28,31,34,37,40-노녹시-2,7,10,16-테트라아자도테트라콘트-42-일)-1H-1,2,3-트리아졸-4-일)메틸)-6-(2-(메틸설포닐)피리미딘-5-일)헥스-5-이닐아미드



[0835]

[0836] **단계 1:** 32-(4-((6-(2-(메틸설포닐)피리미딘-5-일)헥스-5-인아미도)메틸)-1H-1,2,3-트리아졸-1-일)-5-옥소-3,9,12,15,18,21,24,27,30-노녹시-6-아자도트리아콘탄산의 합성

[0837] 20 ℃에서, 화합물 56-1(750 mg, 1.28 mmol) 및 6-(2-(메틸설포닐)피리미딘-5-일)-N-(프로프-2-인-1-일)헥스-5-이닐아미드(496 mg, 1.54 mmol)을 디메틸 설폭시드(10 mL)중에 용해시키고, 브롬화 구리(I)(465 mg, 3.21 mmol)를 하나의 배치에 첨가하였다. 첨가 후에, 혼합물을 교반 하에 12 시간 동안 반응시켰다. 반응 용액을 여과하였고, 여과물을 예비 고성능 액체 크로마토그래피(방법 D)로 정제하여 표제화합물(500 mg)을 수득하였다. ESI-MS(m/z): 860.4[M+H]$^+$.

[0838] **단계 2:** (9H-플루오렌-9-일)메틸((S)-1-(((S)-1-((4-((S)-3-아지도-2-((2R,3R)-3-((S)-1-((3R,4S,5S)-4-((S)-2-((S)-2-(디메틸아미노)-3-메틸부티릴아미노)-N,3-디메틸부티릴아미노)-3-메톡시-5-메틸헵틸)피롤리딘-2-일)-3-메톡시-2-메틸프로피온아미도)프로필)페닐)아미노)-1-옥소-5-우레이도펜타노일아미노-2-일)아미노)-3-메틸-1-옥소부탄-2-일)카바메이트의 합성

[0839] 25 ℃에서, (S)-N-((3R,4S,5S)-1-((S)-2-((1R,2R)-3-(((S)-1-(4-아미노페닐)-3-아지도프로필-2-일)아미노)-1-메톡시-2-메틸-3-옥소프로필)피롤리딘-1-일)-3-메톡시-5-메틸-1-옥소헵틸-4-일)-2-((S)-2-(디메틸아미노)-3-메틸부티릴아미노)-N,3-디메틸부티릴아민(185 mg, 0.24 mmol)을 N,N-디메틸포름아미드(5 mL)중에 용해시키고 나서, HATU(137 mg, 0.36 mmol)를 첨가하고 5 분 동안 교반하였고, 이어서 (S)-2-((S)-2-((((9H-플루오렌-9-일)메톡시)카르보닐)아미노)-3-메틸부티릴아미노)-5-우레이도펜탄산(131 mg, 0.26 mmol)을 첨가하였다. 실온에서 30 분 동안 혼합물을 교반하였고 반응 용액을 다음 반응에 직접 사용하였다. ESI-MS(m/z): 626.0[M/2+H]$^+$.

[0840] **단계 3:** (S)-2-((S)-2-아미노-3-메틸부티릴아미노)-N-(4-((S)-3-아지도-2-((2R,3R)-3-((S)-1-((3R,4S,5S)-4-((S)-2-((S)-2-(디메틸아미노)-3-메틸부티릴아미노)-N,3-디메틸부티릴아미노)-3-메톡시-5-메틸헵틸)피롤리딘-2-일)-3-메톡시-2-메틸프로피온아미도)프로필)페닐)-5-우레이도발레르아미드의 합성

[0841] 25 ℃에서, 디에틸아민(0.5 mL)을 단계 2에서 수득된 반응 용액에 첨가하였고, 첨가 후 30분 동안 반응을 위해 교반하였다. 반응 용액을 예비 고성능 액체 크로마토그래피(방법 D)로 정제하여 표제화합물(70 mg)을 수득하였다. ESI-MS(m/z): 515.0[M/2+H]$^+$.

[0842] **단계 4:** N-((1-((6S,9S)-1-아미노-6-((4-((S)-3-아지도-2-((2R,3R)-3-((S)-1-((3R,4S,5S)-4-((S)-2-((S)-2-(디메틸아미노)-3-메틸부티릴아미노)-N,3-디메틸부티릴아미노)-3-메톡시-5-메틸헵틸)피롤리딘-2-일)-3-메톡시-2-메틸프로피온아미도)프로필)페닐)카바모일)-9-이소프로필-1,8,11,15-테트라옥소-13,19,22,25,28,31,34,37,40-노녹시-2,7,10,16-테트라아자도테트라콘트-42-일)-1H-1,2,3-트리아졸-4-일)메틸)-6-(2-(메틸설포닐)피리미딘-5-일)헥스-5-이닐아미드의 합성

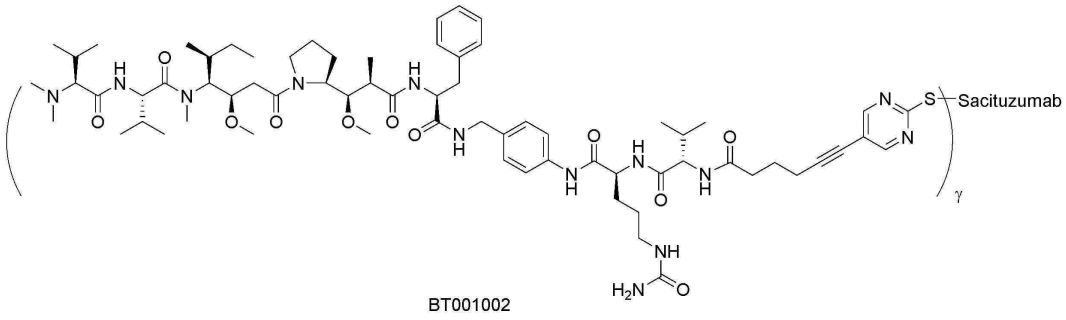
[0843] 25 ℃에서, (S)-2-((S)-2-아미노-3-메틸부티릴아미노)-N-(4-((S)-3-아지도-2-((2R,3R)-3-((S)-1-((3R,4S,5S)-4-((S)-2-((S)-2-(디메틸아미노)-3-메틸부티릴아미노)-N,3-디메틸부티릴아미노)-3-메톡시-5-메틸헵틸)피롤리딘-

2-일)-3-메톡시-2-메틸프로피온아미도)프로필)페닐)-5-우레이도발레르아미드(95 mg, 0.092 mmol) 및 32-(4-((6-(2-(메틸설포닐)피리미딘-5-일)헥스-5-인아미도)메틸)-1H-1,2,3-트리아졸-1-일)-5-옥소-3,9,12,15,18,21,24,27,30-노녹시-6-아자도트리아콘탄산(79 mg, 0.092 mmol)을 N,N-디메틸포름아미드(4 mL)중에 용해시키고, HATU(70 mg, 0.184 mmol)를 하나의 배치에 첨가하였다. 실온에서 1 시간 동안 혼합물 교반하였다. 반응 용액을 예비 고성능 액체 크로마토그래피(방법 D)로 정제하여 표제화합물(30 mg)을 수득하였다. ESI-MS(*m/z*): 935.8[M/2+H]$^+$.

[0844] **III. 생체활성 분자 함유 화합물과 항체를 갖는 링커의 커플링**

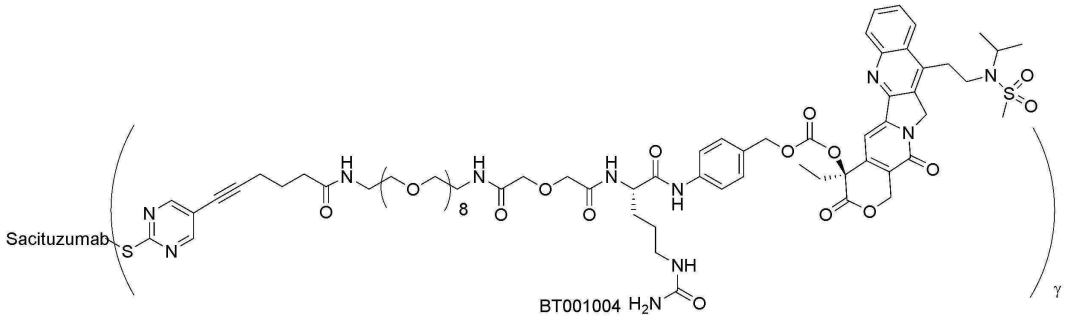
[0845] **실시예 27:** BT001002의 제조

[0846] 0.3 mL의 항체 삭시투주맙(항-Trop-2, 33.5mg/mL)을 20mM PB, 150mM NaCl 및 20mM 소듐 에데테이트(sodium edetate)를 함유하는 0.25 mL의 용액(pH 7.6)으로 희석하였고, 여기에 20mM PB 및 150mM NaCl을 함유하는 0.45 mL의 용액(pH 7.6)을 첨가하고 균일하게 혼합하였다. 혼합물을 1M K_2HPO_4 용액으로 pH=7.4로 조정하였고, 그런 다음 10 mM TCEP(tris(2-카르복시에틸)포스핀) 용액을 첨가하고 균일하게 혼합하였으며, 이를 실온에서 30 분 동안 정치시켰다. 용액 계로, 디메틸 설폭시드 중에 용해된 TL003를 15 당량으로 첨가하였으며 균일하게 혼합하였고, 이를 실온에서 2 시간 동안 정치시켰다. 첨가 후에, 6.1μl의 100mM 시스테인을 첨가하여 반응을 종결하였다. 마지막으로, 완충액을 G-25 겔 컬럼에 의해 pH 6.44의 20 mM PB 완충액으로 대체하여 삭시투주맙을 갖는 TL003인 커플링 생성물을 수득하였으며, 이를 BT001002로 명명하였다.

[0847] 

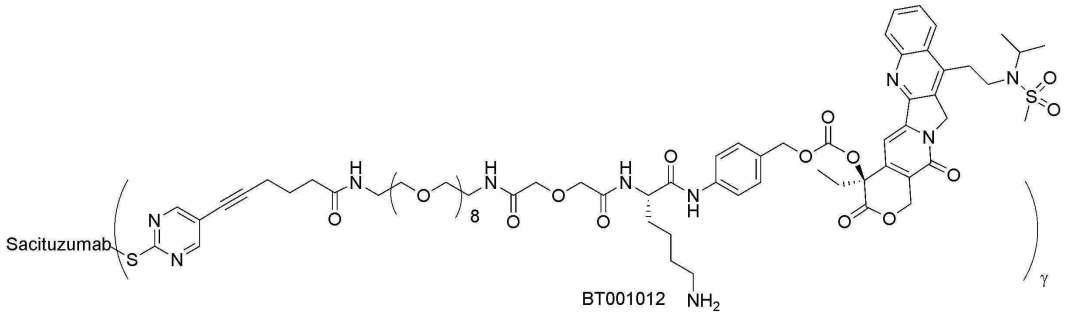
[0848] **실시예 28:** BT001004의 제조

[0849] 0.285 mL의 삭시투주맙(항-Trop-2, 17.6mg/mL)을 0.095 mL의 희석액(20mM PB, 150mM NaCl 및 20mM 소듐 에데테이트를 함유하는, pH 7.6)으로 희석하였다. 그런 다음, 상기 희석된 용액을 1M Na_2HPO_4 용액으로 pH=7.4로 조정하였고, 10 mM TCEP 용액을 첨가하고 균일하게 혼합하였으며, 이를 실온에서 30 분 동안 정치시켰다. 상기 용액 계로, 디메틸 설폭시드 중에 용해된 TL019를 9 당량으로 첨가하였으며 균일하게 혼합하였고, 이를 실온에서 2 시간 동안 정치시켰다. 마지막으로, 완충액을 G-25 겔 컬럼에 의해 pH 6.5의 20 mM PBS 완충액으로 대체하여 삭시투주맙을 갖는 TL019인 커플링 생성물을 수득하였으며, 이를 BT001004로 명명하였다.

[0850] 

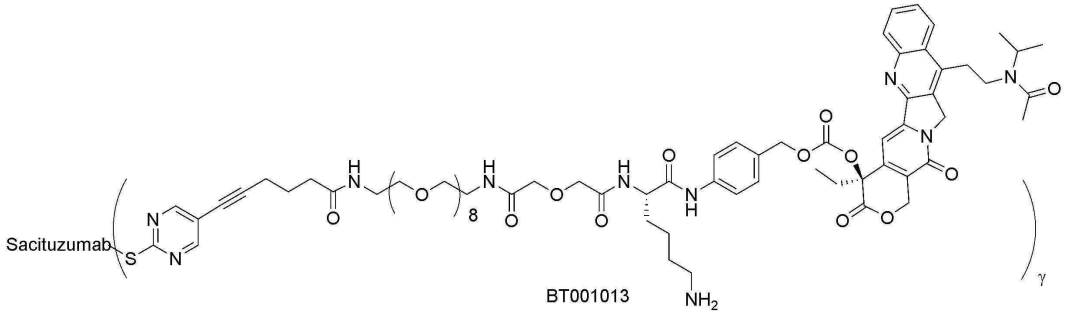
[0851] **실시예 29:** BT001012의 제조

[0852] TL003이 트리플루오로아세테이트인 TL024로 대체되는 것을 제외하고, 실시예 27에 기재된 것과 유사한 방법을 채택하여 BT001012로 명명된, 삭시투주맙을 갖는 TL024인 커플링 생성물을 수득하였다.

[0853] 

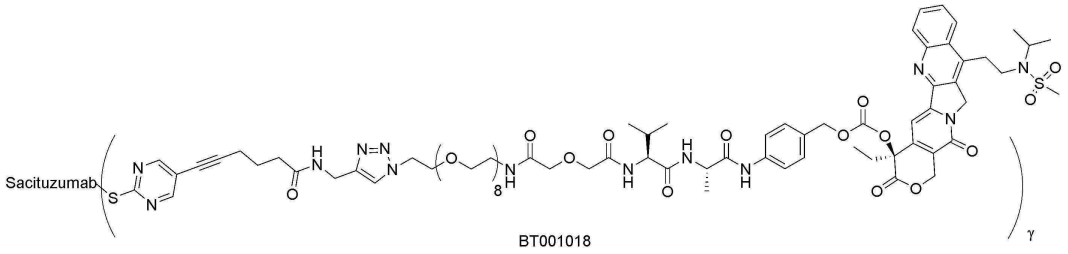
[0854] **실시예 30:** BT001013의 제조

[0855] TL003이 트리플루오로아세테이트인 TL048로 대체되는 것을 제외하고, 실시예 27에 기재된 것과 유사한 방법을 채택하여 BT001013로 명명되는, 삭시투주맙을 갖는 TL048인 커플링 생성물을 수득하였다.

[0856] 

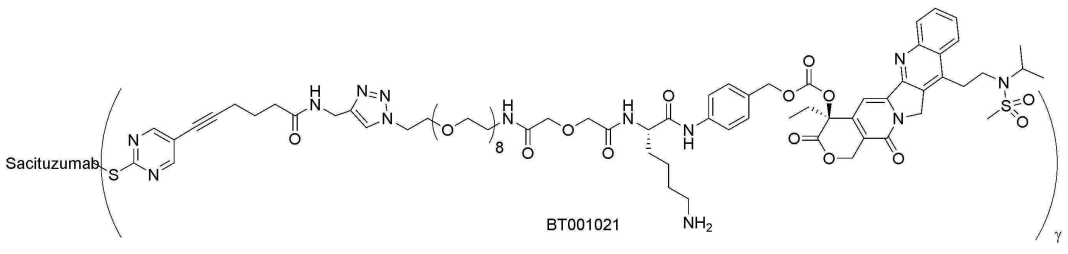
[0857] **실시예 31:** BT001018의 제조

[0858] TL003이 TL030으로 대체되는 것을 제외하고, 실시예 27에 기재된 것과 유사한 방법을 채택하여 BT001018로 명명되는, 삭시투주맙을 갖는 TL030인 커플링 생성물을 수득하였다.

[0859] 

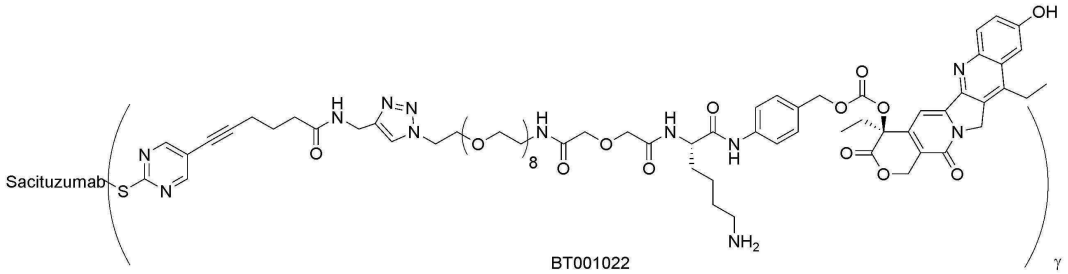
[0860] **실시예 32:** BT001021의 제조

[0861] 0.3 mL의 항체 삭시투주맙(항-Trop-2, 33.5mg/mL)을 20mM PB, 150mM NaCl 및 20mM 소듐 에데테이트를 함유하는 0.25 mL의 용액(pH 7.6)으로 희석한 다음, 20mM PB 및 150mM NaCl을 함유하는 0.45 mL의 용액(pH 7.6)을 첨가하고 균일하게 혼합하였다. 혼합물을 1M Na_2HPO_4 용액으로 pH=7.4로 조정하였고, 그런 다음 10 mM TCEP 용액을 첨가하고 균일하게 혼합하였으며, 이를 실온에서 30 분 동안 정치시켰다. 상기 용액 계로, 디메틸 설폭시드 중에 용해된 트리플루오로아세테이트인 TL033를 10 당량으로 첨가하였으며 균일하게 혼합하였고, 이를 실온에서 2 시간 동안 정치시켰다. 그런 다음, 6.1 μl의 100mM 시스테인을 첨가하여 반응을 종결하였다. 마지막으로, 완충액을 G-25 겔 컬럼에 의해 pH 6.5의 20 mM PBS 완충액으로 대체하여 삭시투주맙을 갖는 TL033인 커플링 생성물을 수득하였으며, 이를 BT001021로 명명하였다.

[0862] 

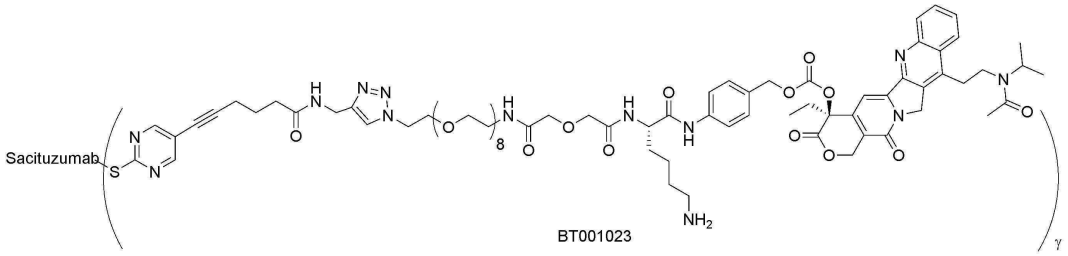
[0863] **실시예 33:** BT001022의 제조

[0864] TL003이 트리플루오로아세테이트인 TL034로 대체되는 것을 제외하고, 실시예 27에 기재된 것과 유사한 방법을 채택하여 BT001022로 명명되는, 삭시투주맙을 갖는 TL034인 커플링 생성물을 수득하였다.

[0865] 

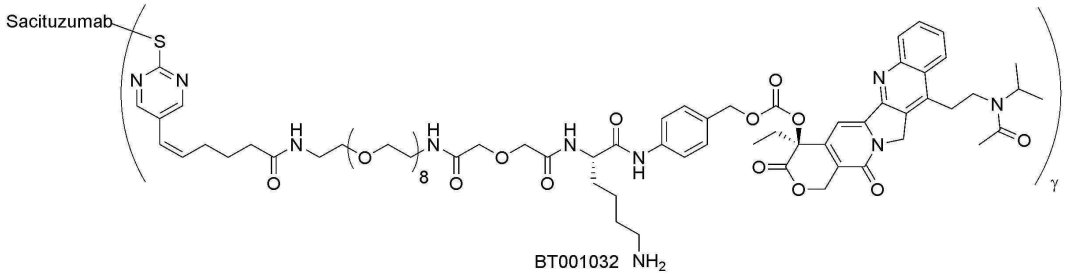
[0866] **실시예 34:** BT001023의 제조

[0867] TL003이 트리플루오로아세테이트인 TL035로 대체되는 것을 제외하고, 실시예 27에 기재된 것과 유사한 방법을 채택하여 BT001023로 명명되는, 삭시투주맙을 갖는 TL035인 커플링 생성물을 수득하였다.

[0868] 

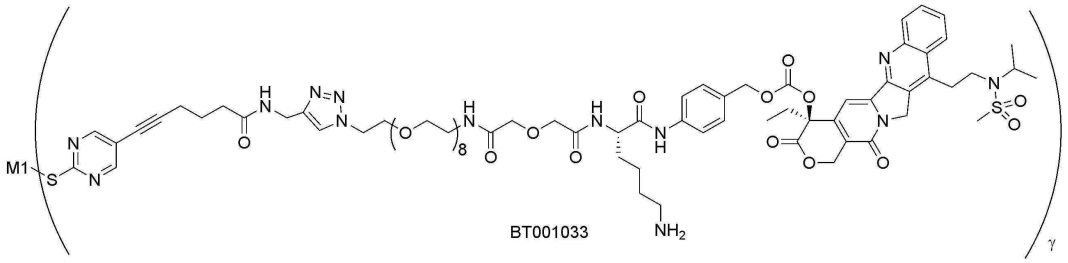
[0869] **실시예 35:** BT001032의 제조

[0870] TL003이 트리플루오로아세테이트인 TL045로 대체되는 것을 제외하고, 실시예 27에 기재된 것과 유사한 방법을 채택하여 BT001032로 명명되는, 삭시투주맙을 갖는 TL045인 커플링 생성물을 수득하였다.

[0871] 

[0872] **실시예 36:** BT001033의 제조

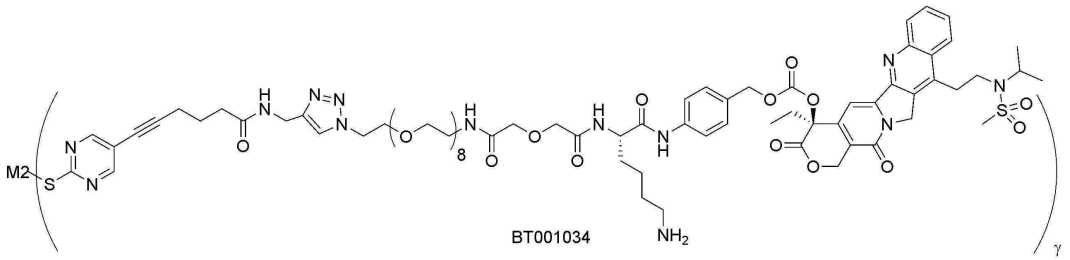
[0873] TL003이 트리플루오로아세테이트인 TL033으로 대체되고 삭시투주맙이 항체 M1으로 대체되는 것을 제외하고, 실시예 27에 기재된 것과 유사한 방법을 채택하여 BT001033으로 명명되는, 항체 M1을 갖는 TL033인 커플링 생성물을 수득하였다.

[0874] 

[0875] **실시예 37:** BT001034의 제조

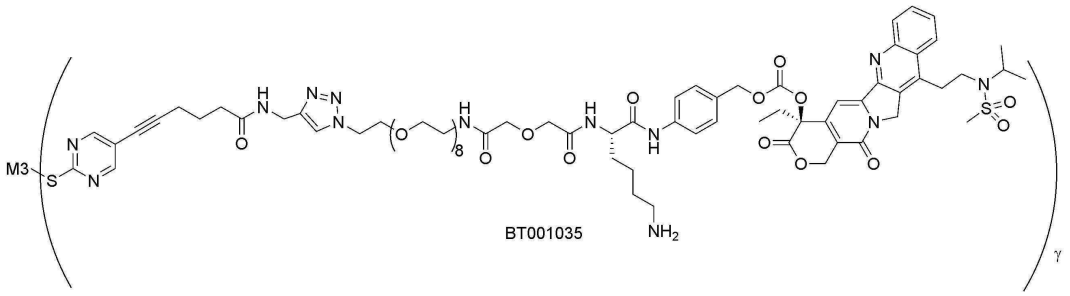
[0876] TL003이 트리플루오로아세테이트인 TL033으로 대체되고 삭시투주맙이 항체 M2로 대체되는 것을 제외하고, 실시

예 27에 기재된 것과 유사한 방법을 채택하여 BT001034로 명명되는, 항체 M2을 갖는 TL033인 커플링 생성물을 수득하였다.

[0877] 

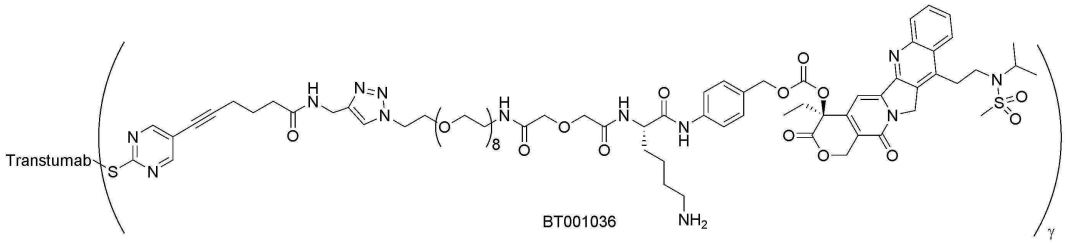
[0878] **실시예 38:** BT001035의 제조

[0879] 0.3 mL의 항체 M3(항-Trop-2, 33.5mg/mL)을 20mM PB, 150mM NaCl 및 20mM 소듐 에데테이트를 함유하는 0.25 mL의 용액((pH 7.6)으로 희석한 다음, 20mM PB, 150mM NaCl 및 20mM 소듐 에데테이트를 함유하는 0.25 mL의 용액((pH 7.6)을 첨가하고 균일하게 혼합하였다. 1M Na_2HPO_4 용액으로 pH=7.4로 조정한 다음, 10 mM TCEP(tris(2-카르복시에틸)포스핀) 용액을 첨가하고 균일하게 혼합하였으며, 이를 실온에서 30 분 동안 정치시켰다. 상기 용액계로, 디메틸 설폭시드 중에 용해된 트리플루오로아세테이트인 TL033을 10 당량으로 첨가하였으며 균일하게 혼합하였다. 결과 혼합물을 실온에서 2 시간 동안 정치시켰다. 그런 다음 6.1μl의 시스테인을 첨가하여 반응을 종결하였다. 마지막으로, 완충액을 G-25 겔 컬럼에 의해 PBS 완충액으로 대체하여 항체 M3을 갖는 TL033인 커플링 생성물을 수득하였으며, 이를 BT001035로 명명하였다.

[0880] 

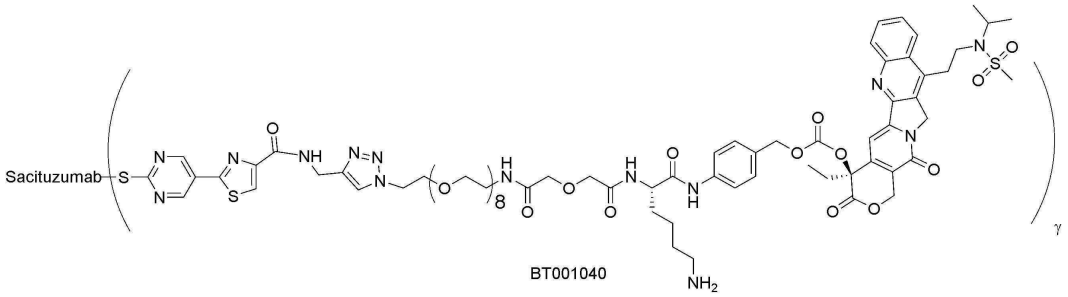
[0881] **실시예 39:** BT001036의 제조

[0882] TL003이 트리플루오로아세테이트인 TL033으로 대체되고 삭시투주맙이 트라스투주맙으로 대체되는 것을 제외하고, 실시예 27에 기재된 것과 유사한 방법을 채택하여 BT001036으로 명명된, 커플링 생성물인 트라스투주맙을 갖는 TL033를 수득하였다.

[0883] 

[0884] **실시예 40:** BT001040의 제조

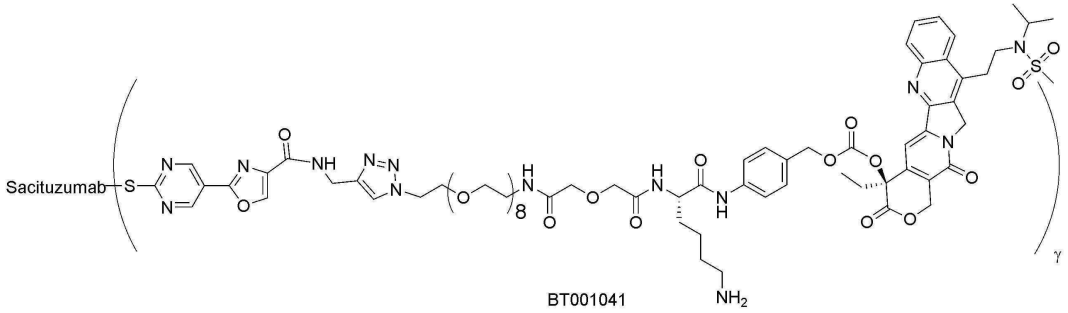
[0885] TL003이 트리플루오로아세테이트인 TL049로 대체되는 것을 제외하고, 실시예 27에 기재된 것과 유사한 방법을 채택하여 BT001040으로 명명되는, 삭시투주맙을 갖는 TL049인 커플링 생성물을 수득하였다.



[0886]

[0887] **실시예 41:** BT001041의 제조

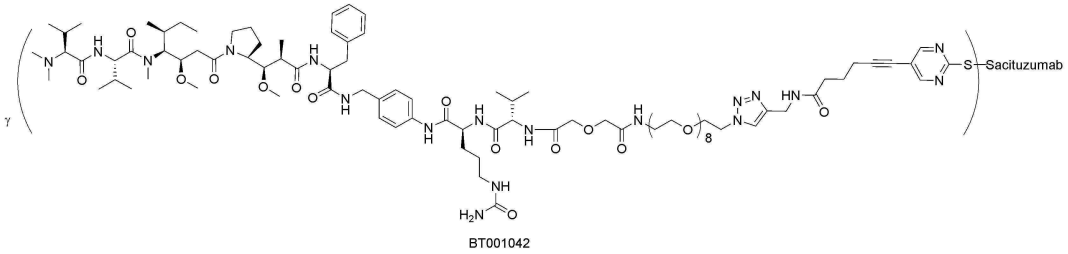
[0888] TL003이 트리플루오로아세테이트인 TL050으로 대체되는 것을 제외하고, 실시예 27에 기재된 것과 유사한 방법을 채택하여 BT001041로 명명되는, 삭시투주맙을 갖는 TL050인 커플링 생성물을 수득하였다.



[0889]

[0890] **실시예 42:** BT001042의 제조

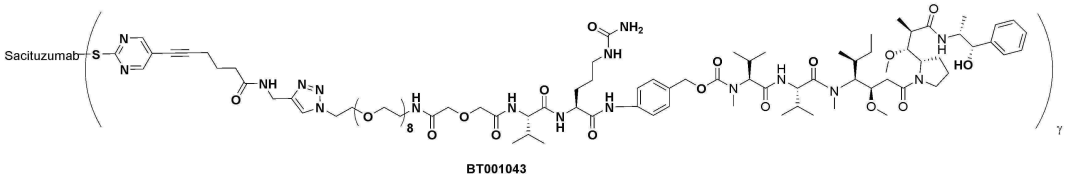
[0891] TL003이 TL051로 대체되는 것을 제외하고, 실시예 27에 기재된 것과 유사한 방법을 채택하여 BT001042로 명명되는, 삭시투주맙을 갖는 TL051인 커플링 생성물을 수득하였다.



[0892]

[0893] **실시예 43:** BT001043의 제조

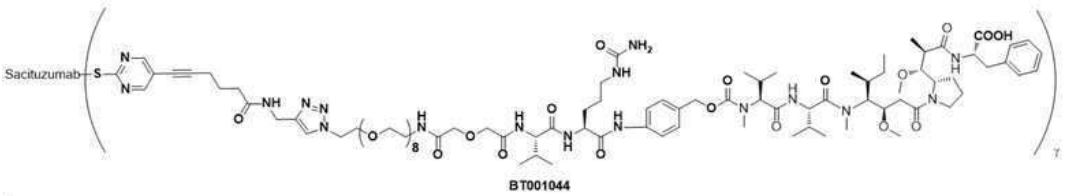
[0894] TL003이 TL052로 대체되는 것을 제외하고, 실시예 27에 기재된 것과 유사한 방법을 채택하여 BT001043로 명명되는, 삭시투주맙을 갖는 TL052인 커플링 생성물을 수득하였다.



[0895]

[0896] **실시예 44:** BT001044의 제조

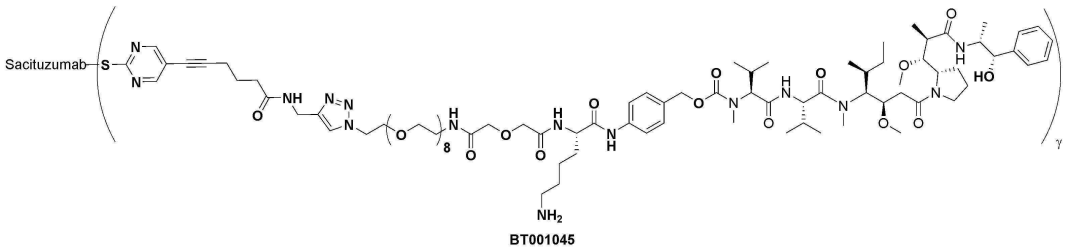
[0897] TL003이 TL053로 대체되는 것을 제외하고, 실시예 27에 기재된 것과 유사한 방법을 채택하여 BT001044로 명명되는, 삭시투주맙을 갖는 TL053인 커플링 생성물을 수득하였다.



[0898]

[0899] **실시예 45:** BT001045의 제조

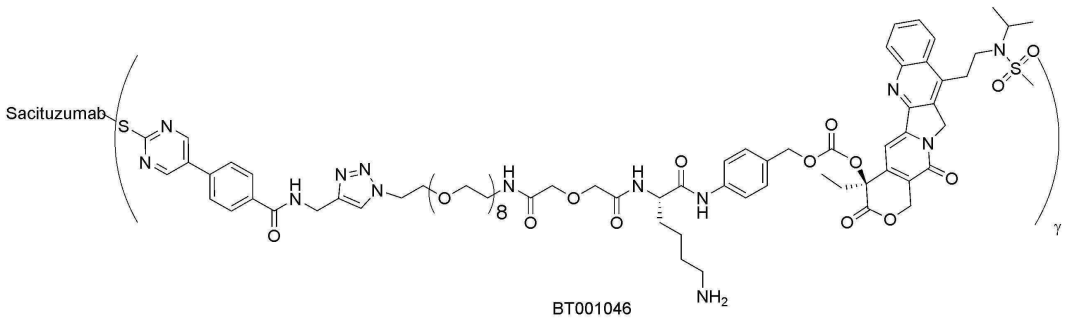
[0900] TL003이 TL054로 대체되는 것을 제외하고, 실시예 27에 기재된 것과 유사한 방법을 채택하여 BT001045로 명명되는, 삭시투주맙을 갖는 TL054인 커플링 생성물을 수득하였다.



[0901]

[0902] **실시예 46:** BT001046의 제조

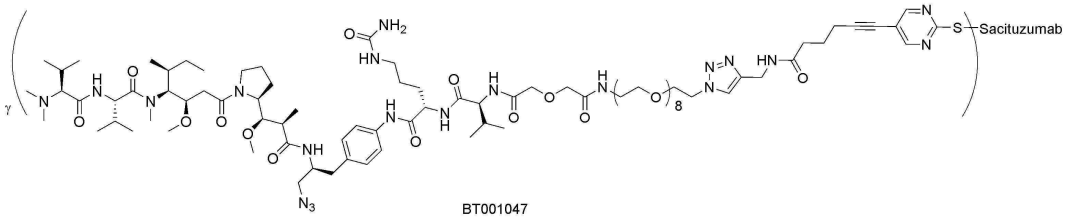
[0903] TL003이 TL055로 대체되는 것을 제외하고, 실시예 27에 기재된 것과 유사한 방법을 채택하여 BT001046으로 명명되는, 삭시투주맙을 갖는 TL055인 커플링 생성물을 수득하였다.



[0904]

[0905] **실시예 47:** BT001047의 제조

[0906] TL003이 TL056으로 대체되는 것을 제외하고, 실시예 27에 기재된 것과 유사한 방법을 채택하여 BT001047로 명명되는, 삭시투주맙을 갖는 TL056인 커플링 생성물을 수득하였다.



[0907]

[0908] **실시예 48:** LC-MS에 의한 BT001002의 분자량 결정

[0909] 커플링에 의해 수득된 BT001002의 분자량을 LC-MS로 분석하였다.

[0910] **LC 조건:**

[0911] 액체 크로마토그래피 컬럼: ACQUITU UPLC® Protein BEH C4 1.7μm, 2.1mm x 100mm;

[0912] 이동상 A: 0.1%FA/98%H_2O/2%ACN; 이동상 B: 0.1%FA/2%H_2O/98%ACN;

[0913] 유속: 0.25 mL/분; 샘플 실온: 8℃; 컬럼 온도: 60℃; 샘플 사이즈 : 1μg;

[0914]

시간 (분)	1	7	8	9	13
이동상 A (%부피)	90	20	20	90	90
이동상 B (%부피)	10	80	80	10	10

[0915] **MS 조건:**

[0916] 질량 분석기 모델: Triple TOF 5600+;

[0917] GS1 60 ; GS2 60 ; CUR30 ; TEM600 ; ISVF5000 ; DP300 ; CE10 m/z600-5000 ;

[0918] 결과는 도 1-3에 제시되어 있다.

[0919] BT001002의 이론 분자량 및 측정 분자량

[0920]

펩티드 사슬		mAb	DAR1	DAR2	DAR3	DAR4
LC	이론값	23334.0	24610.7	25887.3	27163.9	28440.5
	측정값	검출되지 않음	24611.1	검출되지 않음	검출되지 않음	검출되지 않음
HC	이론값	50734.0	52010.6	53287.2	54563.8	55840.4
	측정값	검출되지 않음	검출되지 않음	검출되지 않음	54563.1	검출되지 않음

[0921] 표에서, mAb는 단일클론 항체를 나타내고; LC는 항체의 경사슬을 나타내며; HC는 항체의 중사슬을 나타내고; DAR1은 항체의 경사슬/중사슬 및 하나의 생체활성 분자를 함유하는 접합체를 나타내며; DAR2는 항체의 경사슬/중사슬 및 2개의 생체활성 분자를 함유하는 접합체를 나타내고; DAR3은 항체의 경사슬/중사슬 및 3개의 생체활성 분자를 함유하는 접합체를 나타내며; DAR4는 항체의 경사슬/중사슬 및 4개의 생체활성 분자를 함유하는 접합체를 나타내고; 글리코폼(glycoform)은 2개의 중사슬의 글리칸 구조를 나타내며: GOF는 푸코실화(fucosylation)를 나타내고 갈락토실화(galactosylation)가 없음을 나타낸다. 이하 mAb, LC, HC, DAR1, DAR2, DAR3, DAR4 및 GOF는 전술한 바와 같다.

[0922] 도 1 내지 3에서 알 수 있는 바와 같이, TL003과 커플링된 후, 항체의 경사슬 및 중사슬의 분자량 모두가 변하였고, 여기서 경사슬은 1개의 생체활성 분자와 커플링되었고 중사슬은 3개의 생체활성 분자와 커플링되었다. 따라서, 생체활성 분자에 대한 항체의 DAR은 8인 것으로 추론될 수 있다.

[0923] **실시예 49:** LC-MS에 의한 BT001004의 분자량 결정

[0924] 커플링에 의해 수득된 BT001004의 분자량을 LC-MS로 분석하였다.

[0925] **LC 조건:**

[0926] 액체 크로마토그래피 컬럼: ACQUITU UPLC® Protein BEH C18 1.7μm, 2.1mm × 100mm;

[0927] 이동상 A: 0.1%FA/98%H_2O/2% ACN; 이동상 B: 0.1%FA/2%H_2O/98% ACN;

[0928] 유속: 0.25 mL/분; 샘플 실온: 8℃; 컬럼 온도: 60℃; 샘플 사이즈: 1μg;

[0929]

시간 (분)	2	20	22	25	26	30
이동상 A (%부피)	80	60	10	10	80	80
이동상 B (%부피)	20	40	90	90	20	20

[0930] **MS 조건:**

[0931] 질량 분석기 모델: Triple TOF 5600+; GS1 60 ; GS2 60 ; CUR30 ; TEM 350 ; ISVF5500 ; DP300 ; CE10 ; m/z 600-5000 ;

[0932] 결과는 도 4-6에 제시되어 있다.

[0933] BT001004의 이론 분자량 및 측정 분자량

[0934]

펩티드 사슬		mAb	DAR1	DAR2	DAR3	DAR4
LC	이론값	23334.04	24832.7	26331.4	27830.0	29328.7
	측정값	23334.9	24833.7	검출되지 않음	검출되지 않음	검출되지 않음
HC	이론값	50734.0	52232.6	53731.3	55230.0	56728.6
	측정값	검출되지 않음	52232.1	53730.8	55229.3	검출되지 않음

[0935] LC는 항체의 경사슬을 나타내고; HC는 항체의 중사슬을 나타낸다.

[0936] 도 4-6에서 볼 수 있는 바와 같이, BT001004에서, 항체의 경사슬은 0-1개의 생체활성 분자와 커플링(각각 LC 및 DAR1이 14 % 및 86 %를 차지함)되고, 중사슬은 1-3개의 생체활성 분자와 커플링(DAR1, DAR2 및 DAR3이 각각 13 %, 19 % 및 68 %를 차지함)되었다. 따라서, 생체활성 분자에 대한 항체의 DAR은 7.0 인 것으로 계산될 수 있다.

[0937] **실시예 50:** LC-MS에 의한 BT001012의 분자량 결정

[0938] 실시예 48에 기재되어 있는 방법과 유사한 방법을 채택하였으며, 결과는 도 10 및 11에 제시되어 있다.

[0939] TL024와 항체(주 글리코폼 G0F로부터 계산)를 커플링하여 얻은 BT001012의 경사슬 및 중사슬의 이론적 분자량 및 측정된 분자량은 하기 표에 나타내었다:

[0940]

펩티드 사슬		mAb	DAR1	DAR2	DAR3	DAR4
LC	이론값	23334.04	24803.7	26273.4	27743.0	29212.7
	측정값	23334.8	24804.6	검출되지 않음	검출되지 않음	검출되지 않음
HC	이론값	50734.0	52203.6	53673.3	55143.0	56612.6
	측정값	검출되지 않음	52203.0	53672.2	55141.8	검출되지 않음

[0941] 도 10 및 11에서 알 수 있는 바와 같이, BT001012에서, 항체의 경사슬은 0-1개의 톡신(LC 및 DAR1이 각각 12.9 % 및 87.1 %를 차지함)과 커플링되고, 중사슬은 1- 3 개의 톡신(DAR1, DAR2 및 DAR3이 각각 13.4 %, 10.8 % 및 75.8 %를 차지함)과 커플링되었다. 따라서, 톡신에 대한 항체의 DAR은 7.0 인 것으로 계산될 수 있다.

[0942] **실시예 51:** LC-MS에 의한 BT001013의 분자량 결정

[0943] 실시예 48에 기재되어 있는 방법과 유사한 방법을 채택하였으며, 결과는 도 12 및 13에 제시되어 있다.

[0944] TL048과 항체(주 글리코폼 G0F를 기준으로 계산)를 커플링하여 얻은 BT001013의 경사슬 및 중사슬의 이론적 분자량 및 측정된 분자량은 하기 표에 나타내었다:

[0945]

펩티드 사슬		mAb	DAR1	DAR2	DAR3	DAR4
LC	이론값	23334.04	24767.7	26201.3	27634.9	29068.5
	측정값	23334.6	24768.6	검출되지 않음	검출되지 않음	검출되지 않음
HC	이론값	50734.0	52167.6	53601.2	55034.8	56468.4
	측정값	검출되지 않음	52166.9	53600.8	55034.3	56468.2

[0946] 도 12 및 13에서 알 수 있는 바와 같이, BT001013에서, 항체의 경사슬은 0-1개의 톡신(LC 및 DAR1이 각각 6.8 % 및 93.2 %를 차지함)과 커플링되고, 중사슬은 1-4개의 톡신(DAR1, DAR2, DAR3 및 DAR4가 각각 12.8%, 12.8%, 64.9% 및 9.5%를 차지함)과 커플링되었다. 따라서, 톡신에 대한 항체의 DAR은 7.3인 것으로 계산될 수 있다.

[0947] **실시예 52:** LC-MS에 의한 BT001018의 분자량 결정

[0948] 실시예 48에 기재되어 있는 방법과 유사한 방법을 채택하였으며, 결과는 도 14 및 15에 제시되어 있다.

[0949] TL030과 항체(주 글리코폼 G0F를 기준으로 계산)를 커플링하여 얻은 BT001018의 경사슬 및 중사슬의 이론적 분자량 및 측정된 분자량은 하기 표에 나타내었다:

펩티드 사슬		mAb	DAR1	DAR2	DAR3	DAR4
LC	이론값	23334.04	24926.8	26519.6	28112.3	29705.1
	측정값	23335.6	24928.2	검출되지 않음	검출되지 않음	검출되지 않음
HC	이론값	50734.0	52326.7	53919.5	55512.3	57105.0
	측정값	50736.3	52328.0	53920.7	55513.3	검출되지 않음

[0950]

[0951] 도 14 및 15에서 알 수 있는 바와 같이, BT001018에서, 항체의 경사슬은 0-1개의 톡신(LC 및 DAR1이 각각 55.3% 및 44.7%를 차지함)과 커플링되고, 중사슬은 1-3개의 톡신(DAR1, DAR2, 및 DAR3이 각각 19.6%, 23.3% 및 49.6%를 차지함)과 커플링되었다. 따라서, 톡신에 대한 항체의 DAR은 5.2인 것으로 계산될 수 있다.

[0952] **실시예 53:** LC-MS에 의한 BT001021의 분자량 결정

[0953] **LC 조건:**

[0954] 액체 크로마토그래피 컬럼: ACQUITU UPLC® Protein BEH C4 1.7μm, 2.1mm x 100mm;

[0955] 이동상 A: 0.1%FA/98%H2O/2%ACN; 이동상 B: 0.1%FA/2%H2O/98%ACN;

[0956] 유속: 0.25 mL/분; 샘플 실온: 8℃; 컬럼 온도: 60℃; 샘플 사이즈: 1μg;

시간 (분)	1	7	8	9	13
이동상 A (%부피)	90	20	20	90	90
이동상 B (%부피)	10	80	80	10	10

[0957]

[0958] **MS 조건:**

[0959] 질량 분석기 모델: Triple TOF 5600+; GS1 60 ; GS2 60 ; CUR30 ; TEM600 ; ISVF5000 ; DP300 ; CE10 m/z600-5000 ;

[0960] 결과는 도 16 및 17에 제시되어 있다.

[0961] TL033과 항체(주 글리코폼 G0F를 기준으로 계산)를 커플링하여 얻은 BT001021의 경사슬 및 중사슬의 이론적 분자량 및 측정된 분자량은 하기 표에 나타내었다:

펩티드 사슬		mAb	DAR1	DAR2	DAR3	DAR4
LC	이론값	23334.04	24884.8	26435.5	27986.3	29537.0
	측정값	23334.6	24885.9	검출되지 않음	검출되지 않음	검출되지 않음
HC	이론값	50734.0	52284.7	53835.5	55386.2	56937.0
	측정값	검출되지 않음	52284.3	53834.5	55385.4	검출되지 않음

[0962]

[0963] 도 16 및 17에서 알 수 있는 바와 같이, BT001021에서, 항체의 경사슬은 0-1개의 톡신(LC 및 DAR1이 각각 4.5% 및 95.5%를 차지함)과 커플링되고, 중사슬은 1-3개의 톡신(DAR1, DAR2, 및 DAR3이 각각 15.3%, 17.6% 및 67.1%를 차지함)과 커플링되었다. 따라서, 톡신에 대한 항체의 DAR은 6.9인 것으로 계산될 수 있다.

[0964] **실시예 54:** LC-MS에 의한 BT001023의 분자량 결정

[0965] 실시예 48에 기재되어 있는 방법과 유사한 방법을 채택하였으며, 결과는 도 18 및 19에 제시되어 있다.

[0966] TL035와 항체(주 글리코폼 G0F를 기준으로 계산)를 커플링하여 얻은 BT001023의 경사슬 및 중사슬의 이론적 분자량 및 측정된 분자량은 하기 표에 나타내었다:

펩티드 사슬		mAb	DAR1	DAR2	DAR3	DAR4
LC	이론값	23334.04	24848.7	26363.4	27878.1	29392.7
	측정값	23335.4	24850.2	검출되지 않음	검출되지 않음	검출되지 않음
HC	이론값	50733.98	52248.7	53763.3	55278.0	56792.7
	측정값	50735.2	52249.1	53764.1	55278.6	검출되지 않음

[0967]

[0968] 도 18 및 19에서 알 수 있는 바와 같이, BT001023에서, 항체의 경사슬은 0-1개의 톡신(LC 및 DAR1이 각각 15% 및 85%를 차지함)과 커플링되고, 중사슬은 0-3개의 톡신(HC, DAR1, DAR2, 및 DAR3이 각각 6.7%, 16.7%, 12.7% 및 63.9%를 차지함)과 커플링되었다. 따라서, 톡신에 대한 항체의 DAR은 6.4인 것으로 계산될 수 있다.

[0969] **실시예 55:** LC-MS에 의한 BT001040의 분자량 결정

[0970] 수득된 BT001040의 분자량을 LC-MS로 분석하였다.

[0971] 액체 크로마토그래피 컬럼: Thermo MabPacTM RP 4μm, 3.0mm*100mm

[0972] 이동상 A: 0.1%FA/98%H2O/2% ACN; 이동상 B: 0.1%FA/2%H_2O/98% ACN

[0973] 유속: 0.25 mL/분; 샘플 실온: 8℃; 컬럼 온도: 60℃; 샘플 사이즈: 1μg

시간 (분)	2	20	22	25	26	30
이동상 A (%부피)	80	60	10	10	80	80
이동상 B (%부피)	20	40	90	90	20	20

[0974]

[0975] **MS 조건:**

[0976] 질량 분석기 모델: Triple TOF 5600+ GS1 35 ; GS2 35 ; CUR30 ; TEM 350 ; ISVF5000 ; DP250 ; m/z 600-5000

[0977] TL049와 항체(주 글리코폼 GOF를 기준으로 계산)를 커플링하여 얻은 BT001040의 경사슬 및 중사슬의 이론적 분자량 및 측정된 분자량은 하기 표에 나타내었다:

펩티드 사슬		mAb	DAR1	DAR2	DAR3	DAR4
LC	이론값	23334.04	24901.8	26469.5	28037.3	29605.0
	측정값	23334.2	24902.8	검출되지 않음	검출되지 않음	검출되지 않음
HC	이론값	50733.98	52301.7	53869.5	55437.2	57005.0
	측정값	검출되지 않음	52301.6	53869.2	55437.4	57005.3

[0978]

[0979] 도 20 및 21에서 알 수 있는 바와 같이, BT001040에서, 항체의 경사슬은 0-1개의 생체활성 분자(LC 및 DAR1이 각각 4.9% 및 95.1을 차지함)과 커플링되고, 중사슬은 1-4개의 생체활성 분자(DAR1, DAR2, DAR3 및 DAR4가 각각 16.5%, 14.3%, 52.6% 및 16.6%을 차지함)과 커플링되었다. 따라서, 생체활성 분자에 대한 항체의 DAR은 7.3인 것으로 계산될 수 있다.

[0980] **실시예 56:** LC-MS에 의한 BT001041의 분자량 결정

[0981] 실시예 55에 기재되어 있는 방법과 유사한 방법을 채택하였으며, 결과는 도 22 및 23에 제시되어 있다.

[0982] TL050과 항체(주 글리코폼 GOF를 기준으로 계산)를 커플링하여 얻은 BT001041의 경사슬 및 중사슬의 이론적 분자량 및 측정된 분자량은 하기 표에 나타내었다:

펩티드 사슬		mAb	DAR1	DAR2	DAR3	DAR4
LC	이론값	23334.04	24885.7	26437.4	27989.1	29540.8
	측정값	23334.5	24886.9	검출되지 않음	검출되지 않음	검출되지 않음
HC	이론값	50733.98	52285.7	53837.3	55389.0	56940.7
	측정값	검출되지 않음	52285.2	53836.9	55389.1	56940.9

[0983]

[0984] 도 22 및 23에서 알 수 있는 바와 같이, BT001041에서, 항체의 경사슬은 0-1개의 생체활성 분자(LC 및 DAR1이 각각 10.5% 및 89.5%를 차지함)과 커플링되고, 중사슬은 1-4개의 생체활성 분자(DAR1, DAR2, DAR3 및 DAR4가 각각 21.3%, 14.8%, 57.9% 및 6.0%을 차지함)과 커플링되었다. 따라서, 생체활성 분자에 대한 항체의 DAR은 6.8인 것으로 계산될 수 있다.

[0985] **실시예 57:** LC-MS에 의한 BT001042의 분자량 결정

[0986] 실시예 55에 기재되어 있는 방법과 유사한 방법을 채택하였으며, 결과는 도 24 및 25에 제시되어 있다.

[0987] TL051과 항체(주 글리코폼 GOF를 기준으로 계산)를 커플링하여 얻은 BT001042의 경사슬 및 중사슬의 이론적 분자량 및 측정된 분자량은 하기 표에 나타내었다:

펩티드 사슬		mAb	DAR1	DAR2	DAR3	DAR4
LC	이론값	23334.04	25202.3	27070.6	28938.9	30807.2
	측정값	23335.2	25203.8	검출되지 않음	검출되지 않음	검출되지 않음
HC	이론값	50733.98	52602.3	54470.6	56338.9	58207.2
	측정값	검출되지 않음	52602.8	54471.0	56339.8	검출되지 않음

[0988]

[0989] 도 24 및 25에서 알 수 있는 바와 같이, BT001042에서, 항체의 경사슬은 0-1개의 생체활성 분자(LC 및 DAR1이 각각 14.9% 및 85.1%를 차지함)과 커플링되고, 중사슬은 1-3개의 생체활성 분자(DAR1, DAR2 및 DAR3이 각각 19.7%, 9.4% 및 70.9%을 차지함)과 커플링되었다. 따라서, 생체활성 분자에 대한 항체의 DAR은 6.7인 것으로 계산될 수 있다.

[0990] **실시예 58:** LC-MS에 의한 BT001043의 분자량 결정

[0991] 실시예 55에 기재되어 있는 방법과 유사한 방법을 채택하였으며, 결과는 도 26 및 27에 제시되어 있다.

[0992] TL052과 항체(주 글리코폼 GOF를 기준으로 계산)를 커플링하여 얻은 BT001043의 경사슬 및 중사슬의 이론적 분자량 및 측정된 분자량은 하기 표에 나타내었다:

펩티드 사슬		mAb	DAR1	DAR2	DAR3	DAR4
LC	이론값	23334.04	25202.3	27100.6	28983.9	30867.2
	측정값	23335.5	25221.1	검출되지 않음	검출되지 않음	검출되지 않음
HC	이론값	50733.98	52617.3	54500.6	56383.9	58267.2
	측정값	검출되지 않음	52620.4	54505.8	56391.5	검출되지 않음

[0993]

[0994] 도 26 및 27에서 알 수 있는 바와 같이, BT001043에서, 항체의 경사슬은 0-1개의 생체활성 분자(LC 및 DAR1이 각각 9.1% 및 90.9%를 차지함)과 커플링되고, 중사슬은 1-3개의 생체활성 분자(DAR1, DAR2 및 DAR3이 각각 20.1%, 11.4% 및 68.4%을 차지함)과 커플링되었다. 따라서, 생체활성 분자에 대한 항체의 DAR은 6.8인 것으로 계산될 수 있다.

[0995] **실시예 59:** LC-MS에 의한 BT001044의 분자량 결정

[0996] 실시예 55에 기재되어 있는 방법과 유사한 방법을 채택하였으며, 결과는 도 28 및 29에 제시되어 있다.

[0997] TL053과 항체(주 글리코폼 GOF를 기준으로 계산)를 커플링하여 얻은 BT001044의 경사슬 및 중사슬의 이론적 분자량 및 측정된 분자량은 하기 표에 나타내었다:

[0998]

펩티드 사슬		mAb	DAR1	DAR2	DAR3	DAR4
LC	이론값	23334.04	25233.3	27132.5	29031.8	30931.1
	측정값	23335.5	25234.7	검출되지 않음	검출되지 않음	검출되지 않음
HC	이론값	50733.98	52633.2	54532.5	56431.7	58331.0
	측정값	검출되지 않음	52634.1	54532.9	56432.1	검출되지 않음

[0999] 도 28 및 29에서 알 수 있는 바와 같이, BT001044에서, 항체의 경사슬은 0-1개의 생체활성 분자(LC 및 DAR1이 각각 23.0% 및 77.0%를 차지함)과 커플링되고, 중사슬은 1-3개의 생체활성 분자(DAR1, DAR2 및 DAR3이 각각 19.4%, 11.4% 및 69.3%을 차지함)과 커플링되었다. 따라서, 생체활성 분자에 대한 항체의 DAR은 6.5인 것으로 계산될 수 있다.

[1000] **실시예 60:** LC-MS에 의한 BT001046의 분자량 결정

[1001] 실시예 55에 기재되어 있는 방법과 유사한 방법을 채택하였으며, 결과는 도 30 및 31에 제시되어 있다.

[1002] TL055와 항체(주 글리코폼 GOF를 기준으로 계산)를 커플링하여 얻은 BT001046의 경사슬 및 중사슬의 이론적 분자량 및 측정된 분자량은 하기 표에 나타내었다:

[1003]

펩티드 사슬		mAb	DAR1	DAR2	DAR3	DAR4
LC	이론값	23334.04	24894.8	26455.5	28016.2	29577.0
	측정값	23335.5	24896.7	검출되지 않음	검출되지 않음	검출되지 않음
HC	이론값	50733.98	52294.7	53855.4	55416.2	56976.9
	측정값	50735.4	52296.1	53856.9	55418.0	검출되지 않음

[1004] 도 30 및 31에서 알 수 있는 바와 같이, BT001046에서, 항체의 경사슬은 0-1개의 생체활성 분자(LC 및 DAR1이 각각 33.8% 및 66.2%를 차지함)과 커플링되고, 중사슬은 0-3개의 생체활성 분자(DAR0, DAR1, DAR2 및 DAR3이 각각 21.9%, 6.1%, 9.6% 및 62.3%을 차지함)과 커플링되었다. 따라서, 생체활성 분자에 대한 항체의 DAR은 5.6인 것으로 계산될 수 있다.

[1005] **실시예 61:** LC-MS에 의한 BT001047의 분자량 결정

[1006] 실시예 55에 기재되어 있는 방법과 유사한 방법을 채택하였으며, 결과는 도 32 및 33에 제시되어 있다.

[1007] TL056과 항체(주 글리코폼 GOF를 기준으로 계산)를 커플링하여 얻은 BT001047 경사슬 및 중사슬의 이론적 분자량 및 측정된 분자량은 하기 표에 나타내었다:

[1008]

펩티드 사슬		mAb	DAR1	DAR2	DAR3	DAR4
LC	이론값	23334.04	25124.2	26914.4	28704.6	30494.8
	측정값	23335.5	25126.3	검출되지 않음	검출되지 않음	검출되지 않음
HC	이론값	50733.98	52524.2	54314.3	56104.5	57894.7
	측정값	50735.4	52524.6	54314.1	56106.5	검출되지 않음

[1009] 도 32 및 33에서 알 수 있는 바와 같이, BT001047에서, 항체의 경사슬은 0-1개의 생체활성 분자(LC 및 DAR1이 각각 13.7% 및 86.3%을 차지함)과 커플링되고, 중사슬은 1-3개의 생체활성 분자(DAR1, DAR2 및 DAR3이 각각 22.2%, 13.5% 및 64.3%을 차지함)과 커플링되었다. 따라서, 생체활성 분자에 대한 항체의 DAR은 6.6인 것으로 계산될 수 있다.

[1010] **실시예 62: 사이즈 배제 크로마토그래피 분석**

[1011] 커플링 반응을 SEC-HPLC에 의해 모니터링하였고, 접합체를 SEC에 의해 테스트하였다.

[1012] **크로마토그래피 조건:**

[1013] 액체 크로마토그래피 컬럼: TOSOH TSKgel SuperSW mAb, 4μm, 7.8mm x 300mm;

[1014] 이동상: 100mmol/L Na_2HPO_4, 100mmol/L NaCl, 5% 이소프로판올, pH7.0;

[1015] 유속: 0.5 mL/분; 검출 파장: 280 nm; 컬럼 온도: 실온; 샘플 실온: 8℃;

[1016] 샘플 사이즈: 30μg; 등용매 작동: 30 분.

[1017] TL003을 항체와 커플링하여 얻은 BT001002의 SEC 크로마토그램 및 분자량 마커 SEC 크로마토그램을 각각 도 7 및 8에 나타내었다. 분자량 마커에 따르면, 커플링 생성물의 주 피크의 분자량은 약 150kD, 즉 TL003을 항체와 커플링함으로써 수득된 BT001002의 경우, 경사슬 및 중사슬이 해리되지 않으며, 항체는 여전히 완전한 구조를 유지한다는 것을 확인하였다.

[1018] TL019를 항체와 커플링하여 얻은 BT001004의 SEC 크로마토그램을 도 9에 나타내었다. SEC에서의 체류 시간 및 피크 면적 비율에 따라, 주 커플링 생성물의 분자량이 약 150kD, 즉 TL019를 항체와 커플링함으로써 수득된 BT001004가 여전히 항체의 완전한 구조를 유지한다는 것을 확인하였다.

[1019] TL024를 항체와 커플링하여 얻은 BT001012의 SEC 크로마토그램을 도 34에 나타내었다. SEC에서의 체류 시간 및 피크 면적 비율에 따라, 주 커플링 생성물의 분자량이 약 150kD, 즉 TL024를 항체와 커플링함으로써 수득된 BT001012가 여전히 항체의 완전한 구조를 유지한다는 것을 확인하였다.

[1020] TL048를 항체와 커플링하여 얻은 BT001013의 SEC 크로마토그램을 도 35에 나타내었다. SEC에서의 체류 시간 및 피크 면적 비율에 따라, 주 커플링 생성물의 분자량이 약 150kD, 즉 TL048를 항체와 커플링함으로써 수득된 BT001013가 여전히 항체의 완전한 구조를 유지한다는 것을 확인하였다.

[1021] TL030을 항체와 커플링하여 얻은 BT001018의 SEC 크로마토그램을 도 36에 나타내었다. SEC에서의 체류 시간 및 피크 면적 비율에 따라, 주 커플링 생성물의 분자량이 약 150kD, 즉 TL030을 항체와 커플링함으로써 수득된 BT001018이 여전히 항체의 완전한 구조를 유지한다는 것을 확인하였다.

[1022] TL033을 항체와 커플링하여 얻은 BT001021의 SEC 크로마토그램을 도 37에 나타내었다. SEC에서의 체류 시간 및 피크 면적 비율에 따라, 주 커플링 생성물의 분자량이 약 150kD, 즉 TL033을 항체와 커플링함으로써 수득된 BT001021이 여전히 항체의 완전한 구조를 유지한다는 것을 확인하였다.

[1023] TL035을 항체와 커플링하여 얻은 BT001023의 SEC 크로마토그램을 도 38에 나타내었다. SEC에서의 체류 시간 및 피크 면적 비율에 따라, 주 커플링 생성물의 분자량이 약 150kD, 즉 TL035을 항체와 커플링함으로써 수득된 BT001023이 여전히 항체의 완전한 구조를 유지한다는 것을 확인하였다.

[1024] TL051을 항체와 커플링하여 얻은 BT001042의 SEC 크로마토그램을 도 39에 나타내었다. SEC에서의 체류 시간 및 피크 면적 비율에 따라, 주 커플링 생성물의 분자량이 약 150kD, 즉 TL051을 항체와 커플링함으로써 수득된 BT001042이 여전히 항체의 완전한 구조를 유지한다는 것을 확인하였다.

[1025] TL052를 항체와 커플링하여 얻은 BT001043의 SEC 크로마토그램을 도 40에 나타내었다. SEC에서의 체류 시간 및 피크 면적 비율에 따라, 주 커플링 생성물의 분자량이 약 150kD, 즉 TL052를 항체와 커플링함으로써 수득된 BT001043이 여전히 항체의 완전한 구조를 유지한다는 것을 확인하였다.

[1026] TL053을 항체와 커플링하여 얻은 BT001044의 SEC 크로마토그램을 도 41에 나타내었다. SEC에서의 체류 시간 및 피크 면적 비율에 따라, 주 커플링 생성물의 분자량이 약 150kD, 즉 TL053을 항체와 커플링함으로써 수득된 BT001044가 여전히 항체의 완전한 구조를 유지한다는 것을 확인하였다.

[1027] TL055를 항체와 커플링하여 얻은 BT001046의 SEC 크로마토그램을 도 42에 나타내었다. SEC에서의 체류 시간 및 피크 면적 비율에 따라, 주 커플링 생성물의 분자량이 약 150kD, 즉 TL055를 항체와 커플링함으로써 수득된 BT001046이 여전히 항체의 완전한 구조를 유지한다는 것을 확인하였다.

[1028] TL056을 항체와 커플링하여 얻은 BT001047의 SEC 크로마토그램을 도 43에 나타내었다. SEC에서의 체류 시간 및 피크 면적 비율에 따라, 주 커플링 생성물의 분자량이 약 150kD, 즉 TL056을 항체와 커플링함으로써 수득된

BT001047이 여전히 항체의 완전한 구조를 유지한다는 것을 확인하였다.

[1029] **실시예 63: 시험 관내 세포의 활성에 대한 생체활성 분자 및 항체 약물 접합체의 억제 효과 시험**

[1030] 먼저, 종양 세포 MDA-MB-468(Trop-2 양성 세포주) 및 HCC1806(Trop-2 양성 세포주)을 배양하였다. 본원에 개시된 생체활성 분자 및 ADC 분자를 종양 세포와 공동-배양한 후, CCK8 시약(Dojindo Molecular Technologies, Inc., Cat : CK04, 로트 : JJ744)을 첨가하였다. 미토콘드리아에서의 탈수소효소의 활성을 마이크로플레이트 판독기(제조업체: Molecular Devices, 모델: SpectraMax M2)로부터의 판독(검출 파장 450nm)을 통해 시험하여 세포 증식에 대한 ADC의 억제 효과를 평가하였다. 종양 세포의 공급원을 표 1에 나타내었다.

표 1

[1031]

세포 명칭	종양 종류	공급원
MDA-MB-468	유방암	Concortis
HCC1806	유방암	Cobioer Biosciences Co., Ltd.

[1032] 시험 관내 세포 활성 테스트: 생체활성 분자 또는 ADC를 대응 테스트 배지(2 % FBS 함유)로 희석하였다(12 농도 구배). 종양 세포를 통상적인 방법에 의해 트립신으로 트립신처리하였고, 수집 및 계수한 다음, 대응 테스트 배지(2 % FBS 함유)로 재현탁시켰다. 희석된 생체활성 분자 또는 ADC를 96-웰 플레이트에 첨가한 다음, 세포를 첨가하였다. 20μL의 CCK8 시약을 각각의 웰에 첨가하고 4 시간 동안 반응시켰으며, 판독값(검출 파장은 450nm)을 마이크로 플레이트 판독기에서 처리하였다. 실험 조건 및 시험 결과는 표 2 및 표 3에 나타내었다.

표 2

[1033]

명칭	세포 명칭	EC_{50}(nM)
T001	MDA-MB-468 (7500 세포/웰, 4 일)	1.126
T011		0.211
T012		1.621
T013		0.414
T015		7.428
T-028	HCC1806 (7500 세포/웰, 3 일)	6.016
T-030		6.734

[1034] 표 2는 세포 상의 생체활성 분자의 사멸 효과에 대한 것이다. 시험 결과는 모든 생체활성 분자가 종양 세포에 대해 사멸 효과를 가짐을 나타내었다.

표 3

[1035]

명칭	세포 명칭	EC50(nM)
BT001002	MDA-MB-468 (10000 세포/웰, 3 일)	0.072
BT001004	HCC1806 (7500 세포/웰, 3일)	6.139
BT001012		14.41
BT001013		48.01
BT001018		13.42
BT001021		13.15
BT001022		23.43
BT001023		21.65
BT001040		11.08
BT001041		10.34
BT001042		0.0186
BT001043		0.062
BT001044		0.0051
BT001046		0.81
BT001047		0.23

[1036] 표 3은 세포 상의 생체활성 접합체(ADCs)의 사멸 효과에 대한 것이다.

[1037] 테스트 결과는, 신규한 커플링 방법으로 얻은 ADC 분자가 종양 세포에 대해 사멸 효과를 갖는 것을 나타내며, 이는 신규한 커플링 방법에 의해 형성된 ADC가 종양 세포에 대해 사멸 효과를 가졌으며, 신규한 커플링 방법이 ADC 분자의 합성에 효율적임을 나타낸다.

[1038] **실시예 64:** 생체 내, 항체 약물 접합체 및 생체활성 분자에 대한 약력학적 시험

[1039] **테스트 중인 약물**

[1040] 약물 명칭, 공급원 및 제조 방법:

[1041] BT001021에서, 액체 분취액(aliquot)을 -20 ℃에서 5.44 mg/mL의 농도로 저장하고, 사용 전에 용량에 따라 생리식염수로 희석하여 테스트 용액을 얻었다;

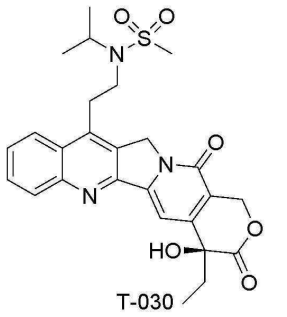
[1042] Immu-132(WO 2015/012904 A2의 실시예 2에 따라 제조, DAR = 5.4, IMMU-132로도 설명됨), 액체 분취액을 -20 ℃에서 13.158 mg/mL의 농도로 저장하고, 사용 전에 복용량으로 생리식염수로 희석하여 투여 테스트 용액을 얻었다;

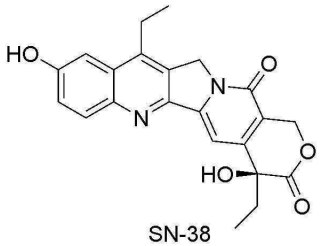
[1043] T-030인 고체 분말을 100% DMSO(Sigma)와 5.2 mg/mL의 농도의 용액으로 제조되고, 액체 분취액을 -20 ℃에서 저장하였고, 사용 전에 원하는 용량에 따라 생리식염수로 희석하여 테스트 용액을 얻었다;

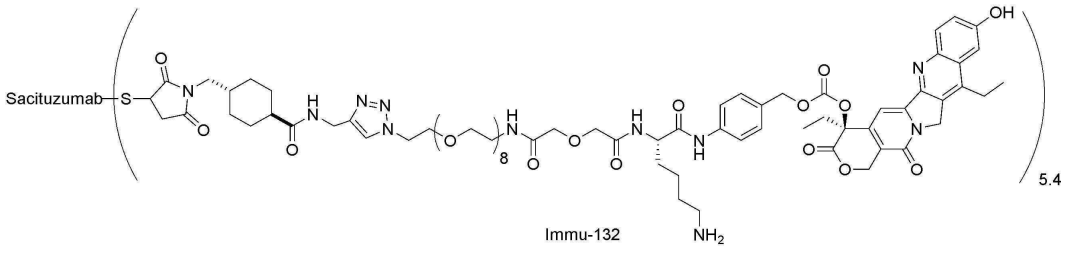
[1044] SN-38(SN38로도 기술됨)인 고체 분말을 100% DMSO(Sigma)와 3.23 mg/mL의 농도의 용액으로 제조되고, 액체 분취액을 -20 ℃에서 저장하였고, 사용 전에 용량에 따라 생리식염수로 희석하여 테스트 용액을 얻었다.

[1045] 참고: 톡신을 ADC 샘플의 등몰비로 제조 및 투여하였다.

[1046] T-030, SN-38 및 Immu-132의 구조는 다음과 같다:

[1047] 

,


,


[1048] **실험 동물 및 세포주**

[1049] Balb/c-nu 마우스(Beijing Vital River Laboratory Animal Technology Co., Ltd., 생산 라이센스 번호: SCXK(Beijing) 2016-0011); 위암 세포주 NCI-N87(ATCC), 유방암 세포주 HCC1806(COBIOER Nanjing).

[1050] **실험 그룹화 및 평가 방법**

[1051] 종양 부피가 100 - 200 mm^3인 종양-보유 마우스(6 마우스/군)를 무작위로 그룹화(군의 수는 샘플 수에 따라 결정)하였다. 투여 부피는 10 mL/kg였으며, 구여 경로는 꼬리 정맥 주사였다. 마우스를 일주일에 두번 투여하였고, 종양 직경을 버니어 캘리퍼(vernier caliper)로 측정하였으며, 종양 부피를 다음의 계산식: $V = 0.5\ a \times b^2$ 를 기준으로 계산하였으며, 여기서 a 및 b는 각각 종양의 장 직경 및 단 직경을 나타낸다. 동물 사

망을 매일 관찰 및 기록하였다.

[1052] 항체 약물 접합체의 종양 억제 효과를 평가하기 위해 하기 식으로부터 종양 성장 억제율, TGI(%)를 계산하였다:

[1053] $TGI(\%) = [1-(V_{Tend}-V_{Tstart})/(V_{Cend}-V_{Cstart})]*100\%$

[1054] 여기서,

[1055] V_{Tend}: 처리군에서의 실험 종료(end)시 평균 종양 부피

[1056] V_{Tstart}: 처리군에서의 실험 시작(start)시 평균 종양 부피

[1057] V_{Cend}: 대조군에서의 실험 종료시 평균 종양 부피

[1058] V_{Cstart}: 대조군에서의 실험 종료시 평균 종양 부피 임.

[1059] 하기 실험예 1 및 2에서, 인간 종양 세포의 피하 이종 이식편에 의해 구축된 종양-보유 마우스의 종양 증식에 대한 항체 접합체 BT001021의 억제를 평가하였다. 구체적으로, 실험예 1 및 2에서, 인간 위암 세포주 NCI-N87 또는 인간 삼중 음성 유방암 세포주 HCC1806의 피하 이종 이식편에 의해 종양-보유 마우스 모델을 구축하였다. 종양 부피가 약 100 mm^3이 된 후, 마우스를 무작위로 그룹화하였고, 일주일에 2회, 총 6회, BT001021로 정맥 내 투여하였다. 마우스의 항체 약물 접합체의 효능(종양 억제 효과)을 평가하기 위해 종양 부피 및 동물 체중의 변화를 일주일에 2회 측정하였다.

[1060] **실험예 1.** 항체 약물 접합체 및 생체활성 분자에 의한 NCI-N87의 억제

[1061] 실험 방법:

[1062] NCI-N87 세포를 37 ℃ 및 5 % CO_2에서 10 % 소 태아 혈청을 함유한 1640 배양 배지(medium)에서 배양하였다. 지수 성장 단계(exponential growth stage)에서 NCI-N87 세포를 수집하였고, 적절한 농도로 PBS에 재현탁시켰으며, 암컷 Balb/c-nu 마우스에 피하로 접종하여 위암 모델을 구축하였다. 평균 종양 부피가 약 90 mm^3 일 때, 마우스를 생리식염수 군, BT001021(3 mg/kg, IV, BIWx3W) 군, 양성 약물 Immu-132(3 mg/kg, IV, BIW x 3W) 군, T030 군 및 SN38 군으로 종양 사이즈에 따라 무작위로 그룹화하고, 일주일에 2회, 총 6회의 해당 약물의 꼬리 정맥 주사를 투여하였다. 투여 후, 마우스의 종양 부피 및 체중을 관찰하고 규칙적으로 측정하였다. 구체적인 결과는 표 4, 도 44 및 45에 나타내었다.

[1063] 결론:

[1064] 상기 실험예에서, 인간 위암 세포주 NCI-N87을 사용하여 인간 위암의 피하 이종 이식편 모델을 구축하였고, NCI-N87 인간 위암 종양-보유 마우스 모델에서 BT001021의 효능을 평가하였다.

[1065] 실험 결과는 BT001021(3 mg/kg, IV, BIW×3W)이 NCI-N87 위암의 이종 이식편 모델 마우스의 종양 성장을 현저하게 억제할 수 있으며, 항-종양 활성이 양성 대조군 Immu-132의 것보다 우수하여 투여 종료시 종양 감소가 발생하였음을 보여주었다. 관찰 기간 동안, 모든 처리군에서 동물 사멸 또는 현저한 체중 감소가 발생하지 않았으며, 이는 BT001021에 현저하게 독성이 없음을 나타낸다.

[1066] 표 4는 위암의 NCI-N87 모델에 대한 내용이다.

표 4

[1067]

군 번호	섭생(Regimen)	투여 후 D21		
		종양 부피 (mm^3)($\bar{x}$ ±S)	종양 성장 억제율(%)	*P* 값 (*vs* 군 1)
군 1	생리 식염수	405.67± 91.81		
군 2	BT001021	42.78± 21.87	114.61	0.0000
군 3	Immu-132	259.04± 42.41	46.46	0.0053
군 4	T-030	339.02± 152.80	21.48	0.3813
군 5	SN-38	416.11±195.15	-2.75	0.9079

[1068] **실험예 2.** 항체 약물 접합체에 의한 HCC1806 억제

[1069] 실험 방법:

[1070] HCC1806 세포를 37 ℃ 및 5 % CO_2에서 10 % 소 태아 혈청을 함유한 1640 배양 배지에서 배양하였다. 지수 성장 단계에서 HCC1806 세포를 수집하였고, 적절한 농도로 PBS에 재현탁시켰으며, 암컷 Balb/c-nu 마우스에 피하로 접종하여 유방암 모델을 구축하였다. 평균 종양 부피가 약 130 mm^3 일 때, 마우스를 생리식염수 군, BT001021(10 mg/kg, IV, BIWx3W) 군 및 양성 약물 Immu-132(10 mg/kg, IV, BIW x 3W) 군으로 종양 사이즈에 따라 무작위로 그룹화하고, 이어서 일주일에 2회, 총 5회의 해당 약물의 꼬리 정맥 주사를 투여하였다. 투여 후, 마우스의 종양 부피 및 체중을 관찰하고 규칙적으로 측정하였다. 구체적인 결과는 표 5 및 도 46에 나타내었다.

[1071] 결론:

[1072] 상기 실험예에서, 인간 유방암 세포주 HCC1806을 사용하여 인간 유방암의 피하 이종 이식편 모델을 구축하였고, HCC1806 인간 유방암 종양-보유 마우스 모델에서 BT001021의 효능을 평가하였다.

[1073] 실험 결과는, 항-종양 활성이 양성 Immu-132의 것보다 우수하다는 것과 함께, BT001021(10 mg/kg, IV, BIW×3W)이 HCC1806 유방암의 이종 이식편 모델 마우스의 종양 성장을 현저하게 억제할 수 있음을 보여준다.

[1074] 표 5는 유방암의 HCC1806 모델에 대한 내용이다.

표 5

[1075]

군 번호	섭생	투여 후 D17		
		종양 부피(mm^3) ($\bar{x}$ ±S)	종양 성장 억제율(%)	*P* 값 (*vs* 군 1)
군 1	생리식염수	2638.22±553.81		
군 2	BT001021	1260.87± 415.60	54.93	0.0006
군 3	Immu-132	2347.05± 317.79	11.62	0.2901

[1076] 표 4, 표 5 및 도 44-46에 따르면, 본 발명의 항체 약물 BT001021은 NCI-N87 마우스 모델에서 종양 성장을 현저하게 억제할 수 있다. 동일한 용량에서 Immu-132보다 현저히 우수하였으며, 체중 감량이나 약물 독성이 없었다. HCC1806 마우스 모델에서, 종양의 높은 악성 종양으로 인해 용량이 10mg/kg으로 증가한 경우, Immu-132는 현저한 억제 활성을 나타내지 않은 반면, BT001021은 종양 성장을 현저하게 억제할 수 있었다. 결과는 본 발명의 BT001021이 우수한 효능 및 우수한 안전성을 갖는다는 것을 나타내었다.

[1077] 실험예 1 및 2의 피하 이종 이식편 모델에서, BT001021의 항-종양 활성은 동일한 용량에서 Immu-132의 항-종양 활성보다 현저히 우수하여, BT001021이 고형 종양을 치료할 수 있는 가능성을 가지며, Immu-132보다 임상적으로 더 많은 환자가 혜택을 받을 것이라 기대되었다.

[1078] **실험예 3.** 항체 약물 접합체에 의한 HCC827 억제

[1079] 실험예 3은 HCC827 비-소세포 폐암의 피하 이종 이식편 인간 종양 세포에 의해 구축된 종양-보유 마우스 모델의 증식에 대한 BT001021 및 BT001035의 억제 효과를 평가하기 위해 사용되었다. 구체적으로, 실험에서, 종양-보유 마우스 모델은 인간 비-소세포 폐암 세포주 HCC827의 피하 이종 이식편에 의해 구축되었다. 종양 부피가 약 100 mm^3 인 후, 마우스를 무작위로 그룹화하고, 일주일에 2회 총 6회, BT001021 및 BT001035로 정맥 내 투여하였다. 이어서, 종양-보유 마우스에 대한 BT001021 및 BT001035의 효능(종양 억제 효과)을 계산하기 위해 종양 부피 및 동물 체중의 변화를 일주일에 2회 측정하였다.

[1080] 실험 방법:

[1081] HCC827 세포를 37 ℃ 및 5 % CO_2에서 10 % 소 태아 혈청을 함유한 1640 배양 에서 배양하였다. 지수 성장 단계에서 HCC827 세포를 수집하였고, 적절한 농도로 PBS에 재현탁시켰으며, 암컷 Balb/c-nu 마우스에 피하로 접종하여 폐암 모델을 구축하였다. 평균 종양 부피가 약 80 mm^3 일 때, 마우스를 생리식염수 군, 양성 약물 Immu-132(10 mg/kg, IV, BIW x 3W) 군, BT001021(10 mg/kg, IV, BIW×3W) 군 및 BT001035(10 mg/kg, IV, BIW×3W) 군으로 종양 사이즈에 따라 무작위로 그룹화하고, 이어서 일주일에 2회, 총 6회의 해당 약물의 꼬리 정맥 주사

를 투여하였다. 투여 후, 마우스의 종양 부피 및 체중을 관찰하고 규칙적으로 측정하였다. 구체적인 결과는 표 6 및 도 47b에 나타내었다.

[1082] 결론:

[1083] 실험 결과는, BT001021 및 BT001035가 HCC827 비-소세포 폐암 세포주 이종 이식편 모델 마우스에서 종양 성장 및 투여 종료 시점에서의 종양 감소를 현저하게 억제할 수 있으며, 항-종양 활성은 양성 군 Immu-132의 것보다 우수하다는 것을 알 수 있었다. 관찰 기간 동안, 모든 처리군에서 동물 사망 및 현저한 동물의 체중 감소가 발생하지 않았으며, 현저한 약물 독성도 관찰되지 않았다. 처리 기간 중에, 마우스는 평가된 모든 약물에 대해 우수한 내성(tolerance)을 보였다.

[1084] 표 6는 폐암 HCC827 모델에 대한 내용이다.

표 6

[1085]

군 번호	섭생	투여 후 D21		
		종양 부피(mm^3) ($\bar{x}$ ±S)	TGI (%)	*P* 값 (vs 군 1)
1	생리식염수	515.25±165.09		
2	Immu-132	145.94±19.72	85.19	0.0003
3	BT001021	40.26±8.36	108.70	0.0001
4	BT001035	48.61±9.99	106.95	0.0000

[1086] 표 6, 도 47a 및 도 47b에 따르면, BT001021 및 BT001035는 평가 기간 동안 종양 성장에 대해 현저한 억제 활성을 가지며, 동일한 용량에서 Immu-132보다 현저히 우수하였다. 처리 중에, 모든 군에서 현저한 체중 감소 및 약물 독성이 관찰되지 않았다. 결과는 BT001021 및 BT001035 둘 다 우수한 항-종양 활성을 가진다는 것을 나타냈다.

[1087] 피하 이종 이식편 모델에서, BT001021 및 BT001035의 항-종양 활성은 동일한 용량에서 Immu-132의 항-종양 활성보다 현저히 우수하였으며, 이는 BT001021 및 BT001035가 고형 종양을 치료할 가능성이 있으며, Immu-132보다 임상적으로 더 많은 환자가 혜택을 받을 것이라 기대된다고 시사했다.

[1088] **실험예 4.** 항체 약물 접합체에 의한 NCI-N87 억제

[1089] 실험예 4는 피하 이종 이식편 인간 종양 세포에 의해 구축된 종양-보유 마우스 모델의 증식에 대한 항체 약물 접합체 BT001036의 억제 효과를 평가하기 위해 사용되었다. 구체적으로, 실험에서, 종양-보유 마우스 모델은 인간 위암 세포주 NCI-N87의 피하 이종 이식편에 의해 구축되었다. 종양 부피가 약 140 mm^3 인 후, 마우스를 무작위로 그룹화하고, 일주일에 2회 총 6회, BT001036으로 정맥 내 투여하였다. 종양-보유 마우스에 대한 항체 약물 접합체의 효능(종양 억제 효과)을 계산하기 위해 종양 부피 및 동물 체중의 변화를 일주일에 2회 측정하였다.

[1090] 실험 방법:

[1091] **NCI-N87** 세포를 37 ℃ 및 5% CO_2에서 10% 소 태아 혈청을 함유한 1640 배양 배지에서 배양하였다. 지수 성장 단계에서 HCC827 세포를 수집하였고, 적절한 농도로 PBS에 재현탁시켰으며, 암컷 Balb/c-nu 마우스에 피하로 접종하여 위암의 이종 이식 편 모델을 구축하였다. 평균 종양 부피가 약 140 mm^3 일 때, 마우스를 생리식염수 군, BT001036(1.5 mg/kg, IV, BIW×3W) 군 및 BT001036(3 mg/kg, IV, BIW×3W) 군으로 종양 사이즈에 따라 무작위로 그룹화하고, 이어서 일주일에 2회, 총 6회의 해당 약물의 꼬리 정맥 주사투여하였다. 투여 후, 마우스의 종양 부피 및 체중을 관찰하고 규칙적으로 측정하였다. 구체적인 결과는 표 7 및 도 48a 및 48b에 나타내었다. 표 7은 위암 NCI-N87 모델에 대한 내용이다.

표 7

[1092]

군 번호	섭생	투여 후 D21		
		종양 부피(mm^3) ($\bar{x}$ ±S)	TGI (%)	P 값 (vs 군 1)
군 1	생리식염수	601.29±198.92		

군 2	BT001036(1.5mg/kg)	150.87±112.84	97.78	0.0017
군 3	BT001036(3mg/kg)	2.74± 0.64	129.95	0.0000

[1093] 결론:

[1094] 상기 실험예에서, 인간 위암 세포주 NCI-N87을 사용하여 인간 위암의 피하 이종 이식편 모델을 구축하였고, NCI-N87 인간 위암 종양-보유 마우스 모델에서 BT001036의 효능을 평가하였다.

[1095] 실험 결과는 BT001036(1.5 mg/kg, 3 mg/kg)이 NCI-N87 위암의 이종 이식편 모델 마우스의 종양 성장을 현저하게 억제할 수 있으며, 항-종양 활성이 우수하여 투여 종료시 종양 감소가 발생하였음을 보여주었다. 관찰 기간 동안, 모든 처리군에서 동물 사멸 또는 현저한 체중 감소가 발생하지 않았으며, 현저한 약물 독성이 관찰되지 않았다. 처리 기간 중에, 마우스는 평가된 모든 약물에 대해 우수한 내성을 보였다.

[1096] **실험예 5.** 항체 약물 접합체에 의한 MDA-MB-231 억제

[1097] 실험예 5는 MDA-MB-231 유방암의 피하 이종 이식 인간 종양 세포에 의해 구축된 종양-보유 마우스 모델의 증식에 대한 BT001021의 억제 효과를 평가하기 위해 사용되었다. 구체적으로, 실험에서, 인간 유방암 세포주 MDA-MB-231의 피하 이종 이식편에 의해 종양-보유 마우스 모델을 구축하였다. 종양 부피가 약 130 mm^3 인 후, 마우스를 무작위로 그룹화하고, 일주일에 2회, 총 6회, BT001021로 정맥 내 투여하였다. 이어서, 종양-보유 마우스에 대한 BT001021의 효능(종양 억제 효과)을 계산하기 위해 종양 부피 및 동물 체중의 변화를 측정하였다.

[1098] 실험 방법:

[1099] NCI-MDA-MB-231 세포를 37 ℃ 및 5 % CO_2에서 10 % 소 태아 혈청을 함유하는 RPMI1640 배양 배지에서 배양하였다. 지수 성장 단계에서 MDA-MB-231 세포를 수집하고, 적절한 농도로 PBS에 재현탁시키고, 유방암의 이종 이식 모델을 구축하기 위해 암컷 Balb/c-nu 마우스에 피하로 접종하였다. 평균 종양 부피가 약 130 mm^3 일 때, 마우스를 생리식염수 군 및 BT001021(3 mg/kg) 군으로 종양 크기에 따라 무작위로 그룹화한 후, 일주일에 2회, 총 6회, 해당 약물을 꼬리 정맥 주사투여 후, 마우스의 종양 부피 및 체중을 관찰하고 규칙적으로 측정하였다. 결과를 표 8, 도 49a 및 도 49b에 나타냈다.

[1100] 결론:

[1101] 결과는 BT001021이 MDA-MB-231 유방암의 이종 이식편 모델 마우스의 종양 성장을 현저하게 억제할 수 있으며, 투여 종료시 종양 감소가 발생하였음을 보여주었다. 관찰 기간 동안, 모든 처리군에서 동물 사멸 또는 현저한 체중 감소가 발생하지 않았으며, 현저한 약물 독성도 관찰되지 않았다. 처리 기간 중에, 마우스는 평가된 모든 약물에 대해 우수한 내성을 보였다. 표 8은 유방암 MDA-MB-231 모델에 대한 내용이다.

표 8

[1102]

군 번호	섭생	투여 후 D33		
		종양 부피(mm^3) ($\bar{x}$ ±S)	TGI (%)	P 값 (vs 군 1)
1	생리식염수	744.53±306.66		
2	BT001021	43.96±7.72	114.18	0.0119

[1103] 피하 이종 이식편 모델에서, BT001021은 현저한 항-종양 활성을 가졌다. 관찰 기간 동안, 모든 처리군에서 동물 사멸 또는 현저한 동물 체중 감소가 발생하지 않았으며, 현저한 약물 독성도 관찰되지 않았다. 처리 기간 동안, 마우스는 평가되는 모든 약물에 대해 우수한 내성을 나타냈다.

[1104] **실시예 65**: 생체 내 항체 약물 접합체 및 생체활성 분자의 약동학 시험

[1105] 실험예 6을 사용하여 생체 내에서 항체 약물 접합체 및 생체활성 분자의 약동학을 평가하였다. 구체적으로, 실험에서, 종양-보유 마우스 모델은 Balb/c-nu 마우스에 대한 인간 위암 세포주 NCI-N87의 피하 이종 이식편에 의해 구축되었다. 종양 부피가 100-200 mm^3 인 후, 마우스를 무작위로 그룹화하고, BT001021 및 T-030의 단일 용량으로 정맥 내 투여하였다. 종양 조직 및 혈청에서 T-030의 농도는 종양-보유 마우스에서 항체 접합체

BT001021 및 생체활성 분자 T-030의 생체 내 약동학을 평가하기 위해 결정되었다.

[1106] 테스트 중인 약물

[1107] 약물 명칭 및 제조 방법:

[1108] BT001021에서, 액체 분취액을 -20 ℃에서 20mg/mL의 농도로 저장하였고, 사용 전에 생리식염수로 원하는 용량으로 희석하여 시험 용액을 얻었으며; T-030을 디메틸설폭시드와 함께 1 mg/mL로 제조하였고, 생리식염수로 희석하여 원하는 용량으로 시험 용액을 얻었다.

[1109] 실험 동물 및 세포주:

[1110] Balb/c-nu 마우스(Beijing Vital River Laboratory Animal Technology Co., Ltd., 생산 라이센스 번호 : SCXK(Beijing) 2016-0011); 위암 세포주 NCI-N87(ATCC).

[1111] 실험군 및 평가 방법:

[1112] 종양 부피가 100 내지 200 mm^3인 종양을 갖는 마우스(4 마리 마우스/그룹)를 무작위로 그룹화(그룹(군) 수는 샘플 수에 따라 결정됨)하고, 투여 경로는 단일 꼬리 정맥 주사였다.

[1113] **실험예 6.** 생체 내 종양-보유 마우스에서 BT001021 및 T-030의 약동학 시험

[1114] 실험 방법:

[1115] NCI-N87 세포를 37 ℃ 및 5 % CO_2에서 10 % 가열-불활성화된 태아 소 혈청을 함유한 1640 배양 배지에서 배양하였다. 지수 성장 단계에서 NCI-N87 세포를 수집하였고, 적절한 농도로 PBS에 재현탁시켰으며, 위암의 이종 이식편 모델을 구축하기 위해 Balb/c-nu 마우스에 피하로 접종하였다. 평균 종양 부피가 약 100-200 mm^3 일 때, 마우스를 생리식염수 군, T-030(0.23 mg/kg, IV, 단일 용량) 군 및 BT001021(10 mg/kg, IV, 단일 용량) 군을 종양 사이에 따라 그룹화하였고, 이어서 해당 약물의 꼬리 정맥 주사투여하였다. T-030 군의 경우, 투여 후 1 시간, 2 시간, 4 시간, 8 시간, 24 시간 및 72 시간 후에 혈청 및 종양 조직을 수집하였다(투여 72 시간 후에 혈청 및 종양 조직에서 T-030은 검출되지 않았으므로, 혈청 및 종양 조직은 투여 후 168h에 수집되지 않음). BT001021군의 경우, 혈청 및 종양 조직을 투여 후 1 시간, 2 시간, 4 시간, 8 시간, 24 시간, 72 시간 및 168 시간에 수집하여 LC-MS/MS에 의한 혈청 및 종양에서의 T-030의 농도를 시험하였다. 특정 결과가 표 9에 제시되어있다. T-030(0.23 mg/kg)의 투여량을 BT001021의 이소몰랄 용량(10mg/kg)으로 전환하였다.

[1116] [표 9] T-030 및 BT001021의 정맥 내 투여 후 종양-보유 마우스의 종양 및 혈청에서 T-030의 약동학적 파라미터

[1117]

샘플	T-030 (0.23 mg/kg) 투여군		BT001021 (10 mg/kg) 투여군	
	종양	혈청	종양	혈청
AUC_{last} (h*ng/ml)	3.85	5.58	850.1	174.97
C_{max} (ng/ml)	1.20	1.81	7.82	11.7
MRT_{INF} (h)	1.52	1.11	64.24	42.9
T_{max} (h)	1.00	1.00	8.00	1.00
$T_{1/2}$ (h)	2.55	1.76	93.14	44.35

[1118] BT001021(10mg/kg) 투여군의 종양 및 혈청에서 약물의 AUC_{last}는 각각 850.1 h*ng/mL 및 174.97 h*ng/mL인 반면, T-030 투여군의 종양 및 혈청에서 약물의 AUC_{last}는 각각 3.85 h*ng/mL 및 5.58 h*ng/mL였다. 비교는 BT001021 투여군의 T-030의 노출량이 T-030 투여군의 노출량과 비교하여 상당히 증가되었음을 나타냈다. 또한, BT001021 투여군의 종양에서 생체활성 분자 T-030의 노출량은 혈청의 것보다 현저하게 높았으며, 반면 혈청에서의 생체활성 분자 및 T-030 투여군의 종양의 노출량은 항체 약물 접합체(BT001021)가 높은 종양 조직 표적성을 갖는다고 나타내는 것은 기본적으로 동일하였다.

[1119] BT001021(10mg/kg) 투여군의 종양 및 혈청에서 생체활성 분자 T-030의 C_{max}는 각각 7.82 ng/mL 및 11.7 ng/mL

인 반면, T-030 투여군의 종양 및 혈청에서 생체활성 분자 T-030의 C_{max}는 각각 1.20 ng/mL 및 1.81 ng/mL였으며, 이는 항체 약물 접합체(BT001021)가 종양 조직 및 혈청에서 더 높은 농도의 생체활성 분자(T-030)를 가짐을 나타낸다.

[1120] BT001021(10mg/kg) 투여군의 종양에서 생체활성 분자 T-030의 $T_{1/2}$는 93.14 시간인 반면, T-030 투여군의 종양에서 생체활성 분자 T-030의 $T_{1/2}$는 2.55 시간이며, 이는 항체 약물 접합체(BT001021)가 종양 조직에서 더 긴 반감기를 가짐을 나타낸다.

[1121] 결론적으로, BT001021은 대응하는 생체활성 분자(T-030)와 비교하여 현저한 종양 조직 표적화 및 우수한 약동학적 특성을 가졌다.

[1122] **실험예 7.** 생체 내 항체 약물 접합체 BT001021 및 Immu-132의 약동학 시험

[1123] 실험에서, 종양-보유 마우스 모델은 Balb/c-nu 마우스에 대한 인간 위암 세포주 NCI-N87의 피하 이종 이식편에 의해 구축되었다. 종양 부피가 100-200 mm^3 인 후, 마우스를 무작위로 그룹화하고, 단일 용량의 BT001021 및 Immu-132를 정맥 내 투여하였다. 종양 조직 및 혈청에서 BT001021 및 Immu-132에 대응하는 생체활성 분자 T-030 및 SN-38의 농도를 각각 측정하여 생체 내에서 종양-보유 마우스에서 항체 접합체 BT001021 및 Immu-132의 약동학을 평가하였다.

[1124] 테스트중인 약물

[1125] 약물 명칭 및 준비 방법:

[1126] BT001021에서, 액체 분취액을 -20 ℃에서 20mg/mL의 농도로 저장하였고, 사용 전에 생리식염수로 원하는 용량으로 희석하여 시험 용액을 얻었다;

[1127] Immu-132를 생리식염수로 원하는 용량으로 희석하여 시험 용액을 얻었다.

[1128] 실험 동물 및 세포주:

[1129] Balb/c-nu 마우스(Beijing Vital River Laboratory Animal Technology Co., Ltd., 생산 라이센스 번호 : SCXK(Beijing) 2016-0011); 위암 세포주 NCI-N87(ATCC).

[1130] 실험군 및 평가 방법:

[1131] 종양 부피가 100 내지 200 mm3 인 종양을 갖는 마우스(4 마리 마우스/군)를 무작위로 그룹화(그룹 수는 샘플 수에 따라 결정됨)하고, 투여 경로는 단일 꼬리 정맥 주사였다.

[1132] 실험 방법:

[1133] NCI-N87 세포를 37 ℃ 및 5 % CO_2에서 10 % 가열-불활성화된 태아 소 혈청을 함유한 1640 배양 배지에서 배양하였다. 지수 성장 단계에서 NCI-N87 세포를 수집하였고, 적절한 농도로 PBS에 재현탁시키고, 위암의 이종 이식 모델을 구축하기 위해 Balb/c-nu 마우스에 피하로 접종하였다. 평균 종양 부피가 약 100-200 mm^3 일 때, 마우스를 종양 사이즈에 따라 BT001021(5 mg/kg, IV, 단일 용량) 군 및 Immu-132(5 mg/kg, IV, 단일 용량) 군으로 무작위로 그룹화하였고, 이어서 해당 약물의 꼬리 정맥 주사하였다. 혈청 및 종양 조직을 각각 투여 후, 2 시간, 24 시간, 48 시간 및 72 시간에 LC-MS/MS에 의해 수집하여 혈청 및 종양 중의 T-030 또는 SN-38의 농도를 시험하였다.

[1134] [표 10] BT001021 및 Immu-132의 정맥 내 투여 후 종양 보유 마우스의 종양 및 혈청에서 T-030 및 SN-38의 약동학적 파라미터

섭생	Immu-132 (5 mg/kg) 투여군		BT001021 (5 mg/kg) 투여군	
	종양	혈청	종양	혈청
AUC_{last} (h*ng/ml)	116.8	422.7	427.2	115.3
C_{max} (ng/ml)	2.8	19.58	6.8	5.08
MRT_{last} (h)	21.5	15.66	31.9	17.6

[1135]

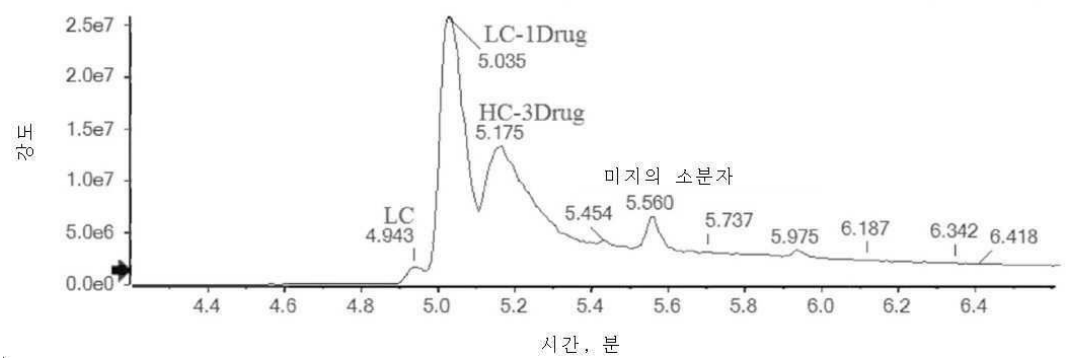
[1136] 결론:

[1137] BT001021 투여군의 종양 및 혈청에서 작은 톡신 분자의 AUC_{last}는 각각 427.2 h*ng/mL 및 115.3 h*ng/mL 인 반면, Immu-132 투여군의 종양 및 혈청에서 작은 톡신 분자의 AUClast는 116.8h*ng/mL 및 422.7 h*ng/mL이었다. BT001021 투여군의 종양에서 작은 톡신 분자의 C_{max}는 6.8 ng/mL 인 반면, Immu-132 투여군의 종양에서 작은 톡신 분자의 C_{max}는 2.8 ng/mL였다. 결과는 BT001021이 Immu-132와 비교하여 더 나은 종양 조직 표적화, 더 나은 약동학적 특성 및 더 나은 치료적 범위를 갖는다는 보여 주었다.

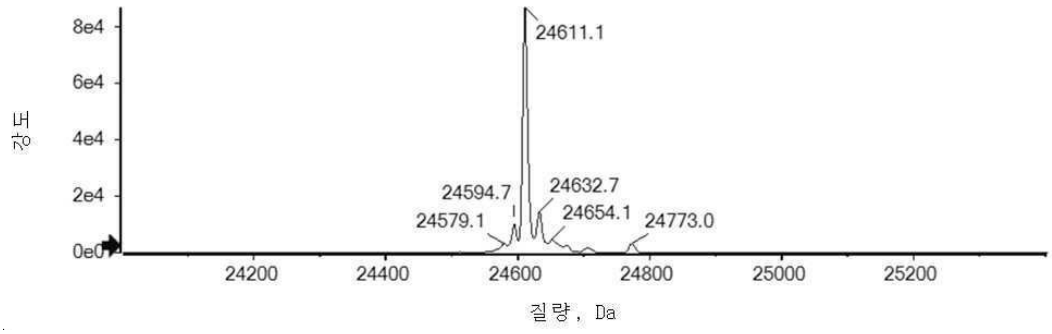
[1138] 본 발명을 수행하기 위한 구체적인 설명이 상세하게 기술되어 있지만, 당해 기술 분야의 통상의 기술자는, 모든 공개된 교시내용에 따라 세부 사항에 대해 다양한 변형 및 대체가 이뤄질 수도 있고, 이러한 변형은 본 발명의 보호 범위 내에 있음을 이해하여야 한다. 본 발명의 전 범위는 첨부된 청구범위 및 그의 균등물에 의해 제공된다.

도면

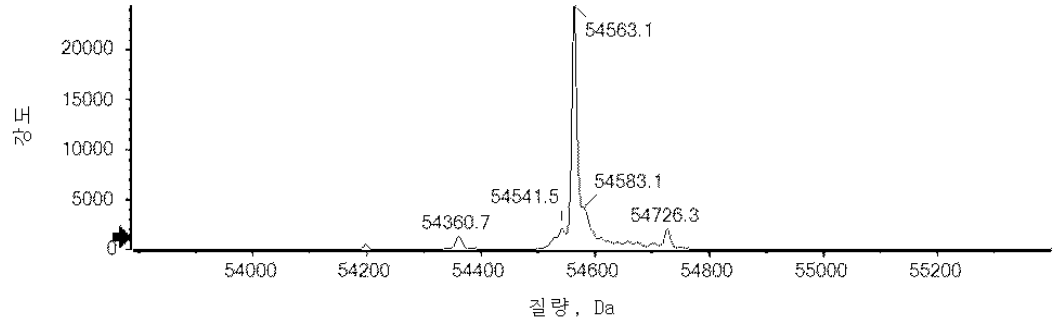
도면1



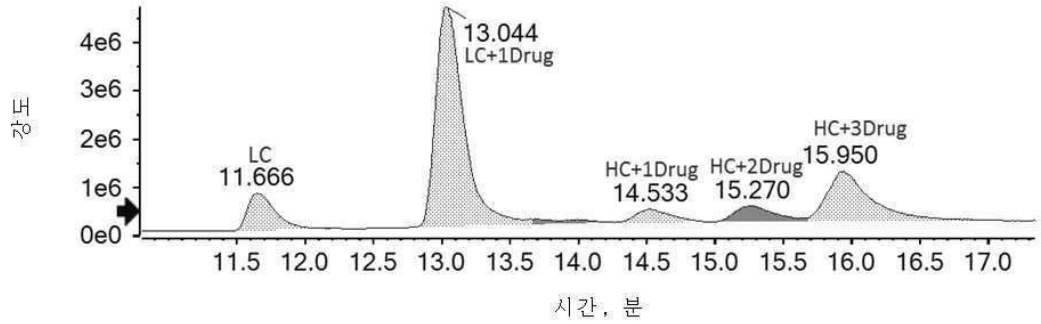
도면2



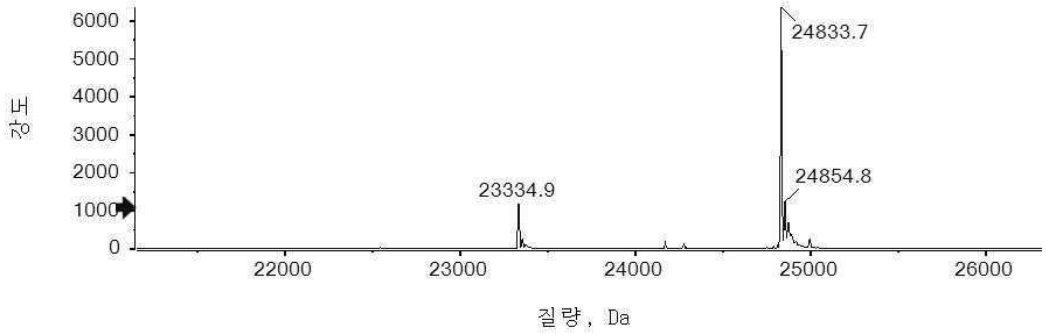
도면3


54563.1
54583.1
54541.5
54726.3
54360.7
강도
20000
15000
10000
5000
0
54000
54200
54400
54600
54800
55000
55200
질량, Da

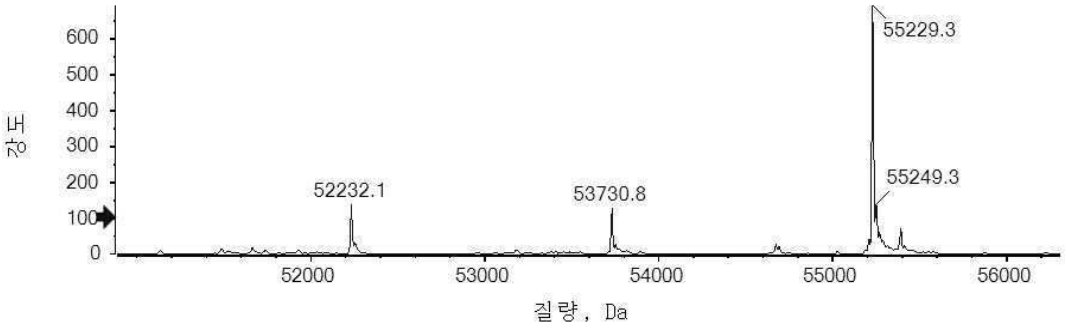
도면4


13.044
LC+1Drug
LC
11.666
HC+1Drug
14.533
HC+2Drug
15.270
HC+3Drug
15.950
강도
4e6
3e6
2e6
1e6
0e0
11.5
12.0
12.5
13.0
13.5
14.0
14.5
15.0
15.5
16.0
16.5
17.0
시간, 분

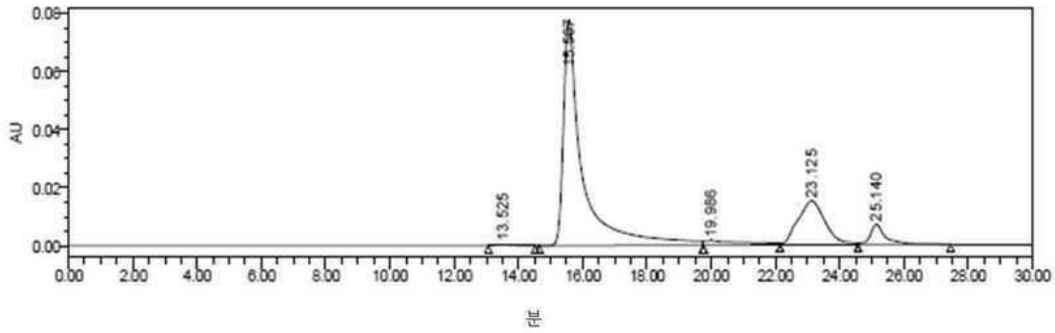
도면5


24833.7
24854.8
23334.9
강도
6000
5000
4000
3000
2000
1000
0
22000
23000
24000
25000
26000
질량, Da

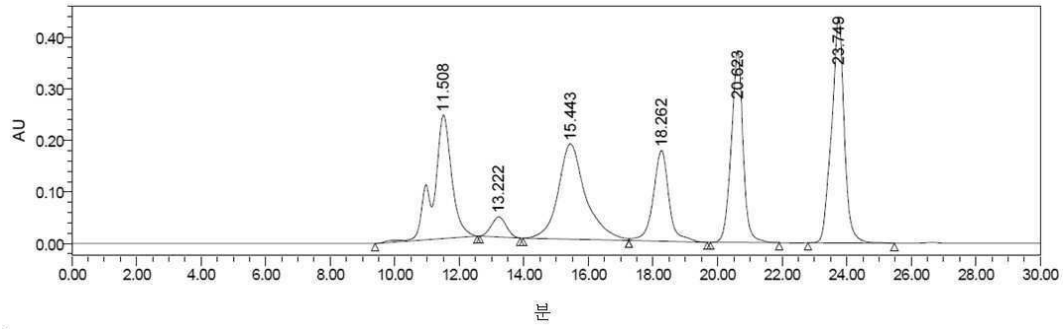
도면6



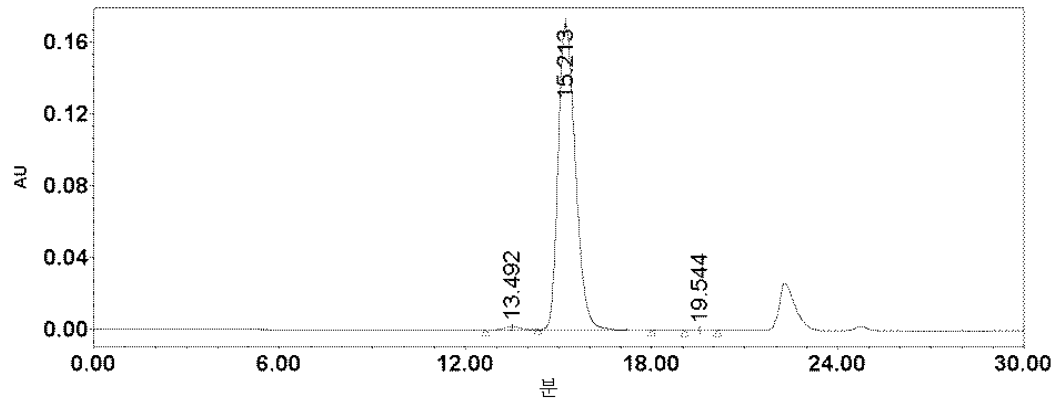
도면7



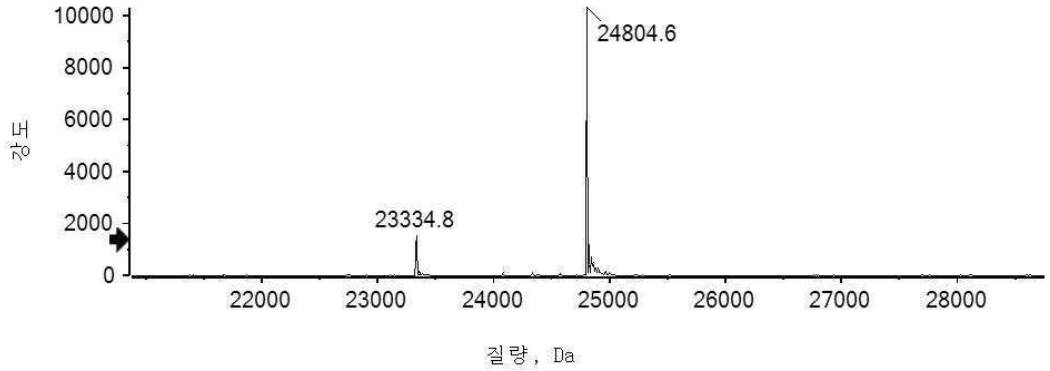
도면8



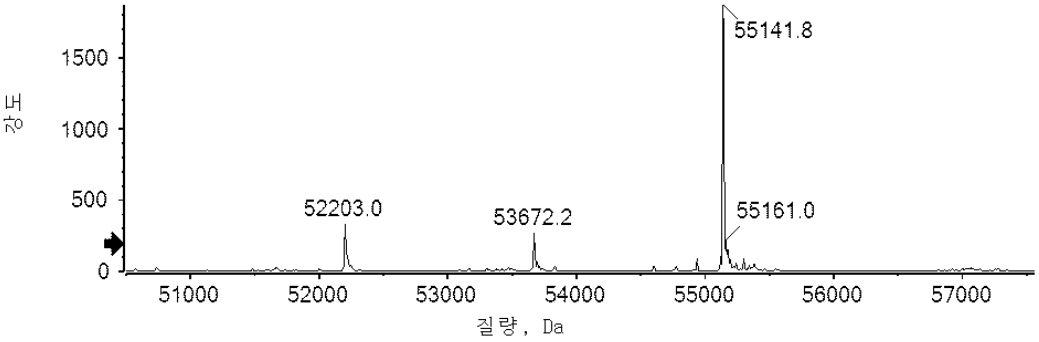
도면9



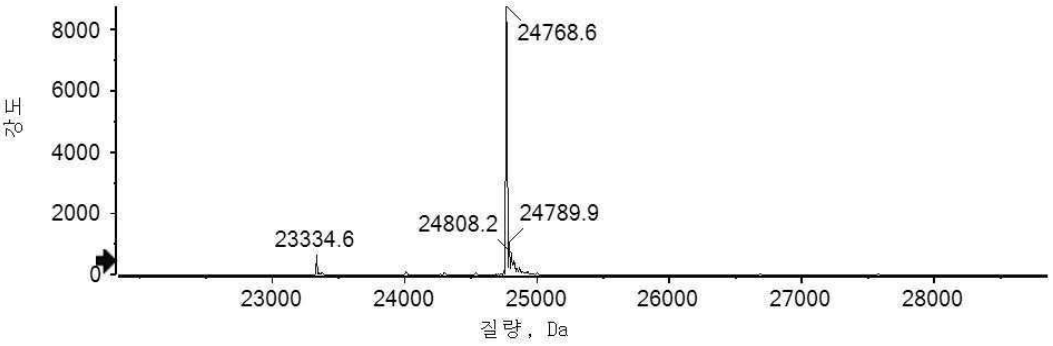
도면10



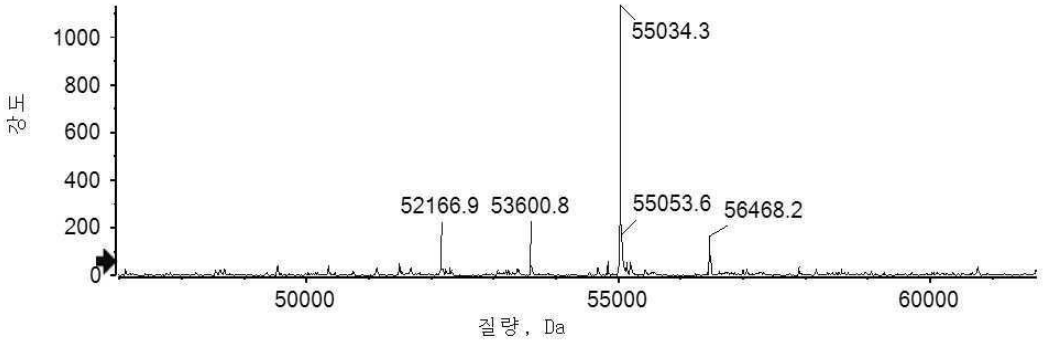
도면11



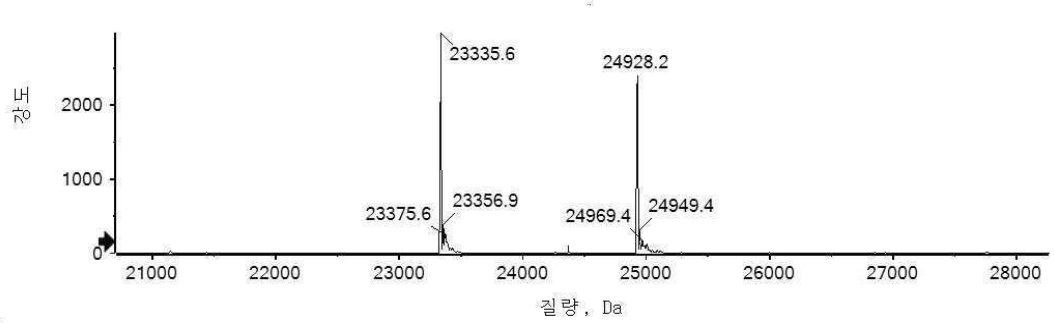
도면12



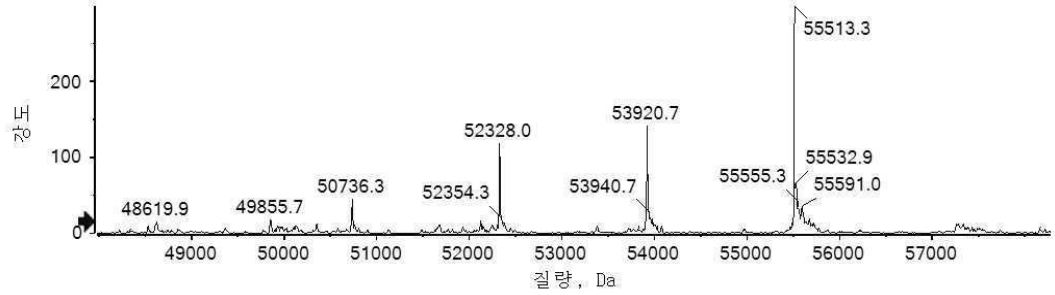
도면13



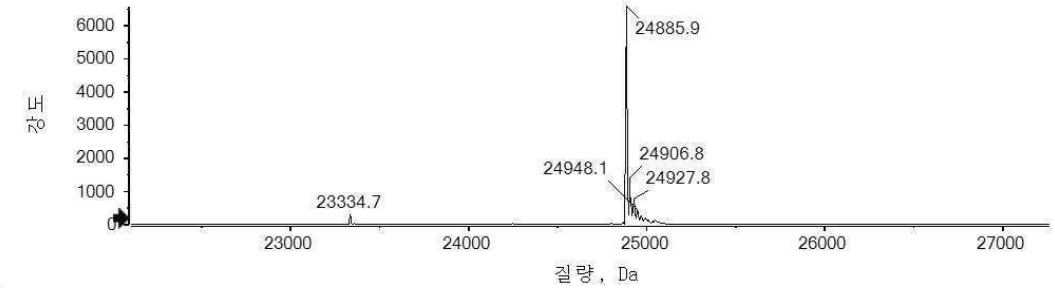
도면14



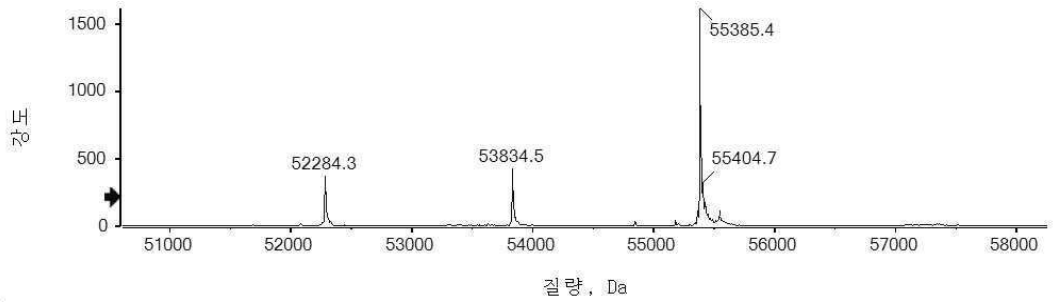
도면15



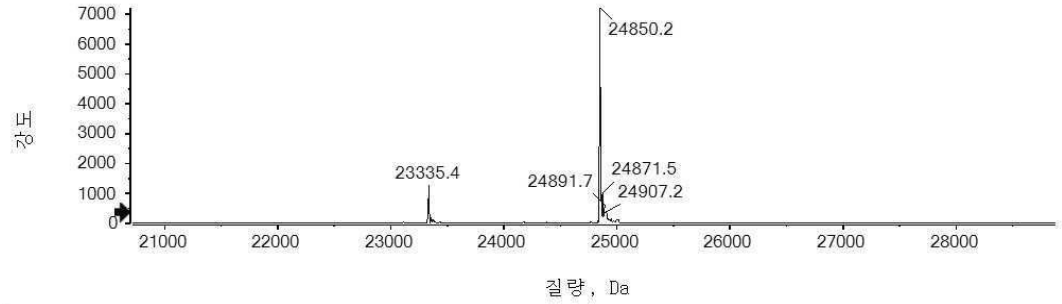
도면16



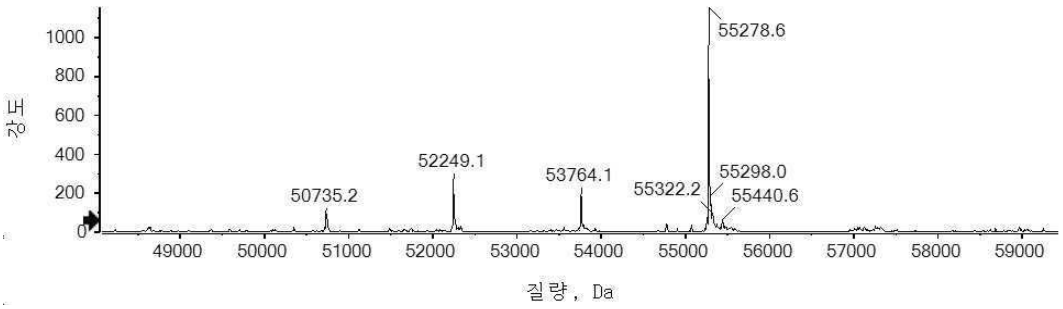
도면17



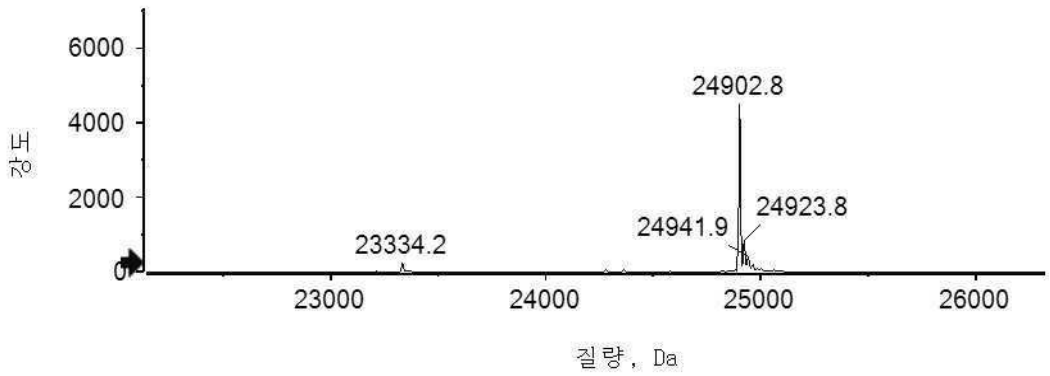
도면18



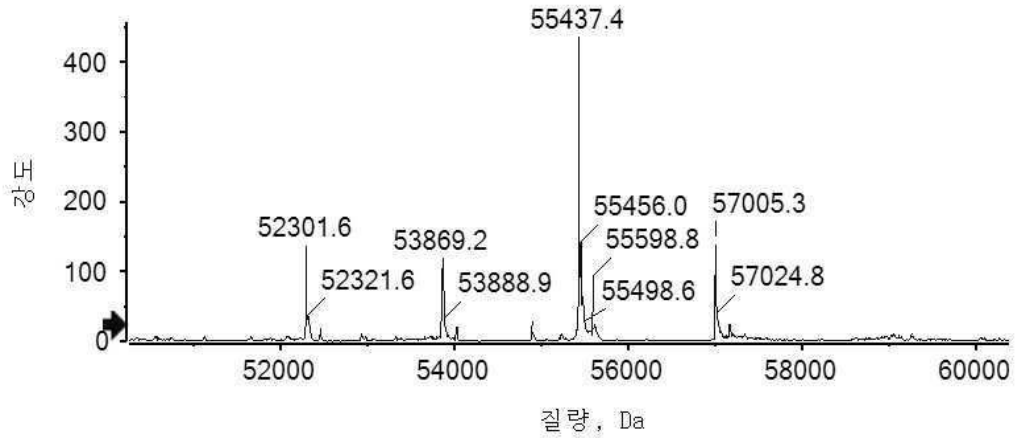
도면19



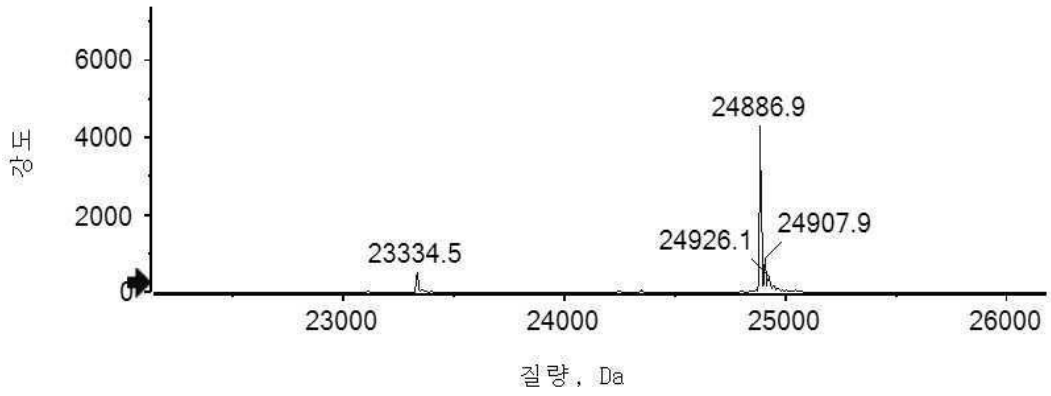
도면20



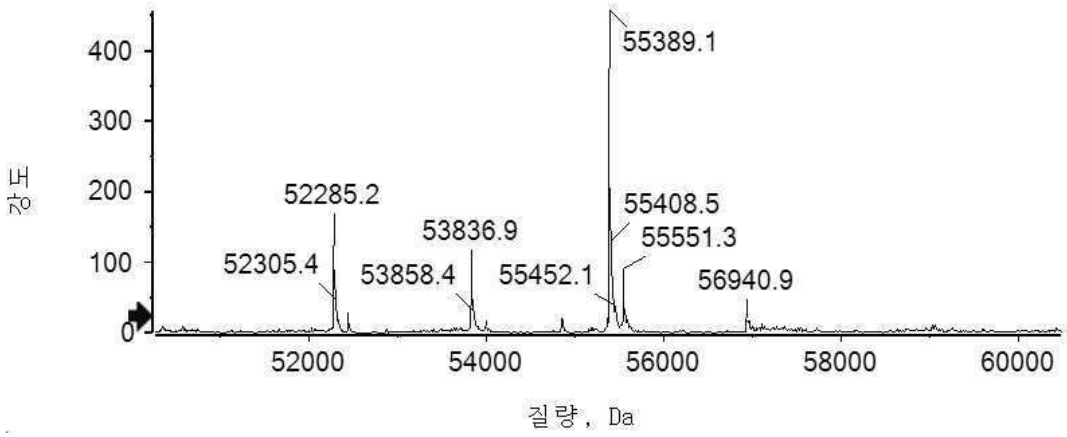
도면21



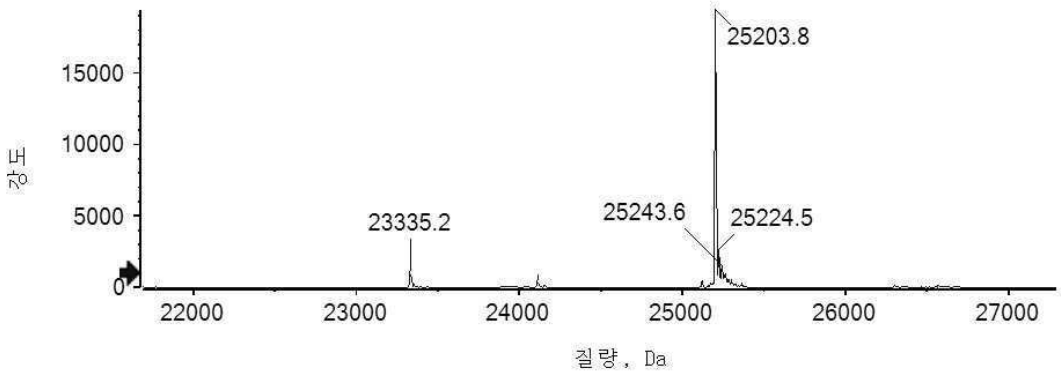
도면22



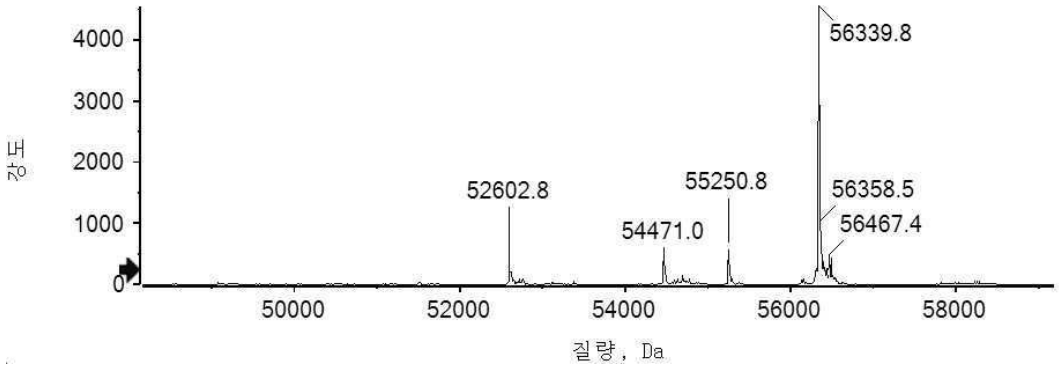
도면23



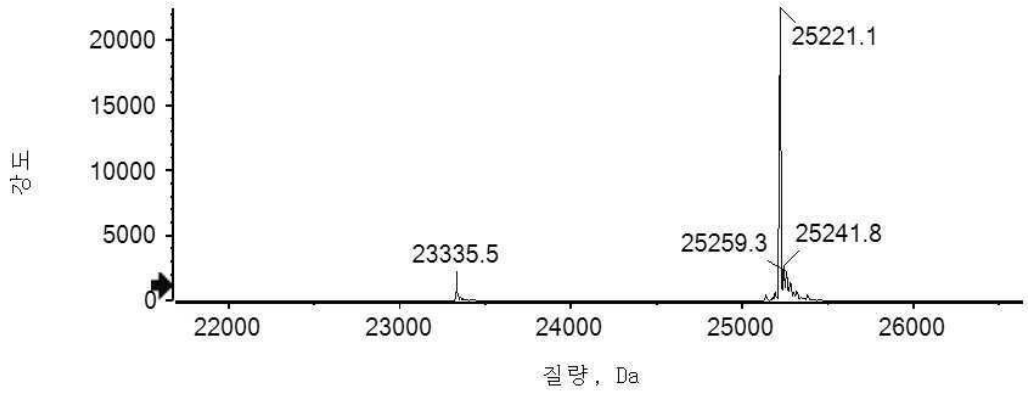
도면24



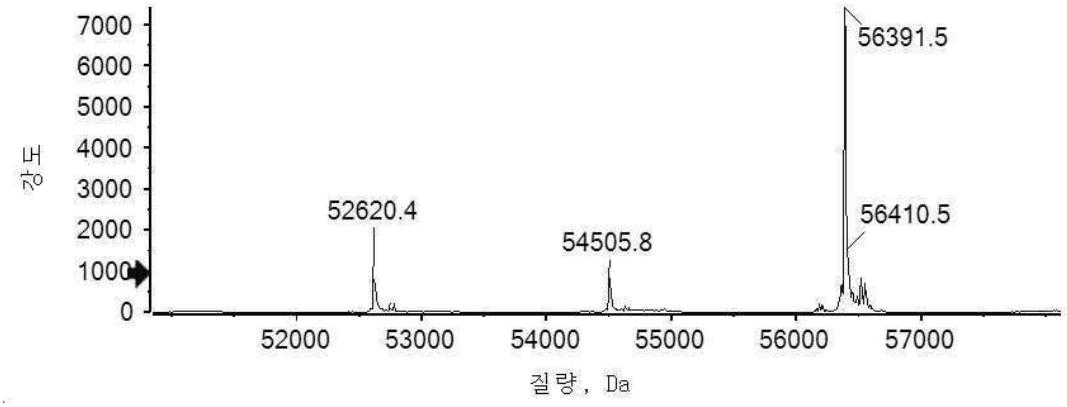
도면25



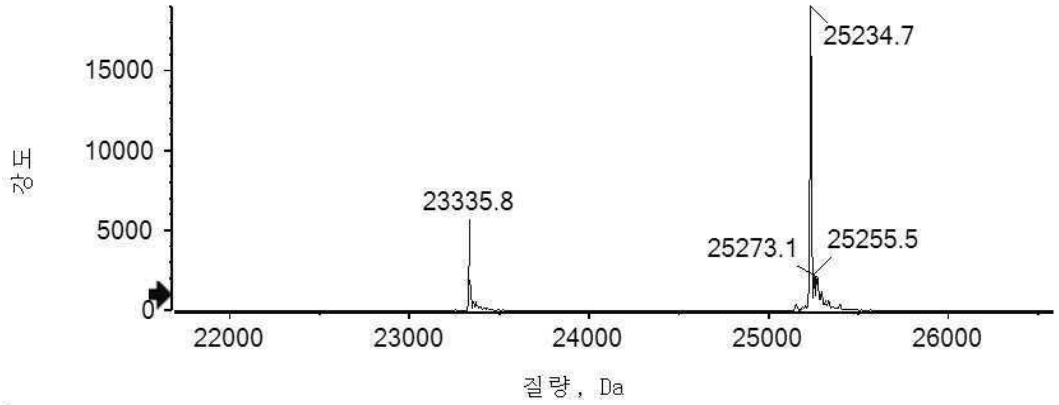
도면26



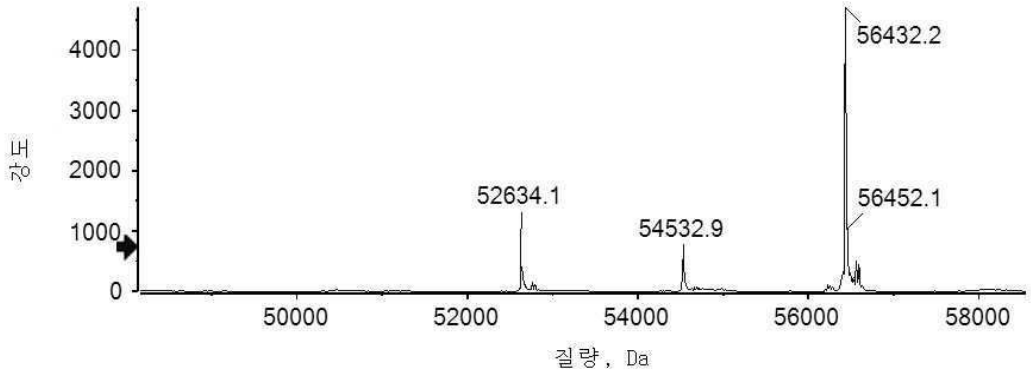
도면27



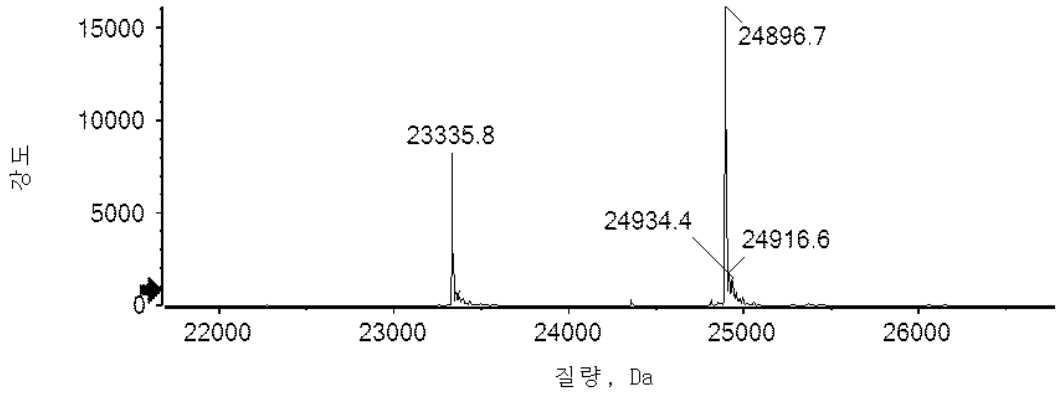
도면28



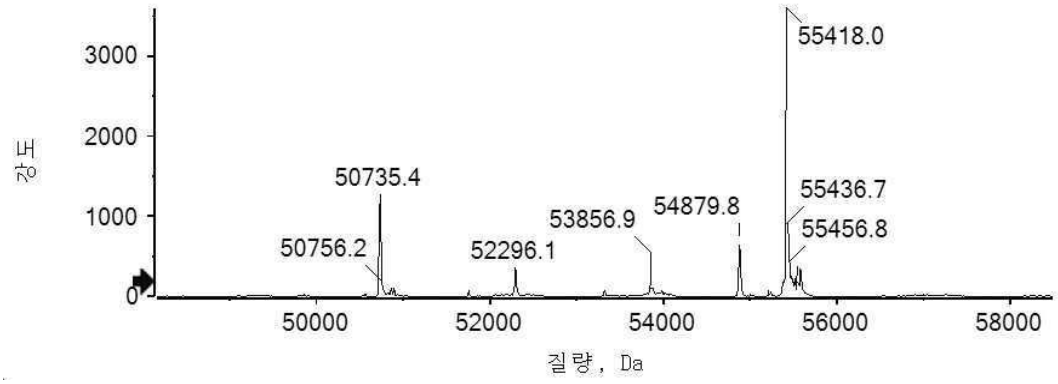
도면29



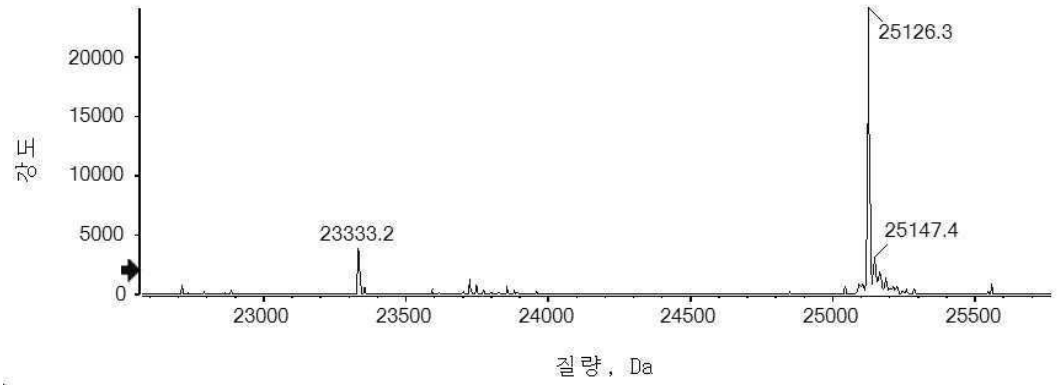
도면30



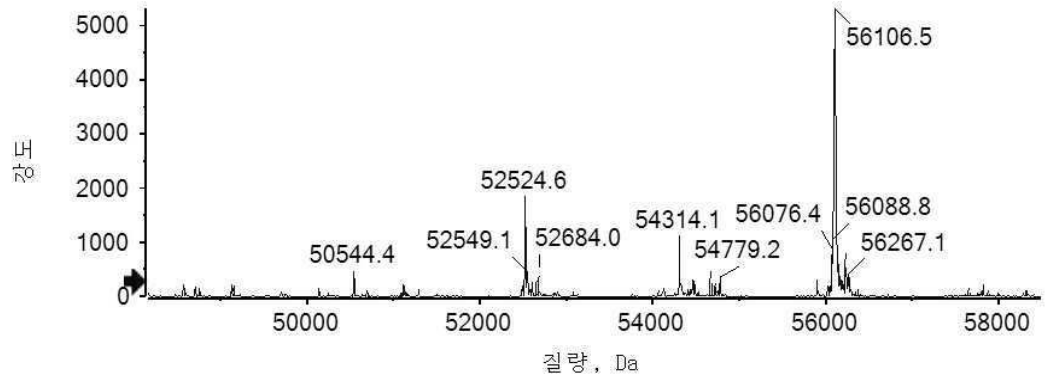
도면31



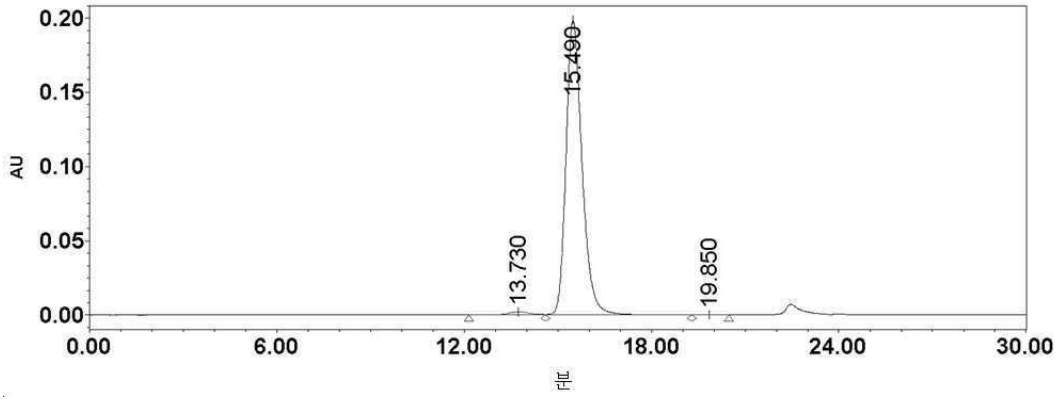
도면32



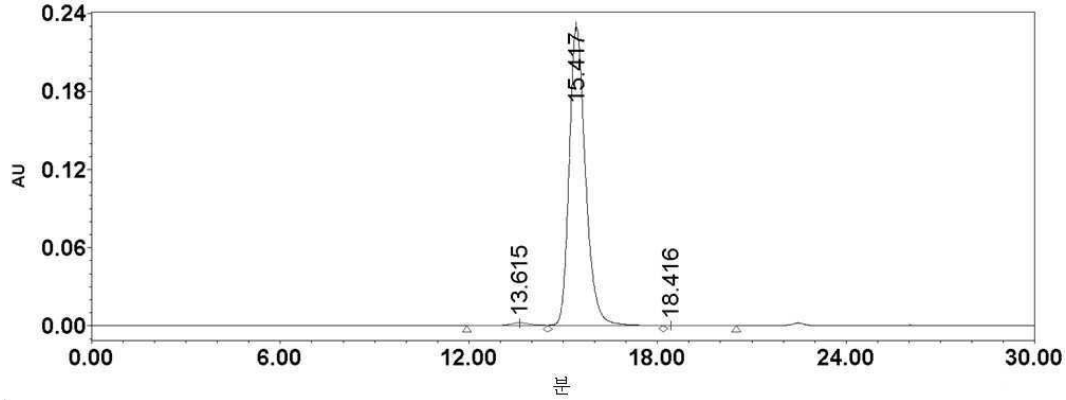
도면33



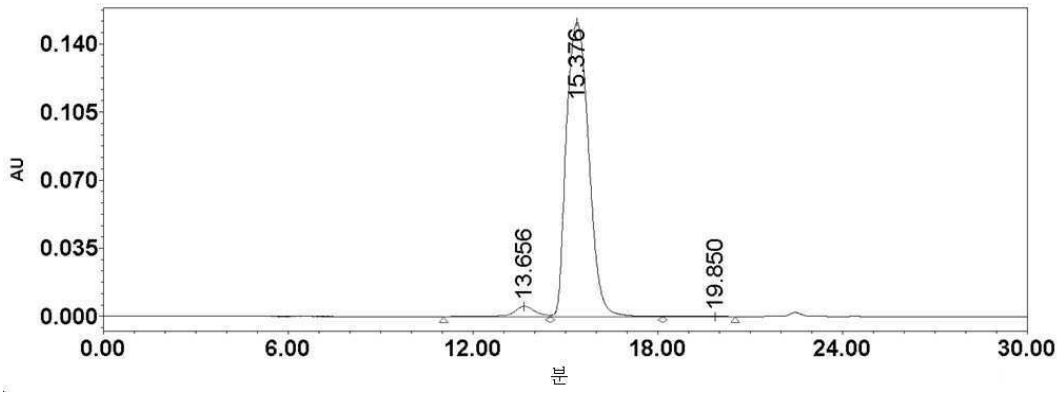
도면34



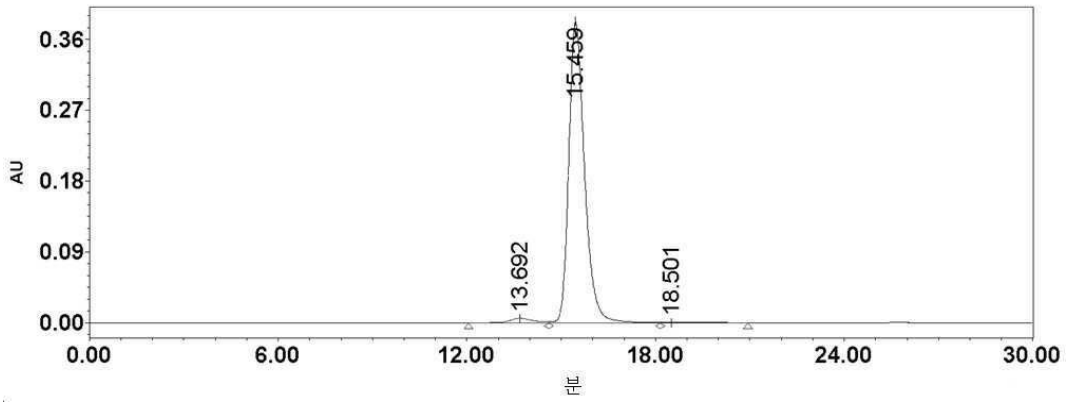
도면35



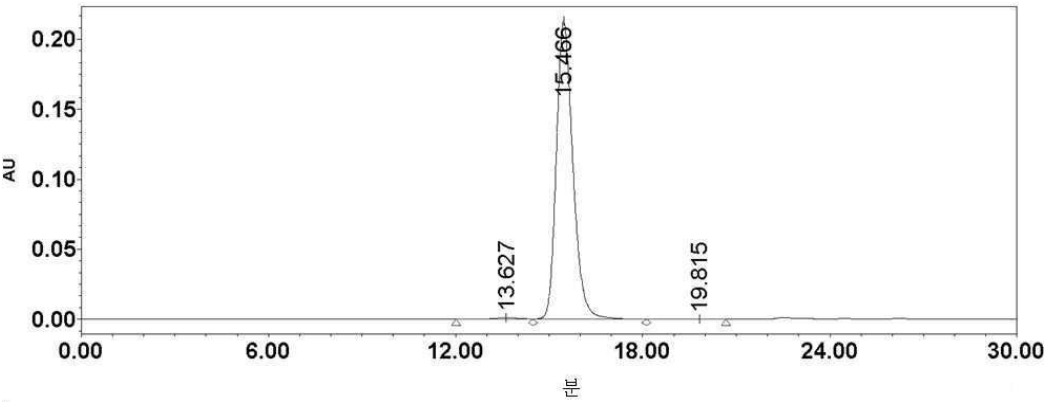
도면36



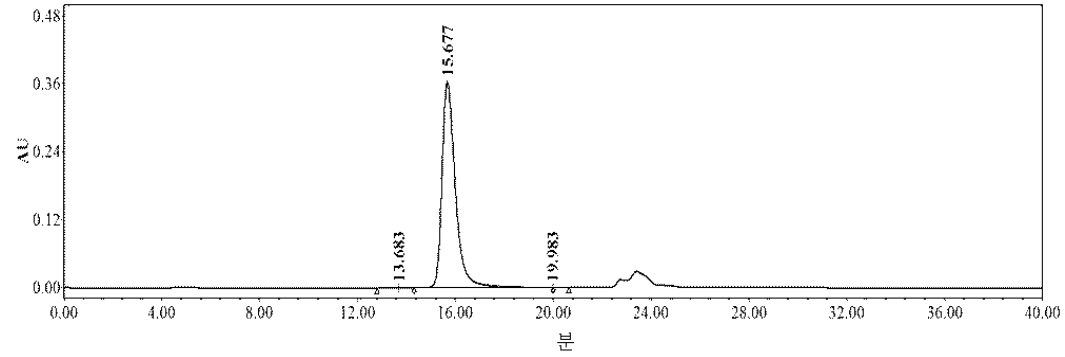
도면37



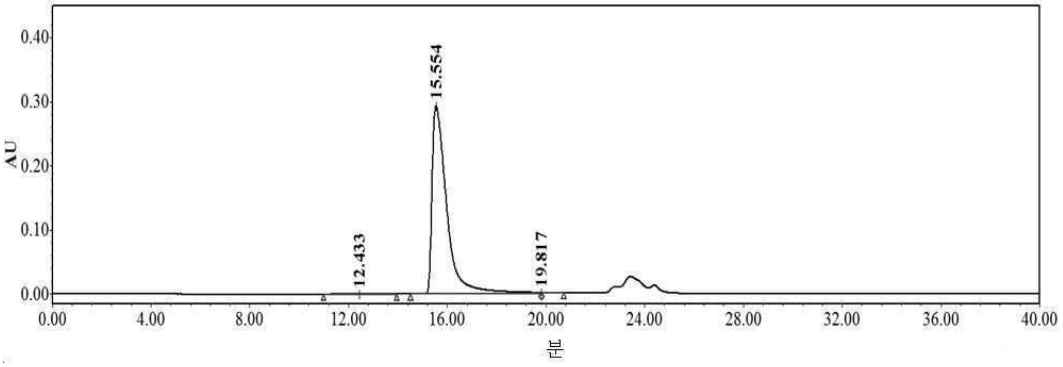
도면38



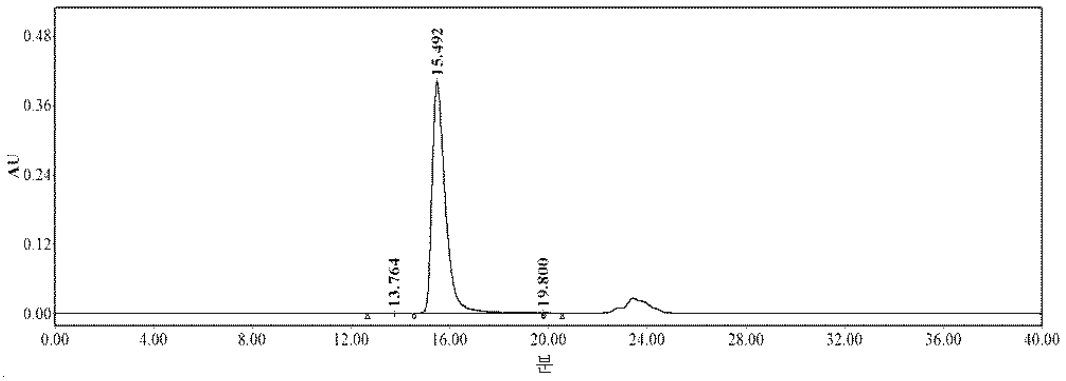
도면39



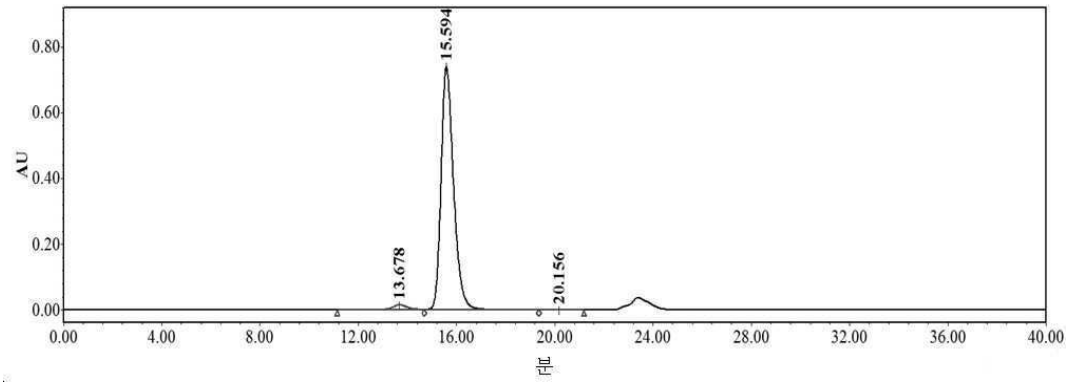
도면40



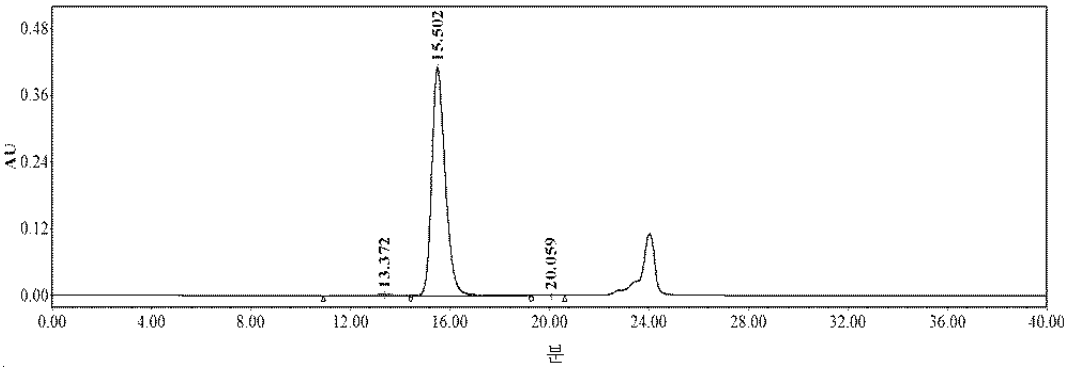
도면41



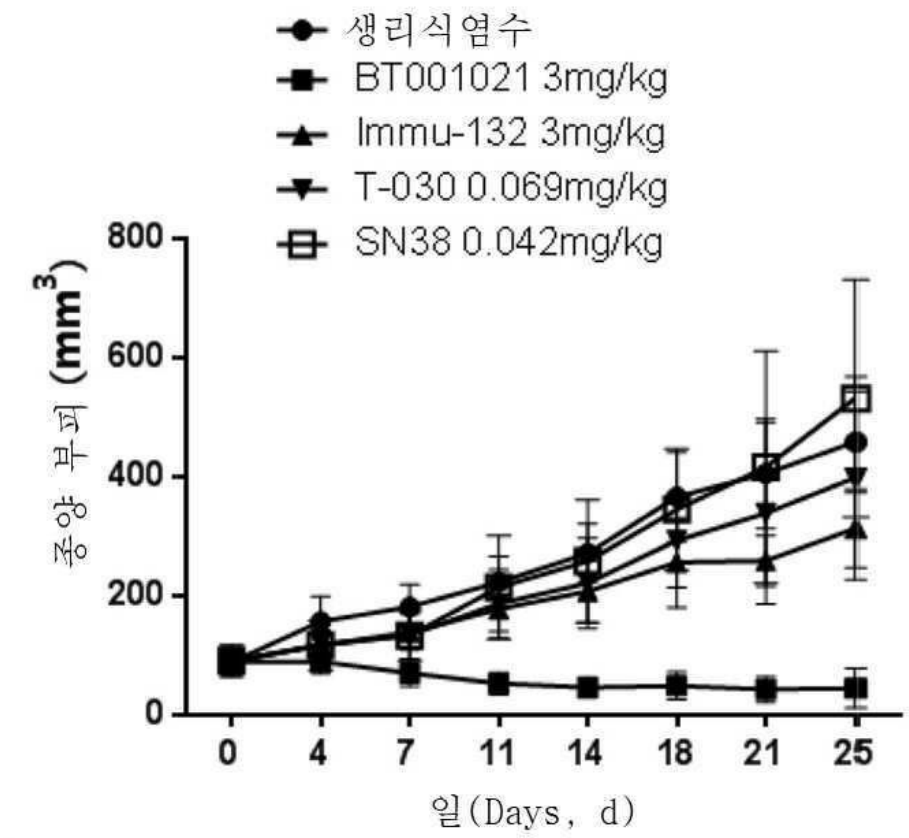
도면42


15.594
13.678
20.156
AU
0.80
0.60
0.40
0.20
0.00
0.00
4.00
8.00
12.00
16.00
20.00
24.00
28.00
32.00
36.00
40.00
분

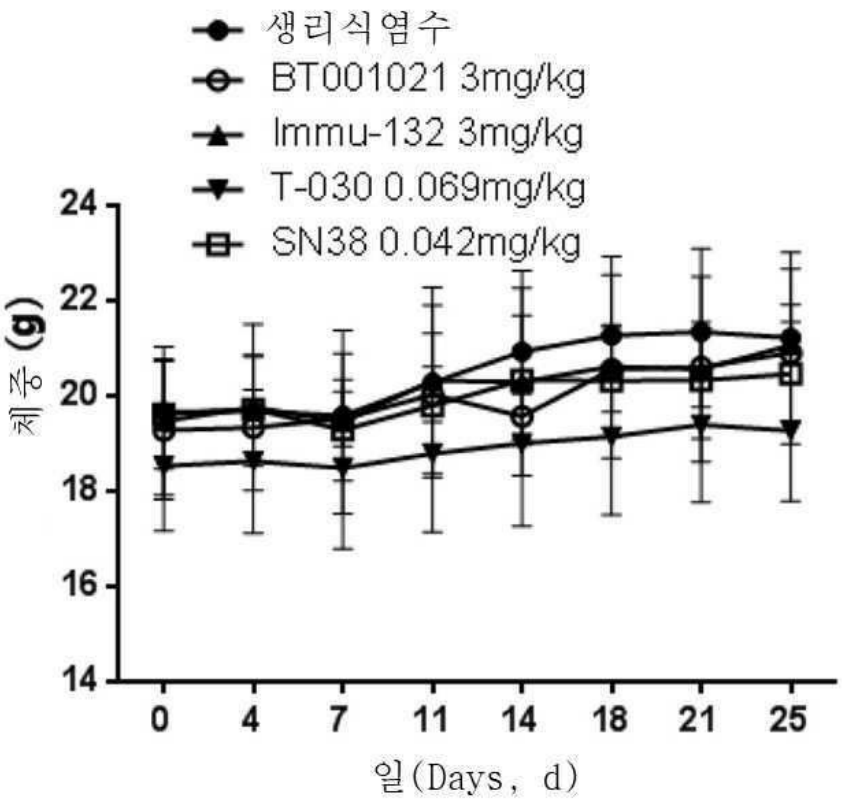
도면43


15.502
13.372
20.059
AU
0.48
0.36
0.24
0.12
0.00
0.00
4.00
8.00
12.00
16.00
20.00
24.00
28.00
32.00
36.00
40.00
분

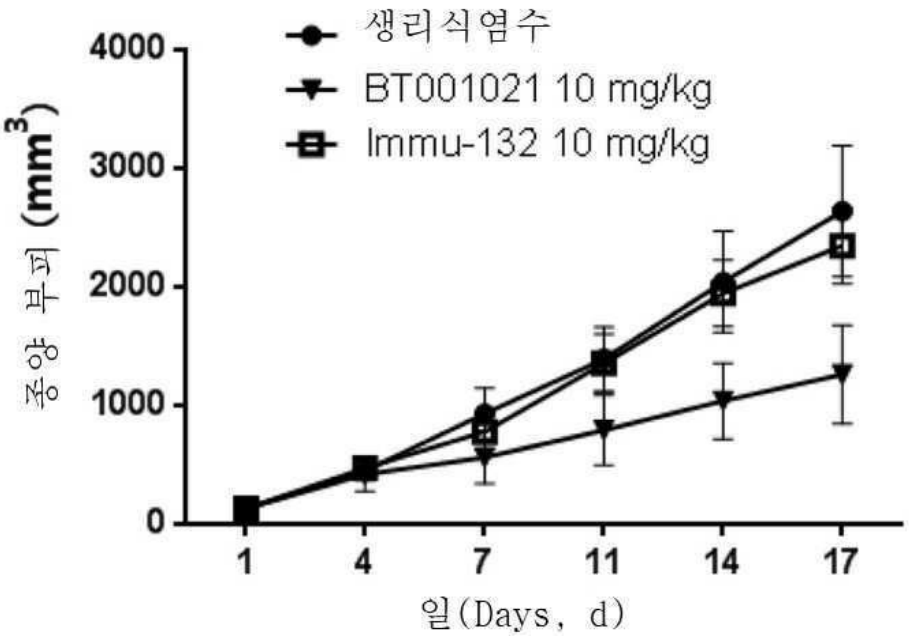
도면44


생리식염수
BT001021 3mg/kg
Immu-132 3mg/kg
T-030 0.069mg/kg
SN38 0.042mg/kg
종양 부피 (mm3)
800
600
400
200
0
0
4
7
11
14
18
21
25
일(Days, d)

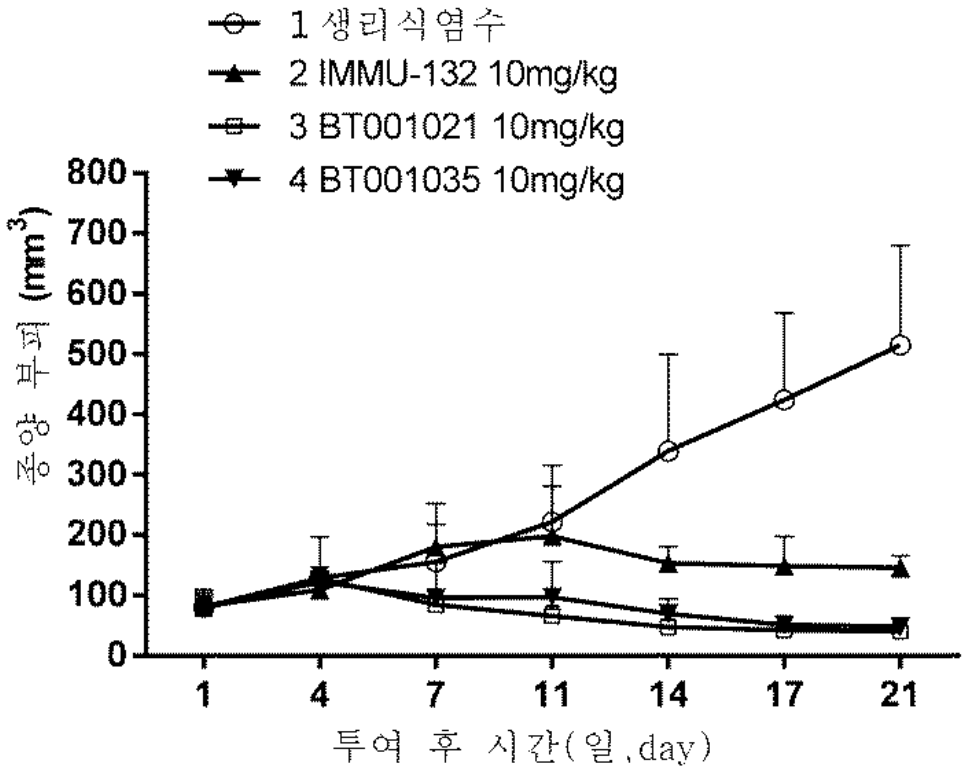
도면45


생리식염수
BT001021 3mg/kg
Immu-132 3mg/kg
T-030 0.069mg/kg
SN38 0.042mg/kg
체중 (g)
24
22
20
18
16
14
0
4
7
11
14
18
21
25
일(Days, d)

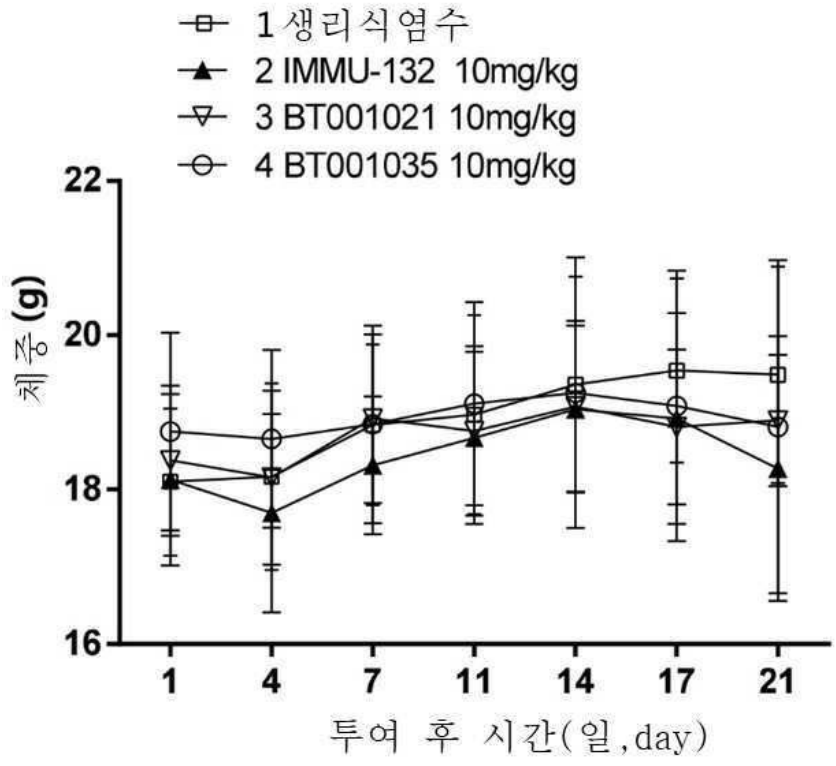
도면46


생리식염수
BT001021 10 mg/kg
Immu-132 10 mg/kg
종양 부피 (mm3)
4000
3000
2000
1000
0
1
4
7
11
14
17
일(Days, d)

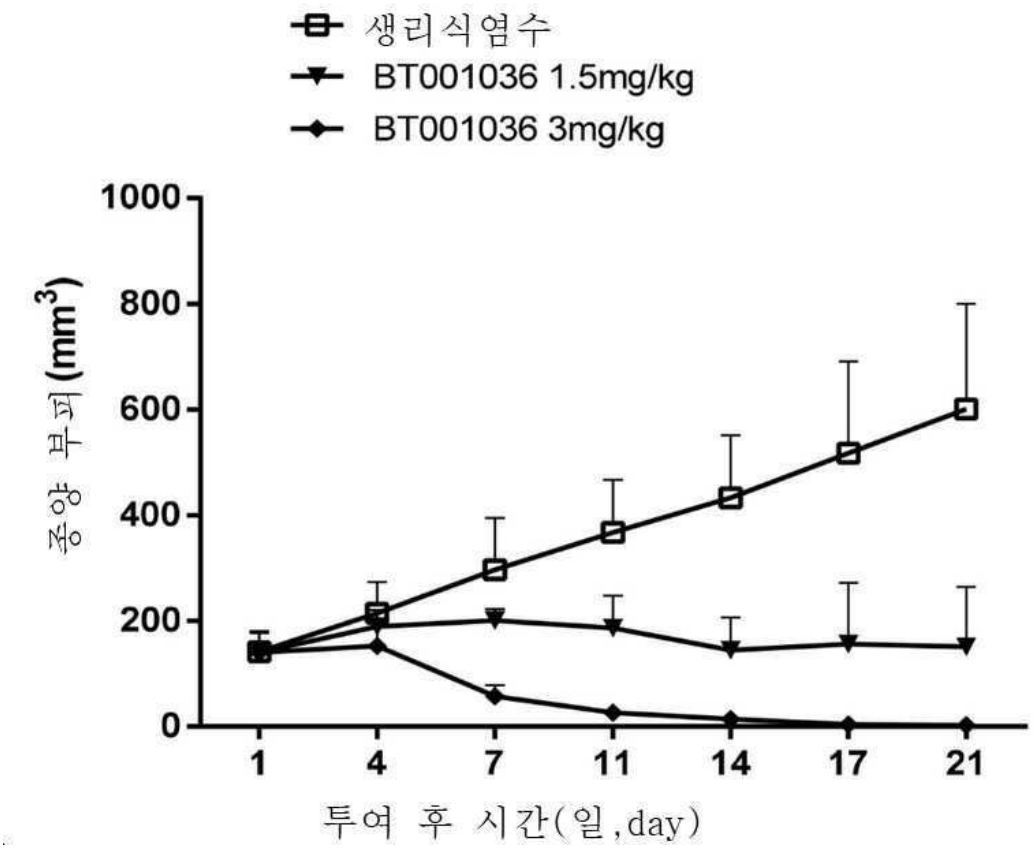
도면47a


1 생리식염수
2 IMMU-132 10mg/kg
3 BT001021 10mg/kg
4 BT001035 10mg/kg
종양 부피 (mm3)
800
700
600
500
400
300
200
100
0
1
4
7
11
14
17
21
투여 후 시간(일,day)

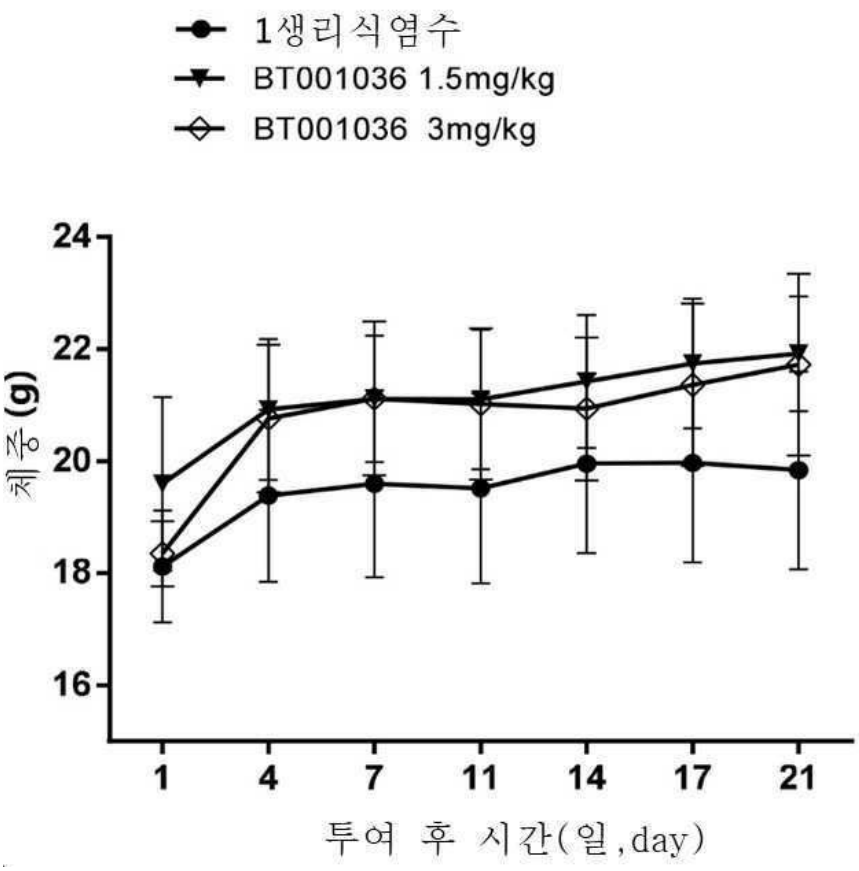
도면47b


1 생리식염수
2 IMMU-132 10mg/kg
3 BT001021 10mg/kg
4 BT001035 10mg/kg
체중 (g)
22
20
18
16
1
4
7
11
14
17
21
투여 후 시간(일,day)

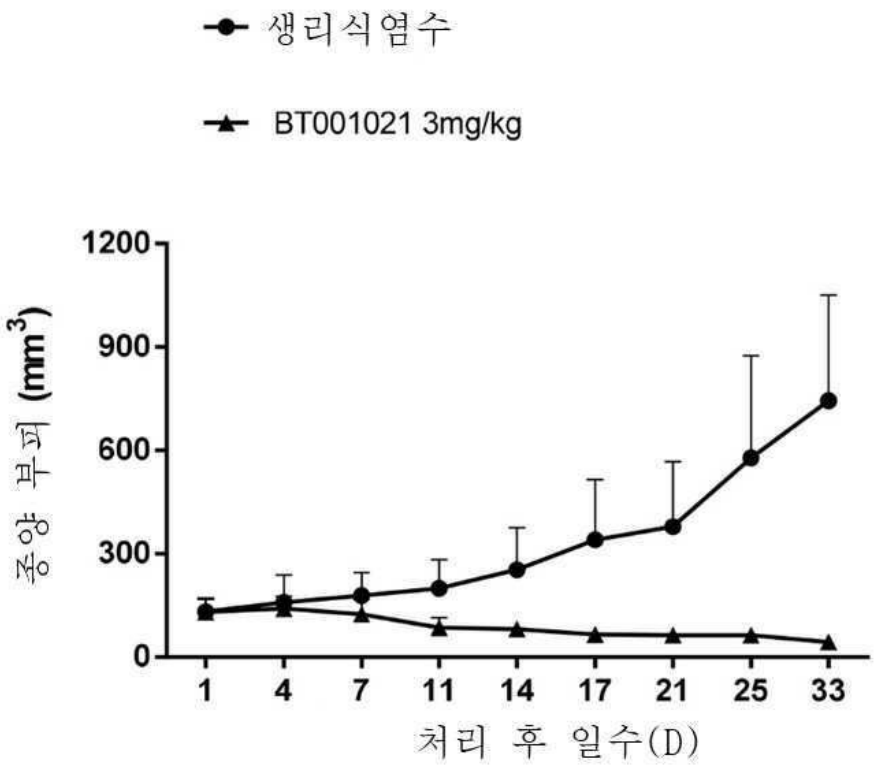
도면48a


생리식염수
BT001036 1.5mg/kg
BT001036 3mg/kg
종양 부피 (mm3)
1000
800
600
400
200
0
1
4
7
11
14
17
21
투여 후 시간(일,day)

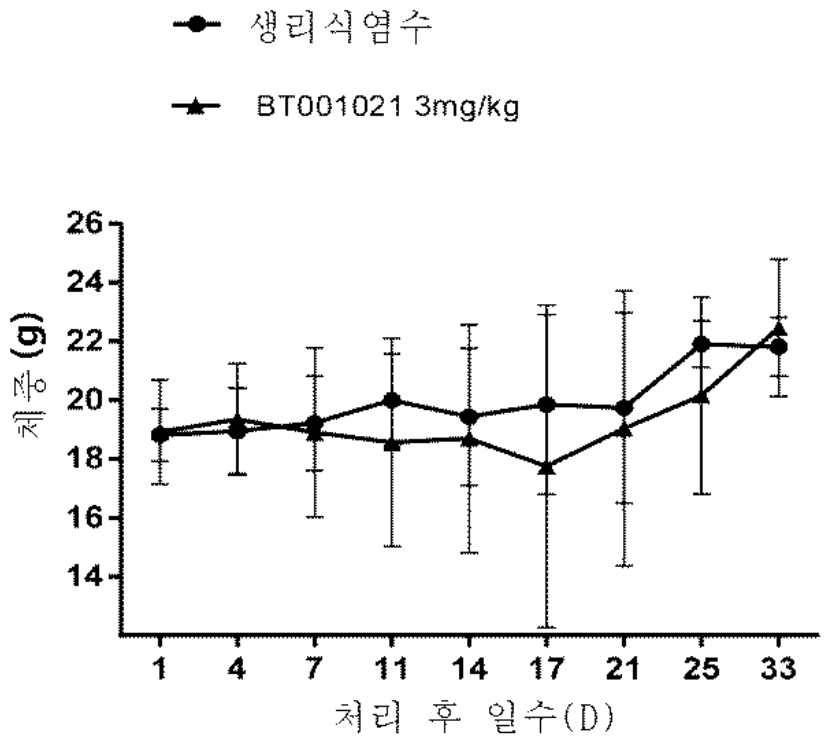
도면48b


1생리식염수
BT001036 1.5mg/kg
BT001036 3mg/kg
체중(g)
24
22
20
18
16
1
4
7
11
14
17
21
투여 후 시간(일, day)

도면49a



도면49b



서 열 목 록

SEQUENCE LISTING

<110> SICHUAN KELUN-BIOTECH BIOPHARMACEUTICAL CO., LTD.

<120> Bioactive Molecule Conjugate, Preparation Method and Use Thereof

<130> IEC170149PCT

<150> CN 201711347535.6

<151> 2017-12-15

<150> CN 201810230346.9

<151> 2018-03-20

<150> CN 201811071947.6

<151> 2018-09-14

<160> 20

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 7

<212> PRT

<213> artificial

<220><223> Heavy chain CDR1 of antibodies of M1, M2 and M3

<400> 1

Gly Tyr Thr Phe Thr Asn Tyr

1 5

<210> 2

<211> 6

<212> PRT

<213> artificial

<220><223> Heavy chain CDR2 of antibodies of M1, M2 and M3

<400> 2

Asn Thr Asp Ser Gly Glu

1 5

<210> 3

<211> 12

<212> PRT

<213> artificial

<220><223> Heavy chain CDR3 of antibodies of M1, M2 and M3

<400> 3

Gly Gly Phe Gly Ser Ser Tyr Trp Tyr Phe Asp Val

1 5 10

<210> 4

<211> 11

<212> PRT

<213> artificial

<220><223> Light chain CDR1 of antibodies of M1 and M2

<400> 4

Lys Ala Ser Gln Asp Val Ser Ser Ala Val Ala

1 5 10

<210> 5

<211> 7

<212> PRT

<213> artificial

<220><223> Light chain CDR2 of antibodies of M1, M2 and M3

<400> 5

Ser Ala Ser Tyr Arg Tyr Thr

1 5

<210> 6

<211> 9

<212> PRT

<213> artificial

<220><223> Light chain CDR3 of antibodies of M1 and M3

<400> 6

Gln Gln His Tyr Ser Thr Pro Leu Thr

1 5

<210> 7

<211> 9

<212> PRT

<213> artificial

<220><223> Light chain CDR3 of antibody M2

<400> 7

Gln Gln His Tyr Ile Thr Pro Leu Thr

1 5

<210> 8

<211> 11

<212> PRT

<213> artificial

<220><223> Light chain CDR1 of antibody M3

<400> 8

Lys Ala Ser Gln Asp Val Ser Ile Ala Val Ala

1 5 10

<210> 9

<211> 107

<212> PRT

<213> artificial

<220><223> Light chain constant region of antibodies of M1, M2 and M3

<400> 9

Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu

1 5 10 15

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

20 25 30

Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln

35 40 45

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

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys

100 105

<210> 10

<211> 330

<212> PRT

<213> artificial

<220><223> Heavy chain constant region of antibodies of M1, M2 and M3

<400> 10

Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys

1 5 10 15

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

20 25 30

Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser

35 40 45

Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser

50 55 60

Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr

65 70 75 80

Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys

85 90 95

Arg Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys

100 105 110

Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro

115 120 125

Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys

130 135 140

Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp

145 150 155 160

Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu

165 170 175

Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu

180 185 190

His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn

195 200 205

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

210 215 220

Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu

225 230 235 240

Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr

245 250 255

Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn

260 265 270

Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe

275 280 285

Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn

290 295 300

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

305 310 315 320

Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys

325 330

<210> 11

<211> 121

<212> PRT

<213> artificial

<220><223> Heavy chain variable region of antibody M1

<400> 11

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

1 5 10 15

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

20 25 30

Gly Met Asn Trp Val Lys Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Lys Trp Met

35 40 45

Gly Trp Ile Asn Thr Asp Ser Gly Glu Pro Thr Tyr Thr Asp Asp Phe

50 55 60

Lys Gly Arg Phe Ala Phe Ser Leu Asp Thr Ser Val Ser Thr Ala Tyr

65 70 75 80

Leu Gln Ile Ser Ser Leu Lys Ala Asp Asp Thr Ala Val Tyr Phe Cys

85 90 95

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

100 105 110

Gln Gly Ser Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 12
<211> 107
<212> PRT
<213> artificial
<220><223> Light chain variable region of antibody M1
<400> 12

Asp Ile Gln Leu Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15
Asp Arg Val Ser Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Asp Val Ser Ser Ala
20 25 30
Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile

35 40 45
Tyr Ser Ala Ser Tyr Arg Tyr Thr Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly
50 55 60
Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80
Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln His Tyr Ser Thr Pro Leu
85 90 95
Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100 105

<210> 13
<211> 121
<212> PRT
<213> artificial
<220><223> Heavy chain variable region of antibody M2
<400> 13

Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Ser Glu Leu Lys Lys Pro Gly Ala
1 5 10 15
Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asn Tyr

20 25 30

Gly Met Asn Trp Val Lys Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Lys Trp Met

35 40 45

Gly Trp Ile Asn Thr Asp Ser Gly Glu Pro Thr Tyr Thr Asp Asp Phe

50 55 60

Lys Gly Arg Phe Ala Phe Ser Leu Asp Thr Ser Val Ser Thr Ala Tyr

65 70 75 80

Leu Gln Ile Ser Ser Leu Lys Ala Asp Asp Thr Ala Val Tyr Phe Cys

85 90 95

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

100 105 110

Gln Gly Ser Leu Val Thr Val Ser Ser

115 120

<210> 14

<211> 107

<212> PRT

<213> artificial

<220><223> Light chain variable region of antibody M2

<400> 14

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

1 5 10 15

Asp Arg Val Ser Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Asp Val Ser Ser Ala

20 25 30

Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile

35 40 45

Tyr Ser Ala Ser Tyr Arg Tyr Thr Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly

50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro

65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln His Tyr Ile Thr Pro Leu

85 90 95

Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys

100 105

<210> 15

<211> 121

<212> PRT

<213> artificial

<220><223> Heavy chain variable region of antibody M3

<400> 15

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

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asn Tyr
20 25 30

Gly Met Asn Trp Val Lys Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Lys Trp Met
35 40 45

Gly Trp Ile Asn Thr Asp Ser Gly Glu Pro Thr Tyr Thr Asp Asp Phe
50 55 60

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

Leu Gln Ile Ser Ser Leu Lys Ala Asp Asp Thr Ala Val Tyr Phe Cys
85 90 95

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

Gln Gly Ser Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 16

<211> 107

<212> PRT

<213> artificial

<220><223> Light chain variable region of antibody M3

<400> 16

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

Asp Arg Val Ser Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Asp Val Ser Ile Ala

20 25 30

Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile

35 40 45

Tyr Ser Ala Ser Tyr Arg Tyr Thr Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly

50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro

65 70 75 80

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

85 90 95

Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys

100 105

<210> 17

<211> 450

<212> PRT

<213> artificial

<220><223> Heavy chain amino acid sequences of Trastuzumab

<400> 17

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

1 5 10 15

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

20 25 30

Tyr Ile His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val

35 40 45

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

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

Ser Arg Trp Gly Gly Asp Gly Phe Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln

100 105 110

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

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

Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser
145 150 155 160

Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val
165 170 175

Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro
180 185 190

Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys
195 200 205

Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp
210 215 220

Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly
225 230 235 240

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

Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu
260 265 270

Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His
275 280 285

Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg
290 295 300

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

Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu
325 330 335

Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr
340 345 350

Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu

355 360 365

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

Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro
435 440 445
Gly Lys
450

<210> 18
<211> 214
<212> PRT
<213> artificial
<220><223> Light chain amino acid sequences of Trastuzumab
<400> 18
Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15
Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Asp Val Asn Thr Ala
20 25 30

Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
35 40 45
Tyr Ser Ala Ser Phe Leu Tyr Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60
Ser Arg Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80
Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln His Tyr Thr Thr Pro Pro
85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala
100 105 110
Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly
115 120 125
Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala
130 135 140
Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln
145 150 155 160

Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser
165 170 175
Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr
180 185 190
Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser
195 200 205
Phe Asn Arg Gly Glu Cys
210

<210> 19
<211> 451
<212> PRT
<213> artificial
<220
><223> Heavy chain amino acid sequences of Sacituzumab
<400> 19
Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Ser Glu Leu Lys Lys Pro Gly Ala
1 5 10 15
Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asn Tyr
20 25 30
Gly Met Asn Trp Val Lys Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Lys Trp Met
35 40 45
Gly Trp Ile Asn Thr Tyr Thr Gly Glu Pro Thr Tyr Thr Asp Asp Phe

50 55 60
Lys Gly Arg Phe Ala Phe Ser Leu Asp Thr Ser Val Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Ile Ser Ser Leu Lys Ala Asp Asp Thr Ala Val Tyr Phe Cys
85 90 95
Ala Arg Gly Gly Phe Gly Ser Ser Tyr Trp Tyr Phe Asp Val Trp Gly
100 105 110
Gln Gly Ser Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser

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

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

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

305 310 315 320
Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile

325 330 335

Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val

340 345 350

Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser

355 360 365

Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu

370 375 380

Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro

385 390 395 400

Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val

405 410 415

Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met

420 425 430

His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser

435 440 445

Pro Gly Lys

450

<210> 20

<211> 214

<212> PRT

<213> artificial

<220><223> Light chain amino acid sequences of Sacituzumab

<400> 20

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

1 5 10 15

Asp Arg Val Ser Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Asp Val Ser Ile Ala

20 25 30

Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile

35 40 45

Tyr Ser Ala Ser Tyr Arg Tyr Thr Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly

50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro

65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln His Tyr Ile Thr Pro Leu

85 90 95

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

100 105 110

Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly

115 120 125

Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala

130 135 140

Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln

145 150 155 160

Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser

165 170 175

Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr

180 185 190

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

195 200 205

Phe Asn Arg Gly Glu Cys

210